

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Medizinische Klinik III – Kardiologie, Angiologie und Nephrologie
Direktor: Prof. Dr. med. A. M. Zeiher

Hormonelle Regulation der QT-Zeit –
Rolle weiblicher Geschlechtshormone unter
physiologischen und pathologischen Bedingungen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Lars Konrad Anneken

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2010

Dekan: Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Joachim Ehrlich
Korreferent: Prof. Dr. med. Rüdiger Hilker
Tag der Disputation: 15.12.2010

Meinen Eltern

Meiner Freundin Andrea

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung	1
1.1 Historischer Hintergrund	1
1.2 Das Lange QT-Syndrom.....	1
1.3 LQTS und Schwangerschaft.....	2
1.4 Ziel der Studie	2
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 EKG und kardiales Aktionspotential	3
2.2 Biophysikalische Eigenschaften von HERG	5
2.3 Östrogene und Gestagene während Menstruationszyklus und Schwangerschaft	6
3 Material und Methoden	8
Gesamtüberblick.....	8
3.1. Klinischer Teil	8
3.1.1 Überblick Klinischer Teil	8
3.1.2 Einwilligung und Ethikvotum.....	9
3.1.3 Untersuchungen in Wilhelmshaven und Lübeck	9
3.1.3.1 Voraussetzungen für die Untersuchung.....	10
Allgemeine Voraussetzungen und Materialien	10
Anforderungen an die Probandinnen.....	11
3.1.3.2 Ablauf der Untersuchung	11
3.1.4 Untersuchungen in der gynäkologischen Abteilung der Universitätsklinik Frankfurt am Main	12
3.1.4.1 Ablauf der Stimulationstherapie	12
Ovarielle Stimulation für zyklusoptimierten Verkehr oder intrauterine Insemination	13
Ovarielle Stimulation für die IVF/ICSI-Therapie	13

3.1.4.2 Ablauf der Untersuchung der nicht Schwangeren und Schwangeren ...	14
3.1.5 Datenverarbeitung	14
3.1.5.1 Bestimmung der Laborwerte.....	14
3.1.5.2 Analyse der EKGs	14
Einzeichnen der QT-Zeit und des RR-Intervalls	15
Computergestützte Datenerfassung und Berechnung der QTc-Zeit.....	15
3.1.6 Statistische Methoden	16
3.1.6.1 Erstellen von Rohwerttabellen in "SPSS" für die Gruppen	16
3.1.6.2 Auswahl der statistischen Methode zur Analyse	17
3.1.6.3 Erstellen einer Tabelle zum Paarvergleich nach Wilcoxon.....	20
3.1.6.4 Überprüfung der Ergebnisse	20
3.2 Experimenteller Teil	23
3.2.1 Überblick experimenteller Teil.....	23
3.2.2 Verwendete Materialien	25
3.2.3 Zellkultivierung und Umsetzung (1. Tag)	25
3.2.4 Transfektion der DNA (2. Tag).....	25
3.2.5 Umsetzung (Splitten) auf Ibidi-Schalen (3. Tag).....	25
3.2.6 Fixation, Blockung und Erstantikörper (4. Tag).....	25
3.2.7 Zweitantikörper und Eindeckung (5. Tag).....	26
3.2.8 Konfokale Mikroskopie	26
4 Ergebnisse.....	28
4.1 Ergebnisse des klinischen Teils	28
4.1.1 Graphische Wiedergabe der Ergebnisse der einzelnen Studienschritte	28
4.1.2 Statistische Analyse der Ergebnisse	36
4.2 Ergebnisse des experimentellen Teils.....	43
5 Diskussion	47

5.1 Wichtige Beobachtungen der vorliegenden Arbeit	47
5.2 Regulation der kardialen Repolarisation durch Geschlechtshormone.....	47
5.3 Einfluss von Geschlechtshormonen auf die QTc-Zeit – klinische Studienlage	49
5.3.1 Patientinnen mit langem QT Syndrom.....	49
5.3.2 Einfluss hoher E2-Konzentrationen auf die QTc-Zeit	51
5.3.3 Verhalten der QTc Zeit während der Schwangerschaft.....	52
5.3.4 Zugrundeliegender zellulärer Mechanismus	52
5.4 Mögliche zelluläre Mechanismen	53
5.5 Schlussfolgerung und klinische Relevanz.....	55
6 Zusammenfassung	56
7 Summary.....	58
8 Literaturverzeichnis	60
9 Abkürzungsverzeichnis	66
10 Anhang.....	68
10.1 Datenbogen klinische Visite.....	68
10.2 Arbeitsanweisung Lübeck	70
10.3 Materialliste	72
10.4 Herstellerliste.....	73
10.5 DNA-Mengen für die Transfektion.....	73
10.6 Substanzliste PBS _s (PH-Wert 7,4).....	73
10.7 Substanzliste Blocklösung.....	74
11 Danksagung	75
12 <i>Curriculum vitae</i>	77
13 Ehrenwörtliche Erklärung.....	78

Abbildung 1: Das EKG	3
Abbildung 2: Das Herzaktionspotential	5
Abbildung 3: Östrogene und Gestagene in Zyklus und Schwangerschaft.....	7
Abbildung 4: Studiendesign Überblick	9
Abbildung 5: Auswertung der EKGs.....	15
Abbildung 6: Formel nach Bazett	16
Abbildung 7: Problematik der Regressionsanalyse	18
Abbildung 8: Interindividuelle QTc-Zeit-Unterschiede.....	19
Abbildung 9: Extremwerte der Regressionsgeraden.....	21
Abbildung 10: Steile Gaußverteilung.....	22
Abbildung 11: Übersicht experimenteller Teil	24
Abbildung 12: Übersicht der Versuchsansätze für die Transfektion	24
Abbildung 13: Korrelation von Kalium, QTc-Zeit und E2.....	28
Abbildung 14: Hormonwerte und QTc-Zeit Wilhelmshaven.	29
Abbildung 15: EKG-Veränderung im Zyklus.....	30
Abbildung 16: Hormonwert- und QTc-Zeit-Veränderung im Zyklus	31
Abbildung 17: Hormonwerte und QTc-Zeit unter Stimulation	32
Abbildung 18: Hormonwerte und QTc-Zeit in der Schwangerschaft.	33
Abbildung 19: EKG-Veränderung in der Schwangerschaft.....	34
Abbildung 20: Hormonwert- und QTc-Zeit-Veränderung in der Schwangerschaft	35
Abbildung 21: Hormonwert- und QTc-Zeit-Veränderung in der Schwangerschaft 2	36
Abbildung 22: Diagramm zum Wilcoxon-Test der klassierten Werte.....	37
Abbildung 23: Konfokale Mikroskopie - ER Funktionalität.....	44
Abbildung 24: Konfokale Mikroskopie - HERG, ER und E2	45
Abbildung 25: Konfokale Mikroskopie - HERG, ER, E2 und Tamoxifen	45
Abbildung 26: Konfokale Mikroskopie - HERG, R752P, ER und E2.....	46

Tabelle 1: Ränge des Wilcoxon-Test der klassierten Hormonwerte	38
Tabelle 2: Statistik zum Wilcoxon-Test der klassierten Hormonwerte	39
Tabelle 3: Steigungswerte und Mittelwerte zum T-Test	40
Tabelle 4: Statistik zum T-Test	41
Tabelle 5: Ränge des Wilcoxon-Test gegen Null	42
Tabelle 6: Statistik des Wilcoxon-Test gegen Null	43

1 Einführung

1.1 Historischer Hintergrund

Geschlechtsunterschiede in der kardialen Repolarisation und der korrigierten QT-Zeit sind seit der Beschreibung von Bazett¹ in den 1920er Jahren bekannt. Gesunde Frauen haben längere QT-Zeiten und werden öfter durch medikamenteninduzierte Arrhythmien betroffen als Männer. Die Geschlechtsunterschiede sind in der Kindheit noch nicht vorhanden und entwickeln sich erst in der Pubertät². Diese Ergebnisse und der Nachweis von Geschlechtshormonrezeptoren im kardiovaskulären System³ deuten auf eine mögliche Rolle von Geschlechtshormonen hin.

1.2 Das Lange QT-Syndrom

Das kongenitale Lange QT-Syndrom (LQTS) ist eine genetisch determinierte Erkrankung, die meist bei strukturell gesundem Herzen auftritt. Neben der angeborenen Form des LQTS kann es auch z. B. durch Einnahme QT verlängernder Medikamente erworben sein⁴. Es handelt es sich bei dem Syndrom um eine namensgebende Verlängerung der QT-Zeit im Elektrokardiogramm (EKG), die mit einem erhöhten Risiko ventrikulärer Rhythmusstörungen einhergeht. Zu Grunde liegt dem LQTS eine Repolarisationsstörung der Herzkammernmuskulatur, die zur Verlängerung der Aktionspotentialdauer führt. Dabei können auftretende Nachdepolarisationen zu einer erneuten Erregung führen und so ventrikuläre Tachyarrhythmien vom Typ der „Torsade-de-pointes“-Tachykardien entstehen⁵. Diese können spontan in Kammerflimmern degenerieren. Klinisch äußert sich dies durch Synkopen oder in Form des plötzlichen Herztodes. Ab einer frequenzkorrigierten QT-Zeit (QTc) > 450 Millisekunden (ms) beim Mann bzw. > 470 ms bei der Frau liegt eine verlängerte QT-Zeit vor⁶.

Bei der erworbenen Form sind neben Medikamentennebenwirkungen auch das Auftreten einer Myokardinsuffizienz und Elektrolytschwankungen für die QT-Zeit-Verlängerung verantwortlich, wobei anzumerken ist, dass auch hier genetische Prädispositionen eine Rolle spielen können⁷.

Das angeborene LQTS, das im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, hat eine Inzidenz von ca. 1:2500^{8,9} Lebendgeburten und tritt meist mit der Pubertät in Erscheinung¹⁰. Aber

auch bei 10 bis 12 % der Fälle von plötzlichem Kindstod wird diese Erkrankung für verantwortlich gehalten¹¹. Bisher sind zwölf Genloci mit dem Auftreten des LQTS assoziiert worden (LQTS1-LQTS12). Nach dem LQTS1 (Häufigkeit ca. 45 %) ist das LQTS2 mit ca. 34 % die zweithäufigste Form¹². Vom LQTS2 sind auch die Genotyp positiven Probandinnen betroffen, die in der vorliegenden Studie betreut wurden. Beim LQTS2 liegen kausale Mutationen im „human ether à go-go related gene“ (*HERG*) vor.

1.3 LQTS und Schwangerschaft

Patientinnen, die vom LQTS betroffen sind, erleiden während einer Schwangerschaft weniger gesundheitsgefährdende Ereignisse (Synkopen, überlebter Herzstillstand oder plötzlicher Herztod) als in der Zeit vor oder nach der Schwangerschaft¹³⁻¹⁷. Besonders hoch ist das Risiko für die Patientinnen in den Monaten nach der Schwangerschaft, also in der Postpartal-Periode. Hier sind LQTS2-Patientinnen besonders gefährdet und weisen im Vergleich zu anderen kongenitalen LQTS-Typen das höchste Risiko auf^{14,16}. Die Ursache dieses Phänomens konnte bis jetzt noch nicht gefunden werden. Spekuliert wird über den Einfluss hämodynamischer Veränderungen¹⁸, den Einfluss von Katecholaminen¹⁹ oder auch eine Rolle von Geschlechtshormonen²⁰⁻²². Letzteres erscheint durch den Zusammenhang mit Schwangerschaft und insbesondere vor dem Hintergrund möglich, dass beide Typen von Östrogenrezeptoren (ER_{α} und ER_{β}) in funktioneller Form in menschlichen Herzmuskelzellen exprimiert werden^{23,24}.

1.4 Ziel der Studie

In dieser Studie sollte die Rolle der Geschlechtshormone (Östrogene und Gestagene) im Hinblick auf die QT-Zeit bei Patientinnen mit LQTS sowie gesunden Probandinnen analysiert werden. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob in diesem Zusammenhang die Höhe der Hormonspiegel eine besondere Bedeutung spielt. Ziel der vorliegenden Studie war, die biologische Ursache zu identifizieren, die für den schützenden Effekt der Schwangerschaft hinsichtlich arrhythmischer Ereignisse bei LQTS2-Patientinnen verantwortlich ist. Nach Identifizierung eines pathophysiologischen Mechanismus könnten zukünftig LQTS-Patientinnen (und gegebenenfalls auch Patientinnen mit erworbenem LQTS) besser vor potentiell tödlichen Arrhythmien geschützt werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 EKG und kardiales Aktionspotential

Die Voraussetzung für jede Kontraktion des Herzmuskels ist die elektrische Erregung (elektromechanische Kopplung). Die Erregungsausbreitung hat physiologischerweise ihren Ursprung im Sinusknoten und wird über das herzeigene Erregungsleitungssystem zum Arbeitsmyokard geleitet. Das EKG ermöglicht die Darstellung des Erregungsablaufes im Herzen durch die Registrierung der Summe der elektrischen Aktivitäten aller Herzmuskelfasern im Zeitverlauf. Es resultiert das typische Bild der elektrischen Herzaktion mit Wellen und Komplexen (Schema in Abb. 1).

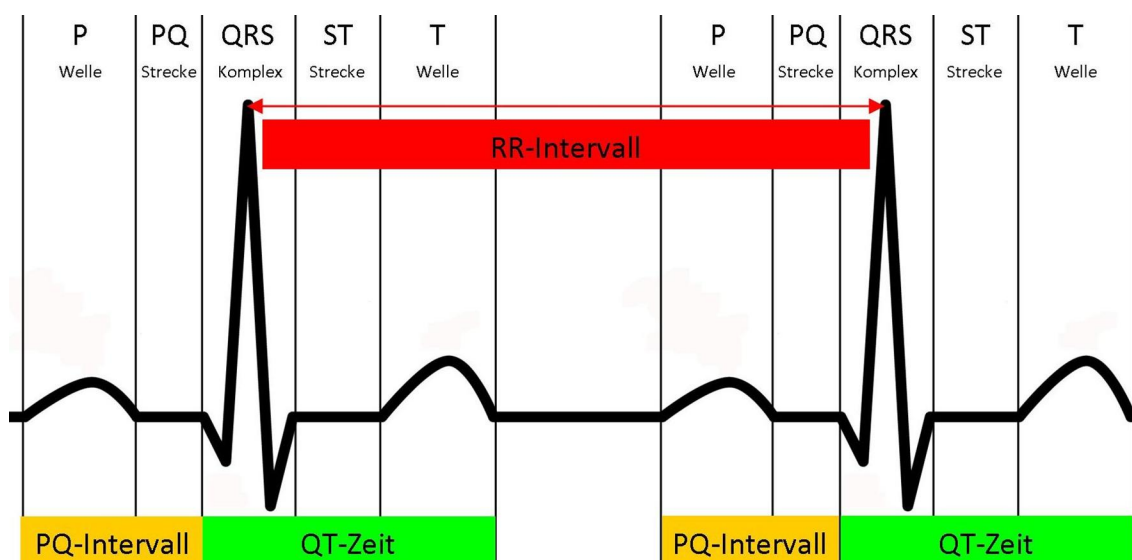


Abbildung 1 zeigt ein stilisiertes EKG. Die P-Welle entspricht der Vorhoferregung, der QRS-Komplex der Kammererregung und die T-Welle der Erregungsrückbildung. Die isoelektrischen Strecken stehen für eine vollkommene Erregung der Vorhöfe (PQ-Strecke) und der Kammern (ST-Strecke). In der isoelektrischen Strecke zwischen T- und P-Welle ist das Herz elektrisch erregbar. Das PQ-Intervall ist Ausdruck der atrioventrikulären Leitungszeit - also vom Erregungsbeginn der Vorhöfe bis zum Erregungsbeginn der Kammern. Die QT-Zeit bezeichnet die gesamte intraventrikuläre Erregungsdauer. Sie verkürzt sich mit zunehmender Herzfrequenz. Das RR-Intervall gibt den zeitlichen Abstand der Herzaktionen wieder und kann zur Berechnung der Herzfrequenz herangezogen werden.

Grundlage der im EKG abgebildeten Summenaktionspotenziale sind die zellulären Aktionspotentiale der Herzmuskelzellen. Das Aktionspotential der Herzmuskelzellen unterscheidet sich von dem der Skelettmuskelzellen durch eine langsamere Repolarisation (insbesondere durch Kalziumeinstrom), wodurch ein mehrere hundert Millisekunden dauerndes Herzaktionspotential entsteht und die elektromechanische Kopplung ermöglicht wird. Das ventrikuläre Herzaktionspotential wird üblicherweise in

fünf Phasen eingeteilt, die mit den Aktivitäten unterschiedlicher Ionenkanäle (und – transportern) korreliert werden können (Abb. 2 A).

In Phase 0 kommt es zur raschen Depolarisation der Zelle, die überwiegend durch eine Aktivierung spannungsabhängiger $\text{Na}_v1.5$ Natriumkanäle hervorgerufen wird. Es kommt zum Einstrom positiv geladener Natrium-Ionen (I_{Na})^{25,26}. Der Depolarisation folgt die Phase 1 des Herzaktionspotentials, eine partielle, frühe Repolarisation („transient outward current“ I_{to}). Hierfür sind die schnell inaktivierenden Auswärtsströme I_{to1} und I_{to2} verantwortlich^{26,27}. Charakteristisch für das ventrikuläre Herzaktionspotential ist vor allem Phase 2, in der es zu einem Plateau kommt. Das Plateau entsteht durch ein Gleichgewicht zwischen dem Kalziumeinstrom $I_{\text{Ca(L)}}$ ^{26,28} durch L-Typ Kalziumkanäle und dem beginnenden Kaliumauswärtsstrom I_{K} . In Phase 3 kommt es zur Beendigung des Aktionspotentials durch Beendigung des Kalziumeinstroms und ein Überwiegen von I_{K} ^{26,29}. Für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials in Phase 4 ist vor allem der auswärts gerichtete Kaliumstrom I_{K1} ^{26,30} verantwortlich. Eine zusammenfassende Übersicht bietet Abb. 2 A^{25,31}.

Der bei Beendigung von Phase 3 wirkende Kaliumstrom I_{K} wird im Wesentlichen durch die Aktivität zweier spannungsabhängiger Kaliumströme, I_{Ks} („slow“) und I_{Kr} („rapid“), vermittelt³². I_{Kr} wird schnell aktiviert (ca. 150 ms nach Depolarisation), während die Aktivierung von I_{Ks} wesentlich länger dauert (ca. 300 ms nach Depolarisation). Beide Ionenströme zusammen bilden eine so genannte "Repolarisationsreserve" und beugen so einem verlängerten Aktionspotential vor³³. Diese Repolarisationsreserve ist wichtig, da sich in Phase 3 ein Großteil der Herzmuskelzellen in einer nur relativen Refraktärphase befinden und somit wieder erregbar sind. Diese Phase wird auch als vulnerable Phase bezeichnet und verläuft im Wesentlichen synchron zur T-Welle im EKG.

I_{Kr} und I_{Ks} sind maßgebend für die Länge des Herzaktionspotentials und schon die Reduktion einer Komponente führt zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer. Im EKG spiegelt sich dies in einer verlängerten QT-Zeit wider und ist durch das klinische Bild und die Risiken des LQTS gekennzeichnet (Abb. 2 B³⁴).

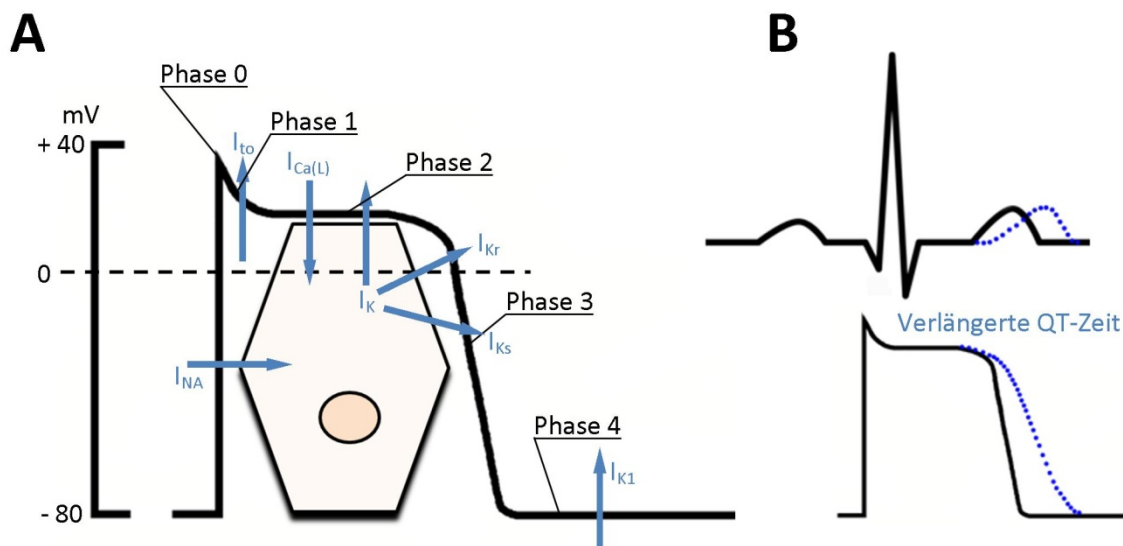


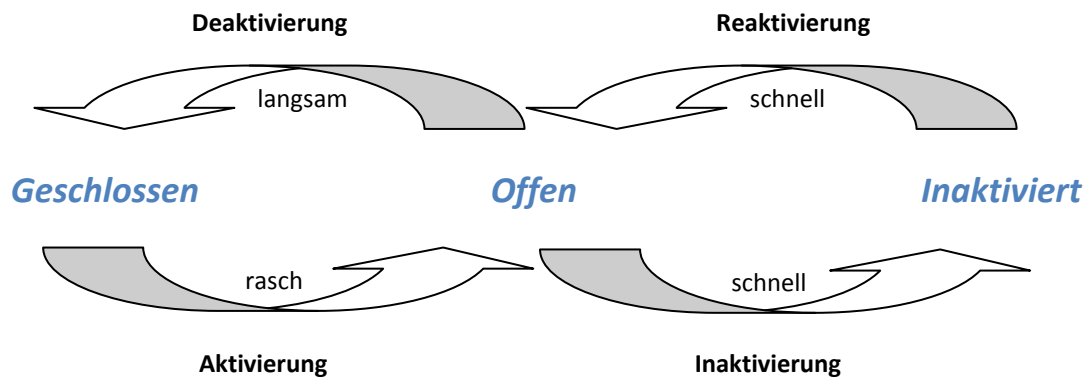
Abbildung 2 A zeigt schematisch die fünf Phasen des ventrikulären Herzaktionspotentials mit den dazugehörigen Ionenströmen (modifiziert nach Whalley 1995²⁵ und Nattel 2006³¹). In B sind die Auswirkungen von einer Störung von HERG (I_{Kr}) auf das EKG und das kardiale Aktionspotential abgebildet (schwarze Linie, physiologischer Zustand, blau gepunktete Linie, pathologischer Zustand). Eine Reduktion von I_{Kr} bewirkt eine verzögerte Repolarisation und somit eine verlängerte QT-Zeit (modifiziert nach Roden, 2002³⁴).

2.2 Biophysikalische Eigenschaften von HERG

Für das LQTS2 sind Mutationen im durch *HERG* kodierten Kaliumkanal verantwortlich, dessen Funktion beim LQTS2 vermindert oder nicht vorhanden ist.

Er gehört zur Familie der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle und vermittelt den schnell repolarisierenden Strom I_{Kr} ³⁵. Der Kanal besteht aus vier identischen α -Untereinheiten (Homotetramer), die jeweils aus sechs transmembranären Domänen bestehen. Die Transmembrandomänen sind für die Porenbildung, die Ionen-Selektivität und die Spannungsabhängigkeit verantwortlich³⁶.

Prinzipiell können die spannungsabhängigen Kaliumkanäle in drei unterschiedlichen Zuständen vorliegen - geschlossen, offen, inaktiviert.



(*HERG*-Kaliumkanal modifiziert nach Roden, 2002³⁴)

Sowohl der geschlossene als auch der offene Zustand sind mit dem inaktivierten Zustand verknüpft sind. Eine Besonderheit des *HERG*-Kaliumkanals ist die im Vergleich zur Aktivierung sehr viel schnellere Inaktivierung³⁷. Es kommt also, anders als bei den meisten anderen Kaliumkanälen, während Depolarisation nur zu einem geringen Auswärtsstrom. Die Erholung (in Phase 3 bei tendenziell negativer werdendem Membranpotential) verläuft bei *HERG* kodiertem I_{Kr} sehr schnell und die anschließende Deaktivierung sehr langsam. Während eines Herzaktionspotentials passiert mit dem *HERG*-Kaliumkanal folgendes:

Nach der Depolarisation (Phase 0) kommt es in Phase 1 zur raschen Aktivierung und schnellen Inaktivierung mit nur geringem Kalium-Auswärtsstrom. In Phase 3 kommt es dann zur zügigen Reaktivierung und nur trägen Deaktivierung und somit zu einem großen Auswärtsstrom³⁸. Kommt es aber zu einem Defekt des Kanals wie z.B. beim LQTS2, nimmt die Stromdichte ab und es können unkontrollierte Erregungen entstehen. Diese äußern sich beim LQTS meist in Form von „Torsade-de-pointes“-Tachykardien⁵.

2.3 Östrogene und Gestagene während Menstruationszyklus und Schwangerschaft

Der weibliche Zyklus beginnt mit dem ersten Tag der Monatsblutung (Menstruation) und endet mit dem ersten Tag der nächsten Blutung. Er wird in zwei Phasen eingeteilt. Die *Proliferationsphase* beginnt mit der Menstruation und endet nach Reifung des Follikels mit dem Eisprung. In der nachfolgenden *Lutealphase* kommt es zur Gelbkörperreifung. Wird das Ei nicht befruchtet, beginnt der nächste Zyklus mit der Menstruation. Die durchschnittliche Länge liegt bei 28 Tagen, wird aber zwischen 25

und 35 Tagen als normal angesehen. Ursache ist ein Zusammenspiel verschiedener Hormone, von denen für diese Studie in erster Linie die Östrogene (Östrogen) und Gestagene (Progesteron) von Bedeutung sind. Von den drei Östrogenen (Östron, Östradiol, Östriol) hat Östradiol (E2) die höchste biologische Wirksamkeit³⁹ und ist auch das wichtigste Östrogen. Im Folgenden werden die Begriffe Östrogen und E2 deshalb synonym verwendet. Eine schematische Darstellung des Hormonverlaufs im Zyklus und während der Schwangerschaft bietet Abb. 3.

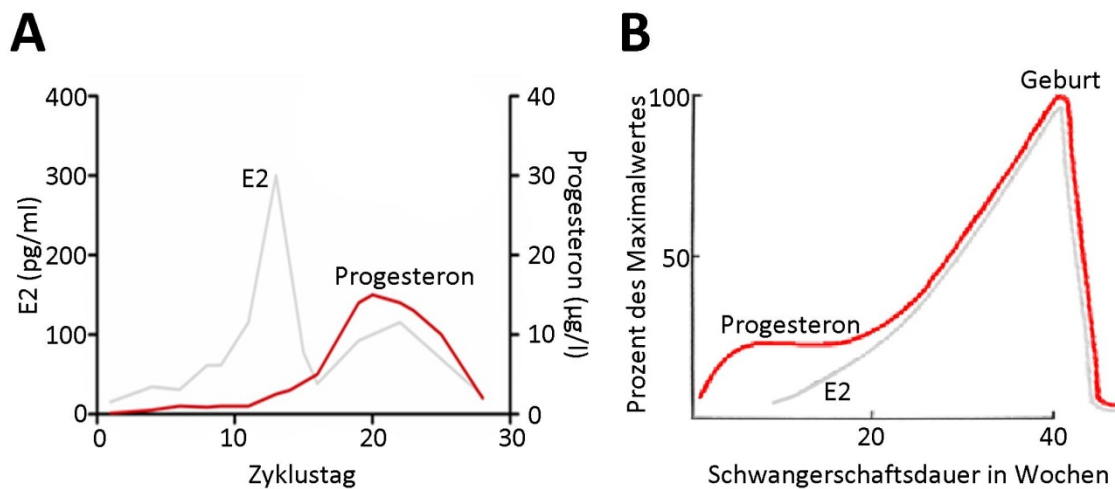


Abbildung 3 A zeigt den Verlauf von E2 und Progesteron im Menstruationszyklus der Frau. Der erste Zyklustag entspricht dem ersten Tag der Menstruation. Zum E2-Spitzenwert kommt es kurz vor der Ovulation (modifiziert nach Windham⁴⁰). B zeigt den Verlauf der Hormone während der Schwangerschaft. Zu beachten ist hier, dass es sich um eine schematische Darstellung des Verlaufs handelt, da große interindividuelle Schwankungen bestehen. Die tatsächlichen Werte für E2 bewegen sich zwischen ca. 1800 und 14000 Pikogramm pro Milliliter (pg/ml) und für Progesteron zwischen 50 und 450 Nanogramm pro Milliliter (ng/ml).

3 Material und Methoden

Gesamtüberblick

Die Studie gliederte sich in drei Teile. In einem ersten klinischen Teil wurden die Auswirkungen von Elektrolyten und Hormonwertschwankungen auf die QTc-Zeit im Oberflächen-EKG dokumentiert. Im zweiten klinischen Teil wurden die Ergebnisse bei gesunden Probandinnen der *in-vitro*-Fertilisations-Sprechstunde verifiziert und in einem dritten, experimentellen Teil wurde die Wirkung von E2 auf den durch *HERG* kodierten Kaliumkanal und dessen Mutante R752P mittels konfokaler Mikroskopie untersucht.

3.1. Klinischer Teil

3.1.1 Überblick Klinischer Teil

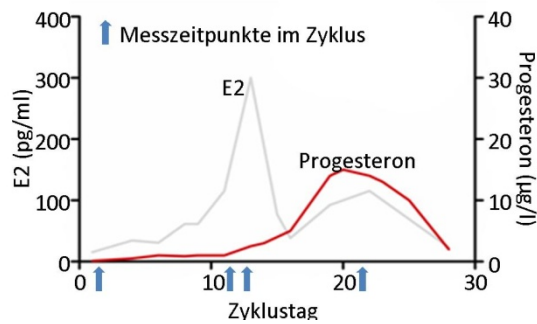
Der klinische Teil der Studie setzte sich aus zwei Teilbereichen zusammen. In Wilhelmshaven und Lübeck wurde bei fünf Patientinnen/Probandinnen aus einer LQTS2-Familie die Auswirkung von Elektrolyten (Natrium, Kalium, Chlorid und Kalzium) und Hormonwertschwankungen (E2, Progesteron und des E2/Progesteron Quotienten) im Menstruationszyklus auf die QT-Zeit untersucht.

In der gynäkologischen Abteilung der Universitätsklinik in Frankfurt am Main wurden bei elf Frauen die QT-Zeiten bei verschiedenen hohen E2-Spiegeln (Basalwerte und Werte unter Stimulation im Rahmen einer Hormontherapie) gemessen. Anschließend wurde bei fünf schwangeren Frauen vor der Schwangerschaft, im ersten Trimenon, im dritten Trimenon und nach der Geburt des Kindes je ein EKG geschrieben und dazu die E2- und Progesteronspiegel bestimmt. Abschließend wurden die erhobenen Daten analysiert und statistisch ausgewertet (Abb. 4).

A Wilhelmshaven und Lübeck

Hier wurde gemessen:

EKG, Hormonwerte und Elektrolyte im Menstruationszyklus bei fünf Familienmitgliedern (drei Genotyp positiv für die *HERG-Mutante* R752P) einer Familie.



B Gynäkologie Frankfurt am Main

Im ersten Teil wurde gemessen:

EKG, Hormonwerte bei stimulierten und niedrigen E2-Werten bei elf gesunden Probandinnen.

Im zweiten Teil wurde gemessen:

EKG und Hormonwerte während der Schwangerschaft bei fünf gesunden Probandinnen.

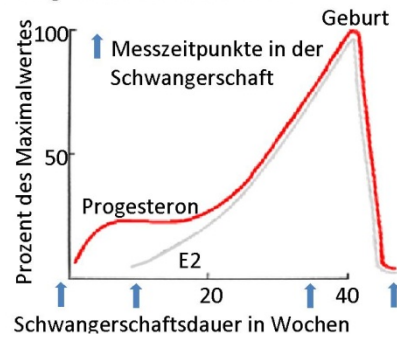


Abbildung 4 zeigt in **A** das Vorgehen in Wilhelmshaven und Lübeck (bei der LQTS2-Familie) sowie schematisch den Hormonverlauf im Menstruationszyklus. In **B** werden das Vorgehen in der gynäkologischen Abteilung der Universitätsklinik in Frankfurt am Main und schematisch der Hormonverlauf während der Schwangerschaft dargestellt.

3.1.2 Einwilligung und Ethikvotum

Alle Probandinnen bzw. Patientinnen wurden über den Ablauf der Studie in mündlicher und schriftlicher Form aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme. Beide klinischen Teile wurden von der Ethikkommission der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter der Geschäftsnummer "70/06" gebilligt.

3.1.3 Untersuchungen in Wilhelmshaven und Lübeck

Unsere Studiengruppe bestand aus fünf Frauen einer LQTS2-Familie im Alter zwischen 19 und 43 Jahren, von denen drei vom LQTS2 betroffen waren; zwei weibliche Familienmitglieder waren Genotyp negativ und dienten als Kontrollgruppe. Bei diesen lag die bisher in der Literatur nicht beschriebene *HERG-Mutante* R752P vor. Familienmitglieder wurden entsprechend in die Untergruppen "Wilhelmshaven Genotyp positiv" und "Wilhelmshaven Genotyp negativ" unterteilt. Vier dieser Frauen lebten in Wilhelmshaven und wurden von mir persönlich während eines zweimonatigen Aufenthalts in Wilhelmshaven betreut. Das fünfte Familienmitglied lebte in Lübeck. Hier übernahm Herr Priv.-Doz. Dr. med. Hendrik Bonnemeier vom Universitätsklinikum Lübeck die Betreuung mittels eines standardisierten Ablaufs der Untersuchungen und Dokumentation in Visitenbögen (siehe Anhang 10.1) sowie einer

detaillierten Arbeitsanweisung (siehe Anhang 10.2). Bei diesen fünf Frauen wurde zu festgelegten Zeitpunkten im Menstruationszyklus ein EKG geschrieben und eine Blutprobe zur Elektrolyt-, E2- und Progesteronwert-Bestimmung entnommen.

3.1.3.1 Voraussetzungen für die Untersuchung

Allgemeine Voraussetzungen und Materialien

Die Untersuchungs-Zeitpunkte im Menstruationszyklus sollten niedrige E2-Werte zu Zyklusbeginn, hohe E2-Werte um die Zyklusmitte (wenn möglich inklusive E2-Spitzenwert) und gegen Zyklusende erfassen. Um die Durchführbarkeit zu gewährleisten, wurde den Probandinnen ein Zeitfenster von jeweils zwei Tagen zur Auswahl gestellt. Es wurden so folgende Untersuchungszeitpunkte bestimmt:

Erster Termin: zweiter/dritter Zyklustag,

zweiter Termin: zehnter/elfter Zyklustag,

dritter Termin: zwölfter/dreizehnter Zyklustag,

vierter Termin: 21./22. Zyklustag.

Das Material zur Blutentnahme wurde aus der Universitätsklinik in Frankfurt am Main mitgebracht. Verwendet wurden für alle Blutentnahmen Monovetten und Butterflys der Firma Sarstedt (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland): Sarstedt S-Monovette Neutral (9 ml) zur Hormonwertbestimmung, Sarstedt S-Monovette Kalium-EDTA (2,7 ml) zur genetischen Diagnostik und die Sarstedt Multifly-Kanülen zur Blutentnahme. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die gleichen Untersuchungsmaterialien in Wilhelmshaven, Lübeck und im gynäkologischen Teil an der Universitätsklinik in Frankfurt am Main verwendet wurden. Die Elektrolytbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Blutgasanalyse (BGA)-Gerätes aus einer venösen Blutprobe (Messung jeweils vor Ort ohne Beeinflussung durch Probentransport). In Wilhelmshaven wurde das Rapid Point 405 von Bayer Health Care (Diagnostics Division, Tarrytown, N. Y., USA) und in Lübeck das Radiometer ABL 700 (Radiometer America Inc., USA and Canada) verwendet. Die E2- und Progesteronwert-Bestimmung erfolgte im Hormonlabor der Universitätsklinik in Frankfurt am Main.

Der Transport der Blutproben geschah durch TNT Express, sodass die Blutproben innerhalb von 24 Stunden in der Universitätsklinik in Frankfurt bearbeitet werden konnten. War es terminlich nicht möglich, eine Blutprobe am nächsten Morgen in der Universitätsklinik in Frankfurt zu bearbeiten, wurde diese zentrifugiert, bei 4° C gelagert und zum nächstmöglichen Termin verschickt. Die Proben wurden zehn Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand abgenommen. In Wilhelmshaven wurde eine Megafuge 1.0 (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) und in Lübeck eine EBA 20 (Hettich AG, Bäch, Schweiz) verwendet.

Pro Termin wurden zwei 12-Kanal-EKGs geschrieben, eines mit einem Vorschub von 50 Millimeter pro Sekunde (mm/s) und ein zweites mit 25 mm/s. Folgende EKG-Geräte wurde verwendet: Schiller AT-2 plus (Schiller Medizintechnik GMBH, Ottobrunn, Deutschland), Welch Allyn CP 200 (Welch Allyn GmbH & Co. KG, Jungingen, Deutschland), Schwarzer Cardioscript CD 6000 (Schwarzer-Picker, München, Deutschland) und ein custo cardio 100 (custo med GmbH, Ottobrunn, Deutschland).

Zum Sicherstellen der Vollständigkeit der Datenerfassung, wurde ein zweiseitiger Visitenbogen (siehe Anhang 10.1) ausgefüllt.

Anforderungen an die Probandinnen

Voraussetzung für die Teilnahme war ein regelmäßiger Menstruationszyklus und der Verzicht auf eine hormonelle Kontrazeption beginnend drei Monate vor Beginn bis zum Ende der Studie. Zudem war wichtig, die im Visitenbogen (siehe Anhang 10.1) vorgegebenen Zeitpunkte einzuhalten. Zusätzlich sollte auf die Einnahme von Medikamenten verzichtet werden. Ausnahme waren die Betablocker der Genotyp positiven Probandinnen, die zur Vermeidung von Arrhythmien weiter eingenommen wurden. Alle Patientinnen wurden über das Risiko einer Schwangerschaft aufgeklärt und unterschrieben eine entsprechende Patienteninformation mit Einwilligungserklärung.

3.1.3.2 Ablauf der Untersuchung

Begrüßung ⇔ *Besonderheiten* ⇔ *EKGs* ⇔ *Blutentnahme* ⇔ *nächster Termin*

Nach der *Begrüßung* wurde nach eventuellen *Besonderheiten* wie z. B. die Einnahme von Medikamenten gefragt. Es folgte das Anlegen eines 12-Kanal-EKGs. Dieses wurde immer im Liegen bei entkleidetem Oberkörper durchgeführt. Anschließend wurde *Blut* zur Bestimmung der E2- und Progesteronwerte und für eine venöse BGA abgenommen. Die venöse BGA wurde direkt an dem entsprechenden BGA-Gerät ausgewertet. Abschließend wurde die Patientin noch einmal auf den *nächsten Termin* hingewiesen.

3.1.4 Untersuchungen in der gynäkologischen Abteilung der Universitätsklinik Frankfurt am Main

Diese Studiengruppe bestand aus sechzehn Frauen im Alter zwischen 22 und 42 Jahren. Die Patientinnen, die an der Studie teilnahmen, wurden aus der "Kinderwunschsprechstunde" des Schwerpunkts Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main rekrutiert. Diese Studiengruppe wurde in zwei Untergruppen aufgeteilt.

In der ersten Untergruppe (Gynäkologie FFM nicht Schwanger) befanden sich elf gesunde Frauen im Alter zwischen 26 und 42 Jahren. Bei diesen wurden zum Zeitpunkt eines zyklusbedingt niedrigen E2-Spiegels und zum Zeitpunkt der E2-Stimulation jeweils ein EKG geschrieben und der E2- und Progesteronwert bestimmt. Diese Frauen wurden wegen Infertilität behandelt und auch unter Therapie konnte keine Schwangerschaft induziert werden.

In der zweiten Untergruppe (Gynäkologie FFM Schwanger) befanden sich fünf Frauen im Alter zwischen 22 und 33 Jahren, die mit Hilfe der Stimulationstherapie schwanger wurden. Zusätzlich zu den beiden oben genannten Untersuchungen wurden diese auch während der Schwangerschaft weiter betreut. Es wurde jeweils im ersten Trimenon, im dritten Trimenon und vier bis sechs Wochen postpartal ein EKG geschrieben und der dazugehörige E2- und Progesteronwert bestimmt.

3.1.4.1 Ablauf der Stimulationstherapie

In Abhängigkeit der Sterilitätsursache wurde bei den Patientinnen eine ovarielle Stimulation zur Ovulationsinduktion durchgeführt. Das Ausmaß der Stimulation richtete sich nach der angestrebten Therapiemaßnahme. So erhielten Patientinnen, die

eine intrauterine Insemination erhalten sollten oder lediglich zyklusoptimierten Verkehr praktizierten, eine niedrig dosierte Stimulationsbehandlung (siehe unten), während Patientinnen, bei denen eine künstliche Befruchtung durchgeführt wurde, hoch dosiert stimuliert wurden (siehe unten). Als Methode bei der künstlichen Befruchtung wurde die *In-vitro*-Fertilisation (IVF) oder die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) angewendet.

Ovarielle Stimulation für zyklusoptimierten Verkehr oder intrauterine Insemination

Die ovarielle Stimulation für zyklusoptimierten Verkehr oder intrauterine Inseminationen erfolgte durch die Gabe von 25-50 Milligramm (mg) Clomifencitrat an den Zyklustagen drei bis sieben. Ab dem zehnten Zyklustag wurde eine Zyklusüberwachung mittels Ultraschalluntersuchung der Follikelanzahl und -größe in beiden Ovarien sowie der Endometriumdicke durchgeführt. Zusätzlich wurden die Spiegel für Luteinisierendes Hormon (LH), E2 und Progesteron gemessen. In Abhängigkeit der ovariellen Reaktion wurden die Patientinnen nach wenigen Tagen erneut einbestellt, bis die Ovulation durch subkutane Gabe von humanem Choriongonadotropin (hCG; Ovitrelle®; Serono GmbH, Darmstadt, Deutschland) ausgelöst werden konnte. Bei Clomifencitrat-Resistenz erfolgte die ovarielle Stimulation durch tägliche subkutane Injektionen von rekombinantem follikelstimulierendem Hormon. Die Zyklusüberwachung verlief wie oben beschrieben.

Ovarielle Stimulation für die IVF/ICSI-Therapie

Patientinnen, die sich einer künstlichen Befruchtung unterzogen, wurden hoch dosiert mit Gonadotropinen im so genannten "langen Protokoll" stimuliert. Nach Herabregulation der Rezeptoren mit einem „Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analogon“ ab dem 20. Zyklustag des Vorzyklus begann die Gonadotropinbehandlung nach Einsetzen der folgenden Menstruationsblutung. Die durchschnittliche Stimulationsdauer betrug elf Tage und die Ovulationsauslösung erfolgte ab einer Follikelgröße von achtzehn Millimetern. Die Follikelpunktion wurde 34 Stunden nach hCG-Gabe durchgeführt. Während der Lutealphase erhielten die Patientinnen 90 mg Progesteron intravaginal.

3.1.4.2 Ablauf der Untersuchung der nicht Schwangeren und Schwangeren

Das Vorgehen entsprach dem bei den Probandinnen in Wilhelmshaven und Lübeck. Es wurde aber auf eine Genotypisierung und die Bestimmung der Elektrolyte verzichtet (ersteres, weil normale QT-Zeiten vorlagen und die kardiale und Familien-Anamnese leer waren und letzteres, weil in den Analysen in Wilhelmshaven kein unabhängiger Einfluss der im physiologischen Bereich liegenden Elektrolyte gezeigt werden konnte). Es wurden ebenfalls Blutentnahmeröhrchen und Butterflies der Firma Sarstedt (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Die Hormonwertbestimmung erfolgte auch hier im Hormonlabor der Universitätsklinik in Frankfurt am Main. Als EKG Gerät kam ein MAC 5000 der Firma GE (Marquette) (GE, München, Deutschland) zum Einsatz.

3.1.5 Datenverarbeitung

3.1.5.1 Bestimmung der Laborwerte

Die Auswertung aller Blutproben erfolgte im Zentrallabor der Universitätsklinik in Frankfurt am Main. Einzige Ausnahme war die Elektrolytbestimmung der Probandinnen aus Wilhelmshaven und Lübeck, die direkt mittels eines BGA-Gerätes erfolgte. So konnten die Auswirkungen einer eventuellen Hämolyse durch den langen Transport vermieden werden.

3.1.5.2 Analyse der EKGs

Alle EKGs wurden nach demselben Schema in zwei Schritten analysiert. Zur Bestimmung der QT-Zeit wurde bei einer Schreibgeschwindigkeit von 50 mm/s die Ableitung (Abl.) II nach Einthoven und Abl. V5 nach Wilson herangezogen. Dieses Vorgehen entspricht den Vorgaben des Internationalen LQTS-Registers zur Erfassung von Patienten mit LQTS⁴¹ und eignet sich zur Bestimmung der QT-Zeit^{42,43}. Entscheidend bei der Auswertung der QT-Zeit ist die Bestimmung des Endpunkts der T-Welle, welcher durch Anlegen einer Tangente an die T-Welle an dem Kreuzpunkt mit der isoelektrischen Linie ermittelt wurde⁴⁴ (siehe auch Abb. 5). Da es zwischen den einzelnen Herzaktionen zu QTc-Zeit-Unterschieden kommen kann⁴⁵, wurde zur genaueren Bestimmung der QT-Zeit für Abl. II der Mittelwert aus drei Messungen gebildet. Ableitung V5 wurde nur einfach gemessen und diente zur Gegenkontrolle bei den statistischen Tests.

Es gibt eine Vielzahl an Korrekturformeln zur Frequenzkorrektur der QT-Zeit⁴⁶⁻⁴⁹. Wir verwendeten die am weitesten verbreitete Formel nach Bazett¹, die für unser Vorhaben angemessen erscheint⁵⁰. Diese Formel arbeitet nicht linear und sollte nur zwischen Herzfrequenzen von 60 bis 100 Schlägen pro Minute angewendet werden. Bei langsameren Herzfrequenzen kommt es zu einer Unterkorrektur, bei schnelleren Herzfrequenzen zu einer Überkorrektur^{42,51}. Ein Verfahren mit individuell angepasster Korrektur wie es Malik *et al.* vorschlagen⁵² wäre zwar wünschenswert und würde die Fehlerwahrscheinlichkeit eindämmen, kam aber unter Abwägung des Nutzens gegen den beträchtlichen technischen Aufwands (320 EKGs, alle zwölf Ableitungen, zwei Gutachter) nicht in Frage.

Einzeichnen der QT-Zeit und des RR-Intervalls

Im ersten Schritt wurden die QT-Zeiten und RR-Intervalle in die EKGs eingezeichnet. Es wurde in Abl. II nach Einthoven nach drei gut erkennbaren T-Wellen gesucht. Im absteigenden Schenkel der T-Wellen wurde jeweils eine Tangente eingezeichnet. Anschließend wurde der Schnittpunkt der Tangente mit der Nulllinie (isoelektrische Linie) des EKGs markiert. Auch der Beginn der Q-Zacke wurde markiert. Die RR-Intervalle wurden mit Hilfe eines Geodreiecks so gekennzeichnet, dass eine gedachte Verbindungslinie zwischen den Markierungen parallel zur Nulllinie verlaufen würde. Analog wurde auch in Abl. V5 nach Wilson verfahren (Abb. 5).

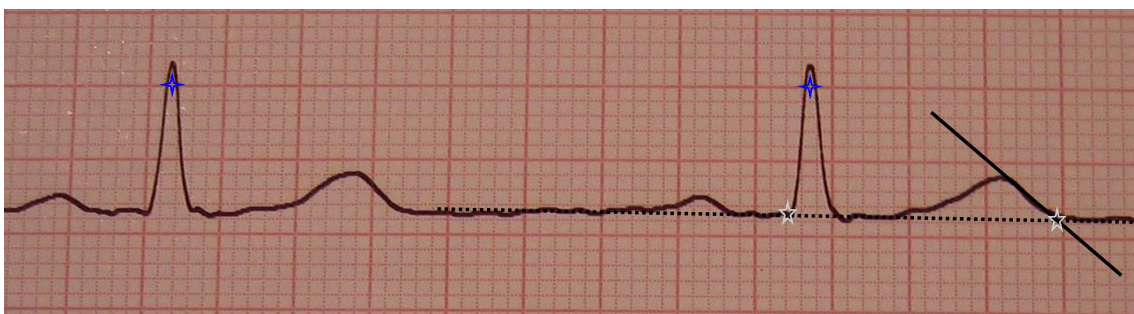


Abbildung 5 illustriert mit den grauen Sternen (★) die QT-Zeit und mit den blauen Sternen (+) das RR-Intervall. Die gepunktete Gerade entspricht der isoelektrischen Nulllinie und die durchgezogene Gerade entspricht der Tangente der T-Welle. Es handelt sich um ein EKG einer Studienpatientin mit einem Vorschub von 50 mm/s.

Computergestützte Datenerfassung und Berechnung der QTc-Zeit

In einem zweiten Schritt wurde computergestützt gemessen. Es wurde immer das RR-Intervall direkt vor der zu messenden QT-Zeit ermittelt. Gemessen wurde in Abl. II nach Einthoven und in Abl. V5 nach Wilson. In Abl. II nach Einthoven wurden jeweils drei RR-Intervalle mit nachfolgenden QT-Zeiten pro EKG bestimmt. Die Bestimmung

erfolgte mit Hilfe eines „Klickboards“ (Digitizer KD 3200, Graphtec Corporation, Yokohama, Japan), das an einen Computer angeschlossen war. Es wurde jeweils das RR-Intervall und die QT-Zeit in Millisekunden gemessen und auf eine bereitgelegte Tabelle übertragen. Anschließend wurden die erhobenen QT-Zeiten mit Hilfe des Statistikprogramms "SPSS® 16 für Windows®" (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, Illinois, USA) und der Formel nach Bazett korrigiert (Abb. 6).

$$QTc = \frac{\overline{QT} (ms)}{\sqrt{RR} (sec)}$$

Abbildung 6 zeigt die Formel nach Bazett ¹.

3.1.6 Statistische Methoden

Die gesamte Statistik in diesem Dokument wurde nach Rücksprache mit Herrn Dr. Hanns Ackermann (Zentrum der Medizinischen Informatik) erarbeitet und durchgeführt.

3.1.6.1 Erstellen von Rohwerttabellen in "SPSS" für die Gruppen

Es wurden folgende Rohwerttabellen in dem Statistikprogramm "SPSS" erstellt:

Wilhelmshaven Genotyp positiv (WH positiv)

Wilhelmshaven Genotyp negativ (WH negativ)

Gynäkologie FFM nicht Schwanger (Gyn FFM nicht S.)

Gynäkologie FFM Schwanger (Gyn FFM Schwanger)

Hier wurden alle Rohwerte eingetragen und die QTc-Zeiten nach Bazett berechnet. Diese Tabellen wurden erstellt, um ein Backup aller Daten zu gewährleisten und einen schnelleren Zugriff auf bestimmte Probandinnen zu ermöglichen. Zunächst wurde bei den Probandinnen aus Wilhelmshaven ein möglicher Einfluss der normwertigen Elektrolyte (Natrium, Kalium, Chlorid und Kalzium) auf die QTc-Zeit und die Hormonwerte untersucht, um einen elektrolyt-unabhängigen Effekt der Hormonwerte

untersuchen zu können. Hier wurden die gleichen statistischen Methoden wie später bei der Auswertung der Hormonwerte für alle Probandinnen (siehe unten) verwendet.

3.1.6.2 Auswahl der statistischen Methode zur Analyse

Es wurde eine Gesamttabelle erstellt, in der alle relevanten Daten zusammengefasst wurden. Zunächst wurde mittels einer Regressionsanalyse nach einem linearen Zusammenhang zwischen der QTc-Zeit in Abl. II und den Hormonwerten (E2, Progesteron sowie dem E2/Progesteron Quotienten) gesucht. Dies gestaltete sich aber aus statistischer Sicht schwierig.

Um die Problematik der Analyse zu erläutern, wird hier stellvertretend für die Hormonwerte der E2-Wert verwendet.

Die Gesamtregression für den Zusammenhang zwischen E2 und QTc-Zeit zeigte mit $p = 0,020491$ ein, auf dem Niveau $\alpha \leq 0,05$, signifikantes Ergebnis (siehe "Anpassungslinie für Gesamtsumme" in Abb. 7). Dieses Ergebnis ist zu hinterfragen weil nicht die verlängerte QTc-Zeit (bei relativ niedrigen Hormonspiegeln) der Genotyp positiven Probandinnen aus Wilhelmshaven berücksichtigt wurde.

Als nächstes wurde versucht, die Regressionsanalyse nach den Rohwertgruppen durchzuführen. Aber auch hier ergaben sich Schwierigkeiten. Die Problematik der Regressionsanalyse lässt sich am besten mit einem Diagramm verdeutlichen (Abb. 7).

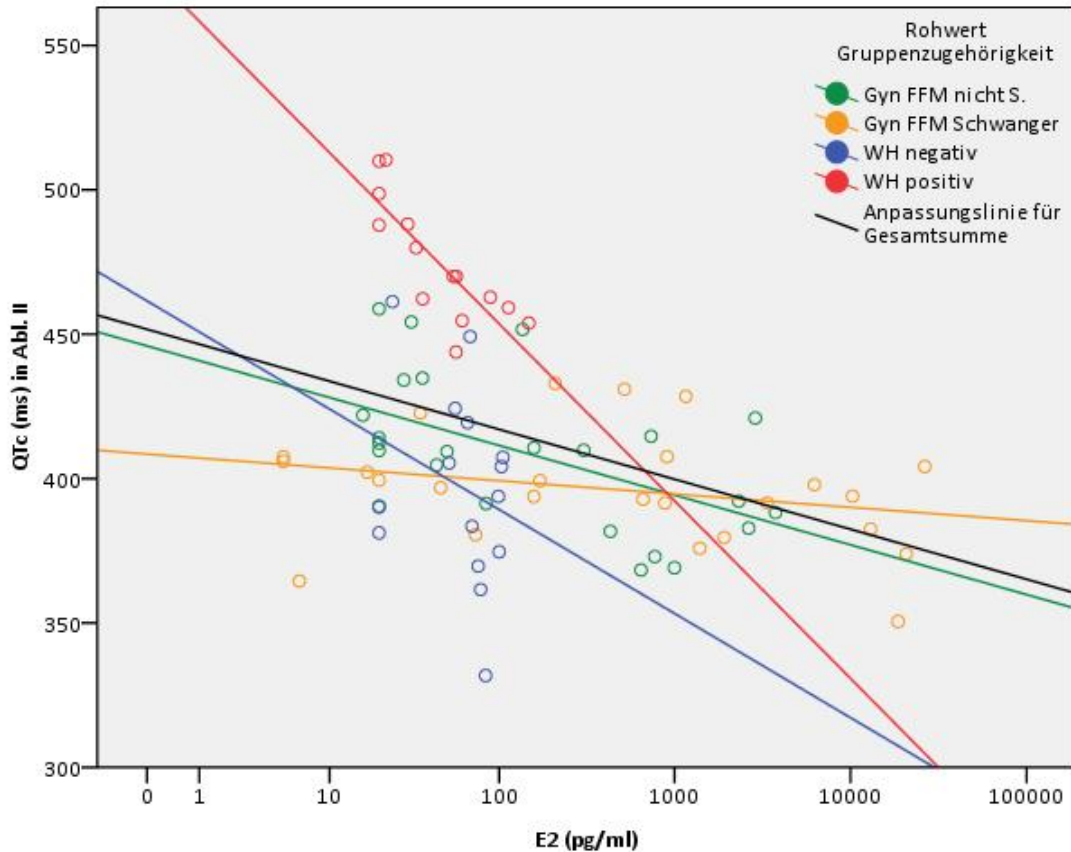


Abbildung 7 zeigt die Werte nach Rohwertgruppen getrennt in einem Streudiagramm aufgetragen. Für die jeweiligen Gruppen wurde eine Regressionsgerade eingefügt. Die schwarze Linie stellt die Anpassungslinie für das Gesamtkollektiv da. Die QTc-Zeiten der Genotyp positiven Probandinnen aus Wilhelmshaven sind länger als die der anderen Gruppen. Es sind die hohen E2-Werte unter Stimulation bei den nicht Schwangeren sowie die sehr hohen E2-Werte während der Schwangerschaft zu erkennen. Um diese in einer Abb. darstellen zu können, wurde eine logarithmische Skalierung verwendet. Die QTc-Zeiten sind Mittelwerte aus drei Messungen.

Obwohl alle Geraden eine negative Steigung haben (das bedeutet, dass sich bei steigendem E2-Wert die QTc-Zeit verkürzt), lässt sich hier das Problem der Regressionsanalyse erkennen. Es liegt eine sehr große Streuung der QTc-Zeiten vor. Bei einem E2-Wert von 25 pg/ml schwanken die QTc-Zeiten zwischen 340 ms und 510 ms. Dass aber von einem Zusammenhang ausgegangen werden kann, verdeutlicht Abb. 8.

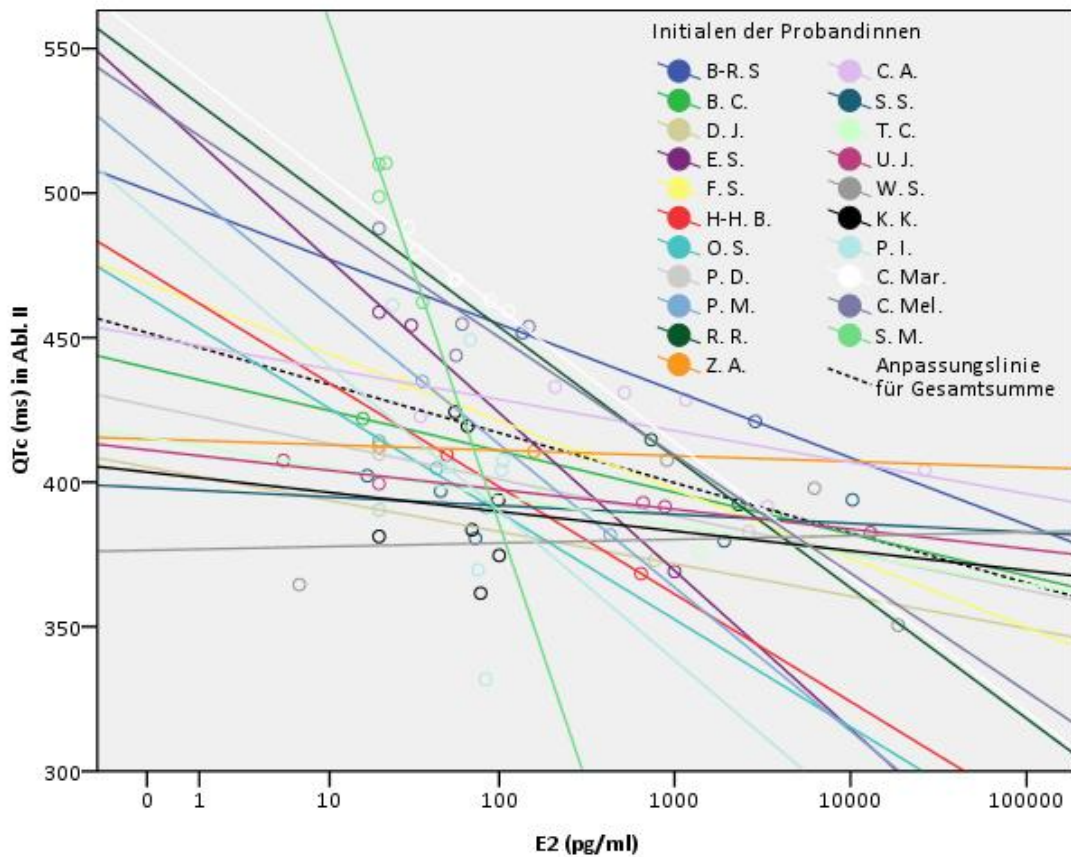


Abbildung 8 zeigt die Daten nach Probandinnen getrennt (farbkodiert) aufgetragen. Für alle Probandinnen wurde jeweils eine individuelle Regressionsgerade eingezeichnet. Die Steigungen der Regressionsgeraden sind negativ. Auffällig ist auch die stark negative Steigung von Frau S.M. (Steigungsgerade in hellgrün) sowie die fast horizontale Steigung bei Frau Z.A. (orange). Die QTc-Zeiten sind Mittelwerte aus drei Messungen und auch hier wurden die E2-Werte logarithmisch skaliert dargestellt.

Wenn man sich die QTc-Zeit-Veränderung jeder Probandin einzeln anschaut, ergibt sich das in Abb. 8 dargestellte Bild. Ein steigender E2-Wert führt zu einer sinkenden QTc-Zeit (die Steigung der Geraden ist negativ). Jedoch ist hier keine Linearität gegeben, da sich die QTc Zeit bei stark erhöhten E2-Werten (im Rahmen der Schwangerschaft) nicht gegen Null verkürzt.

Man müsste die Regressionsanalyse für jede Probandin einzeln durchführen um ihre individuellen QTc-Zeiten zu berücksichtigen und so obige Aussage statistisch zu beweisen. Dazu müssten von den einzelnen Probandinnen wesentlich mehr Werte bestimmt werden. Der Aufwand einer solchen Studie wäre entsprechend beträchtlich.

Um das Problem der interindividuellen QTc-Zeit-Unterschiede zu lösen und um die verschiedenen Gruppen vergleichbar zu machen, wurde als statistisches Verfahren der Paarvergleich nach Wilcoxon gewählt (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Hier wird das

Verhalten einer Variablen (in unserem Fall die QTc-Zeit) zu zwei verschiedenen Zeitpunkten bzw. Bedingungen (z.B. niedriger *versus* hoher Hormonwert) getestet.

3.1.6.3 Erstellen einer Tabelle zum Paarvergleich nach Wilcoxon

Voraussetzung für den Paarvergleich ist das Vorhandensein von vergleichbaren Wertepaaren. Um diese Grundlage zu schaffen, wurde zunächst je Probandin eine Klassierung mit einem Trennwert für die individuellen Hormonwerte (E2, Progesteron und E2/Progesteron Quotient) durchgeführt. Die Hormonwerte der Probandinnen wurden in hohe und niedrige unterteilt. Die Trennwerte wurden entsprechend des Medians der Messwerte festgelegt. Die QTc-Zeiten waren nun keinen tatsächlichen Hormonwerten mehr zugeordnet, sondern jeweils niedrigen bzw. hohen Hormonwerten (klassierten Hormonwerten). Anschließend war es möglich, einen Mittelwert der QTc-Zeiten (aus Abl. II und zum Vergleich auch aus Abl. V5) für jede Probandin zum zugehörigen klassierten Hormonwert zu erstellen.

Dieser Paarvergleich testet den Zusammenhang zwischen der Änderung des Hormonwertes und der QTc-Zeit. Der Wilcoxon-Test untersucht diesen Zusammenhang für jede Probandin einzeln und wurde mit berechneten QTc-Zeit-Mittelwerten durchgeführt. Dadurch war es möglich, eine gruppenübergreifende Auswertung der Ergebnisse vorzunehmen. Als Wertepaar wurde bei dem Test die gemittelte QTc-Zeit bei niedrigem und die gemittelte QTc-Zeit bei hohem Hormonwert verwendet. Wie oben bereits erwähnt, wurde das gleiche Verfahren auch für die Abl. V5 durchgeführt.

3.1.6.4 Überprüfung der Ergebnisse

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde der Einstichproben t-Test (im folgenden Text als t-Test bezeichnet) verwandt.

Die Nullhypothese besagte, dass eine Änderung des Hormonwertes *keine* Änderung der QTc-Zeit zur Folge hat. Dies entspräche einer mittleren Steigung (aller Regressionsgeraden) von Null. In der Folge wurde die Steigung der Regressionsgeraden jeder einzelnen Probandin bestimmt und getestet, ob diese normalverteilt waren (Voraussetzung für den t-Test). Dazu wurde zunächst eine Regressionsanalyse für jede einzelne Probandin durchgeführt. Es wurde jeweils der Hormonwert als unabhängige Variable und die QTc-Zeit als abhängige Variable definiert. Der errechnete B-Wert entspricht hierbei der Steigung der Regressionsgeraden. Anschließend wurde eine

weitere Tabelle zur Anwendung des t-Tests erstellt. Dieses Verfahren wurde auf Messwerte von beiden Ableitungen (II und V5) angewendet.

Beim Steigungsvergleich des t-Tests fließt auch die Größe der Hormonwert-Änderung mit ein. Daher war es notwendig, Frau S. M. für diesen Test auszuschließen. Sie hatte während ihres Zyklus nur eine sehr geringe E2- (20 bis 36 pg/ml) und Progesteronwert-Schwankung (0,59 bis 0,97 ng/ml). Ihre Hormonwerte sind als prämenopausal anzusehen und entsprechen nicht mehr denen eines physiologischen Zyklus. Weiterhin wurde der entsprechende Steigungswert als Extremwert identifiziert (signifikanter Grubbs-Test) und gehörte so nicht zu der an sich homogenen Stichprobe (Abb. 8 und 9).

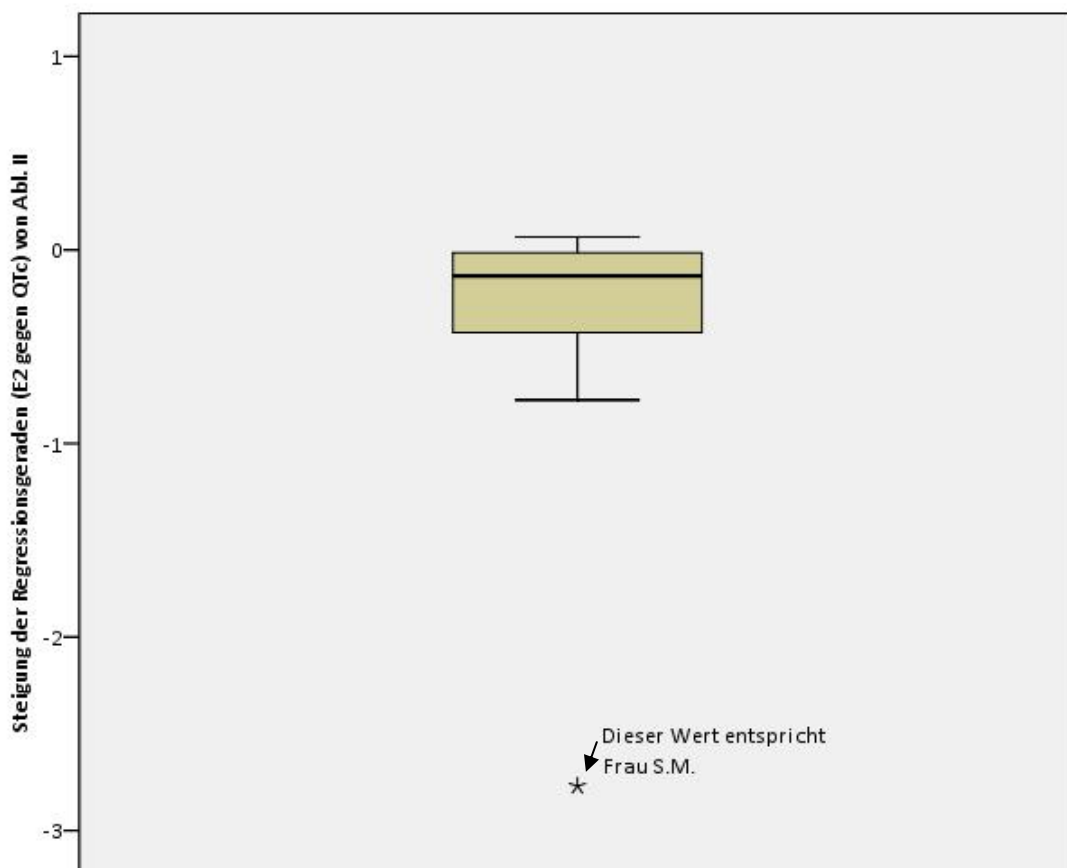


Abbildung 9 zeigt die Steigung der Regressionsgeraden aller Probandinnen aus der Regressionsanalyse von E2 (als unabhängige Variable) und QTc-Zeit (als abhängige Variable) aufgetragen. Der Steigungswert von Frau S. M. ist deutlich als Extremwert (mehr als drei Boxenlängen unter dem 25 %-Perzentil) zu erkennen.

Beim Wilcoxon-Test geht es ausschließlich um eine Zeitdifferenz (zum Zeitpunkt eines hohen und eines niedrigen E2- und Progesteronspiegels bzw. E2/Progesteron Quotienten). Es wird also nur zwischen einem positiven oder negativen Rang unterschieden. Daher war es vorher nicht notwendig, Frau S. M. auszuschließen (keine

Anfälligkeit für Extremwerte). Mit dem Steigungvergleich haben wir eine Standardisierung im Sinne von "Veränderung der QTc-Zeit pro Einheit von E2" eingeführt, was angesichts der heterogenen E2-Werte sinnvoll erschien.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den Steigungswerten um normalverteilte Werte handelt, wurde mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Lilliefors-Tests und des Shapiro-Wilk-Tests eine explorative Datenanalyse durchgeführt und die Nullhypothese, dass *keine* Normalverteilung der Werte vorliegt, auf dem Niveau $\alpha \leq 0,05$ angenommen. Bei graphischer Auftragung der Steigungswerte, fällt auf, dass anscheinend eine sehr steile Gaußverteilung vorliegt und die Werte nicht offensichtlich schief verteilt sind (Abb. 10).

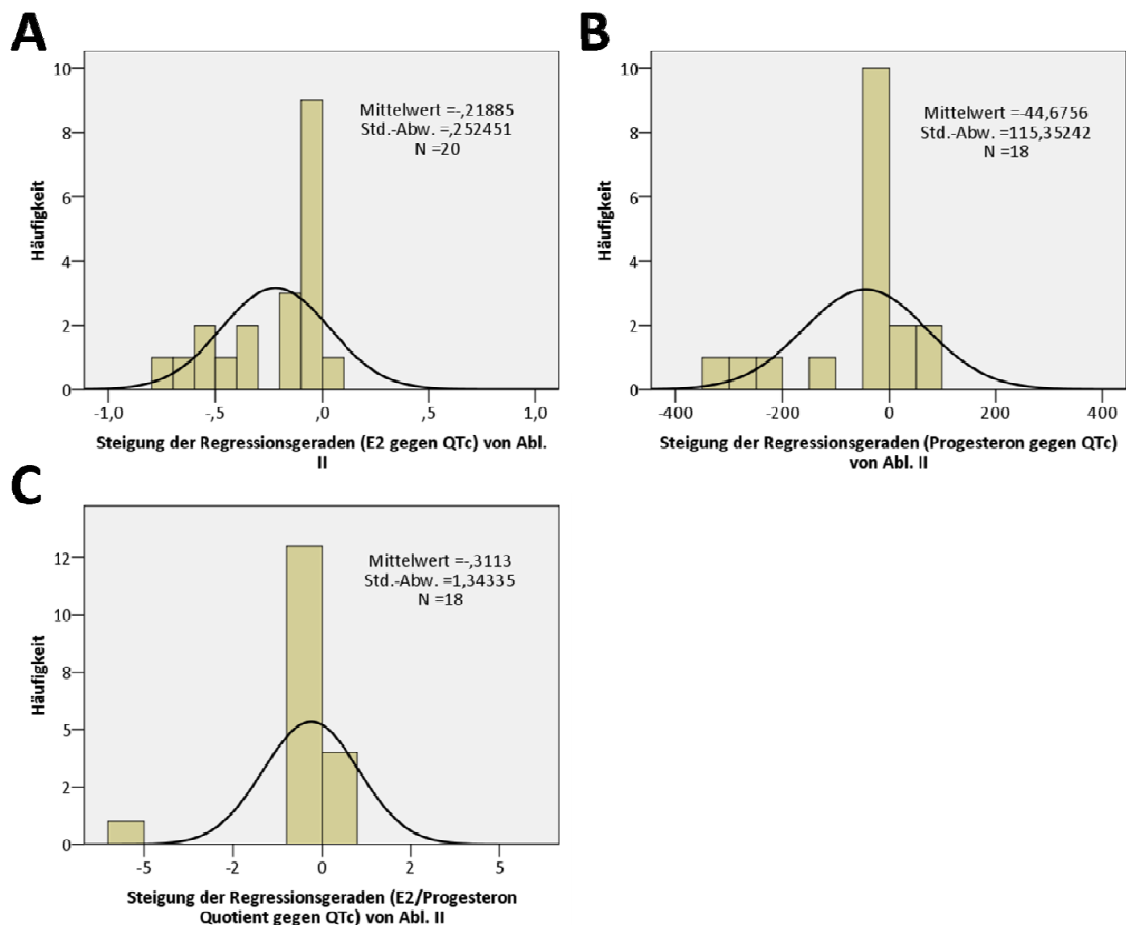


Abbildung 10 zeigt in A bis C die Steigungswerte der Regressionsgeraden mit ihrer Häufigkeit in Abhängigkeit von E2, Progesteron und des E2/Progesteron Quotienten. Die Balken zeigen eine steile Verteilung der Werte an. Std.-Abw. = Standardabweichung.

Vor dem Hintergrund, dass parametrische Verfahren bei kleinen Fallzahlen im allgemeinen effektiver sind, wurde der t-Test als ausreichend valide für die Analyse gewählt.

Die Ergebnisse des t-Tests wurden mittels des nichtparametrischen Wilcoxon-Tests überprüft. Es wurde die Steigung der Regressionsgeraden jeweils gegen Null getestet. Da auch hier Steigungswerte verwendet wurden, musste Frau S. M. ausgeschlossen werden.

Der t-Test und der Wilcoxon-Test wurden mit den Steigungen der Regressionsgeraden beider Ableitungen (II und V5) durchgeführt.

Auf Grund der geringen Fallzahlen und der fehleranfälligen Bestimmung der QT-Zeit haben wir für unsere Ergebnisse die Signifikanz auf dem Niveau $\alpha \leq 0,001$ festgelegt (0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit).

3.2 Experimenteller Teil

3.2.1 Überblick experimenteller Teil

Im experimentellen Teil der Arbeit wurde der Einfluss von E2 auf den durch *HERG* kodierten Kaliumkanal und auf dessen Mutante R752P untersucht. Dazu wurden menschliche embryonale Nierenzellen („human embryonic kidney“ = HEK) mit *HERG*-R752P- und ER-DNA transfiziert und anschließend mit E2 behandelt. Die Zellkulturen wurden nach der Transfektion und Inkubation mit Antikörpern (AK) gefärbt und mikroskopiert. Zusätzlich wurden Negativkontrollen durchgeführt. Die folgenden Abbildungen zeigen eine Übersicht der Versuchsplanung (Abb. 11) und der Transfektionsansätze (Abb. 12). Tamoxifen ist ein selektiver Östrogenrezeptorinhibitor. Es sollte die ER gegenüber E2 blockieren um zu untersuchen, ob der Effekt des E2 ER-vermittelt oder unspezifisch ist.

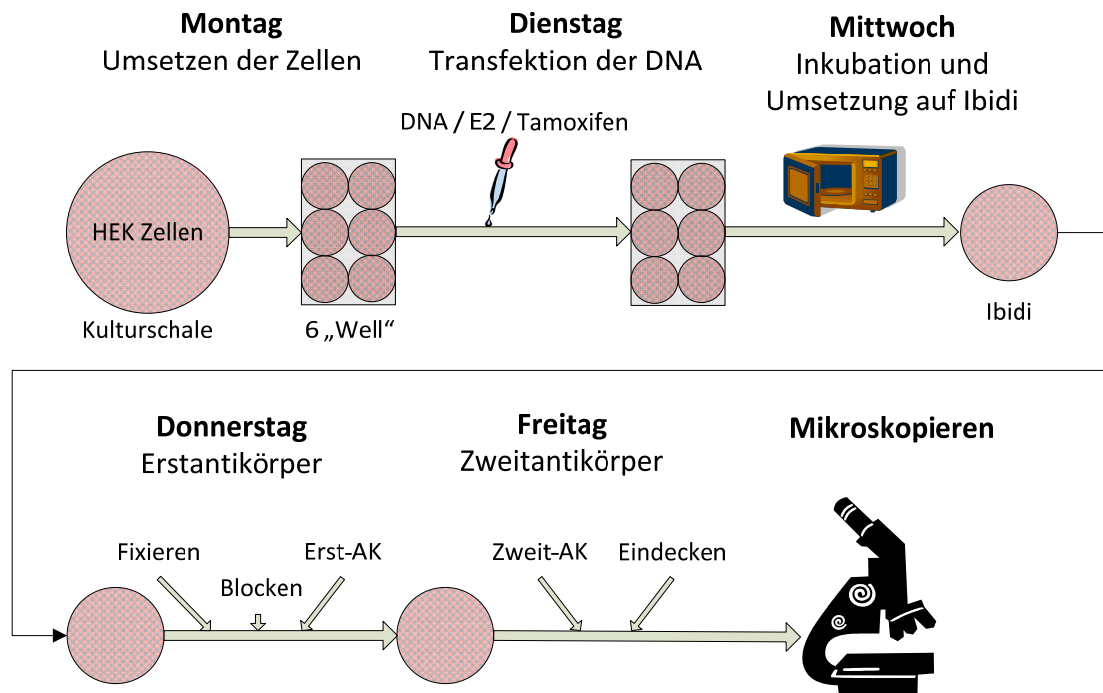


Abbildung 11 zeigt eine Übersicht der Versuchsplanung.

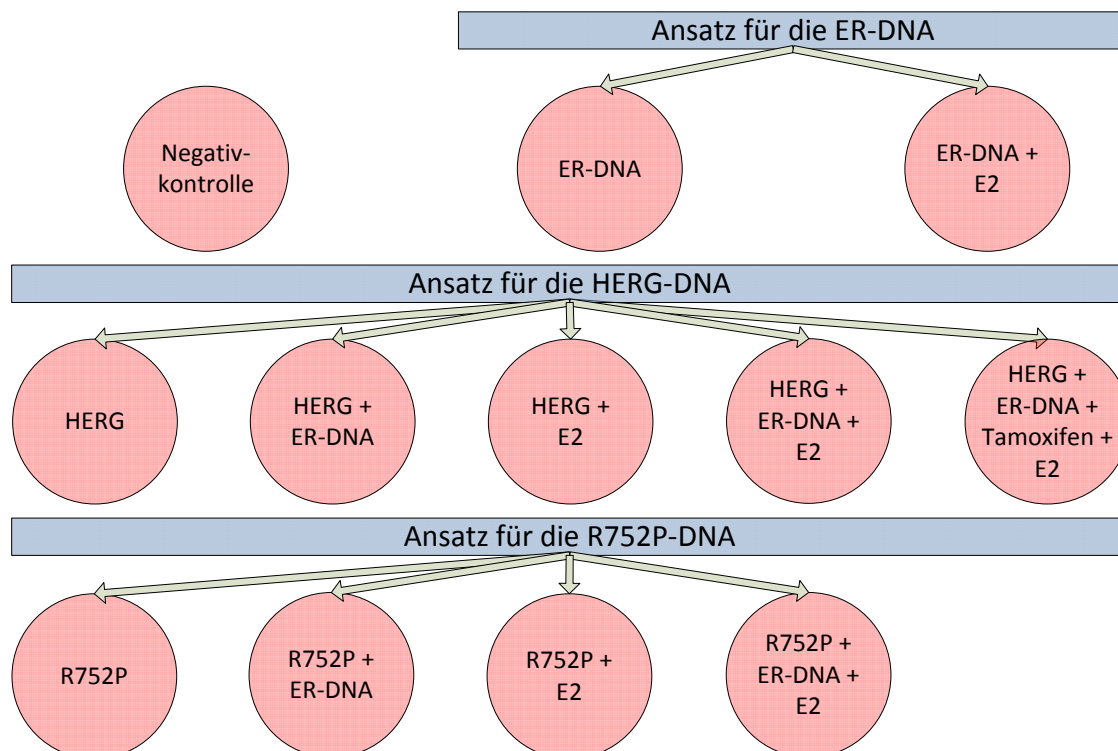


Abbildung 12 zeigt eine Übersicht der Versuchsansätze für die Transfektion (2. Tag). Die HEK-Zellen wurden mit der entsprechenden DNA transfiziert und je nach Ansatz mit E2 oder Tamoxifen behandelt. Anschließend wurde die Färbung, Fixierung und Mikroskopie durchgeführt.

3.2.2 Verwendete Materialien

Auf die Auflistung von Standardmaterialien (z.B. Pipetten) und -chemikalien (z.B. Natriumchlorid) wird hier verzichtet. Im Anhang befinden sich die Materialliste (10.3) und die Herstellerliste (10.4).

3.2.3 Zellkultivierung und Umsetzung (1. Tag)

Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen nach lichtmikroskopischer Kontrolle auf neue 94x16 mm Stammschalen und einmal pro Woche auf Zellkulturschalen (6-„Wells“) umgesetzt. Letztere wurden für die Durchführung der Transfektion verwendet. Dem verwendeten, E2-freien DMEM-Zellmedium waren 10 % FBS zugesetzt worden. Die Zellschalen verblieben daraufhin im Brutschrank bei 37° Celsius und 5 % CO₂ Zufuhr.

3.2.4 Transfektion der DNA (2. Tag)

Falls vorgesehen, wurden den jeweiligen „Wells“ nach Transfektion 60 Pikomol E2, 200 Nanomol Tamoxifen oder beides zugeführt und die Schalen für 24 Stunden zurück in den Brutschrank gestellt. Die für die Transfektion verwendeten DNA-Mengen sind im Anhang (10.5) aufgelistet.

3.2.5 Umsetzung (Splitten) auf Ibidi-Schalen (3. Tag)

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen aus den 6-„Wells“ auf Ibidi-Schalen umgesetzt (gesplittet). Diesen wurden je nach Ansatz wieder E2, Tamoxifen oder beides zugefügt und weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.2.6 Fixation, Blockung und Erstantikörper (4. Tag)

Bei der Fixation wurde selbst hergestellte phosphatgepufferte Salzlösung (PBS_s, bestehend aus den in Anhang 10.6 aufgelisteten Substanzen) und selbst hergestellte 2 %ige PFA Lösung verwendet.

2 %iges PFA: Es wurden 2 Gramm (g) PFA in 1 ml Natronlauge gelöst und anschließend 50 ml PBS_s zugeführt. Das Gemisch wurde mit Salzsäure auf einen PH-Wert von 7,3 eingestellt und dann mit PBS_s auf 100 ml aufgefüllt.

Blocklösung: Die Blocklösung zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung wurde ebenfalls selbst hergestellt (Substanzliste im Anhang 10.7).

Diese Substanzen wurden mit PBS_s auf 4 ml aufgefüllt. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, danach mit Blocklösung geblockt und abschließend mit dem Erstantikörper über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4° C inkubiert.

3.2.7 Zweitantikörper und Eindeckung (5. Tag)

Nach Absaugung des Erstantikörpers wurde der Zweitantikörper zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Wenn zusätzlich eine Kernfärbung mit DAPI gemacht wurde, wurde verdünntes DAPI nach Inkubation des Zweitantikörpers für fünf Minuten aufgetragen.

Zum Eindecken wurde eine Lösung aus DABCO, PBS_s und Glycerin verwendet und die fertigen Ibidi-Schalen bis zur mikroskopischen Begutachtung dunkel und kühl gelagert.

3.2.8 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie fand je nach Verfügbarkeit des Mikroskops ein bis fünf Tage nach der Eindeckung statt. Es wurde ein LSM 510 der Firma Zeiss (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) verwendet.

Die konfokale Lasermikroskopie beruht auf dem Prinzip, dass der Kondensor und die optische Linse eines Mikroskops den gleichen Brennpunkt innehaben. Dies verspricht eine höhere Bildauflösung im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie auf Kosten des Blickfeldes. Bei einem Lasermikroskop dient ein Laser anstelle einer Lampe als Lichtquelle (monochromatisches Licht). Die Fluoreszenzmethode bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die zu untersuchenden Zellen bzw. das Gewebe mit einem verträglichen Fluoreszenzfarbstoff vorbehandelt werden. Zu diesem Zweck werden meist konjugierte Antikörper verwendet. Der Erstantikörper bindet spezifisch an die Zielstruktur. Der Zweitantikörper trägt den Fluoreszenzfarbstoff und bindet an den Erstantikörper. Bei unseren Experimenten wurden als Zweitantikörper Alexa Fluor 488 nm (Esel anti Ziege) und Alexa Fluor 555 nm (Esel anti Hase) verwendet. Alexa Fluor 488 nm wurde mit einem Argon Laser mit 488 nm angeregt und emittierte fluoreszierendes Licht mit einem Maximum von 519 nm. Alexa Fluor 555 nm wurde mit einem Helium/Neon Laser mit 543 nm angeregt und emittierte fluoreszierendes Licht mit einem Maximum von 565 nm. Zur Kernfärbung wurde DAPI mit einem Diodenlaser mit 405 nm angeregt und emittierte fluoreszierendes Licht mit einem Maximum von

454 nm. Das Emissionssignal wurde aufgefangen und produzierte in der Bildgestaltung einen Kontrast. Durch die Verwendung verschiedener Antikörper, Farbstoffe und Laser konnten wir unterschiedliche Zellstrukturen darstellen.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse des klinischen Teils

4.1.1 Graphische Wiedergabe der Ergebnisse der einzelnen Studienschritte

Gemäß der Studienplanung wurde zunächst getestet, ob Elektrolyte (Natrium, Kalium, Chlorid und Kalzium - die entsprechenden Werte lagen durchweg im physiologischen Normbereich) Einfluss auf die QTc-Zeit oder die Hormonwerte haben. Hier konnte weder eine signifikante Beeinflussung der QTc-Zeit noch der Hormonwerte festgestellt werden. Am wahrscheinlichsten wäre eine Beeinflussung der Ergebnisse durch den Kaliumwert, dessen Einfluss auf die QTc-Zeit bekannt ist. Aus diesem Grund sind hier nur die Ergebnisse für Kalium aufgeführt (Abb. 13 A und B).

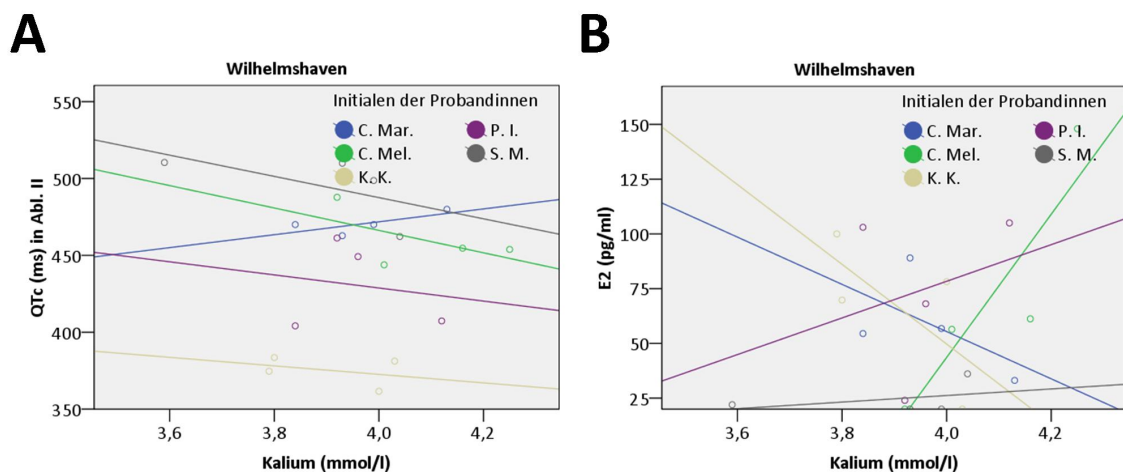


Abbildung 13 zeigt in **A** die Korrelation von Kalium (in Millimol pro Liter (mmol/l)) und der QTc-Zeit. Ein steigender Kaliumwert führt zu einer sinkenden QTc-Zeit. Dies wurde statistisch jedoch nicht belegt ($p > 0,17$ im t-Test der Steigung gegen Null). Grund hierfür ist mutmaßlich die geringe Varianz der Kaliumwerte, welche sich allesamt im Normbereich bewegten. In **B** ist die Korrelation von Kalium und E2 dargestellt. Wie zu erkennen ist gibt es keinen Zusammenhang zwischen den Kalium- und E2-Werten ($p > 0,77$ im t-Test der Steigung gegen Null). Die QTc-Zeiten sind Mittelwerte aus drei Messungen.

Im Anschluss konnte der Einfluss der Hormonwertschwankung (E2, Progesteron und des E2/Progesteron Quotienten) im Zyklus auf die QTc-Zeit untersucht werden (Abb. 14 A, B und C). Dies geschah bei den fünf Probandinnen aus Wilhelmshaven, von denen drei Genotyp positiv für die HERG-Mutante R752P waren.

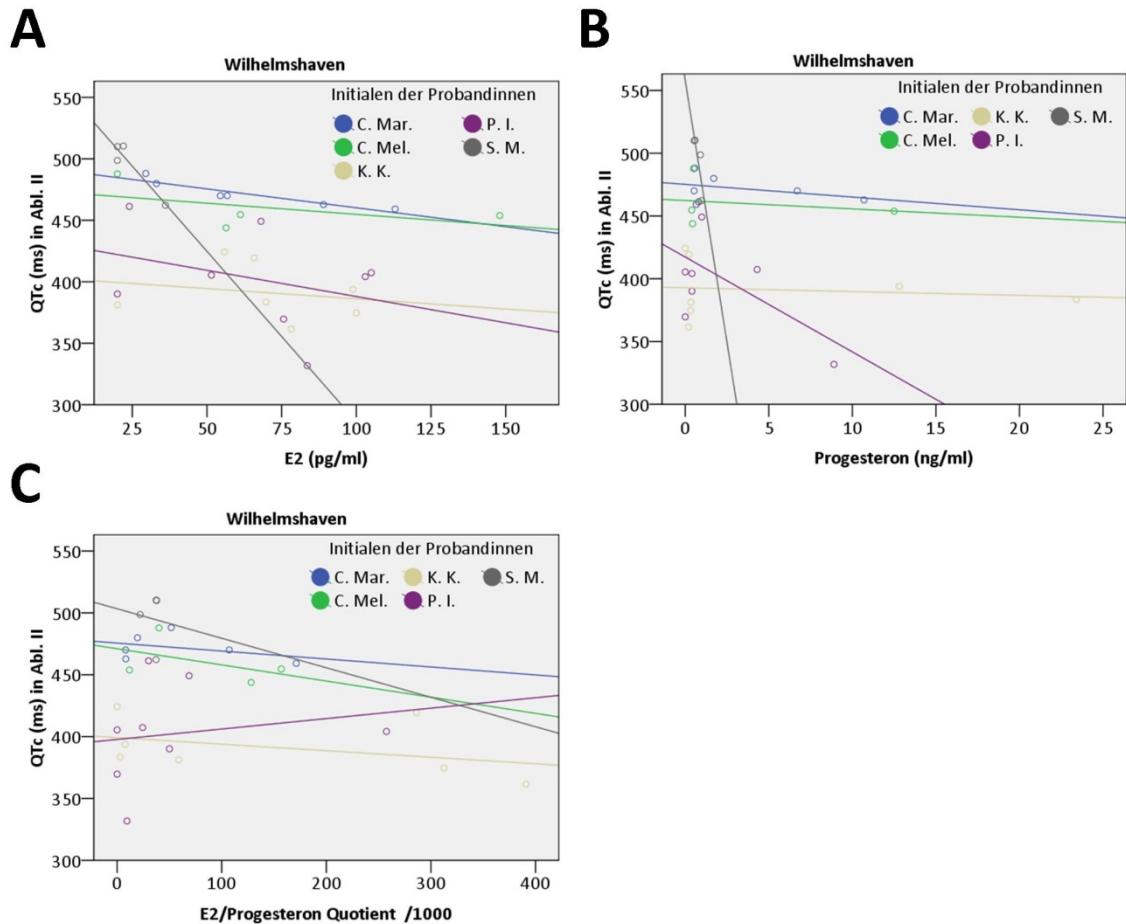
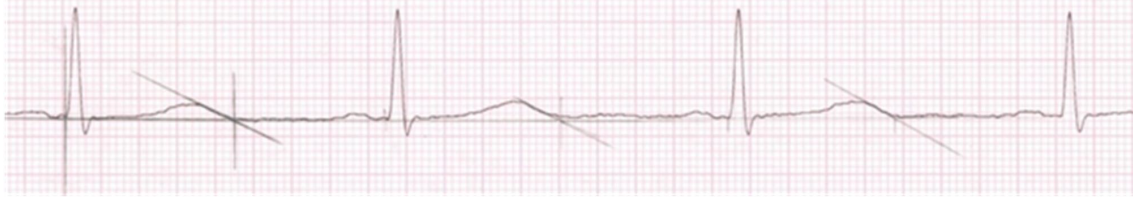


Abbildung 14 zeigt die Korrelation von der QTc-Zeit mit E2 (A), mit Progesteron (B) und mit dem E2/Progesteron Quotienten (C). Die Genotyp positiven Probandinnen erkennt man an der längeren QTc-Zeit. Es handelt sich um Frau C. Mar., Frau C. Mel. und Frau S. M.. Auffällig ist die stark negative Steigung der Regressionsgeraden von Frau S. M.. In B fällt auf, dass es nur sehr wenig höhere Progesteronwerte gibt. Ein steigender E2- und Progesteronwert führt zu einer Verkürzung der QTc-Zeit. Beim E2/Progesteron Quotienten ist der Einfluss uneinheitlicher. Aber auch hier führt ein Anstieg zur Verkürzung der QTc-Zeit. Die QTc-Zeiten sind Mittelwerte aus drei Messungen.

In Abb. 14 sind die Ergebnisse für jede einzelne Probandin dargestellt. Diese Darstellung wurde gewählt, um die interindividuellen QTc-Zeit-Unterschiede zu berücksichtigen und so den Zusammenhang genauer betrachten zu können. In Abb. 15 ist beispielhaft das EKG von Frau C. Mel. zu zwei verschiedenen Zeitpunkten im Zyklus gezeigt.

C. Mel.; Wilhelmshaven; Genotyp positiv; Abl. II

QTc Mittelwert: 488 ms; E2: 20 pg/ml; Progesteron: 0,5 ng/ml; E2/Progesteron Quotient: 40



QTc Mittelwert: 454 ms; E2: 148 pg/ml; Progesteron: 12,5 ng/ml; E2/Progesteron Quotient: 11,8



Abbildung 15 zeigt oben ein EKG vom zweiten Zyklustag. Der E2- und Progesteronwert war hier noch niedrig. Das untere EKG wurde am 21. Zyklustag bei hohen Hormonwertem aufgezeichnet.

Zusammenfassend wird in Abb. 14 und 15 gezeigt, dass ein steigender Hormonwert mit einer kürzeren QTc-Zeit assoziiert ist. Zu berücksichtigen ist hier die Tatsache, dass bei Zyklusbeginn beide Hormone relativ niedrige Spiegel aufweisen und gegen Zyklusende beide Hormone erhöht sind. Interessant ist es gegen Zyklusmitte, da der E2-Anstieg vor dem Progesteronanstieg liegt und sich hier beide Hormone voneinander abgrenzen lassen und so eine Differenzierung des Einflusses erleichtert wird (Abb. 16 A bis D).

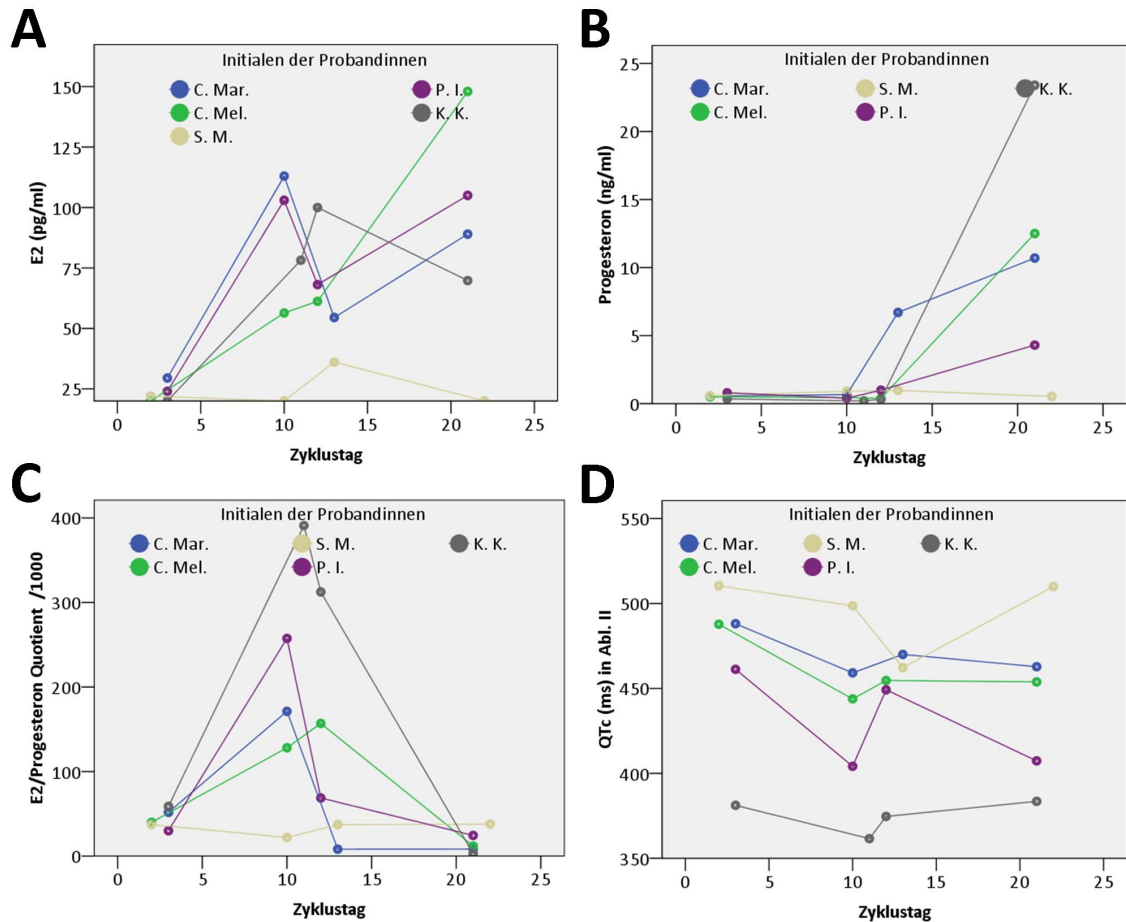


Abbildung 16 zeigt die E2- und Progesteronwerte bzw. die E2/Progesteron Quotienten sowie die QTc-Zeiten der Probandinnen aus Wilhelmshaven zu vier verschiedenen Zeitpunkten im Menstruationszyklus (A bis D). Die Geraden geben nicht den Verlauf der Werte wieder, sondern dienen dazu, den jeweiligen Trend zum nächsten Messzeitpunkt zu verdeutlichen. In der Übersicht sind auch die niedrigen Hormonwertschwankungen von Frau S. M. zu sehen, welche durch den prämenopausalen Zustand erklärt werden. Während es zwischen dem zweiten und dritten Messzeitpunkt bei den E2-Werten und bei der QTc-Zeit zu deutlichen Unterschieden kommt, sind diese Unterschiede bei den Progesteronwerten bis auf einen Ausnahme nur sehr gering. Daraus ergeben sich, wie in C gezeigt, deutliche Unterschiede der E2/Progesteron Quotienten um Zyklusmitte. Die QTc-Zeiten sind gemittelte Werte aus drei Messungen.

Im zweiten Teil der Studie wurden bei elf gesunden Probandinnen im Rahmen einer Hormontherapie hohe bis sehr hohe E2-Werte erreicht und eine Assoziation mit der QTc-Zeit untersucht. Auch hier wurde der Progesteronwert mitbestimmt (Abb. 17 A bis D). Bei zwei Probandinnen fehlt jeweils ein Progesteronwert. Es handelt sich dabei um Frau H-H. B. und Frau P. M.

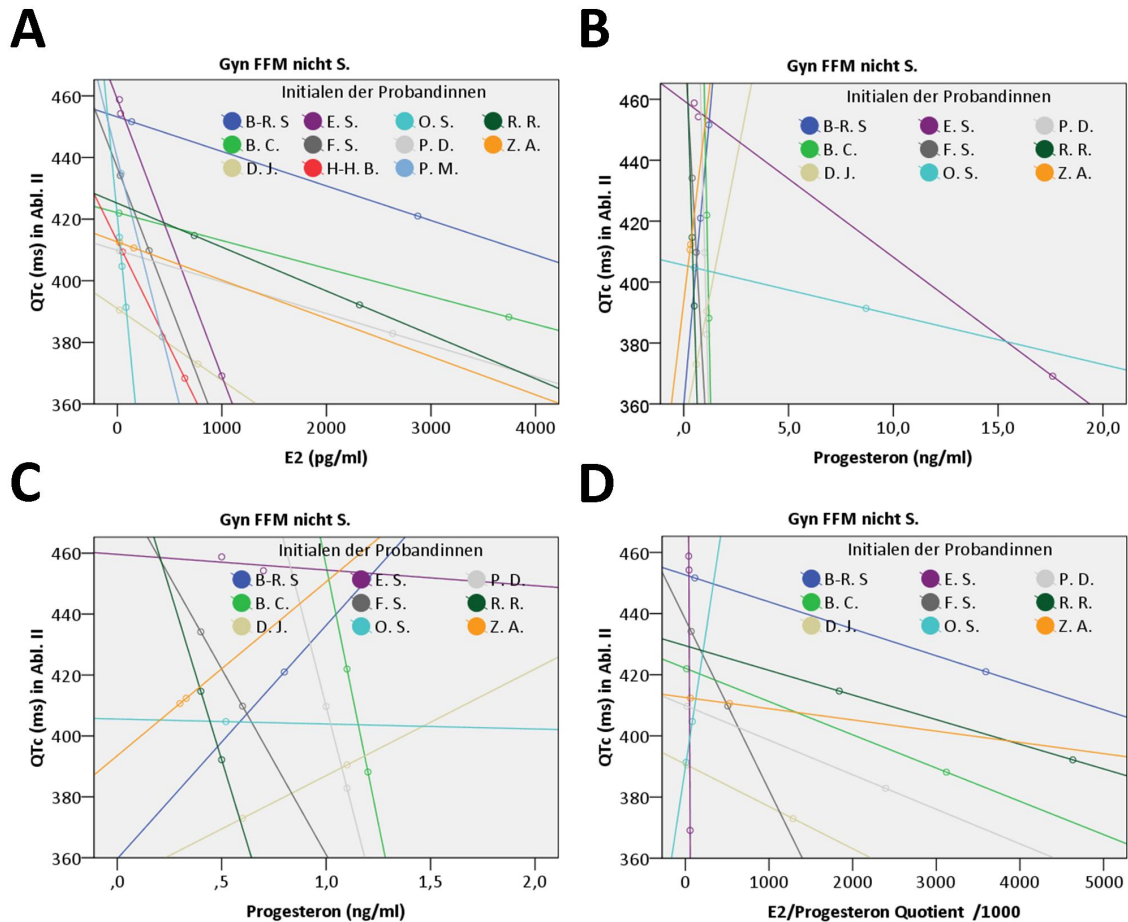


Abbildung 17 zeigt in **A bis D** jeweils die QTc-Zeit und E2, Progesteron und den E2/Progesteron Quotienten. In **B, C** und **D** fehlen die Geraden von Frau H-H. B. und von Frau P. M., da hier die Progesteronwerte fehlen. In **A** sieht man, dass bei einem steigendem E2-Wert die QTc-Zeit sinkt. In **B** ist der Zusammenhang kaum zu beurteilen, da bei zwei Probandinnen unerwartet hohe Progesteronwerte gemessen wurden. Um einen besseren Überblick zu verschaffen, ist in **C** der Bereich der niedrigen Werte gezeigt. Hier erkennt man, dass sechs Geraden eine negative und drei Geraden eine positive Steigung haben. Dieses Ergebnis ist nicht ganz so eindeutig wie das in **A** gezeigte. Beim E2/Progesteron Quotienten in **D** kommt es bei steigendem E2/Progesteron Quotienten wieder zu sinkender QTc-Zeit. Die QTc-Zeiten sind Mittelwerte aus drei Messungen.

Bei der Beurteilung von Abb. 17 A bis D fällt auf, dass die Stimulation regelrecht funktioniert hat und hohe E2-Wert-Unterschiede zu erkennen sind. Die Progesteronwert-Unterschiede sind wie erwartet gering. Der E2/Progesteron Quotient ist demnach wesentlich durch die E2-Wert-Unterschiede geprägt.

Zuletzt wurde bei fünf schwangeren Frauen die Korrelation der Hormonveränderungen während der Schwangerschaft mit der QTc-Zeit untersucht (Abb. 18 A, B und C).

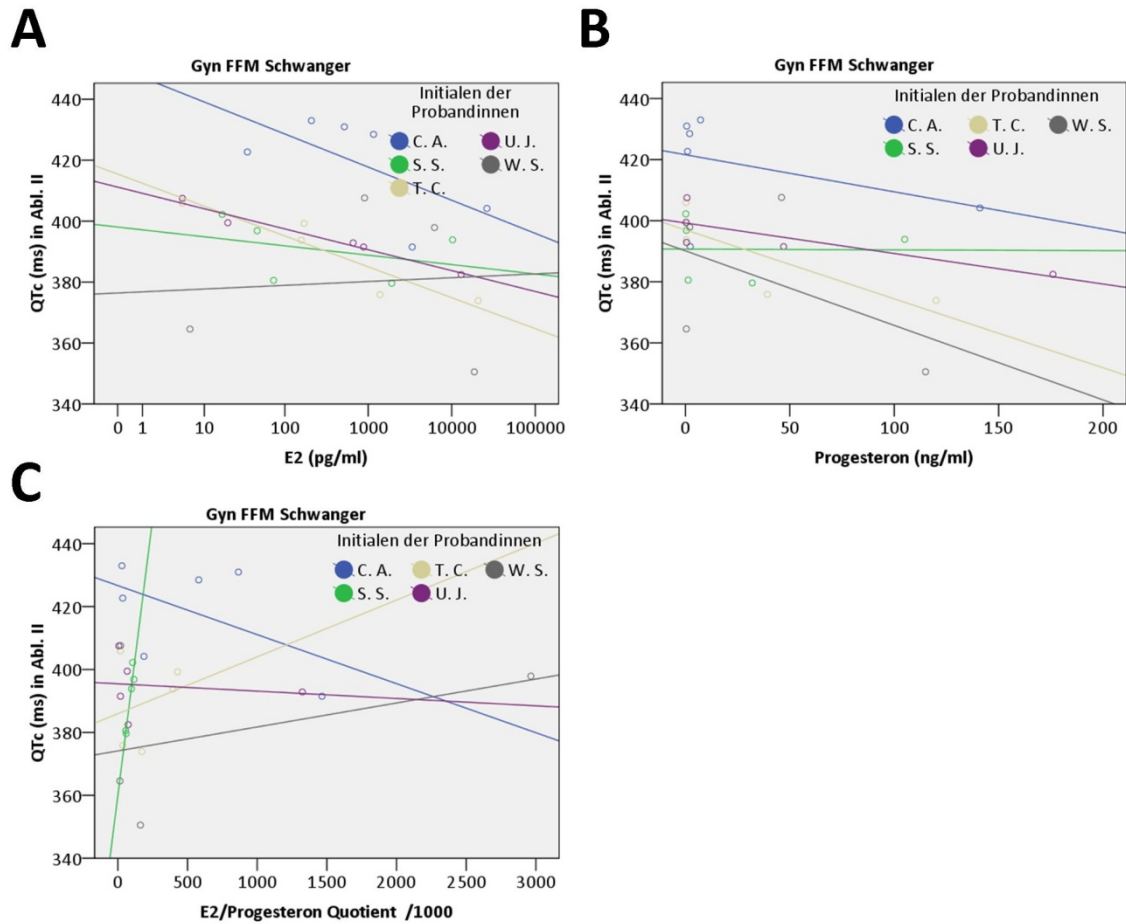


Abbildung 18 zeigt, dass ein steigender E2- (A) und Progesteronwert (B) zur Verkürzung der QTc-Zeit führt. Ein gerichteter Einfluss des E2/Progesteron Quotienten (C) ist nicht zu erkennen. Bei den QTc-Zeiten handelt es sich um Mittelwerte aus drei Messungen.

Beispielhaft für die EKG-Veränderungen in der Schwangerschaft ist in Abb. 19 das EKG von Frau U.J. dargestellt.

U. J.; Gyn FFM Schwanger; Abl. II

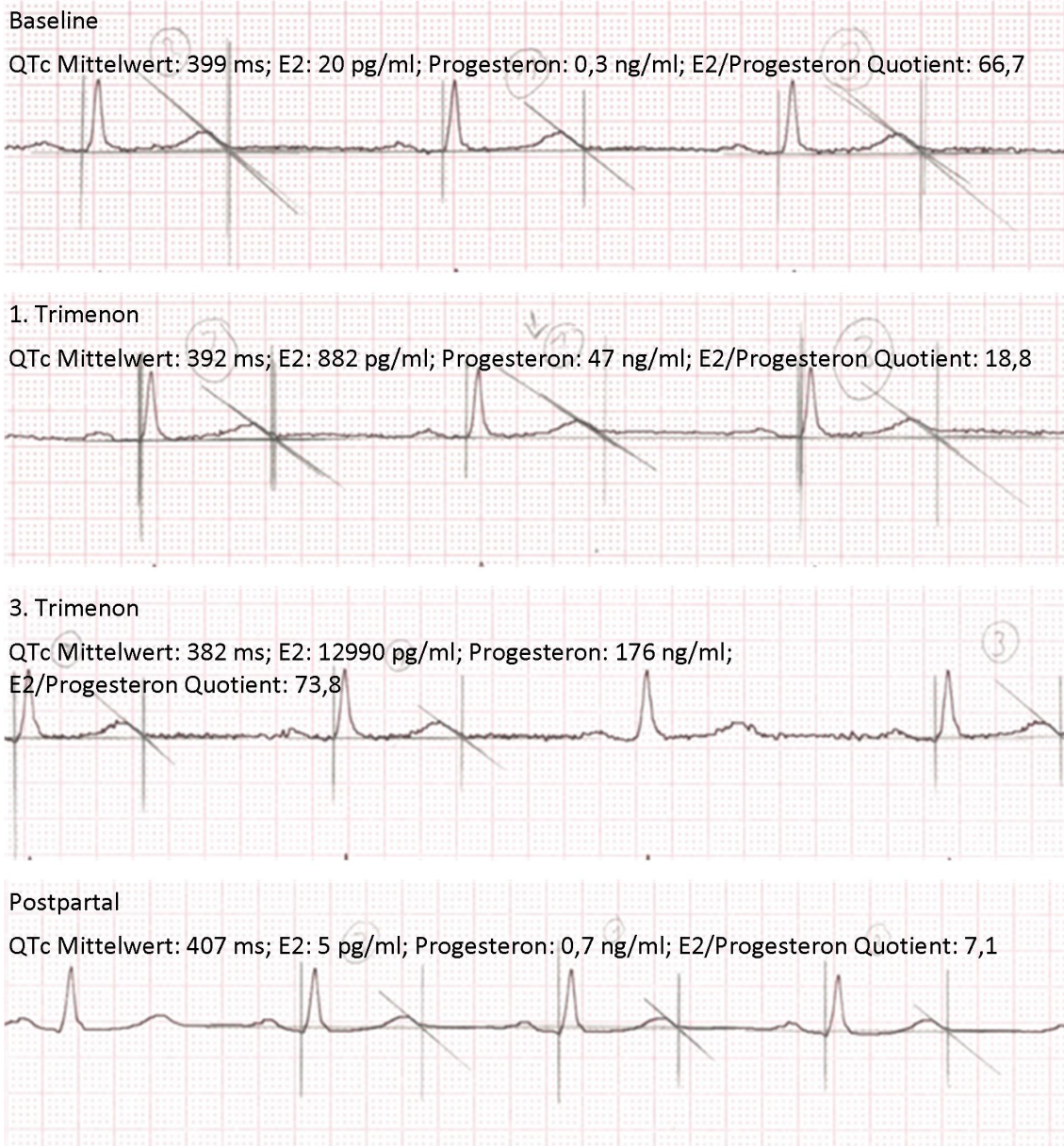


Abbildung 19 zeigt die EKG-Veränderungen im Verlauf der Schwangerschaft. Die QTc-Zeit verkürzt sich mit zunehmender Schwangerschaftsdauer und steigt postpartal wieder stark an. Die QTc-Zeit-Mittelwerte wurden aus drei QTc-Zeiten berechnet.

Neben der Darstellung des Zusammenhangs zwischen Hormonwert und QTc-Zeit ist auch der Verlauf der Hormonwerte und der QTc-Zeit in der Schwangerschaft interessant (Abb. 20 A bis D).

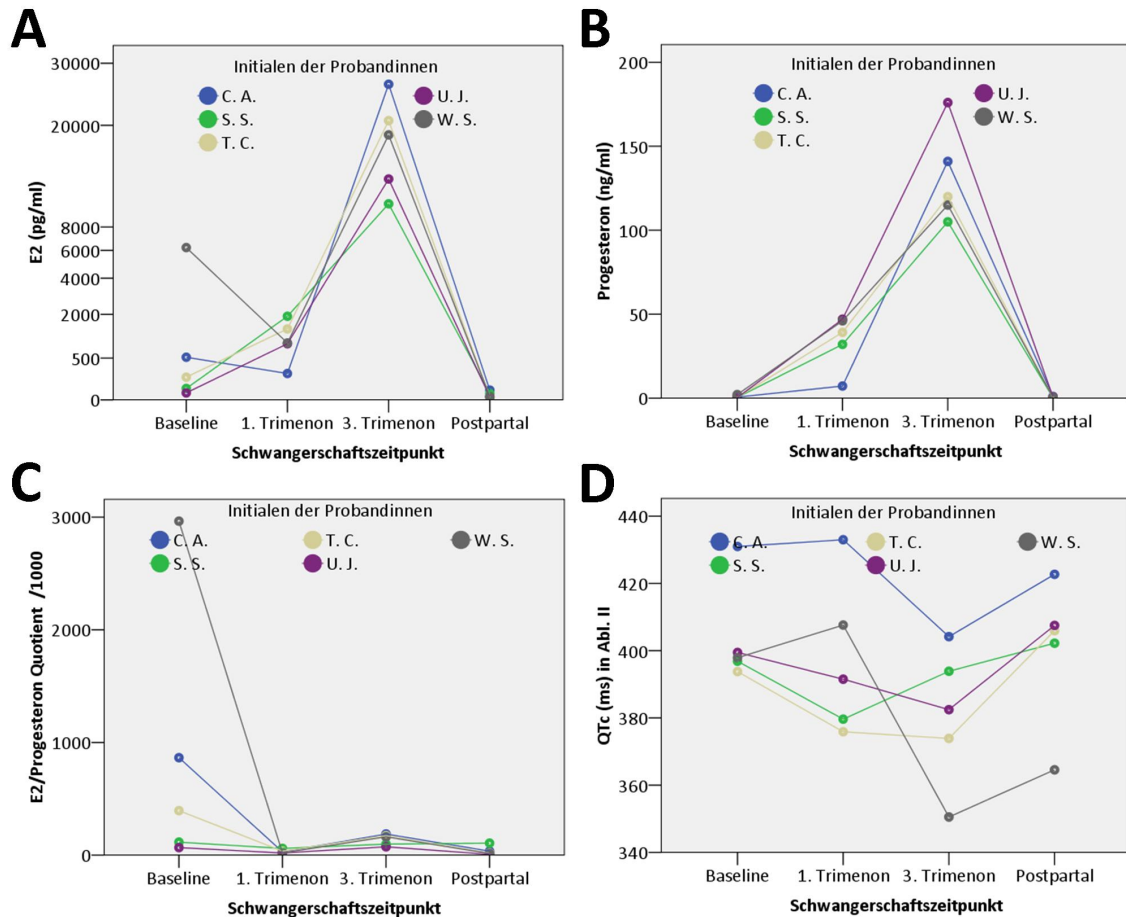


Abbildung 20 zeigt den Hormonverlauf und den Verlauf der QTc-Zeit in der Schwangerschaft (A bis D). Die Verbindungsgeraden geben nicht den tatsächlichen Verlauf wieder, sondern dienen der Veranschaulichung des Trends zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten. In A ist zu beachten, dass der E2-Wert exponentiell aufgetragen wurde. Auffällig ist, dass der E2-Basalwert bei zwei Probandinnen höher als im ersten Trimenon ist. Die E2- und Progesteronwerte erreichen ihr Maximum im dritten Trimenon. Der E2/Progesteron Quotient ist vor der Schwangerschaft („Baseline“) vor allem abhängig vom E2-Wert unter Stimulation. Während der Schwangerschaft steigt dieser Quotient leicht an und fällt postpartal wieder ab. Die QTc-Zeit verhält sich bis auf eine Ausnahme (Frau S. S. im dritten Trimenon) reziprok zum E2-Wert. Bei den QTc-Zeiten handelt es sich um gemittelte Werte aus drei Messungen.

Auffällig ist hier, dass der Basalwert von zwei Probandinnen höher ist als der Wert im ersten Trimenon, was im Rahmen der Stimulationstherapie zu erklären ist. In Abb. 21 A bis D wird auf die Einbeziehung des ersten Trimenons verzichtet, um die Darstellung zu vereinfachen. Auch im ersten Trimenon zeigen die Kurven die Korrelation zwischen E2 und der QTc-Zeit (blaue und graue Punkte).

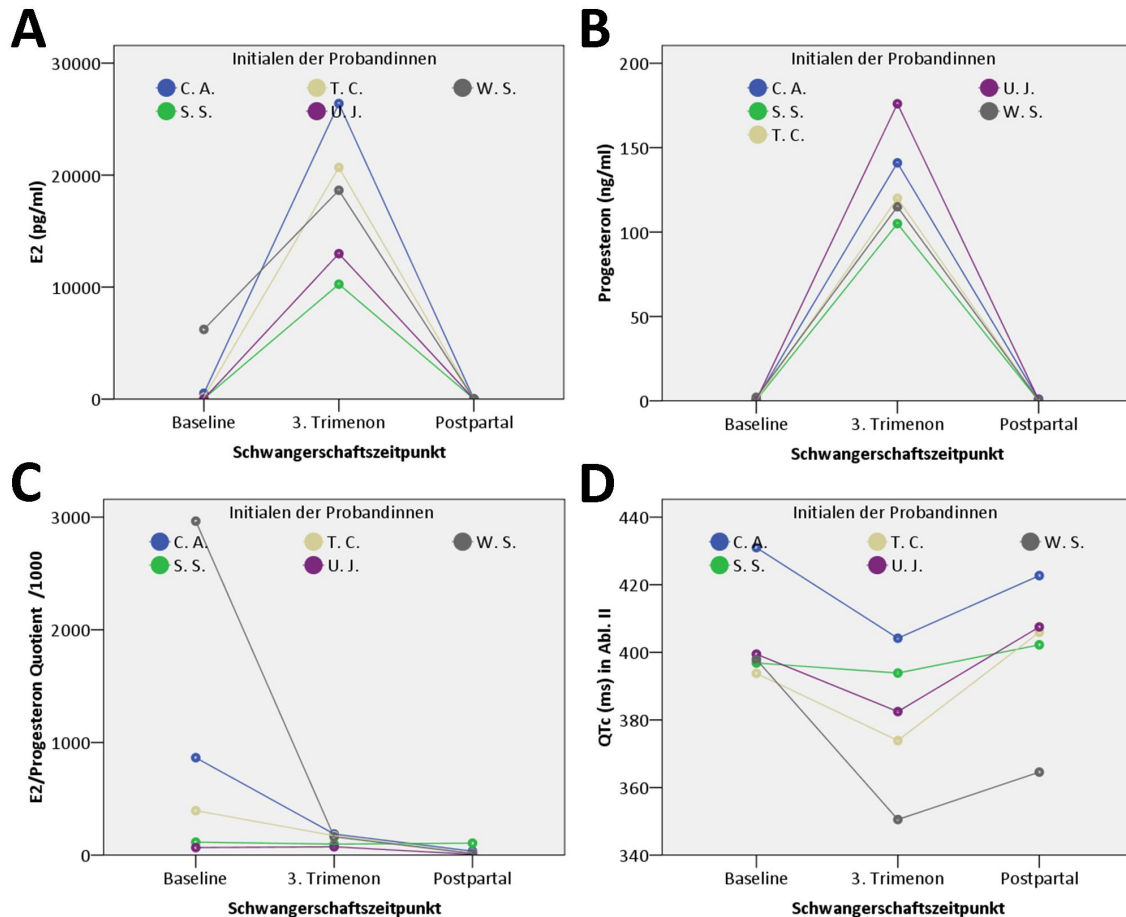
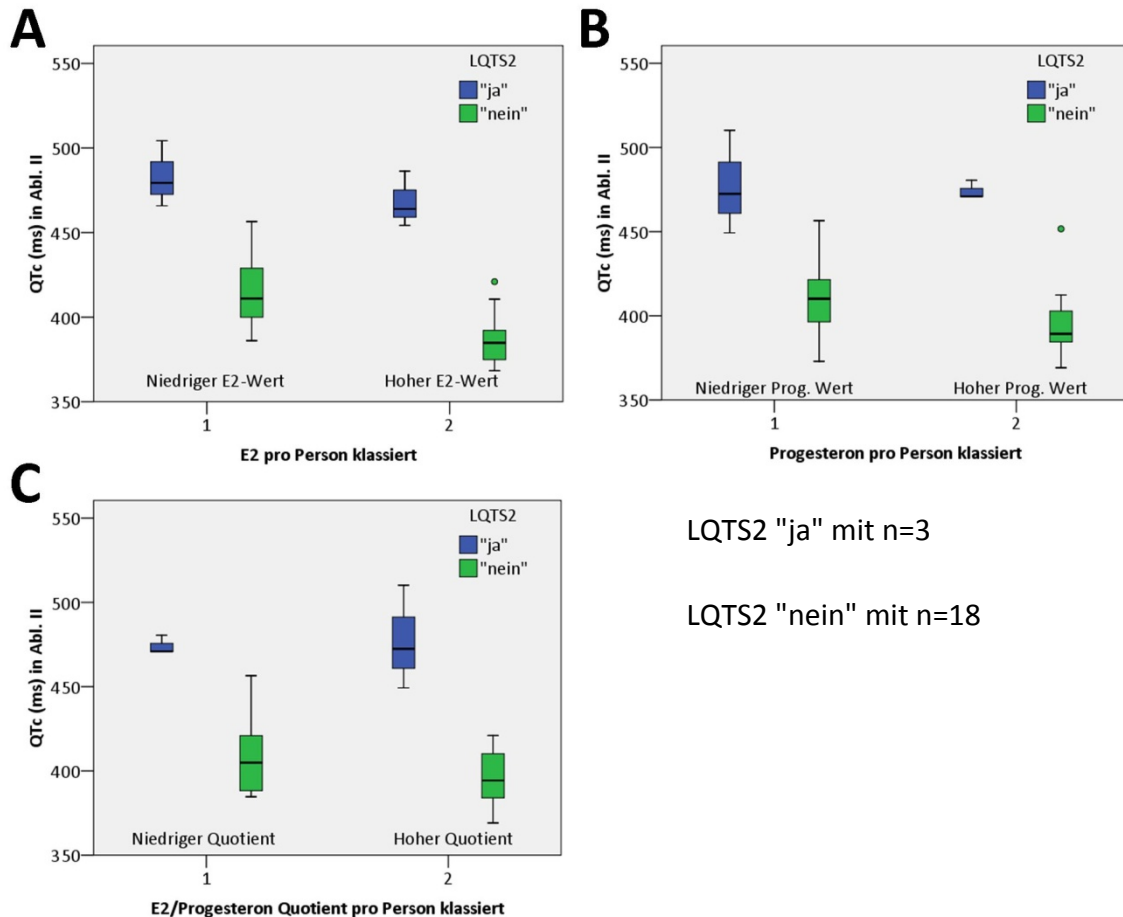


Abbildung 21 zeigt analog zu **Abbildung 20** den Verlauf der Hormonwerte und der QTc-Zeit in der Schwangerschaft (**A bis D**). Das erste Trimenon wurde herausgenommen. Zudem wird in **A** der E2-Wert in einer linearen Skala gezeigt. Es ist zu erkennen, dass steigende E2 und Progesteronwerte in der Schwangerschaft mit sinkenden QTc-Zeiten einhergehen (gegenläufiger Trend **A, B** => **D**). Der Einfluss des E2/Progesteron Quotienten ist uneinheitlich. Bei den QTc-Zeiten handelt es sich um gemittelte Werte aus drei Messungen.

4.1.2 Statistische Analyse der Ergebnisse

Zunächst wurde der Wilcoxon-Test für die klassierten Hormonwerte durchgeführt (Abb. 22 A, B und C). Um diesen nicht durch die längeren QTc-Zeiten der LQTS2-Patientinnen zu verfälschen, wurde hierfür nach LQTS2 (LQTS2 "ja" mit n=3 und LQTS2 "nein" mit n=18) unterschieden.



LQTS2 "ja" mit n=3

LQTS2 "nein" mit n=18

Abbildung 22 zeigt in **A bis C** die QTc-Zeit zum Zeitpunkt eines hohen E2- und Progesteronspiegels bzw. eines hohen E2/Progesteron Quotienten ("1") und zum Zeitpunkt eines niedrigen Hormonspiegels bzw. niedrigen Quotienten ("2"). Am deutlichsten ist der Unterschied in **A** zu sehen. Es ist zu beachten, dass die individuellen Unterschiede in der Gesamtheit "untergehen". Die QTc-Zeiten sind aus drei Messungen gemittelt. Es wurde der klassische Boxplot verwendet. In der Box befinden sich 50 % der Werte. Die dicke Linie in der Box stellt den Median dar. Die „Whisker“ umfassen jeweils 95 % der Werte.

In den Tab. 1 und 2 wird die Statistik zum Wilcoxon-Test dargestellt. Hier wurden alle Probandinnen aus Wilhelmshaven und aus der Gynäkologie der Universitätsklinik in Frankfurt am Main gemeinsam ausgewertet. Das n=21 setzt sich zusammen aus den fünf Probandinnen aus Wilhelmshaven, den elf nicht Schwangeren und den fünf Schwangeren aus der Gynäkologie FFM. Bei den Progesteronwerten und den E2/Progesteron Quotienten haben wir ein n=19, da zwei Progesteronwerte nicht bestimmt wurden und somit auch kein E2/Progesteron Quotient errechnet werden konnte.

Tabelle 1 zeigt die Ränge zur Berechnung des Wilcoxon-Test. Ein negativer Rang bedeutet, dass sich mit steigendem E2- und Progesteronwert bzw. E2/Progesteron Quotienten die QTc-Zeit verkürzt (je mehr desto weniger => negativer Rang). Ein positiver Rang bedeutet das Entgegengesetzte.

Ränge für den Wilcoxon-Test

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Mittlere QTc-Zeit zum hohem E2-Wert in Abl. II (ms) - Mittlere QTc-Zeit zum niedrigen E2-Wert in Abl. II (ms)	Negative Ränge	21	11,00	231,00
	Positive Ränge	0	,00	,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	21		
Mittlere QTc-Zeit zum hohem E2-Wert in Abl. V5 (ms) - Mittlere QTc-Zeit zum niedrigen E2-Wert in Abl. V5 (ms)	Negative Ränge	20	11,50	230,00
	Positive Ränge	1	1,00	1,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	21		
Mittlere QTc-Zeit zum hohem Progesteronwert in Abl. II (ms) - Mittlere QTc-Zeit zum niedrigen Progesteronwert in Abl. II (ms)	Negative Ränge	14	10,86	152,00
	Positive Ränge	5	7,60	38,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	19		
Mittlere QTc-Zeit zum hohem Progesteronwert in Abl. V5 (ms) - Mittlere QTc-Zeit zum niedrigen Progesteronwert in Abl. V5 (ms)	Negative Ränge	13	10,46	136,00
	Positive Ränge	6	9,00	54,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	19		
Mittlere QTc-Zeit zum hohem E2/Progesteron Quotienten in Abl. II (ms) - Mittlere QTc-Zeit zum niedrigen E2/Progesteron Quotienten in Abl. II (ms)	Negative Ränge	13	10,31	134,00
	Positive Ränge	6	9,33	56,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	19		
Mittlere QTc-Zeit zum hohem E2/Progesteron Quotienten in Ableitung V5 (ms) - Mittlere QTc-Zeit zum niedrigen E2/Progesteron Quotienten in Ableitung V5 (ms)	Negative Ränge	14	10,29	144,00
	Positive Ränge	5	9,20	46,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	19		

^N Anzahl

Tabelle 2 zeigt die zweiseitige asymptotische Signifikanz. Die Signifikanz für die klassierten E2-Werte ist in beiden Ableitungen deutlich. Bei den klassierten Progesteronwerten und dem E2/Progesteron Quotienten ist das Ergebnis uneinheitlich und nicht mehr signifikant auf dem Niveau $\alpha \leq 0,001$.

Statistik für den Wilcoxon-Test

	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Mittlere QTc-Zeit zum hohem E2-Wert in Abl. II (ms) - Mittlere QTc-Zeit zum niedrigen E2-Wert in Abl. II (ms)	0,000001
Mittlere QTc-Zeit zum hohem E2-Wert in Abl. V5 (ms) - Mittlere QTc-Zeit zum niedrigen E2-Wert in Abl. V5 (ms)	0,000002
Mittlere QTc-Zeit zum hohem Progesteronwert in Abl. II (ms) - Mittlere QTc-Zeit zum niedrigen Progesteronwert in Abl. II(ms)	0,02
Mittlere QTc-Zeit zum hohem Progesteronwert in Abl. V5 (ms) - Mittlere QTc-Zeit zum niedrigen Progesteronwert in Abl. V5 (ms)	0,104
Mittlere QTc-Zeit zum hohem E2/Progesteron Quotienten in Abl. II (ms) - Mittlere QTc-Zeit zum niedrigen E2/Progesteron Quotienten in Abl. II (ms)	0,123
Mittlere QTc-Zeit zum hohem E2/Progesteron Quotienten in Abl. V5 (ms) - Mittlere QTc-Zeit zum niedrigen E2/Progesteron Quotienten in Abl. V5 (ms)	0,049

Nach Durchführung des Wilcoxon-Tests wurde der t-Test unter Ausschluss von Frau S. M. durchgeführt. So ergab sich für den t-Test ein $n=20$ für die Steigungsgeraden der

E2-Werte und ein $n=18$ für die Steigungsgeraden der Progesteronwerte sowie für die E2/Progesteron Quotienten. Die Ergebnisse sind in den Tab. 3 und 4 dargestellt.

Tabelle 3 zeigt die Steigung der Regressionsgeraden der 20 bzw. 18 Probandinnen mit Mittelwert und Standardabweichung.

Statistik für den t-Test

Steigung der Regressionsgeraden	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
E2 gegen QTc-Zeit von Abl. II	20	-,21885	,252451	,056450
E2 gegen QTc-Zeit von Abl. V5	20	-,19225	,268254	,059983
Progesteron gegen QTc-Zeit von Abl. II	18	-44,6756	115,35242	27,18883
Progesteron gegen QTc-Zeit von Abl. V5	18	-15,0137	99,92918	23,55353
E2/Progesteron Quotient gegen QTc-Zeit von Abl. II	18	-,3113	1,34335	,31663
E2/Progesteron Quotient gegen QTc-Zeit von Abl. V5	18	-,2395	,98414	,23196

^N Anzahl

Tabelle 4 zeigt die abschließende Statistik des t-Tests. Eine signifikante Abweichung der Steigung von Null ist nur bei den Steigungswerten unter E2-Einfluss zu erkennen.

t-Test

Steigung der Regressionsgeraden	Testwert = 0					
	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
					Untere	Obere
E2 gegen QTc-Zeit von Abl. II	-3,877	19	,001	-,218850	-,33700	-,10070
E2 gegen QTc-Zeit von Abl. V5	-3,205	19	,005	-,192250	-,31780	-,06670
Progesteron gegen QTc-Zeit von Abl. II	-1,643	17	,119	-44,67556	-102,0390	12,6879
Progesteron gegen QTc-Zeit von Abl. V5	-,637	17	,532	-15,01370	-64,7073	34,6799
E2/Progesteron Quotient gegen QTc-Zeit von Abl. II	-,983	17	,339	-,31132	-,9793	,3567
E2/Progesteron Quotient gegen QTc-Zeit von Abl. V5	-1,032	17	,316	-,23947	-,7289	,2499

^{df} „degrees of freedom“ = n-1

Sig. = Signifikanz

Mittlere Differenz = Differenz der Mittelwerte beider Testwerte

Abschließend wurde das Ergebnis des t-Tests überprüft. Dazu wurden die Steigungswerte mittels des nichtparametrischen Wilcoxon-Tests gegen Null getestet.

In Tab. 5 und 6 werden die Ergebnisse wiedergegeben.

Tabelle 5 zeigt analog zu Tabelle 1 die Ränge zur Berechnung des Wilcoxon-Tests. Der Testwert ist in diesem Fall Null. Bei einem positiven Rang ist der Testwert "0" größer als die Steigung der Regressionsgeraden (das heißt, die Steigung der Regressionsgeraden ist negativ); bei einem negativen Rang gilt das Entgegengesetzte.

Ränge für den Wilcoxon-Test

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Testwert "0" - Steigung der Regressionsgeraden (E2 gegen QTc-Zeit) von Abl. II	Negative Ränge	1	7,00	7,00
	Positive Ränge	20	11,20	224,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	21		
Testwert "0" - Steigung der Regressionsgeraden (E2 gegen QTc-Zeit) von Abl. V5	Negative Ränge	2	13,50	27,00
	Positive Ränge	18	10,17	183,00
	Bindungen	1		
	Gesamt	21		
Testwert "0" - Steigung der Regressionsgeraden (Progesteron gegen QTc-Zeit) von Abl. II	Negative Ränge	4	10,50	42,00
	Positive Ränge	15	9,87	148,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	19		
Testwert "0" - Steigung der Regressionsgeraden (Progesteron gegen QTc-Zeit) von Abl. V5	Negative Ränge	7	10,71	75,00
	Positive Ränge	12	9,58	115,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	19		
Testwert "0" - Steigung der Regressionsgeraden (E2/Progesteron Quotient gegen QTc-Zeit) von Abl. II	Negative Ränge	4	11,50	46,00
	Positive Ränge	15	9,60	144,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	19		
Testwert "0" - Steigung der Regressionsgeraden (E2/Progesteron Quotient gegen QTc-Zeit) von Abl. V5	Negative Ränge	4	9,50	38,00
	Positive Ränge	15	10,13	152,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	19		

^N Anzahl

Tabelle 6 zeigt die zweiseitige asymptotische Signifikanz. Das Signifikanzniveau von E2 gegen QTc-Zeit sticht in beiden Ableitungen sehr deutlich hervor.

Statistik für den Wilcoxon-Test

	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Testwert "0" - Steigung der Regressionsgeraden (E2 gegen QTc-Zeit) von Abl. II	0,000018
Testwert "0" - Steigung der Regressionsgeraden (E2 gegen QTc-Zeit) von Abl. V5	0,002245
Testwert "0" - Steigung der Regressionsgeraden (Progesteron gegen QTc-Zeit) von Abl. II	0,032
Testwert "0" - Steigung der Regressionsgeraden (Progesteron gegen QTc-Zeit) von Abl. V5	0,441
Testwert "0" - Steigung der Regressionsgeraden (E2/Progesteron Quotient gegen QTc-Zeit) von Abl. II	0,049
Testwert "0" - Steigung der Regressionsgeraden (E2/Progesteron Quotient gegen QTc-Zeit) von Abl. V5	0,02

4.2 Ergebnisse des experimentellen Teils

Zunächst wurde die Funktionalität von ER α und ER β getestet. Dazu wurden die Zellen mit dem jeweiligen ER transfiziert und anschließend mit oder ohne E2-Stimulation im konfokalen Mikroskop betrachtet. Ohne Stimulation befanden sich die ER hauptsächlich im Zytoplasma und translozierten unter 48-stündiger E2-Stimulation in den Zellkern (Abb. 23). Dieses Verhalten ist typisch für Steroid-Rezeptoren und bestätigt die Funktionalität der mittels „Flag-Tag“ markierten Rezeptoren.

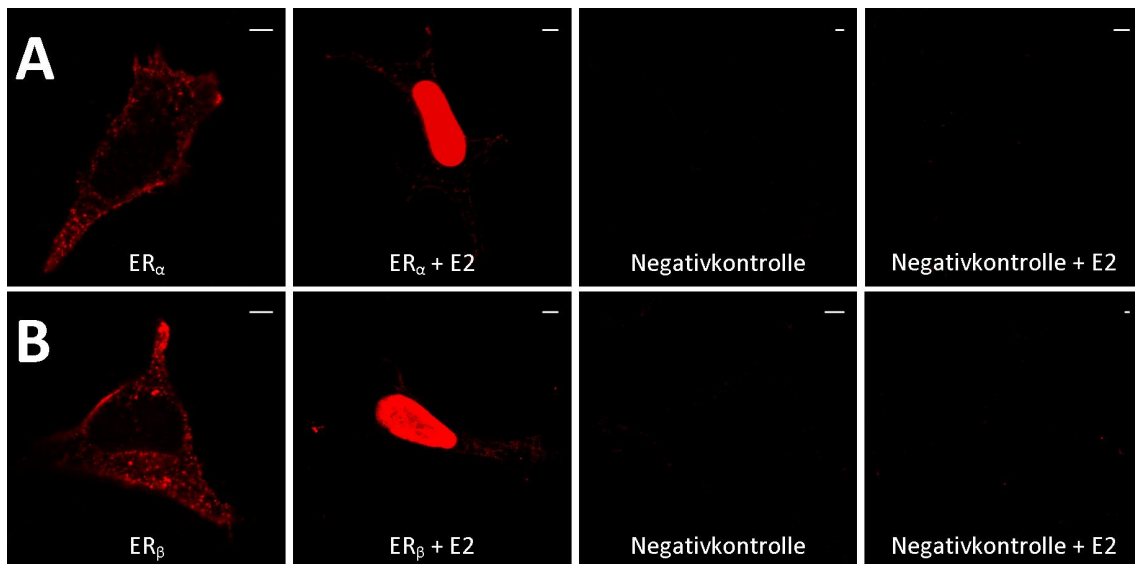


Abbildung 23 zeigt in **Tafel A** die Ergebnisse für ER α und in **B** für ER β (beide rot). Es sind jeweils auch die Negativkontrollen mit dargestellt. Die ER befinden sich zunächst im Zytoplasma. Unter 48-stündiger Stimulation mit E2 kommt es zur Translokation der ER in den Zellkern. Die weißen Balken entsprechen 5 μ m. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei gleichartige Ansätze, die an verschiedenen Tagen untersucht wurden.

In einem nächsten Ansatz wurden Zellen untersucht, die mit *HERG*- und ER-DNA ko-transfiziert waren und zum Teil mit E2 stimuliert wurden. Hierbei konnte unter E2-Stimulation eine deutliche Translokation von *HERG*-Protein an die Zellmembran dokumentiert werden, wenn ER α ko-transfiziert war. Wurde ER β verwendet, stellte sich kein entsprechender Effekt ein. Es wurden zur Kontrolle Zellen mikroskopiert, die nur mit *HERG* transfiziert waren und mit E2 stimuliert wurden (Abb. 24). Unter solchen Bedingungen zeigte sich kein Effekt der E2-Stimulation.

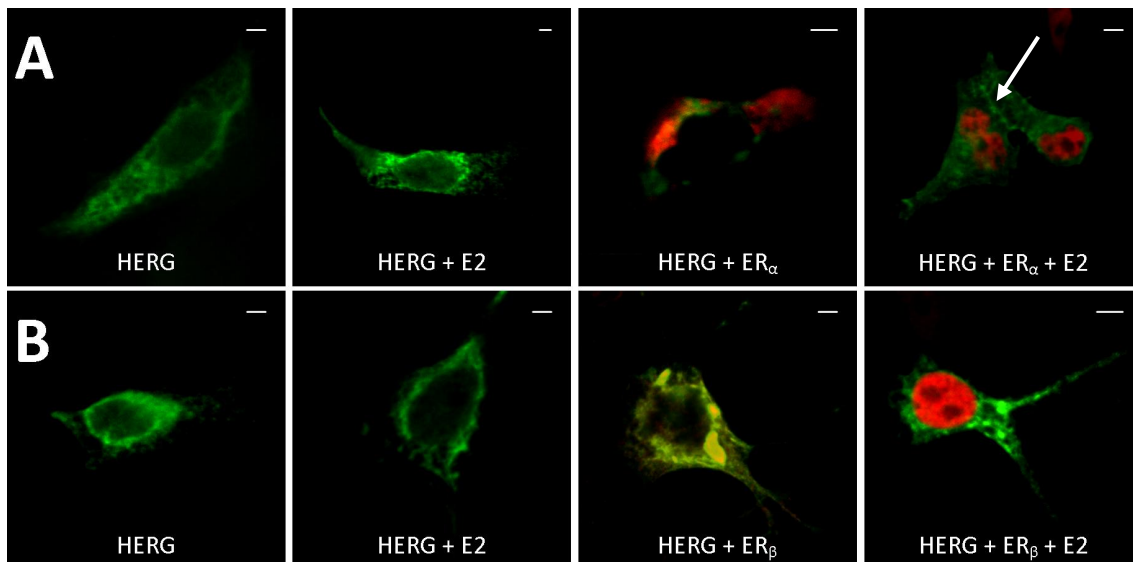


Abbildung 24 zeigt in Tafel A *HERG* (grün) alleine und in Ko-Transfektion mit ER α (rot). E2 alleine ändert nichts an der Verteilung von *HERG* innerhalb der Zelle. Bei ko-transfiziertem ER α wird dieser im Zytoplasma exprimiert. Unter 48-stündiger E2-Stimulation transloziert der ER in den Zellkern und *HERG* ist vermehrt an der Plasmamembran lokalisiert (weißer Pfeil). In Tafel B sind analoge Experimente mit ER β gezeigt. Unter E2-Stimulation transloziert ER β ebenfalls in den Zellkern. Eine vermehrte Membranlokalisation von *HERG* unter E2-Stimulation lässt sich in B nicht feststellen. Die weißen Balken entsprechen 5 μm . Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens fünf gleichartige Ansätze, die an verschiedenen Tagen untersucht wurden.

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich der Effekt des E2 durch Tamoxifen verhindern ließ. In einem entsprechenden Ansatz wurden die ko-transfizierten Zellen (*HERG* und ER) 48 Stunden mit E2 und Tamoxifen ko-exponiert (Abb. 25). Wie in Abb. 25 zu erkennen ist, blieb die Translokation von *HERG*-Protein an die periphere Zellmembran unter Inhibierung des Rezeptors mittels Tamoxifen aus. Dies spricht für einen direkten Rezeptor-vermittelten Effekt auf das „Trafficking“ des *HERG*-Proteins.

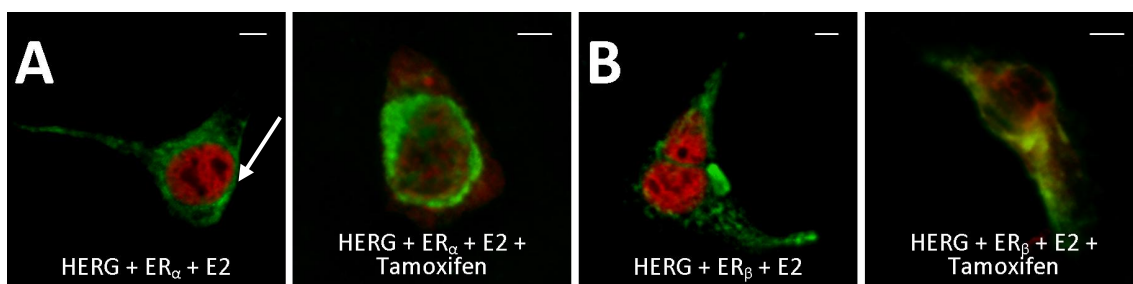


Abbildung 25 zeigt in A und B jeweils die ko-transfizierten (*HERG* und ER) Zellen unter 48-stündiger E2-Exposition bzw. 48-stündiger E2- und Tamoxifen- Ko-Exposition. In A erkennt man, dass *HERG* (grün) unter E2-Stimulation vermehrt an der Plasmamembran lokalisiert ist (weißer Pfeil) und sich dieser Effekt mit Tamoxifen verhindern ließ. In B ist *HERG* beide Male eher im Zytoplasma zu finden. In A und B bleibt unter Tamoxifen- Ko-Stimulation ein Teil der ER (rot) im Zytoplasma. Die weißen Balken entsprechen 5 μm . Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei gleichartige Ansätze, die an verschiedenen Tagen untersucht wurden.

Anschließend fanden analoge Untersuchungen mit der *HERG*-Mutante R752P statt. Auf eine Transfektion mit ER β wurde verzichtet. Zusätzlich wurde eine Kernfärbung mit DAPI vorgenommen (Abb. 26). Hierbei zeigte sich, dass die *HERG*-Mutante R752P

Mutante „trafficking“ defizient war und sich diese Störung auch durch Ko-Transfektion des ER α mit E2 Stimulation nicht aufheben ließ.

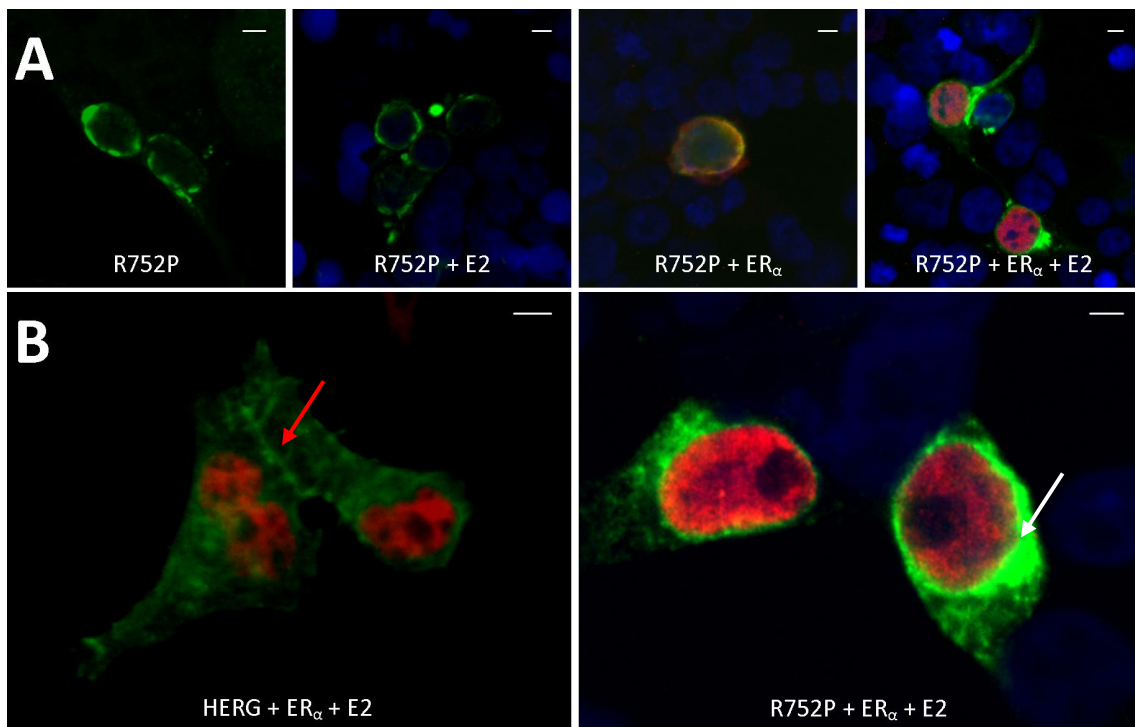


Abbildung 26 zeigt in **A** analoge Versuche zu Abb. 24 mit der *HERG*-Mutante R752P (grün). R752P ist zunächst im Zytoplasma lokalisiert. Die E2-Exposition ändert nichts an diesem Zustand. Der unstimulierte ER α (rot) befindet sich größtenteils im Zytoplasma. Die E2-Stimulation der ko-transfizierten (R752P und ER α) Zellen führt zu einer Translokation des ER in den Zellkern (was eine funktionierende Stimulation andeutet) hat aber keinen Einfluss auf die Lokalisation von R752P. In blau sind die DAPI gefärbten Zellkerne dargestellt. In **B** ist der direkte Vergleich zwischen *HERG* (selbe Abb. wie Abb.24 ganz rechts) und R752P zu sehen. Unter E2-Stimulation ist *HERG* vermehrt an der Plasmamembran lokalisiert (roter Pfeil) während R752P seine Verteilung nicht ändert (weißer Pfeil). Die weißen Balken entsprechen 5 μ m. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens fünf gleichartige Ansätze, die an verschiedenen Tagen untersucht wurden.

5 Diskussion

5.1 Wichtige Beobachtungen der vorliegenden Arbeit

In der Zusammenschau der Ergebnisse und unter Berücksichtigung der statistischen Analyse lässt sich folgender Effekt von E2 auf die QTc-Zeit im Oberflächen-EKG dokumentieren:

Ein steigender E2-Wert geht mit einer Verkürzung der QTc-Zeit einher.

Dieser Effekt ist nach unserer Analyse bei normwertigen Elektrolyten als elektrolyt-unabhängig zu werten. Auf dem von uns gewählten statistischen Signifikanzniveau ($\alpha \leq 0,001$) konnte kein ähnlicher Effekt für Progesteron oder den E2/Progesteron Quotienten festgestellt werden. Die Ergebnisse aus dem klinischen Teil lassen sich mit den Ergebnissen des experimentellen Teils in Einklang bringen.

Durch die experimentellen Arbeiten konnte ein möglicher zellulärer Mechanismus für den beschriebenen physiologischen Effekt identifiziert werden:

E2-Stimulation führt zu einer ER_{α} -vermittelten Translokation von *HERG*-Kaliumkanälen an die Zellmembran.

5.2 Regulation der kardialen Repolarisation durch Geschlechtshormone

Der Einfluss von Geschlechtshormonen auf die Repolarisation von Herzmuskelzellen ist schon seit langer Zeit eine Frage, die die klinische wie experimentelle Forschung beschäftigt und wurde entsprechend sowohl beim Menschen als auch bei mehreren Tierspezies mit verschiedenen Methoden untersucht.

In einer Studie von Nakajima *et al.* wurde der akute Einfluss von E2-Applikation auf die Aktionspotentialdauer von Meerschweinchen-Vorhofzellen mit der „Patch-Clamp“-Technik untersucht. Hierbei führte E2 (3-10 $\mu\text{mol/l}$) mittels einer Reduktion des L-Typ Kalziumstromes zu Verkürzung der Aktionspotentialdauer (APD) und so auch der QTc-Zeit. Kaliumströme blieben in dieser Arbeit unbeeinflusst und die Verkürzung der APD wies zudem noch einen antiarrhythmischen Effekt durch Unterdrückung getriggelter

Aktivität auf²¹. Demgegenüber wurde in einer Arbeit von Tanabe *et al.* festgestellt, dass etwas höhere Konzentrationen von E2 (10-30 $\mu\text{mol/l}$) die Aktionspotentialdauer verlängern⁵³. In dieser Arbeit kam es zu keiner Veränderung des Kalziumstromes sondern vielmehr zu einer Reduktion der verzögerten Gleichrichterströme (I_{Kr} und I_{Ks}), womit die Autoren die Verlängerung der ventrikulären APD erklärten. Die Methodik war in beiden Studien ähnlich, mit dem Unterschied, dass bei Nakajima *et al.* Vorhofzellen und bei Tanabe *et al.* Kammerzellen von Meerschweinchenherzen untersucht wurden. Die E2-Konzentrationen, die eingesetzt wurden, lagen jedoch in jedem Fall weit oberhalb der Konzentrationen, die im Rahmen unserer Untersuchungen an nicht-schwangeren Frauen (\bar{x} 224 pmol/l) und schwangeren Frauen im dritten Trimenon (\bar{x} 15,7 nmol/l) gemessen wurden, so dass eine physiologische Relevanz der Beobachtung zweifelhaft erscheint. Auch andere Untersucher stellten physiologische Konzentrationen in dem von uns dargelegten Bereich fest⁵⁴⁻⁵⁶. In einer weiteren „Patch-Clamp“-Studie an ventrikulären Meerschweinchen-Kardiomyozyten (isoliert von weiblichen Tieren) zeigte sich, dass niedrige Dosen von akut appliziertem E2 die QTc-Zeit verlängern, während hohe Dosen die QTc-Zeit verkürzen⁵⁷. Hierbei wurde eine halbmaximale Inhibition von I_{Kr} bei 1,3 nmol/l E2 beobachtet, welcher viel mehr im Bereich der physiologisch relevanten Konzentrationen lag. Demgegenüber verkürzte die Applikation von 300 nmol/l E2 die APD vermittelt durch einen hemmenden Effekt auf I_{Ca} . Eine wichtige Beobachtung dieser Arbeit war die Tatsache, dass E2 durch Affektion der *HERG*-Ionenkanalpore I_{Kr} in einer rezeptorunabhängigen Art und Weise beeinträchtigte. Während Kurokawa und Koautoren auf den möglichen pro-arrhythmischen Effekt der I_{Kr} Reduktion hinwiesen, konnten Philp *et al.* an weiblichen und männlichen Ratten ein dosisabhängiges antiarrhythmisches Potential von E2 zeigen⁵⁸. Sie fanden in einem Ischämie/Reperusionsmodell einen größeren Effekt von E2 auf I_{Ca} bei weiblichen als bei männlichen Tieren. Die Reduktion von I_{Ca} führte zu weniger Extrasystolen und hatte bei weiblichen Tieren einen ausgeprägteren antiarrhythmischen Effekt.

Die Heterogenität dieser Studien kann durch die Verwendung unphysiologischer Konzentrationen und möglicherweise unterschiedlicher Spezies/Geschlechter erklärt werden. Weiterhin könnten Unterschiede der Regulation atrialer und ventrikulärer Ionenkanäle vorliegen. Unsere Arbeit ging von einer chronischen Regulation der

Repolarisation aus, da es sich bei der humanen Freisetzung von E2 nicht um einen einmaligen – akuten – sondern einen dauerhaft stattfindenden Prozess handelt. Akute E2-Effekte sind beim Menschen möglicherweise als therapeutischer Ansatz interessant, wenn man (entsprechend der in der vorliegenden Arbeit erstmals beobachteten Prozesse) mittels Applikation hoher E2-Konzentrationen z.B. eine Verkürzung der QT-Zeit herbeiführen und Arrhythmien behandeln könnte. Zusammenfassend ist der zelluläre Mechanismus eines Einflusses von E2 auf Ionenströme und Aktionspotentialdauer noch nicht ausreichend geklärt und vor allem die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen (akut oder chronisch) bedarf weiterer Studien.

Zur Rolle des Progesterons in Bezug auf die zelluläre Regulation der QTc-Zeit gibt es nur sehr wenige Arbeiten. Von Nakamura *et al.* wurde ein die APD verkürzender Effekt von 100 nmol/l akut applizierten Progesterons in Meerschweinchen-Kardiomyozyten gezeigt, den die Autoren als möglichen antiarrhythmischen Effekt gegen Herzrhythmusstörungen bei LQTS-Patienten auslegten²².

In einer retrospektiven, klinischen Beobachtungsstudie der „Woman’s Health Initiative“ (an > 34000 postmenopausalen Frauen) konnten Kadish *et al.* nachvollziehen, dass die Einnahme von E2 und Progesteron die QTc-Zeit verkürzte, während die Einnahme von E2 allein keinen Effekt hatte⁵⁹. Die Daten dieser Studie erscheinen zwar vor dem Hintergrund der großen Zahl an untersuchten Probandinnen beeindruckend, jedoch ist zum Ersten der absolute Unterschied zwischen der QTc-Zeit von Frauen mit E2-Einnahme alleine (425.6 ± 0.2 ms) im Vergleich zu der von Frauen mit E2- und Progesteron-Einnahme (424.0 ± 0.2 ms) nur marginal (klinisch sicherlich irrelevant) verlängert, zum Zweiten verwendeten diese Autoren eine automatische Analyse der QTc-Zeit, welche vom EKG-Gerät durchgeführt wurde und daher mutmaßlich unpräzise ist.

5.3 Einfluss von Geschlechtshormonen auf die QTc-Zeit – klinische Studienlage

5.3.1 Patientinnen mit langem QT Syndrom

Ziel des ersten Teiles dieser Arbeit war zu untersuchen, inwieweit Veränderungen der Geschlechtshormone im Menstruationszyklus von drei LQTS2-Patientinnen Einfluss auf

die QTc-Zeit haben und ob dieser Einfluss bei normwertigen Elektrolyten elektrolyt-unabhängig ist. Als Kontrollgruppe mit ähnlichem genetischem Hintergrund wurden zwei Genotyp negative weibliche Familienmitglieder untersucht. Für die Elektrolyte konnte keine Beeinflussung der QTc-Zeit oder der Hormonwerte festgestellt werden. Zwar ist nicht auszuschließen, dass auch normwertige Kaliumwerte einen gerichteten Einfluss auf die QTc-Zeit haben können (Abb. 13 A), dieser aber ist unabhängig von den Hormonwerten (Abb. 13 B). Es ist deshalb von einem elektrolyt-unabhängigen Einfluss der Hormonwerte auf die QTc-Zeit auszugehen. Bei steigenden E2- und Progesteronwerten sowie bei steigenden E2/Progesteron Quotienten sank die QTc-Zeit (siehe Abb. 14). Dies war sowohl bei Genotyp positiven als auch bei Genotyp negativen Familienmitgliedern der Fall. Die Assoziation der E2-Werte mit der QTc-Zeit war jedoch deutlich stärker als die der beiden anderen Parameter.

In früheren Studien an gesunden Probandinnen konnten keine Schwankungen der QTc-Zeit im Zyklus festgestellt werden⁶⁰; zum Teil wurde aber ein Unterschied zwischen der QTc-Zeit in der Proliferationsphase und in der Lutealphase gefunden (kürzere QTc-Zeit in der Lutealphase)⁵⁵. Eine kürzere QTc-Zeit am Zyklusende (Lutealphase) im Vergleich zu Zyklusbeginn lässt sich auch bei unserer Arbeit nachweisen. Hulot *et al.* konnten, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, keinen QTc-Zeit-Unterschied im Zusammenhang mit verschiedenen hohen E2-Spiegeln im Menstruationszyklus feststellen⁵⁴. Die Autoren hatten eine umsichtige Korrektur der Herzfrequenz mittels einer individualisierten Formel vorgenommen, welche Veränderungen während einer submaximalen Ergometrie mit einbezogen. Es war in dieser Studie nicht möglich, eine Aussage über das Verhalten der QTc-Zeit bei sehr hohen E2-Wert-Unterschieden wie z.B. unter Stimulation oder in der Schwangerschaft zu machen. Dies könnte auch mit den vorliegenden Ergebnissen erklärt werden, wenn man die Daten in Abb. 7 betrachtet fällt auf, dass bei Genotyp positiven Patientinnen eine deutlich stärkere Veränderung der QTc-Zeit zu beobachten ist als bei der Genotyp negativen Kontrollgruppe. Dies mag daher rühren, dass die physiologische Bandbreite der QT-Veränderungen bei normaler QT-Zeit recht gering ist, wohingegen die Veränderungen bei Patientinnen mit verlängerter QT-Zeit deutlich prononciert waren.

Ob in der Zyklusanalyse unserer Studie der E2-Spiegel, der Progesteronspiegel oder der E2/Progesteron Quotient für die Verkürzung der QTc-Zeit verantwortlich ist, war zunächst noch unklar. Elektrolytschwankungen und Arzneimittelnebenwirkung als häufige Urheber von QTc-Zeit-Schwankungen⁷ konnten in diesem Zusammenhang ausgeschlossen werden, da es weder zu Elektrolytverschiebungen noch zur Einnahme von Medikamenten⁶¹ gekommen war, die eine QTc-Zeit-Veränderung hätten hervorrufen können. Das Problem der Unterscheidung zwischen E2, Progesteron oder des E2/Progesteron Quotienten als möglicher Urheber wird noch verschärft durch die Tatsache, dass zu Beginn des Zyklus beide Hormone in niedriger Konzentration und gegen Zyklusende beide Hormone in hoher Konzentration vorliegen (siehe Abb. 4). Deshalb haben wir bei den Ergebnissen speziell die mittleren zwei Messwerte um die Zyklusmitte angesehen (siehe Abb. 16). Es fällt auf, dass neben E2-Wert-Schwankungen auch intraindividuelle Schwankungen der QTc-Zeiten zu verzeichnen sind, während sich der Progesteronwert hier kaum ändert. Dies bedeutet, dass sich der E2/Progesteron Quotient entsprechend ändert und eine Interpretation der Ergebnisse erschwert. Letztlich war jedoch die statistische Signifikanz für einen Effekt von Progesteron oder des E2/Progesteron Quotienten auf die QTc-Zeit nicht auf dem vordefinierten Niveau der statistischen Genauigkeit signifikant ($\alpha \leq 0,001$).

5.3.2 Einfluss hoher E2-Konzentrationen auf die QTc-Zeit

Im zweiten Teil der Studie wurde entsprechend zur Verifizierung der Beobachtungen im Menstruationszyklus der Einfluss hoher E2-Werte (\bar{x} 4993 pmol/l unter Stimulation) auf die QTc-Zeit untersucht. Es wurden elf Frauen jeweils zum Zeitpunkt eines niedrigen E2-Spiegels (vor hormoneller Stimulation) und unter Stimulation bei hohem E2-Spiegel untersucht. Dabei wurden (in Analogie zu den oben beschriebenen Untersuchungen) neben dem E2-Wert weiterhin Progesteronwert und E2/Progesteron Quotient mitbestimmt.

Bei steigenden E2-Werten (und entsprechend auch bei steigendem E2/Progesteron Quotienten) kam es auch in dieser Studienpopulation zur Abnahme der QTc-Zeit. Hinsichtlich der Progesteronwerte wurde in 2/3 der Fälle eine Verkürzung der QTc-Zeit bei steigenden Werten festgestellt (siehe Abb. 17 A bis D). Zu beachten ist dabei, dass es größtenteils nur sehr geringe Progesteronwert-Unterschiede zwischen den

Messzeitpunkten gab. Daraus lässt sich schließen, dass der steigende E2/Progesteron Quotient vornehmlich durch die E2-Wert-Änderung bestimmt wurde und deshalb seine Ergebnisse auch überwiegend E2-abhängig sind. In der Literatur lässt sich keine vergleichbare Studie finden. Die Ergebnisse aus diesem Teil der Studie lassen sich wegen der unphysiologisch hohen E2-Werte während der Stimulation nicht direkt auf die Normalbevölkerung übertragen. Es könnten allerdings Rückschlüsse auf das Verhalten der QTc-Zeit während der Schwangerschaft gezogen werden, da es auch hier zu sehr hohen E2-Spiegeln kommt. Im Unterschied zum Stimulationsteil dieser Studie kommt es aber während der Schwangerschaft auch zu sehr hohen Progesteronwerten. Deshalb wurde das Verhalten der QTc-Zeit während der Schwangerschaft im nächsten Schritt untersucht.

5.3.3 Verhalten der QTc Zeit während der Schwangerschaft

Bei den fünf schwangeren Probandinnen führte ein Anstieg von E2 und Progesteron zu einer Verkürzung der QTc-Zeit. Der E2/Progesteron Quotient hatte keinen Einfluss auf die QTc-Zeit (siehe Abb. 18 A bis C). Zum Verhalten der QTc-Zeit während der Schwangerschaft bei gesunden Frauen liegen in der Literatur keine Voruntersuchungen vor. Unsere Ergebnisse lassen sich aber durchaus in Einklang bringen mit Studien, die an LQTS-Patientinnen durchgeführt wurden. LQTS Registerstudien¹³⁻¹⁷ haben gezeigt, dass LQTS-Patientinnen während der Schwangerschaft weniger kardiale Ereignisse (Synkopen, überlebter Herzstillstand oder plötzlichen Herztod) hatten. Das Risiko für solche Ereignisse war jedoch in der Postpartal-Periode von LQTS2-Patientinnen besonders hoch^{14,16}. In diesen Studien wurde zwar nicht direkt die QTc-Zeit gemessen, sondern nur die Häufigkeit der kardialen Ereignisse, aber die QTc-Zeit ist sicherlich ein Hauptrisikofaktor für das Auftreten kardialer Ereignisse bei Patienten mit LQTS⁶². In Anbetracht unserer Daten erscheint möglich, dass der Rückgang der kardialen Ereignisse während der Schwangerschaft mit einer verkürzten QTc-Zeit einhergeht und umgekehrt.

5.3.4 Zugrundeliegender zellulärer Mechanismus

Wie in den Abb. 23 bis 26 zu sehen ist, kommt es unter E2-Einfluss zu einer Rezeptor-vermittelten Zunahme von *HERG*- (jedoch nicht R752P-) Kaliumkanälen an der äußeren Zellmembran. Dieser Effekt wurde spezifisch durch ER α vermittelt und ließ sich durch

Tamoxifen Ko-Exposition blockieren. Für ER β konnte keine Wirkung auf die Membrantranslokation von *HERG* oder R752P festgestellt werden.

Über die Lokalisation der ER innerhalb der Zelle gibt es verschiedenen Thesen. Ursprünglich wurde ein Zwei-Stufen-Modell angenommen, in welchem der nicht stimulierte ER nur im Zytoplasma zu finden ist und unter Stimulation in den Zellkern transloziert⁶³. In Untersuchungen an Hippocampusgewebe von Ratten konnte später eine gleichzeitige nukleare und zytoplasmatische Lokalisationen der ER sowohl für ER α als auch für ER β ⁶⁴ beobachtet werden. In unserer Arbeit wurde der nicht stimulierte ER hauptsächlich im Zytoplasma nachgewiesen und translozierte unter Stimulation in den Zellkern. Dieser Effekt des E2 konnte auch in einer Studie von Dauvois *et al.* gezeigt werden. Hier bewirkte die Stimulation mit E2 eine Verschiebung der Rezeptoren in den Zellkern. Dieses „Shutteling“ konnte durch das Antiöstrogen ICI 182780 komplett unterbunden werden⁶⁵. In einer Arbeit von Maruvada *et al.*⁶⁶ wurde gezeigt, dass die Mobilität von ER auch unter Tamoxifen-Exposition erheblich eingeschränkt wird. Dies lässt sich auch in unserer Arbeit dokumentieren.

Zum Einfluss von E2 auf den intrazellulären Transport des *HERG*-kodierte Kaliumkanals gibt es keine Daten in der Literatur. In Arbeiten, die sich mit dem Wildtyp *HERG* und verschiedenen LQTS-Mutanten beschäftigen, wurden Veränderungen der Lokalisation, ähnlich wie in unserer Studie, mittels konfokaler Mikroskopie nachgewiesen⁶⁷⁻⁶⁹. Diese Mutanten werden als „trafficking“-defiziente Mutanten bezeichnet. Die Zunahme von *HERG*-Kaliumkanälen an der äußeren Zellmembran in der vorliegenden Arbeit könnte durch einen vermehrten Transport dorthin verursacht sein. Dieser Transport wird im Englischen als „Trafficking“ bezeichnet und ist von vielen Faktoren abhängig^{70,71}. Eine Rolle für E2 beim Transport der Ionenkanalproteine, ist bisher nicht beschrieben. Auch eine vermehrte Transkription von *HERG* würde zur Zunahme von *HERG*-Kaliumkanälen an der Plasmamembran führen. Als limitierender Faktor der Plasmamembranzunahme von *HERG*-Kaliumkanälen beschrieben Chen *et al.* das „Trafficking“ selbst⁷² (gesättigter Transport).

5.4 Mögliche zelluläre Mechanismen

E2 und Progesteron gehören zu den Steroidhormonen. Für diese gibt es drei Wirkmechanismen:

1. Spezifisch genomisch (klassisch): Das Steroidhormon bindet im Zytoplasma an seinen spezifischen Rezeptor. Der Rezeptor-Ligand-Komplex wandert in den Zellkern und führt dort zur Transkription. Die Wirkung tritt hier nach einigen Stunden ein.
2. Spezifisch nicht-genomisch: Das Steroidhormon bindet an spezifische plasmamembranständige Rezeptoren und entfaltet seine Wirkung direkt.
3. Unspezifisch nicht-genomisch (rezeptorunabhängig): Hohe Dosen an Steroidhormonen können durch unspezifische Interaktion mit der Plasmamembran eine Wirkung entfalten.

Für E2 und Progesteron konnten sowohl genomische als auch nicht-genomische Wirkmechanismen an Herzmuskelzellen nachgewiesen werden⁷³⁻⁷⁵. Für E2 wurde auch eine ER-unabhängige Wirkung gezeigt⁵⁷.

Die Ergebnisse des klinischen und des experimentellen Teils lassen darauf schließen, dass es unter E2-Einfluss zu einer ER-vermittelten Zunahme der Dichte an *HERG*-Kaliumkanälen an der Plasmamembran kommt. Eine erhöhte Dichte des Kanals bewirkt eine schnellere Repolarisation und so eine Verkürzung der QT-Zeit. Ob unter E2-Einfluss transkriptionsbedingt die Gesamtmenge an *HERG*-Kaliumkanälen zunimmt oder sich dessen Verteilung innerhalb der Zelle durch vermehrtes „Trafficking“ an die Plasmamembran ändert, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Neben dem „Trafficking“ ist auch die räumliche Faltung des *HERG*-Proteins bedeutsam. Hier spielen, wie auch beim „Trafficking“, spezielle Proteine (so genannte „Chaperone“) eine wichtige Rolle^{71,76-78}. Ob E2 eventuell die Transkription von Chaperonen fördert, die bei der Faltung und beim „Trafficking“ von *HERG*-Kaliumkanälen eine Rolle spielen, ist unklar. An Skelettmuskelzellen konnte aber schon eine vermehrte Transkription von dem Chaperon "Hitzeschock Protein 27" (HSP27) unter E2-Einfluss nachgewiesen werden⁷⁹.

Nicht-genomische Wirkungen von E2 wurden ebenfalls beschrieben. An Muskelzellen von Herzkranzgefäßen führte die Stimulation mit E2 zur vermehrten Bindung von "Hitzeschock Protein 90" (HSP90) an ein Stickoxid bildendes Enzym und steigerte so die Bildung von Stickoxid⁸⁰. Auch die Expression des "Hitzeschock Proteins 70" (HSP70) konnte durch E2-Stimulation gesteigert werden⁸¹. HSP90 und HSP70 sind Chaperone,

die an der Faltung und am „Trafficking“ von *HERG*-Kaliumkanälen beteiligt sind^{71,76}. Zum Einfluss des E2 auf weitere Chaperone, die an der Faltung und am „Trafficking“ von *HERG*-Kaliumkanälen eine Rolle spielen, sind noch keine Studien publiziert worden.

Letztendlich lässt sich durch die Zunahme von *HERG*-Kaliumkanälen an der Plasmamembran kardialer Myozyten der protektive Effekt der Schwangerschaft bei LQTS2-Patientinnen erklären. Diese Ergebnisse erklären jedoch nicht, warum es in der Postpartal-Periode zu gehäuften kardialen Ereignissen kommt. Ein möglicher Grund könnte sein, dass durch den vermehrten Strom von I_{Kr} (*HERG*) der Strom von I_{Ks} abnimmt und sich postpartal erst langsam wieder regeneriert. In der Literatur ist bis jetzt nur der gegenteilige Effekt beschrieben, nämlich dass eine I_{Kr} -Reduktion zu I_{Ks} -Hochregulation führen kann⁸². Hier bedarf es noch weiterer Studien, um den Mechanismus vollständig zu klären.

5.5 Schlussfolgerung und klinische Relevanz

Im klinischen Teil der Studie zeigte sich, dass E2 mit steigender Dosis die QTc-Zeit verkürzt ($p \leq 0,001$). Dieser Effekt ist bei normwertigen Elektrolyten als elektrolyt-unabhängig zu werten. Einen Effekt von Progesteron oder dem E2/Progesteron Quotienten konnten wir nicht mit entsprechender statistischer Signifikanz nachweisen. Der genaue zelluläre Mechanismus konnte bisher noch nicht geklärt werden, wir fanden unter E2-Stimulation eine Zunahme von *HERG*-Kaliumkanälen an der Plasmamembran. Dieser Effekt war bei der Mutante (R752P) nicht nachweisbar. Dies kann die verkürzte QTc-Zeit unter E2-Wirkung (bei den heterozygoten Patientinnen sowie den Genotyp negativen Probandinnen) erklären. Ob die Zunahme der *HERG*-Kaliumkanäle durch vermehrtes „Trafficking“, eine vermehrte Transkription oder einen anderen Mechanismus bedingt ist, kann noch nicht abschließend beurteilt werden. Künftige Studien sollten diesen Effekt des E2 weiter aufklären.

Unsere Daten liefern einen neuartigen therapeutischen Ansatz, LQTS2-Patientinnen in der Postpartal-Periode mit E2 zu behandeln, um so möglichen kardialen Ereignissen durch maligne Rhythmusstörungen vorzubeugen. Weiterhin wäre zu erwägen, Patientinnen mit erworbenem LQTS ebenso zu behandeln. Diese Interventionen sollten im Rahmen prospektiv randomisierter klinischer Studien evaluiert werden.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Geschlechtsunterschiede in der kardialen Repolarisation und der korrigierten QT-Zeit sind seit der Beschreibung von Bazett in den 1920er Jahren bekannt. Gesunde Frauen haben längere QT-Zeiten und werden öfter durch medikamenteninduzierte Arrhythmien betroffen als Männer. Patientinnen, die unter der erblichen Form des Langen QT-Syndroms (LQTS) leiden, weisen ein niedrigeres Risiko für kardiale Ereignisse während der Schwangerschaft auf. Dies ist nach einer Schwangerschaft deutlich erhöht. Weibliche Geschlechtshormone könnten eine wichtige Rolle spielen; ihr Einfluss ist aber noch unklar.

Hypothese: Veränderungen von Östrogen, Progesteron und dem Östrogen/Progesteron Quotienten sind mit einer Veränderung der QTc-Zeit assoziiert.

Methoden: Diese Studie gliedert sich in einen klinischen und einen experimentellen Teil. Im klinischen Teil wurden die Geschlechtshormone und die QTc-Zeiten von insgesamt 21 Frauen untersucht. Drei LQTS2-Patientinnen (heterozygote Trägerinnen der *HERG-Mutante* R752P) und zwei Genotyp negativen weiblichen Familienmitgliedern wurden während des Menstruationszyklus gemessen (inklusive Elektrolytbestimmung). Die zweite Gruppe bestand aus elf gesunden Frauen, die während einer hormonalen Stimulationstherapie gemessen wurden. Eine letzte Gruppe bestand aus fünf gesunden Frauen, die vor, während und nach einer Schwangerschaft untersucht wurden.

Im experimentellen Teil wurde die Wirkung von Östradiol (E2) auf Zellkulturen, die mit *HERG*-DNA (Wildtyp oder R752P), Östrogenrezeptor-DNA (ER $_{\alpha}$ oder ER $_{\beta}$) oder beidem transfiziert waren, mittels konfokaler Mikroskopie untersucht.

Ergebnisse: Im klinischen Teil der Studie zeigte sich, dass E2 mit steigender Serumkonzentration (in allen drei Gruppen) die QTc-Zeit verkürzte ($p \leq 0,001$). Dieser Effekt ist als elektrolyt-unabhängig zu werten. Einen signifikanten Effekt von Progesteron oder dem E2/Progesteron Quotienten konnten wir nicht nachweisen.

Als zugrunde liegender zellulärer Mechanismus zeigte sich eine ER $_{\alpha}$ -abhängige Zunahme von *HERG*-Kaliumkanälen an der Plasmamembran. Dieser Effekt war bei der

Mutante (R752P) nicht nachweisbar und konnte für ER_{β} oder ohne ER nicht gezeigt werden. Ob die Zunahme durch vermehrtes „Trafficking“, eine vermehrte Transkription oder einen anderen Mechanismus bedingt ist, kann noch nicht abschließend beurteilt werden.

Schlussfolgerung: Eine Zunahme der E2-Serumkonzentration führt in Abhängigkeit von ER_{α} zu vermehrter *HERG*-Lokalisation an der äußeren Zellmembran und erklärt so die Verkürzung der QTc-Zeit. Für die Zukunft könnte man erwägen, LQTS-Patientinnen in der Postpartal-Periode mit E2 zu behandeln, um so möglichen kardialen Ereignissen durch tachykarde Rhythmusstörungen vorzubeugen. Weiterhin wäre zu erwägen, Patientinnen mit erworbenem LQTS ebenso zu behandeln.

7 Summary

Background: Gender differences in cardiac repolarization and corrected QT interval have been noticed since Bazett's description in the 1920s. Healthy women have longer QT intervals and are more often affected by drug-induced arrhythmias compared to men. It has been shown, that patients suffering from the hereditary long QT Syndrome (LQTS) had a lower risk for cardiac events during pregnancy. This is clearly increased after a pregnancy. Female gonadal hormones might play an important role but their influence is not clear yet.

Hypothesis: Changes of estrogen, progesterone and the estrogen/progesterone quotient are associated with a change of the QTc interval.

Methods: This study was structured in two parts; a clinical and an experimental part. In the clinical part we measured the gonadal hormones and the QT interval of 21 women. Three LQTS2 patients (heterozygote carriers of *HERG-mutation* R752P) and two genotype negative female family members were studied during the menstrual cycle (including determination of electrolyte levels). The second group contained eleven healthy females which were studied during a hormonal stimulation therapy. The last group consisted of five healthy pregnant women who were studied before, during and after pregnancy.

In the experimental part we examined the effect of estradiol (E2) on cell cultures which were transfected with *HERG*-DNA (wild type or R752P-DNA), estrogen receptor-DNA (ER_{α} or ER_{β}) or both via confocal laser scanning microscopy.

Results: Our clinical data showed that E2 shortened QTc intervals with rising serum levels ($p \leq 0,001$). This effect was electrolyte-independent. We had no significant findings for a role of progesterone or the E2/progesterone quotient in QTc changes.

As an underlying cellular mechanism we documented an ER_{α} depending increase of *HERG* potassium channel localization at the outer membrane due to E2-stimulation in cell cultures. This effect was absent with the mutant (R752P) and there was no such an effect for ER_{β} or without ER. It is not clear if this increase in membrane localization was

caused by increased trafficking or increased DNA transcription or another unknown mechanism.

Conclusion: Elevated serum levels of E2 lead to shorter QTc intervals potentially due to an ER α depending increase of HERG potassium channels at the outer cell membrane. Nevertheless we should consider a treatment with female gonadal hormones for LQTS patients after giving birth to prevent life-threatening arrhythmias or sudden cardiac death. Furthermore, such a treatment could also be considered for patients with acquired LQTS.

8 Literaturverzeichnis

1. Bazett HC. An analysis of the time relationship of electrocardiograms. *Heart*. 1920;7:353-370.
2. Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S et al. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can.J Cardiol*. 1992;8:690-695.
3. Stumpf WE, Sar M, Aumuller G. The heart: a target organ for estradiol. *Science*. 1977;196:319-321.
4. Witchel HJ, Hancox JC. Familial and acquired long qt syndrome and the cardiac rapid delayed rectifier potassium current. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol*. 2000;27:753-766.
5. Tan HL, Hou CJ, Lauer MR et al. Electrophysiologic mechanisms of the long QT interval syndromes and torsade de pointes. *Ann.Intern.Med*. 1995;122:701-714.
6. Goldenberg I, Moss AJ, Zareba W. QT interval: how to measure it and what is "normal". *J Cardiovasc.Electrophysiol*. 2006;17:333-336.
7. Cahoon WD, Jr. Acquired QT prolongation. *Prog.Cardiovasc.Nurs*. 2009;24:30-33.
8. Crotti L, Celano G, Dagradi F et al. Congenital long QT syndrome. *Orphanet.J.Rare.Dis*. 2008;3:18-
9. Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Crotti L et al. Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 2009;120:1761-1767.
10. Schwartz PJ. The long QT syndrome. *Curr.Probl.Cardiol*. 1997;22:297-351.
11. Baruteau AE, Baruteau J, Joomye R et al. Role of congenital long-QT syndrome in unexplained sudden infant death: proposal for an electrocardiographic screening in relatives. *Eur.J.Pediatr*. 2009;168:771-777.
12. Webster G, Berul CI. Congenital long-QT syndromes: a clinical and genetic update from infancy through adulthood. *Trends Cardiovasc.Med*. 2008;18:216-224.
13. Rashba EJ, Zareba W, Moss AJ et al. Influence of pregnancy on the risk for cardiac events in patients with hereditary long QT syndrome. LQTS Investigators. *Circulation*. 1998;97:451-456.
14. Khositseth A, Tester DJ, Will ML et al. Identification of a common genetic substrate underlying postpartum cardiac events in congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 2004;1:60-64.

15. Heradien MJ, Goosen A, Crotti L et al. Does pregnancy increase cardiac risk for LQT1 patients with the KCNQ1-A341V mutation? *J Am.Coll.Cardiol.* 2006;48:1410-1415.
16. Seth R, Moss AJ, McNitt S et al. Long QT syndrome and pregnancy. *J Am.Coll.Cardiol.* 2007;49:1092-1098.
17. Meregalli PG, Westendorp IC, Tan HL et al. Pregnancy and the risk of torsades de pointes in congenital long-QT syndrome. *Neth.Heart J.* 2008;16:422-425.
18. Mone SM, Sanders SP, Colan SD. Control mechanisms for physiological hypertrophy of pregnancy. *Circulation.* 1996;94:667-672.
19. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C et al. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation.* 2001;103:89-95.
20. Kam KW, Qi JS, Chen M et al. Estrogen reduces cardiac injury and expression of beta1-adrenoceptor upon ischemic insult in the rat heart. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2004;309:8-15.
21. Nakajima T, Iwasawa K, Oonuma H et al. Antiarrhythmic effect and its underlying ionic mechanism of 17beta-estradiol in cardiac myocytes. *Br.J.Pharmacol.* 1999;127:429-440.
22. Nakamura H, Kurokawa J, Bai CX et al. Progesterone regulates cardiac repolarization through a nongenomic pathway: an in vitro patch-clamp and computational modeling study. *Circulation.* 2007;116:2913-2922.
23. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K et al. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett.* 1997;416:107-112.
24. Brandenberger AW, Tee MK, Lee JY et al. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin.Endocrinol.Metab.* 1997;82:3509-3512.
25. Whalley DW, Wendt DJ, Grant AO. Basic concepts in cellular cardiac electrophysiology: Part I: Ion channels, membrane currents, and the action potential. *Pacing Clin.Electrophysiol.* 1995;18:1556-1574.
26. Grant AO. Cardiac ion channels. *Circ.Arrhythm.Electrophysiol.* 2009;2:185-194.
27. Wang Z, Fermini B, Nattel S. Delayed rectifier outward current and repolarization in human atrial myocytes. *Circ.Res.* 1993;73:276-285.
28. Wang YG, Lipsius SL. Genistein elicits biphasic effects on L-type Ca²⁺ current in feline atrial myocytes. *Am.J.Physiol.* 1998;275:H204-H212.
29. Noble D, Tsien RW. Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol.* 1969;200:205-231.
30. Barry DM, Nerbonne JM. Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annu.Rev.Physiol.* 1996;58:363-394.

31. Nattel S, Carlsson L. Innovative approaches to anti-arrhythmic drug therapy. *Nat.Rev Drug Discov.* 2006;5:1034-1049.
32. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen.Physiol.* 1990;96:195-215.
33. Roden DM. Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link. *J.Intern.Med.* 2006;259:59-69.
34. Roden DM, Balser JR, George AL, Jr. et al. Cardiac ion channels. *Annu.Rev.Physiol.* 2002;64:431-475.
35. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME et al. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell.* 1995;81:299-307.
36. Tristani-Firouzi M, Sanguinetti MC. Structural determinants and biophysical properties of HERG and KCNQ1 channel gating. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2003;35:27-35.
37. Rudy Y. Molecular basis of cardiac action potential repolarization. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2008;1123:113-118.
38. Smith PL, Baukowitz T, Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature.* 1996;379:833-836.
39. Singh M, Dykens JA, Simpkins JW. Novel mechanisms for estrogen-induced neuroprotection. *Exp.Biol.Med (Maywood.).* 2006;231:514-521.
40. Windham GC, Elkin E, Fenster L et al. Ovarian hormones in premenopausal women: variation by demographic, reproductive and menstrual cycle characteristics. *Epidemiology.* 2002;13:675-684.
41. Moss AJ, Schwartz PJ, Crampton RS et al. The long QT syndrome: a prospective international study. *Circulation.* 1985;71:17-21.
42. Vetter VL. Clues or miscues? How to make the right interpretation and correctly diagnose long-QT syndrome. *Circulation.* 2007;115:2595-2598.
43. Johnson JN, Ackerman MJ. QTc: how long is too long? *Br.J.Sports Med.* 2009;43:657-662.
44. Postema PG, De Jong JS, Van der Bilt IA et al. Accurate electrocardiographic assessment of the QT interval: teach the tangent. *Heart Rhythm.* 2008;5:1015-1018.
45. Berger RD. QT interval variability is it a measure of autonomic activity? *J Am.Coll.Cardiol.* 2009;54:851-852.
46. Balakrishna Hosmane, Charles Locke , David Morris. QT Interval: Correction for Heart Rate. *J Appl Res.* 2006;6:288-299.

47. Davey P. A new physiological method for heart rate correction of the QT interval. *Heart*. 1999;82:183-186.
48. Sagie A, Larson MG, Goldberg RJ et al. An improved method for adjusting the QT interval for heart rate (the Framingham Heart Study). *Am.J Cardiol*. 1992;70:797-801.
49. Fridericia L. The duration of systole in the electrocardiogram of normal subjects and of patients with heart disease. *Acta Med Scand*. 1920;469-486.
50. Brouwer J, Van den Berg MP, Grobbee DE et al. Diagnostic performance of various QTc interval formulas in a large family with long QT syndrome type 3: Bazett's formula not so bad after all.. *Ann.Noninvasive.Electrocardiol*. 2003;8:269-274.
51. Franz MR. Bazett, Fridericia, or Malik? *Heart Rhythm*. 2008;5:1432-1433.
52. Malik M, Hnatkova K, Schmidt A et al. Accurately measured and properly heart-rate corrected QTc intervals show little daytime variability. *Heart Rhythm*. 2008;5:1424-1431.
53. Tanabe S, Hata T, Hiraoka M. Effects of estrogen on action potential and membrane currents in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1999;277:H826-H833.
54. Hulot JS, Demolis JL, Riviere R et al. Influence of endogenous oestrogens on QT interval duration. *Eur.Heart J*. 2003;24:1663-1667.
55. Nakagawa M, Ooie T, Takahashi N et al. Influence of menstrual cycle on QT interval dynamics. *Pacing Clin.Electrophysiol*. 2006;29:607-613.
56. James AF, Choisy SC, Hancox JC. Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization. *Prog.Biophys.Mol.Biol*. 2007;94:265-319.
57. Kurokawa J, Tamagawa M, Harada N et al. Acute effects of oestrogen on the guinea pig and human IKr channels and drug-induced prolongation of cardiac repolarization. *J Physiol*. 2008;586:2961-2973.
58. Philp KL, Hussain M, Byrne NF et al. Greater antiarrhythmic activity of acute 17beta-estradiol in female than male anaesthetized rats: correlation with Ca²⁺ channel blockade. *Br.J Pharmacol*. 2006;149:233-242.
59. Kadish AH, Greenland P, Limacher MC et al. Estrogen and progestin use and the QT interval in postmenopausal women. *Ann.Noninvasive.Electrocardiol*. 2004;9:366-374.
60. Burke JH, Ehlert FA, Kruse JT et al. Gender-specific differences in the QT interval and the effect of autonomic tone and menstrual cycle in healthy adults. *Am J Cardiol*. 1997;79:178-181.
61. www.qtdrugs.org. 2009.

62. Locati ET. QT interval duration remains a major risk factor in long QT syndrome patients. *J Am.Coll.Cardiol.* 2006;48:1053-1055.
63. Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T et al. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1968;59:632-638.
64. Kalita K, Szymczak S, Kaczmarek L. Non-nuclear estrogen receptor beta and alpha in the hippocampus of male and female rats. *Hippocampus.* 2005;15:404-412.
65. Dauvois S, White R, Parker MG. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci.* 1993;106 (Pt 4):1377-1388.
66. Maruvada P, Baumann CT, Hager GL et al. Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J Biol.Chem.* 2003;278:12425-12432.
67. Claassen S, Schwarzer S, Ludwig J et al. Electrophysiological and fluorescence microscopy studies with HERG channel/EGFP fusion proteins. *J Membr.Biol.* 2008;222:31-41.
68. Huo J, Zhang Y, Huang N et al. The G604S-hERG mutation alters the biophysical properties and exerts a dominant-negative effect on expression of hERG channels in HEK293 cells. *Pflugers Arch.* 2008;456:917-928.
69. Yang HT, Sun CF, Cui CC et al. HERG-F463L potassium channels linked to long QT syndrome reduce I(Kr) current by a trafficking-deficient mechanism. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 2009;36:822-827.
70. Thomas D, Kiehn J, Katus HA et al. Defective protein trafficking in hERG-associated hereditary long QT syndrome (LQT2): molecular mechanisms and restoration of intracellular protein processing. *Cardiovasc.Res.* 2003;60:235-241.
71. Charpentier F, Merot J, Loussouarn G et al. Delayed rectifier K(+) currents and cardiac repolarization. *J Mol.Cell Cardiol.* 2009;
72. Chen J, Sroubek J, Krishnan Y et al. PKA phosphorylation of HERG protein regulates the rate of channel synthesis. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol.* 2009;296:H1244-H1254.
73. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA et al. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol.Rev.* 2006;58:773-781.
74. Hammes SR, Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr.Rev.* 2007;28:726-741.
75. Levin ER. Plasma Membrane Estrogen Receptors. *Trends Endocrinol.Metab.* 2009;20:477-482.
76. Ficker E, Dennis AT, Wang L et al. Role of the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel HERG. *Circ.Res.* 2003;92:e87-100.

77. Baram D, Yonath A. From peptide-bond formation to cotranslational folding: dynamic, regulatory and evolutionary aspects. *FEBS Lett.* 2005;579:948-954.
78. Perrin MJ, Subbiah RN, Vandenberg JI et al. Human ether-a-go-go related gene (hERG) K⁺ channels: function and dysfunction. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 2008;98:137-148.
79. Vasconsuelo A, Milanesi L, Boland R. Participation of HSP27 in the antiapoptotic action of 17beta-estradiol in skeletal muscle cells. *Cell Stress.Chaperones.* 2009;
80. Han G, Ma H, Chintala R et al. Essential role of the 90-kilodalton heat shock protein in mediating nongenomic estrogen signaling in coronary artery smooth muscle. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 2009;329:850-855.
81. Bombardier E, Vigna C, Iqbal S et al. Effects of ovarian sex hormones and downhill running on fiber-type-specific HSP70 expression in rat soleus. *J Appl Physiol.* 2009;106:2009-2015.
82. Xiao L, Xiao J, Luo X et al. Feedback remodeling of cardiac potassium current expression: a novel potential mechanism for control of repolarization reserve. *Circulation.* 2008;118:983-992.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol/l	Mikromol pro Liter
Abb.	Abbildung
Abl.	Ableitung
AK	Antikörper
APD	Aktionspotentialdauer
BGA	Blutgasanalyse
BSA	„Bovine serum albumine“
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Zirka
DMEM	Dulbecco's „Modified Eagle Medium“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
E2	Östrogen (Östradiol)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Östrogenrezeptor
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (Maskulinum); <i>et aliae</i> (Femininum)
FBS	„Fetal Bovine Serum“
FFM	Frankfurt am Main
g	Gramm
g/l	Gramm pro Liter
Gyn	Gynäkologie
Gyn FFM nicht S.	Gynäkologie Frankfurt am Main nicht Schwanger
Gyn FFM Schwanger	Gynäkologie Frankfurt am Main Schwanger
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HEK	„Human embryonic kidney“
HERG	„Human ether à go-go related gene“
HSP27	Hitzeschock Protein 27
HSP70	Hitzeschock Protein 70
HSP90	Hitzeschock Protein 90
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion

IVF	<i>In-vitro</i> -Fertilisation
LH	Luteinisierendes Hormon
LQTS	Langes QT-Syndrom
med.	<i>medicinae</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol/l	Millimol pro Liter
ms	Millisekunden
NDS	„Normal donkey serum“
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
nm	Nanometer
nmol/l	Nanomol pro Liter
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS _s	Selbst hergestellte Phosphatgepufferte Salzlösung
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
pg/ml	Pikogramm pro Milliliter
pmol/l	Pikomol pro Liter
Priv.-Doz.	Privatdozent
Prof.	Professor
QTc	Frequenzkorrigierte QT-Zeit
Sig.	Signifikanz
Std.-Abw.	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
t-Test	Einstichproben t-Test
WH	Wilhelmshaven
\bar{x}	Mittelwert
z. B.	Zum Beispiel

10 Anhang

10.1 Datenbogen klinische Visite



„Hormoneller Einfluss bei langem QT Syndrom“ Datenbogen klinische Visite

Name:

Geburtsdatum:

Patientin / Probandin

Anamnestic Angaben

Anzahl Schwangerschaften:

Anzahl Geburten:

Alter bei erster Schwangerschaft:

Menarche:

Zyklus:

Regelmäßig: Ja Nein

Länge:

Zwischenblutungen: Ja Nein

Medikamente (der letzten 6 Monate):

Regelmäßig:

Bei Bedarf:

Kardiale Ereignisse:

vor Schwangerschaft:

- keine
- Synkope
- überlebter plötzlicher Herztod

während Schwangerschaft:

- keine
- Synkope
- überlebter plötzlicher Herztod

nach Schwangerschaft (4 Wochen)

- keine
- Synkope
- überlebter plötzlicher Herztod

Betablockereinnahme:

Ja Nein

Schilddrüsenerkrankungen:

Ja Nein

Lebererkrankungen:

Ja Nein

Hypertonus:

Ja Nein

Diabetes Mellitus:

Ja Nein

Fettstoffwechselstörung:

Ja Nein

Maligne Erkrankung:

Ja Nein

Thrombose oder Gerinnungsdefekte:

Ja Nein

Arterielle Thrombembolien (Infarkte):

Ja Nein

Nikotin (Zigaretten/d; seit wann):

Alkoholkonsum:

Nie Selten Gelegentlich

Regelmäßig

Keine hormonelle Kontrazeption seit:

Datum:

Cave: keine hormonfreisetzende Spirale
(z.B. Mirena[®], femena[®], NovaT[®])



**„Hormoneller Einfluss bei langem QT Syndrom“
Datenbogen klinische Visite**

Name:

Geburtsdatum:

Patientin / Probandin

Visiten im Rahmen der Studie

I. am 2. /3. Tag der Menstruation

Datum:

Uhrzeit:

RR:

EKG 50mm/s

EKG 25mm/s

Blutentnahme (E'lyte/Hormone)

Besonderheiten (Einnahme von AM):

Nächster Termin:

III. am 12. /13. Tag

Datum:

Uhrzeit:

RR:

EKG 50mm/s

EKG 25mm/s

Blutentnahme (E'lyte/Hormone)

Besonderheiten (Einnahme von AM):

Nächster Termin:

II. am 10. /11. Tag

Datum:

Uhrzeit:

RR:

EKG 50mm/s

EKG 25mm/s

Blutentnahme (E'lyte/Hormone)

Besonderheiten (Einnahme von AM):

Nächster Termin:

IV. am 21. /22. Tag

Datum:

Uhrzeit:

RR:

EKG 50mm/s

EKG 25mm/s

Blutentnahme (E'lyte/Hormone)

Besonderheiten (Einnahme von AM):

Nächster Termin:

10.2 Arbeitsanweisung Lübeck



„Hormoneller Einfluss bei langem QT-Syndrom“ Untersuchungsablauf

Nachdem mit der Patientin Kontakt aufgenommen und der erste Termin vereinbart wurde, sollte zunächst der „Datenbogen klinische Visite“ zusammen durchgearbeitet werden.

1. Datenbogen klinische Visite:

Nachdem Name und Geburtsdatum der Patientin eingetragen worden sind, werden die Punkte des Fragebogens auf Seite 1 abgearbeitet und so genau wie möglich beantwortet.

Auf Seite 2 des Datenbogens sollte nun auch der Name und das Geburtsdatum eingetragen werden. Am ersten Visitentag (wie auch an den folgenden) wird als erstes der betroffene Zyklustag angekreuzt und dann die Untersuchungen durchgeführt. Nachdem „Datum“, „Uhrzeit“ und „RR“ eingetragen wurden, sollte zunächst das EKG geschrieben werden um eine kurze Liegezeit vor der Blutentnahme zu gewährleisten. Wie auf dem Datenbogen vermerkt, sollten zwei 12-Kanal EKGs (eines mit 50 mm/s und einen Rhythmusstreifen mit 25 mm/s) in ausreichender Länge geschrieben werden. Eine rechtseitige Ableitung ist nicht notwendig.

Bei der abschließenden Blutentnahme werden bei der **ersten Untersuchung** folgende Röhrchen abgenommen:

- 2 rote EDTA Röhrchen zur DNA Diagnostik
- 2 weiße Serumröhrchen zur Hormondiagnostik
- 1 schwarze BGA Spritze für die VENÖSE BGA

Bei den **folgenden Untersuchungen** (II, III und IV) wird auf die Abnahme der beiden roten EDTA Röhrchen verzichtet, so dass nur:

- 2 weiße Serumröhrchen zur Hormondiagnostik
- 1 schwarze BGA Spritze für die VENÖSE BGA

abgenommen werden. Es ist zu beachten, die BGA Spritze als letztes abzunehmen und sie so schnell wie möglich von einer BGA-Maschine auswerten und ausdrucken zu lassen (GERINNUNGSGEFAHR!). Am Ende jeder Untersuchung sollte noch nach eventuellen besonderen Vorkommnissen (wie z. B. die Einnahme von Medikamenten) gefragt werden. Ist der nächste Termin bereits vereinbart, kann die Patientin nun entlassen werden.

2. Etiketten:

Nachdem man den Datenbogen sorgfältig ausgefüllt hat und die Patientin gegangen ist, werden nun die entsprechenden Etiketten mit Datum und Uhrzeit versehen. Ein Etikett wird auf den BGA-Ausdruck, eines auf das 50 mm/s EKG und eines auf das 25 mm/s EKG geklebt. Bei der ersten Untersuchung wird jeweils ein Etikett auf ein rotes EDTA Röhrchen geklebt.

Bei den Serumröhrchen kommt es nun darauf an, ob das Serum noch am selben Tag von TNT abgeholt wird und am nächsten Tag zugestellt werden kann. Dies ist der Fall an folgenden Wochentagen jeweils vor 17 Uhr (späteste Abholung!), wenn am darauf folgenden Tag kein FEIERTAG ist:

- MONTAGS
- DIENSTAGS
- MITTWOCHS
- DONNERSTAGS



In diesem Fall kann auf je ein Serumröhrchen ein mit Datum und Uhrzeit versehenes Etikett geklebt werden. Die beiden Serumröhrchen (und eventuell auch die beiden EDTA Röhrchen) werden nun in etwas Zellstoff gewickelt und auf den Boden des „Medpacks“ (das ist das beiliegende Paket für den Transport mit TNT) mit Klebestreifen fixiert. Dazu werden die beiden EKGs und der Ausdruck der BGA-Maschine gelegt und das „Medpack“ verschlossen. Eine Lagerung im Kühlschrank bis zur Abholung ist nicht nötig, wobei eine Lagerung mit direkter Sonneneinstrahlung vermieden werden sollte.

An Freitagen kann das Serum zwar von TNT abgeholt werden, da aber samstags keine MTA in unserem Labor arbeitet, würde hier das Serum länger als 24 Stunden liegen. Die Liegezeit wird auch an Tagen überschritten, auf die ein Feiertag folgt oder an denen eine Abholung nicht (z.B. sonntags) oder nicht mehr (z.B. eine Blutentnahme abends nach 17 Uhr) möglich ist. Ist also abzusehen, dass das Serum nicht innerhalb von 24 Stunden bearbeitet werden kann, MUSS es zentrifugiert werden.

3. Zentrifugieren:

Die beiden Serumröhrchen sollten auf jeden Fall irgendwie markiert werden (z.B. mit einem kleinen Klebestreifen oder einem Aufkleber oder mit Edding) um eine Verwechslung zu vermeiden.

Das Serum sollte 10 min. bei 4000 Umdrehungen/min. zentrifugiert werden und der Überstand (das Serum) dann in ein Transportröhrchen (im Labor gibt es sicher welche) abpipettiert werden. Dieses Transportröhrchen wird nun mit einem Etikett (auch hier wieder mit Datum und Uhrzeit) beklebt und bis zur Abholung (eventuell zusammen mit den roten EDTA Röhrchen) im Kühlschrank gelagert.

Am Tag der Abholung wird mit den Röhrchen genau wie oben beschrieben verfahren. Sie werden in etwas Zellstoff eingewickelt und auf den Boden des „Medpacks“ geklebt. Die beide EKGs und der BGA-Ausdruck werden zugefügt und dann das „Medpack“ bis zur Abholung verschlossen.

4. TNT Abholung:

Die Abholung von TNT sollte spätestens einen Tag vor Abholung mit dem Abholauftragsformular arrangiert werden. Dieses habe ich Ihnen per Email (wie auch andere wichtige Formulare) bereits zugesandt. Am besten speichert man sich einen Vordruck mit der Abholadresse, Kontaktperson und Unterschrift (diese ist ganz am Ende des Dokuments) ab. Es muss dann nur noch das gewünschte ABHOLDATUM und ein ZEITRAUM (ca. 3 Stunden) angegeben werden (im Abholauftrag mit roten Sternchen markiert). Vor dem Abschicken an diese Email Adresse: DE117SAN@tnt.de sollte auf jeden Fall noch am Ende des Abholauftrags das „Datum“ auf das Absendedatum aktualisiert werden. Es sollte dann relativ bald eine Bestätigungsmail von TNT eintreffen. Bei Problemen oder wenn die Bestätigungsmail ausbleiben sollte, kann man unter folgender Telefonnummer: 06074 / 408300 bei TNT um Hilfe bitten. In diesem Fall ist folgende Kundennummer zu nennen: XXXXXXXX (Uniklinik Frankfurt – BITTE VERTRAULICH BEHANDELN!).

Bei irgendwelchen Fragen oder Problemen können Sie jederzeit folgende Handynummer anrufen (Lars Anneken): XXXX XXXXXXXX

10.3 Materialliste

Material/Substanz	Hersteller
15 ml Falconröhrchen	Greiner
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
6-„Well“	Sigma
94x16 Millimeter (mm) Zellkultur Schalen	Greiner
DABCO (1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan)	Sigma
Deckgläschen	Fisherbrand
Dulbecco's „Modified Eagle Medium“ (DMEM)	GIBCO®
Erst-AK: „Anti-flag“ (Hase)	Sigma-Aldrich
Erst-AK: „Anti-HERG-n“ (Ziege)	Santa Cruz
Esel Serum („normal donkey serum“, NDS)	Jackson
Fötale Kälberserum („Fetal Bovine Serum“, FBS)	PAA
Glycerin	ROTH
HERG-DNA	Prof. Michael Sanguinetti ^a
HERG-Mutante R752P-DNA	Prof. Dr. E. Schulze-Bahr ^b
Ibidi µ-„Dish“, 35 mm, „low“ mikroskopier Schalen	Ibidi
L-Glutamin	PAA
E2	Sigma
ER _α -DNA	Dr. David G. Monroe ^c
ER _β -DNA	Dr. David G. Monroe ^c
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences
Rinderserum Albumin („bovine serum albumine“, BSA)	ROTH
Tamoxifen	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	PAA
Tween	AppliChem
Zweit-AK: Esel anti Hase (Alexa Flour 555 nm - rot)	Molecular Probes
Zweit-AK: Esel anti Ziege (Alexa Flour 488 nm - grün)	Molecular Probes

^a von der „University of Utah“; ^b vom Universitätsklinikum Münster; ^c aus der Mayo Klinik

10.4 Herstellerliste

Hersteller	Herstellerinformationen
AppliChem	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fischerbrand	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
GIBCO®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Greiner	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Ibidi	Ibidi GmbH, München, Deutschland
Jackson	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA
Merck	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PAA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Polysciences	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland
ROTH	Carl ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Santa Cruz	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, Deutschland
Sigma	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Molecular Probes	Molecular Probes Inc., Eugene, USA

10.5 DNA-Mengen für die Transfektion

DNA	DNA-Menge
ER _α	0,1 Mikrogramm (µg)
ER _β	0,1 µg
HERG	0,25 µg
R752P	0,25 µg

10.6 Substanzliste PBS_s (PH-Wert 7,4)

Substanz	Menge
KCl	0,2 Gramm pro Liter (g/l)
KH ₂ PO ₄	0,27 g/l
MgCl	0,05 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,42 g/l
NaCl	8 g/l

10.7 Substanzliste Blocklösung

Substanz	Menge
Triton X-100	8 μ l (0,2 %)
BSA	0,2 g (5 %)
NDS	200 μ l (5 %)

11 Danksagung

Natürlich würde ich hier gerne alle Personen namentlich aufführen, die mich in den letzten drei Jahren unterstützt und so das Projekt möglich gemacht haben. Leider würde das den Rahmen komplett sprengen.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. med. Joachim Ehrlich ganz herzlich bedanken, der mich mit seiner Begeisterung für dieses Projekt anstecken konnte. Ich danke ihm auch für die zahllosen fruchtbaren Diskussionen und Hilfestellungen. Herr Ehrlich hatte immer ein offenes Ohr bei Fragen und Problemen und seine Betreuung in den letzten drei Jahren war hervorragend. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch bei Stefan Baumann möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Er war immer bereit mich in diesem Projekt zu unterstützen und sein unermüdlicher Einsatz trug entscheidend zum Gelingen dieses Projektes bei.

Mein Dank gilt auch der ganzen "Wilhelmshaven Fraktion", die an der Grundsteinlegung dieser Arbeit maßgeblich beteiligt waren. Hier zu nennen sind zunächst die Probandinnen, die für diese Studie so viel Freizeit geopfert haben, die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter um Prof. Dr. med. Armin Heisel des Reinhard-Nieter-Krankenhauses und den medizintechnischen Assistentinnen und Assistenten. Sie alle waren bereit, mich auch an Sonn- und Feiertagen zu unterstützen. Nicht zu vergessen sind die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Universitätsklinikums in Lübeck um Priv.-Doz. Dr. med. Hendrik Bonnemeier, der sich sofort für diese Arbeit begeistern ließ.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Priv.-Doz. Dr. med. Inka Wiegratz, ihrem Vorgänger Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Kissler und deren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, die den gynäkologischen Teil der Arbeit ermöglicht haben. Insbesondere Frau Wiegratz war immer bereit, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen und konnte mit ihren Ideen diese Arbeit bereichern. Vor allem aber danke ich auch allen Probandinnen, die sich von mir während der Hormontherapie und der Schwangerschaft begleiten ließen.

Auch bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Kardiologie der Universitätsklinik in Frankfurt am Main und insbesondere Herrn Dr. Hanns Ackermann vom Institut für Biostatistik und mathematische Modellierung möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank geht an die Mitarbeiterinnen des Labors für zelluläre Elektrophysiologie Sabine Harenkamp, Zenawit Girmatsion und Christin-Katrin Schwerthelm, die mich in die Verfahren der Zellkultivierung und Antikörperfärbung einwiesen und mir bei Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Auch Dr. phil. nat. Ina Takac und weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Kardiovaskuläre Physiologie um Prof. Dr. med. Ralf P. Brandes möchte ich ganz herzlich danken. Sie haben mich in die Welt der konfokalen Mikroskopie eingeführt und bei diesem Projekt tatkräftig unterstützt.

Nicht zuletzt gilt mein Dank natürlich meiner Familie, meinen Freunden und vor allem auch meiner Freundin Andrea, die mich während der gesamten Zeit immer unterstützt und zur Korrektur dieser Arbeit beigetragen haben.

12 Curriculum vitae

Persönliche Angaben:

Name: Lars Konrad Anneken
 Geburtsdatum: 06.08.1981
 Geburtsort: Frankfurt am Main
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/1988 – 06/1992 Grundschole in Bad König
 08/1992 – 06/2001 Gymnasium Michelstadt in Michelstadt
 06/2001 Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

Zivildienst:

08/2001 – 06/2002 Zivildienst am Zentrum Gemeinschaftshilfe in Bad König

Studium:

10/2002 – 06/2009 Medizinstudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
 10/2004 Erstes Staatsexamen (Note: gut)
 06/2009 Zweites Staatsexamen (Note: sehr gut)
 08/2009 Approbation

Famulaturen:

Frühjahr 2005 Asklepiosklinik in Langen: Allgemeine Chirurgie
 Sommer 2005 „Universidade Federal Do Ceara“ in Fortaleza, Brasilien:
 Innere Medizin, Kardiologie
 Frühjahr 2006 Gemeinschaftspraxis im Michael-Therapeutikum:
 Allgemeinmedizin, anthroposophische Medizin und
 Naturheilverfahren
 Frühjahr 2007 Universitätsklinikum Frankfurt am Main: Dermatologie

Praktisches Jahr (08/2007-07/2008):

1. Tertial Universitätsklinikum Frankfurt am Main: Anästhesie
 2. Tertial (erste Hälfte) Universitätsklinikum Frankfurt am Main: Innere Medizin
 2. Tertial (zweite Hälfte) „Royal Prince Alfred Hospital“ in Sydney, Australien:
 Innere Medizin
 3. Tertial „Cairns Base Hospital“ in Cairns, Australien: Chirurgie

Promotion:

Promotion an der Goethe-Universität Frankfurt am Main
 Medizinische Klinik III – Kardiologie, Angiologie und Nephrologie
 Direktor: Prof. Dr. med. A. M. Zeiher
 Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Joachim Ehrlich

Frankfurt, den 16.12.2010

Lars Anneken

13 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Hormonelle Regulation der QT-Zeit – Rolle weiblicher Geschlechtshormone unter physiologischen und pathologischen Bedingungen

in der medizinischen Klinik III für Kardiologie, Angiologie und Nephrologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Priv.-Doz. Dr. med. Joachim Ehrlich ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt, den 16.12.2010

Lars Anneken