

**Elektrophysiologische Substrate für Vorhofflimmern:
genetische Prädisposition und erworbene
Veränderungen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Zenawit Girmatsion

aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2010

(D30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als
Dissertation angenommen.

Dekanin: Professor Dr. Anna Starzinski-Powitz

1. Gutachter: Privatdozent Dr. Joachim R. Ehrlich

2. Gutachter: Professor Dr. Jürgen Bereiter-Hahn

eingereicht am: 31.08.2010

Datum der Disputation: 24.01.2011

meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	VORHOFFLIMMERN.....	1
1.1.1	Zelluläre Pathogenese von Vorhofflimmern	3
1.2	LANGES QT-SYNDROM.....	5
1.2.1	Zelluläre Pathogenese des langen QT Syndroms	6
1.2.2	LQT-Syndrom Typ 1	6
1.2.3	LQT-Syndrom Typ 5	7
1.2.4	Jervell und Lange-Nielsen Syndrom.....	7
1.3	BASIS KARDIALER ERREGBARKEIT	8
1.3.1	Der verzögerte Gleichrichterstrom I_{Ks}	10
1.3.2	Die einwärts gleichrichtenden Ströme I_{K1} und I_{KACH}	15
1.4	SYNTHESE UND FUNKTION VON MICRORNA	17
1.4.1	microRNA 1.....	18
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	20
3	METHODEN	22
3.1	SYNTHESE DER KCNE1-KONSTRUKTE.....	22
3.1.1	PCR.....	23
3.1.2	Klonierung	24
3.2	HETEROLOGE EXPRESSION	27
3.2.1	Kultivieren und Passagieren von Zellen.....	27
3.2.2	Transfektion	27
3.3	EXPRESSIONSNACHWEIS	29
3.3.1	Western Blot	29
3.3.2	Konfokale Mikroskopie	31
3.4	IMMUNOPRÄZIPITATION	32
3.5	QUANTIFIZIERUNG VON MRNA UND MIRNA	33
3.5.1	RNA-Isolation.....	33

3.5.2	Reverse Transkription	33
3.5.3	Reverse Transkription für die nachfolgende mRNA-Quantifizierung	33
3.5.4	Reverse Transkription für die nachfolgende miRNA-Quantifizierung	34
3.5.5	Real-time PCR	34
3.6	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	35
3.6.1	Enzymatische Isolierung humaner Kardiomyozyten	35
3.6.2	Aufbereitung der Zellen aus Kultur	35
3.6.3	Patch-Clamp Technik.....	36
3.6.4	Mathematisches Fitten eines Stroms	38
3.7	MEMBRANLOKALISATION	39
3.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	40
4	ERGEBNISSE	41
4.1	GENETISCHE PRÄDISPOSITION: DER N-TERMINUS DER β-UNTEREINHEIT KCNE1.....	41
4.1.1	Synthese der KCNE1-Konstrukte	41
4.1.2	Nachweis der Konstrukte, Auswahl der Antikörper	42
4.1.3	Expressionsnachweis	45
4.1.4	Quantifizierung der Expression.....	46
4.1.5	Co-Immunopräzipitation.....	49
4.1.6	Elektrophysiologische Untersuchungen.....	50
4.1.7	Lokalisation der Ionenkanalproteine.....	57
4.1.8	Zusammenfassung.....	63
4.2	ERWORBENE VERÄNDERUNGEN: HERAUFREGULATION DER EINWÄRTS GLEICHRICHTENDEN STRÖME I_{K1} UND $I_{KACH,C}$	64
4.2.1	Patientencharakteristika	64
4.2.2	Elektrophysiologische Untersuchungen.....	65
5	DISKUSSION.....	77
5.1	GENETISCHE DISPOSITION FÜR VORHOFFLIMMERN: ROLLE DER β-UNTEREINHEIT KCNE1	77
5.1.1	Struktur und Funktion der β -Untereinheit KCNE1	77

5.1.2	N-Terminus beeinflusst Transport oder Verankerung an Plasmamembran	81
5.1.3	KCNE-Familie	85
5.1.4	Kinetik des I_{Ks}	87
5.1.5	physiologische Implikationen	88
5.1.6	Evolutionärer Vorteil durch SNP 38 G/S?	91
5.2	ERWORBENE VERÄNDERUNGEN: HERAUFREGULATION VON I_{K1} UND $I_{KACH,C}$	91
5.2.1	Regulation einwärts gleichrichtender Ströme bei VHF – Stand der Forschung	91
5.2.2	Ergebnisse dieser Arbeit	92
5.2.3	Die Rolle der microRNA 1 in der Arrhythmogenese	93
5.2.4	Einwärts gleichrichtende Ströme tragen zur Erhaltung von Vorhofflimmern bei	93
5.2.5	Regionale Unterschiede im Herzen	94
6	ZUSAMMENFASSUNG	96
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	99
8	ANHANG	103
8.1	MATERIAL	103
8.1.1	Zelllinien	103
8.1.2	Bakterienkultur	103
8.1.3	Patientenmaterial	103
8.1.4	Primersequenzen	103
8.1.5	Versuchsansätze zur Klonierung	107
8.1.6	Versuchsansätze zur Realtime-PCR	108
8.1.7	Puffer	109
8.1.8	Chemikalien	115
9	LITERATURVERZEICHNIS	120
	DANKSAGUNG	141
	PUBLIKATIONEN	142
	LEBENS LAUF	143

1 Einleitung

1.1 Vorhofflimmern

Vorhofflimmern (VHF) ist eine sehr häufige atriale Rhythmusstörung mit beträchtlichem Einfluss auf Morbidität, Mortalität und entsprechend auch Kosten im Gesundheitswesen¹. Insgesamt sind in der westlichen Welt etwa 0,5% der erwachsenen Bevölkerung von VHF betroffen, bei den über 70jährigen sind es bis zu 10%^{2,3}. VHF ist typischerweise eine Erkrankung, die mit höherem Lebensalter einhergeht und oftmals liegt eine kardiale, strukturelle Vorerkrankung zugrunde. Entsprechend handelt es sich meist um eine erworbene Krankheit. In seltenen Fällen tritt sie jedoch als eine genetische, familiär gehäufte Erkrankung auf. Die Ursache solcher Fälle sind Mutationen und Einzelnukleotidpolymorphismen („single nucleotide polymorphism“, SNP) verschiedener Ionenkanal- und Nicht-Ionenkanal-Gene, die über eine Beeinflussung der elektrischen Eigenschaften des Herzens mit erhöhter VHF-Inzidenz assoziiert wurden. Inwieweit Inzidenz und Prävalenz von VHF wirklich durch genetische Determinanten bestimmt wird, ist unbekannt.

Die Arrhythmie zeichnet sich durch schnelle, irreguläre atriale Aktivität und in der Folge durch gestörte bis völlig fehlende Kontraktion des Atriums aus. Im Oberflächen-Elektrokardiogramm (EKG) fehlen entsprechend die P-Wellen. Die Kammeraktivierung ist ebenfalls unregelmäßig⁴. Die Arrhythmie geht mit ausgeprägten elektrophysiologischen, kontraktile sowie strukturellen Veränderungen des Atriums einher. Dieser Vorgang wird als „Remodeling“ bezeichnet. Diese durch die Krankheit erzeugten Veränderungen verhelfen wiederum zu einer Festigung des eigenen Aufrechterhalts^{5,6}.

Der flimmernde Vorhof hat eine stark erhöhte Aktivierungsfrequenz. Dadurch kann sich die intrazelluläre (insbesondere diastolische) Kalziumkonzentration bis um das 10fache erhöhen, was eine Bedrohung für die zelluläre Lebensfähigkeit darstellt⁷. Hierauf setzt ein natürlicher Schutzmechanismus ein, der eine biophysikalische Inaktivierung der Kalziumkanäle bewirkt. Es kommt zu einer Reduktion des anhaltenden Kalziumstromes ($I_{Ca,L}$)⁸. Bei hoher Aktivierungsfrequenz über einen längeren Zeitraum können Änderungen auf transkriptioneller Ebene beobachtet werden.

Die Expression der mRNA der α -Untereinheit des Kalziumkanals wird vermindert⁹⁻¹², was entsprechend zu einer Verminderung des $I_{Ca,L}$ führt¹²⁻¹⁵. Neuere Hinweise sprechen auch für eine Herunterregulierung des $I_{Ca,L}$ durch Proteinphosphatasen¹⁶. Diese Mechanismen wirken der Überladung der Zelle durch Kalzium entgegen, allerdings führt der verminderte Kalzium-Stromfluss in der Plateauphase zu der Verkürzung des Aktionspotentials¹³. Die Kaliumionenkanäle unterliegen ebenfalls Veränderungen der Expression. Es ist eine Reduktion des transienten I_{to} ¹³ sowie die Erhöhung der einwärts gleichrichtenden Ströme I_{K1} und I_{KACH} ^{15,17,18} zu beobachten. Auch die Connexine, von Bedeutung für die interzelluläre Erregungsleitung, sind VHF-induzierten Veränderungen unterworfen. Die Vorhöfe weisen insbesondere die beiden Connexine Cx40 und Cx43 auf¹⁹. Studienergebnisse hinsichtlich der ‚Remodeling‘-Vorgänge der Connexine in humanen Vorhöfen sind jedoch widersprüchlich. Polontchouk *et al.* konnten bei VHF eine erhöhte Expression des Proteins Cx40 verzeichnen, jedoch keine Veränderung bei Cx43. Außerdem war eine erhöhte Lateralisation beider Connexine zu beobachten, welche zur anisotropen Pulsweiterleitung beitragen könnte²⁰. Andere Arbeiten zeigten hingegen eine Reduktion von Cx40 und Cx43^{21,22}.

Längerfristiges VHF bewirkt auch strukturelle Veränderungen²³. In einer Tierstudie konnten Ausma *et al.* zeigen, dass Veränderungen der zellulären Substruktur die Folge von VHF waren. Unter anderem war ein Verlust von Myofibrillen zu beobachten, eine Akkumulation von Glykogen, eine Veränderung von Form und Größe der Mitochondrien, eine Fragmentierung des sarkoplasmatischen Retikulums und die Dispersion des nuklearen Chromatins. Weitere Studien konnten außerdem eine Dilatation der Atrien verzeichnen^{24,25}. Eine besondere Rolle für den Erhalt der Rhythmusstörung spielt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System²⁶. Das ‚Angiotensin converting enzyme‘ (ACE) zeigt bei VHF eine erhöhte Expression in den Atrien^{27,28}. Dies hat einen Anstieg an Angiotensin II zur Folge, und damit auch die erhöhte Aktivierung der extrazellulären Signal-regulierten Kinasen Erk1 und Erk2. Diese sind wiederum verantwortlich für die Induktion von Zelldifferenzierungsprozessen und die Aktivierung von Fibroblasten, die die Entwicklung interstitieller Fibrose verursachen²⁹⁻³². Auch Aldosteron kann atriale Fibrose hervorrufen³³ und ist bei VHF heraufreguliert³⁴. Die atriale Fibrose stellt ein pathophysiologisches Substrat für VHF dar³⁵.

1.1.1 Zelluläre Pathogenese von Vorhofflimmern

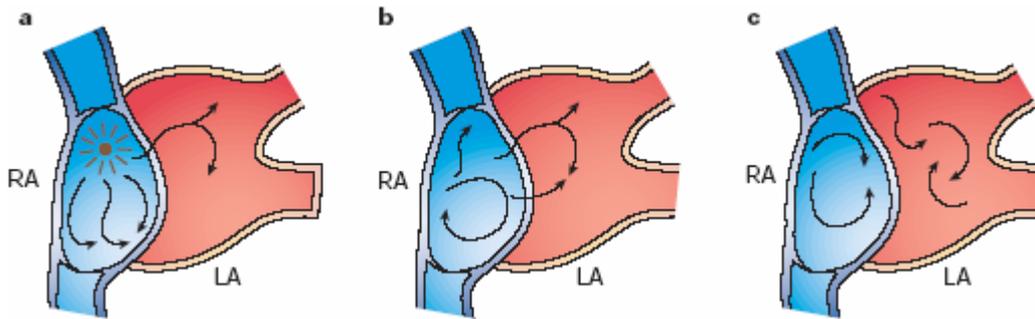


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Pathogenese von VHF (nach Nattel, mit Genehmigung)⁶. VHF-Entstehung durch einen ektopischen Fokus (a), durch eine einzelne kreisende Erregung („Reentry“) (b), durch mehrere funktionelle „Reentry“-Kreise (c). RA – rechtes Atrium; LA – linkes Atrium

Abb. 1.1 gibt drei relevante hypothetische Modelle der VHF-Entstehung und -Aufrechterhaltung wieder. Alle Hypothesen können in spezifischen klinischen Zuständen bei Patienten oder experimentell im Ganztier-Versuch nachgewiesen werden. Abb. 1.1 (a) zeigt das Modell eines einzelnen atrialen ektopischen Fokus. Dieser ist der primäre Generator eines elektrischen Impulses, der durch die refraktoren Eigenschaften des Gewebes zu einer ungleichmäßigen Erregungsausbreitung führt, weil unterschiedliche Anteile der Vorhöfe mit unterschiedlicher Frequenz folgen können. Hierbei entsteht ungeordnete Aktivierung der gesamten Vorhöfe durch regional unterschiedliche Impulsleitungsfähigkeiten. Ein typisches klinisches Beispiel hierfür ist die Tatsache, dass in den frühen Formen eines anfallsweise auftretenden VHF bei Patienten mit wenig struktureller Herzkrankheit häufig die Pulmonalvenen als Fokus für die Erregungsentstehung dienen. Das zweite Modell (b) sieht einen einzelnen sich selbst erhaltenden „Reentry“-Kreis als Ursache. Solche Veränderungen können bei Patienten mit Herzmuskelschwäche beobachtet werden. Das dritte Modell beschreibt multiple funktionelle „Reentry“-Kreise. Deren Entstehung liegt vor allem in abnormaler atrialer Repolarisation begründet⁶. Dies ist die Endstrecke nahezu allen VHF, da mit längerer Dauer des Bestehens der Arrhythmie die zelluläre Aktionspotentialdauer abnimmt und hierdurch das zeitgleiche Bestehen der kreisenden Erregungen in einer räumlich begrenzten Fläche ermöglicht wird.

Zum Verständnis der multiplen ‚Reentry‘-Kreise haben insbesondere Arbeiten von Gordon K. Moe großen Beitrag geleistet³⁶. In den siebziger und achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts konnten weitere Arbeiten diese These stützen und das Verständnis vertiefen^{37,38}. Hierbei wurde insbesondere das Konzept der ‚Wellenlänge des ‚Reentry‘-Kreises‘ vorgestellt, wobei die Wellenlänge als die von dem elektrischen Impuls innerhalb einer Refraktärphase zurückgelegte Distanz definiert ist. Sie ist das Produkt aus Refraktärzeit und Erregungsleitungsgeschwindigkeit. Wenn die Weglänge kleiner als die Wellenlänge des potentiellen Kreises ist, dann kehrt der Impuls noch während der Refraktärzeit an seinen Startpunkt zurück. Das Gewebe ist dann noch nicht wieder erregbar und die Erregungsleitung wird gestoppt. Nach der These von Allesie *et al.* entsteht ein ‚Reentry‘, wenn die Weglänge größer oder gleich der Wellenlänge ist. Hierbei wird ein ohne anatomisches Leitungshindernis entstehendes ‚Reentry‘ beschrieben. Die Zahl der daraufhin auftretenden Erregungswellen wird durch die Größe des Atriums und der Wellenlänge des ‚Reentry‘-Kreises bestimmt. Je kleiner die Wellenlänge, desto kleiner der ‚Reentry‘-Kreis, desto größer die mögliche Zahl der ‚Reentry‘-Kreise³⁷. Dies gilt analog für eine zunehmende Vergrößerung der Vorhöfe. Diese ist zudem eine typische strukturelle Konsequenz aus bereits länger bestehendem VHF.

Ergebnisse aus Untersuchungen der letzten Jahre widersprechen dieser Theorie zumindest teilweise. So konnte die optische Kartierung in Schafherzen einen primären Generator des VHF zeigen, bestehend entweder aus einem ektopischen Fokus oder einem einzelnen kleinen ‚Reentry‘-Kreis^{39,40}. Ergebnisse einer weiteren Tierstudie zu Myokardinsuffizienz zeigten, dass ein einzelner Reentry-Kreis VHF aufrechterhielt^{41,42}. Es ist also möglich, dass alle drei Modelle der Erregungsleitung bei VHF auftreten.

Es scheint, dass dem linken Atrium als VHF-Generator eine besondere Rolle zukommt^{39,40,43}. Ein Indiz für diese Prädominanz sind elektrophysiologische Unterschiede zwischen den beiden Atrien, die eine kürzere linksatriale Refraktärphase zur Folge haben, wie etwa die erhöhte Proteinexpression der I_{KACH} -Untereinheiten im linken Atrium⁴⁴. Dies kann ein ‚Reentry‘ begünstigen⁴⁵. Weiteren Stellenwert weist das linke Atrium durch die Einmündung der Pulmonalvenen auf⁴⁶. Haissaguerre *et al.* fanden hier in einer bahnbrechenden klinischen Arbeit einen prädisponierten Entstehungsort für VHF⁴⁷.

1.2 Langes QT-Syndrom

Das lange QT-Syndrom (LQT-Syndrom) ist eine schwere episodische Erkrankung, die überwiegend auf erblichen Defekten von Ionenkanälen beruht, aber auch erworben sein kann⁴⁸. Das Syndrom zeichnet sich im EKG durch ein verlängertes QT-Intervall aus, das seine Ursache in einer gestörten Repolarisation des ventrikulären Aktionspotentials hat (Abb. 1.2 A). Das QT-Intervall beschreibt den Zeitraum zwischen De- und Repolarisation der Herzkammern. Die Dauer des Intervalls ist frequenzabhängig, weshalb Angaben in frequenzkorrigierter QT-Zeit (QTc) gemacht werden. Dieser Wert kann beispielsweise anhand der Formel von Bazett ($QTc = QT/[RR]^{1/2}$) ermittelt werden⁴⁹. (RR steht hier für den RR-Abstand.) Ein QT-Intervall gilt bei Frauen ab einer QTc von 470 ms und bei Männern ab 450 ms als abnorm verlängert⁵⁰.

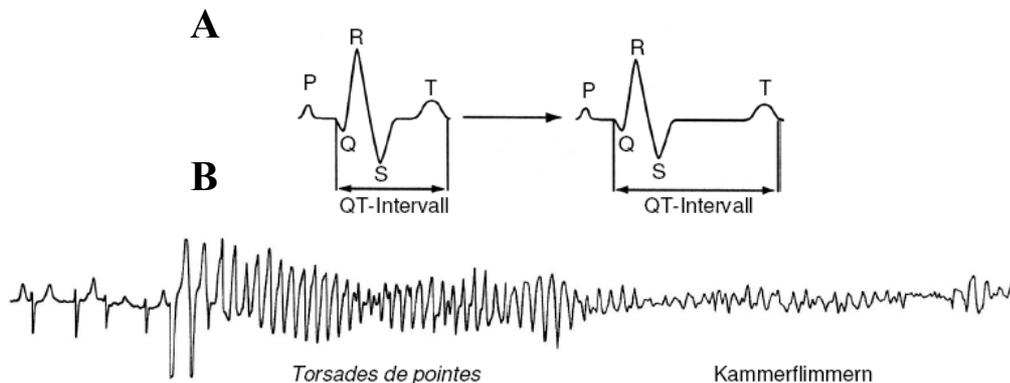


Abb. 1.2: LQT-Syndrom und ‚Torsades de pointes‘. A zeigt links das Schema eines normalen EKGs, rechts ein EKG mit einem verlängerten QT-Intervall. B stellt ein EKG bei Ausbruch von ‚Torsades de pointes‘ dar. Diese degenerieren zu einem Kammerflimmern. P – atriale Depolarisation; PQ – atrioventrikuläre Weiterleitung; QRS – ventrikuläre Depolarisation; ST – Plateau; T – ventrikuläre Repolarisation.

Typisch für dieses Krankheitsbild ist das Auftreten von sogenannten ‚Torsades de pointes‘-Tachykardien (‚Spitzenumkehrtachykardien‘). Hierbei handelt es sich um polymorphe Kammertachykardien; der QRS-Komplex dreht sich um die isoelektrische Achse des EKGs⁵¹. Die ‚Torsades de pointes‘ können in Kammerflimmern degenerieren, was einen funktionellen Herzstillstand und somit den Tod zur Folge hat, sofern nicht therapeutisch eingegriffen wird^{52,53} (Abb. 1.1 B). Oftmals provoziert besonders ausgeprägte Aktivität des sympathischen Nervensystems solche Arrhythmien und kann selbst bei jungen und ansonsten insbesondere strukturell herzgesunden Menschen zu Bewusstseinsverlust und plötzlichem Tod führen⁵¹. Das erbliche LQT-

Syndrom ist, nach dem Locus des jeweiligen Gendefekts, in 12 Subtypen unterteilt (Tab. 1.1)⁵⁴.

1.2.1 Zelluläre Pathogenese des langen QT Syndroms

Tab. 1.1: Hereditäre Subtypen des LQT-Syndroms beim Menschen⁵⁴

Syndrom	Genlocus	Gen	Genprodukt	Relative Häufigkeit
LQTS 1	11p15.5	KCNQ1 (KvLQT1)	α -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks}	40–55%
LQTS 2	7q35-36	KCNH2 (HERG)	α -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Kr}	35–45%
LQTS 3	3p21-24	SCN5A (NaV1.5)	α -Untereinheit des Natriumkanals I_{Na}	2–8%
LQTS 4	4q25-27	ANKB (ANK2)	Ankyrin-B	< 1%
LQTS 5	21q22.1-22.2	KCNE1 (minK)	β -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks}	< 1%
LQTS 6	21q22.1	KCNE2 (MiRP1)	β -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Kr}	< 1%
LQTS 7	17q23	KCNJ2 (Kir2.1)	α -Untereinheit des Kaliumkanals I_{K1}	< 1%
LQTS 8	12p13.3	CaCNA1c	α -Untereinheit des Kalziumkanals $I_{Ca,L}$	< 1%
LQTS 9	3p25	Caveolin 3	Membran-Strukturprotein	< 1%
LQTS 10	11q23.3	SCN4B	β -Untereinheit des Natriumkanals I_{Na}	< 0,1%
LQTS 11	7q21-q22	ACAP9	A-Kinase Ankerprotein Yotiao	< 0,1%
LQTS 12	20q11.2	SNTA1	Syntrophin, Natriumkanal, $I_{Na,late}$	< 0,1%

1.2.2 LQT-Syndrom Typ 1

LQT-1 ist mit etwa 40-55% der Fälle die häufigste Form der Krankheit⁴⁸. Es konnte 1991 erfolgreich dem kurzen Arm des Chromosoms 11 zugeordnet werden⁵⁵. Das Gen KCNQ1 kodiert für die α -Untereinheit des verzögerten Gleichrichterstroms I_{Ks} ^{56,57}.

Die meisten der Krankheit zugrunde liegenden Punktmutationen befinden sich um die Porenregion des Kanals herum, wobei allerdings auch N- und C-terminal lokalisierte Mutationen beschrieben sind. Es handelt sich um ‚loss-of-function‘-Mutationen, die sich meist durch reduzierte Stromdichten und Minderung der Aktivität auszeichnen⁴⁸. Oftmals tritt ein gestörter intrazellulärer Transport der Ionenkanal-Proteine auf, oder die biophysikalischen Eigenschaften der Ströme werden abnorm verändert. Weiterhin können Mutationen zu vorzeitigem Abbruch der Proteinkette oder einem so genannten ‚frame-shift‘ führen, was dann ein stark pathologisch verändertes Ionenkanal-Protein zur Folge hat, welches oftmals durch die intrazelluläre Qualitätskontrolle der Proteinsynthese gar nicht an die Membran gelangen kann.

1.2.3 LQT-Syndrom Typ 5

Nach der Entdeckung, dass es sich bei KCNE1 um die β -Untereinheit des I_{Ks} handelt^{56,57}, wurde das Gen auf bislang nicht zugeordnete LQT-Syndrome untersucht. Es wurde als weiterer Locus definiert⁵⁸. Es wurden schwerwiegende Effekte vor allem von Mutationen erwartet, die eine Assemblierung der beiden Untereinheiten stören würden. Allerdings konnten auch in anderen Bereichen liegenden Mutationen drastische Veränderungen des Stroms zugeordnet werden^{58,59}.

1.2.4 Jervell und Lange-Nielsen Syndrom

Mutationen in beiden Untereinheiten des I_{Ks} , KCNQ1 und KCNE1, konnten als Ursache für das Jervell und Lange-Nielsen Syndrom verantwortlich gemacht werden^{60,61}. Es handelt sich hierbei um eine autosomal rezessiv erbliche Erkrankung, die mit einem verlängerten QT-Intervall und – der I_{Ks} wird auch in der *Stria vascularis* des Innenohrs exprimiert⁶² – angeborener Taubheit assoziiert ist⁶³. Taubheit tritt scheinbar nur bei nahezu vollem Funktionsausfall des I_{Ks} auf. Es ist eine seltene Krankheit, die bei weniger als 1% gehörloser Kinder diagnostiziert wird⁶².

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit elektrophysiologischen Veränderungen bei VHF. Sowohl erworbene Veränderungen als auch genetisch prädisponiertes Auftreten der Krankheit wurden dabei beleuchtet. In beiden Fällen war das Hauptaugenmerk auf

Kaliumionenkanäle des Herzens gerichtet. Zum näheren Verständnis soll im nächsten Abschnitt näher auf die Erregungsleitung des Herzens eingegangen werden.

1.3 Basis kardialer Erregbarkeit

Kardiomyozyten weisen als herausragendes elektrophysiologisches Merkmal erregbare Zellmembranen auf, welche durch ein Kalium-Ruhemembranpotential bei einer Spannung zwischen -70 (Vorhof-) und -90 mV (Ventrikulmyokard) gehalten werden. Dieses Ruhemembranpotential wird im Wesentlichen durch den sogenannten I_{K1} (den einwärts gleichrichtenden Kaliumstrom) aufrechterhalten. Im Rahmen einer elektrischen Erregung ruft der Natrium-Einstrom eine rasche Depolarisation hervor. Durch eine fein abgestimmte Sequenz der Aktivierung von Ionenströmen, welche auch die elektromechanische Kopplung unterstützt, wird die depolarisierte Zellmembran zum Ruhestand zurück gebracht.

Neben depolarisierendem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, wird die Dauer des Aktionspotentials vor allem von dem auswärts gerichteten, verzögert gleichrichtenden Kaliumstrom I_K ⁶⁴ bestimmt. Dieser besteht aus den Komponenten I_{Kur} , die nur atrial exprimiert wird, I_{Kr} und I_{Ks} . Die drei Kaliumströme unterscheiden sich in ihren molekularen, pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften und tragen zudem zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Aktionspotentials zur Repolarisation bei, teilweise ist auch eine regionale Heterogenität zu beobachten. Der Strom I_{Kur} ist die sehr schnelle („ultrarapid“) Komponente des verzögerten Gleichrichterstrom-Systems. Er ist nahezu instantan und hat nach extrem kurzer Zeit die maximale Aktivität erreicht^{65,66}. Der Strom bleibt aber bis in die Endphase der Repolarisation konstant und inaktiviert dann abrupt (Abb. 1.3).

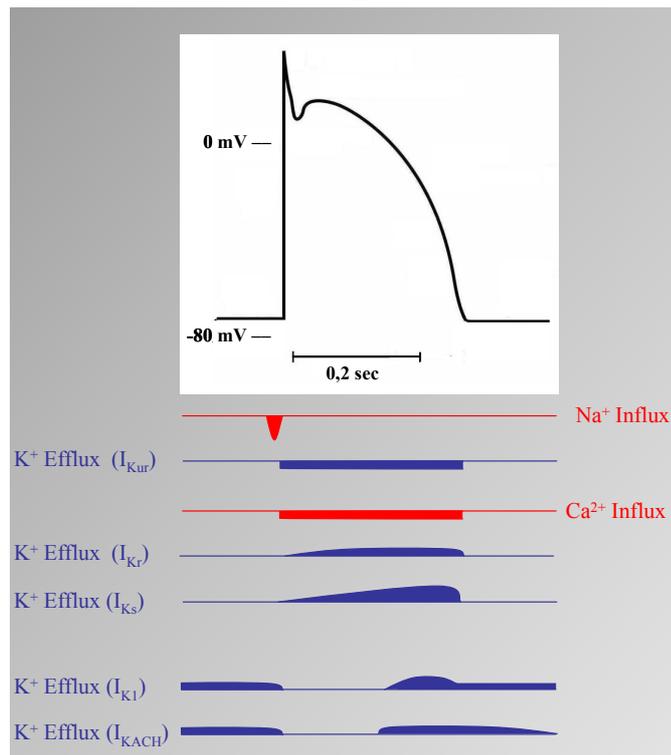


Abb. 1.3: Stark vereinfachtes Schema eines Aktionspotentials und den an Depolarisation und Repolarisation beteiligten Ionenströmen. I_{Kur} stellt die sehr schnelle („ultrarapid“) Komponente des verzögerten auswärts gleichrichtenden Kaliumstroms dar. Diese Komponente ist nur atrial exprimiert. I_{Kr} ist die schnelle, I_{Ks} die langsame Komponente des verzögerten Gleichrichterstroms. I_{K1} und I_{KACh} sind einwärts gleichrichtende Kaliumströme. I_{KACh} ist ebenfalls nur atrial exprimiert.

Er kann durch das sympathische Nervensystem stimuliert werden⁶⁷. Der I_{Kr} stellt die schnelle („rapid“) Komponente der verzögerten Gleichrichterströme dar und ist sowohl atrial als auch ventrikulär exprimiert. Er erreicht sein Aktivitätsmaximum relativ schnell (bei -10 mV in < 200 ms)⁶⁸ und inaktiviert rasch (bei -85 mV in < 25 ms)⁶⁹. Der I_{Kr} wird nicht β -adrenerg stimuliert⁷⁰. Der I_{Ks} , der langsame („slow“) verzögerte Gleichrichterstrom, setzt etwa zur selben Zeit wie die anderen I_K -Ströme ein, erreicht aber die maximale Aktivität erst viel später zur Phase der terminalen Repolarisation. Die Dauer der Aktivierung liegt hier im Sekundenbereich⁷¹. Auch die Deaktivierung verläuft langsamer (bei -85 mV 135 ms)⁷². Der Strom zeichnet sich außerdem durch fehlende Inaktivierung aus⁷³. Er nimmt unter β -adrenerger Stimulation zu⁶⁷ und stellt damit als Antagonist zum Kalzium-Einstrom einen wichtigen Beitrag zur Herzfrequenz-abhängigen Verkürzung der Aktionspotentialdauer dar.

Die einwärts gleichrichtenden Ströme I_{K1} und I_{KACH} wirken hauptsächlich vor und nach dem Aktionspotential. Ihre Aufgabe ist es, das Ruhepotential der Membran zu erhalten; sie tragen zur Schlussphase der Repolarisation bei^{67,74}.

Dem I_{Ks} kommt vor allem bei durch genetische Prädisposition hervorgerufenen Arrhythmien eine Rolle zu. So ist dieser Strom mit den LQT-Syndromen 1 und 5 assoziiert und auch die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit einem Einzelnukleotidpolymorphismus, der in der β -Untereinheit des Ionenkanals entdeckt wurde. Der folgende Abschnitt befasst sich daher mit den Eigenschaften des I_{Ks} , seiner Zusammensetzung und der β -Untereinheit KCNE1.

1.3.1 Der verzögerte Gleichrichterstrom I_{Ks}

Der langsame, verzögerte Gleichrichterstrom I_{Ks} wird von einem Proteinkomplex bestehend aus KCNQ1 und KCNE1 konstituiert^{56,57}. Die α -Untereinheit KCNQ1 besteht aus sechs transmembranären Domänen (TMD)⁷⁵. Ein Homotetramer aus KCNQ1-Proteinen bildet die Pore des Ionenkanals (Abb. 1.4). Roderick MacKinnon wurde im Jahr 2003 für seine Arbeiten zur Aufklärung dieser Strukturen mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Zwischen den TMD 5 und 6 befindet sich ein der Pore zugewandter ‚loop‘. Dieser Aufbau ist in allen spannungsgesteuerten Kaliumionenkanälen erhalten geblieben^{76,77}. Ebenso konserviert ist die in der Porenregion enthaltene Sequenz TXG^Y/P^G⁷⁵. Die Aufgabe dieser Struktur ist es, die Größe der durchtretenden Ionen mit ihrer Hydrathülle zu beschränken. Sie stellt damit die strukturelle Voraussetzung für die Kalium-Selektivität der Kanäle dar⁷⁸. Die TMD 4 der spannungsgesteuerten Kaliumionenkanäle weist viele positiv geladene Aminosäuren an ihrer Oberfläche auf und fungiert als Spannungssensor^{79,80}.

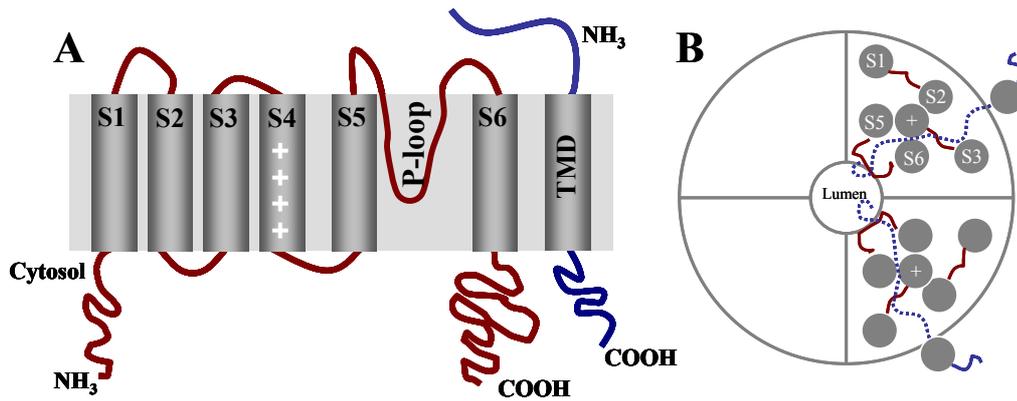


Abb. 1.4: A zeigt eine schematische Ansicht des Proteinkomplexes KCNQ1 und KCNE1 in der Plasmamembran. B zeigt eine schematische Kopfansicht des KCNQ1/KCNE1-Komplexes: Ein Homotetramer aus KCNQ1-Proteinen. Die transmembranären Domänen des KCNQ1 sind in grau dargestellt. Das ‚+‘ bezeichnet das spannungssensitive Segment. Die blau gestrichelte Linie indiziert KCNE1. S – Segment, TMD – transmembranäre Domäne

Die β -Untereinheit KCNE1 moduliert die biophysikalischen Eigenschaften der α -Untereinheit. Zwar ist die genaue Zusammensetzung des Proteinkomplexes noch umstritten, allerdings wird vermutet, dass sich ein KCNQ1-Tetramer mit zwei KCNE1-Peptiden zusammensetzt^{59,81}. Die Assoziation mit KCNE1 führt zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften des Ionenkanals. So aktiviert der I_{Ks} erst bei stärker depolarisiertem Membranpotential als ein aus KCNQ1 α -Untereinheiten allein bestehender Ionenkanal. Die Aktivierung des I_{Ks} ist im Vergleich stark verlangsamt und der resultierende Strom weist eine höhere Stromdichte auf als das KCNQ1-Tetramer^{56,57} (Abb. 1.5), was dadurch bedingt ist, dass die Inaktivierung des KCNQ1-Kanals durch die Assemblierung mit KCNE1 unterdrückt wird^{82,83}.

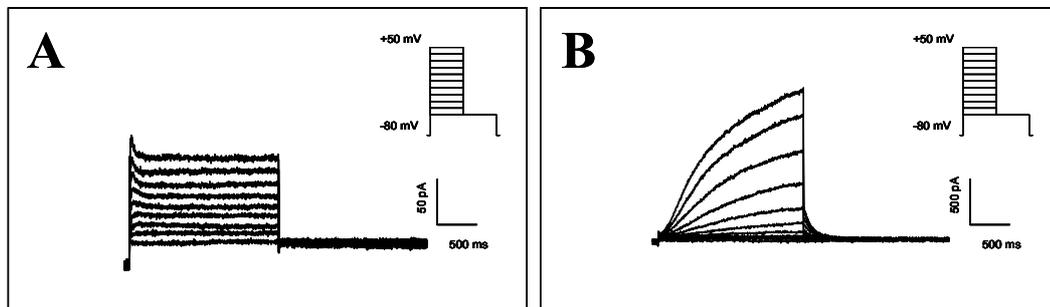


Abb. 1.5: Beispielströme, die mittels ‚Patch-clamp‘-Technik registriert wurden. A zeigt den Strom einer mit KCNQ1 transfizierten CHO-Zelle, B den Strom einer mit KCNQ1 und KCNE1 transfizierten CHO-Zelle. Die Ströme wurden mithilfe des in beiden Bildern rechts oben abgebildeten Spannungsprotokolls abgeleitet.

Auch pharmakologische Eigenschaften veränderten sich unter dem Einfluss des KCNE1. Es konnte eine höhere Empfindlichkeit gegen die Hemmstoffe 293B, Azimilid und 17- β -Östradiol und auch gegen die Stimulanzen Mefenaminsäure und 4,4'-Diisothiocyano-stilben-2,2'-Disulphonsäure (DIDS) festgestellt werden⁸⁴.

I_{Ks} wird auf vielfältige Weise reguliert. So wird er durch cAMP-abhängige Phosphorylierungen am N-Terminus des KCNQ1 aktiviert⁸⁵. Hierzu ist ein weiteres Peptid notwendig. Dieses trägt den Namen ‚Yotiao‘ und ist ein sogenanntes ‚A-kinase anchoring protein‘. Es koppelt Proteinphosphatasen und die Proteinkinase A an den Ionenkanalkomplex^{85,86}. Der Komplex wird zudem durch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) modifiziert^{87,88}. Schließlich hängt die Aktivierung des I_{Ks} von Temperatur und intrazellulärer Kalziumkonzentration ab⁸⁹⁻⁹¹.

Die Proteinuntereinheiten des I_{Ks} werden auch in anderen Geweben exprimiert^{57,62,92}. Neben dem Herzen stellt das Innenohr einen weiteren wichtigen Ort der Proteinexpression dar. Der I_{Ks} reguliert dort die Kaliumkonzentration der Endolymphe^{93,94}.

1.3.1.1 β -Untereinheit KCNE1

KCNE1 wurde 1988 erstmals aus der Rattenniere kloniert. Es erhielt zunächst den Namen minK („minimal K^+ “) aufgrund der irrtümlichen Annahme, es könne trotz seiner nur eine transmembranäre Domäne umfassenden Struktur alleine einen eigenen Strom produzieren⁹². Etwas später gelang es, das humane Gen zu klonieren⁹⁵. Es befindet sich auf dem Chromosom 21q22.1-q22.2 und besteht aus 3 Exons⁹⁶. KCNE1 ist ein Typ 1 Membranprotein mit 129 Aminosäuren und einer transmembranären Domäne⁹⁷ (Abb. 1.4, Abb. 1.6). Es wird unter anderem im Herzen, im Innenohr sowie in der Niere exprimiert^{57,62,92}.

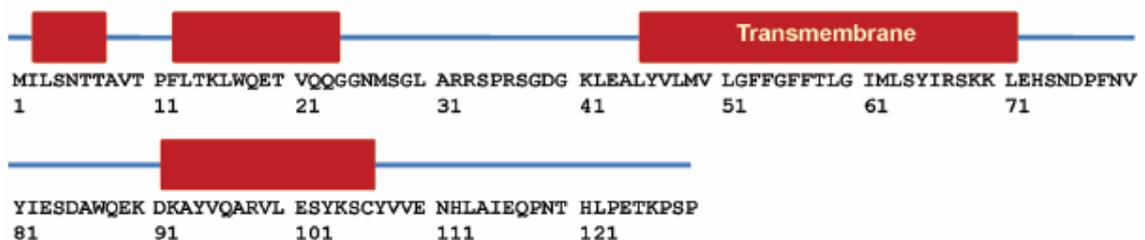


Abb. 1.6: Aminosäuresequenz des humanen KCNE1-Proteins. Helikale Strukturen sind rot gekennzeichnet (nach Kang *et al.*, mit Genehmigung)⁹⁸.

Es wird vermutet, dass der C-Terminus des KCNE1 mit anderen Proteinen, die selbst nicht Teil eines Ionenkanals sind, interagiert⁹⁹. Dem C-Terminus wird aber auch eine Rolle bei der Modulation der α -Untereinheit zugeschrieben; unter anderem scheint er für die fehlende Inaktivierung des I_{Ks} von Bedeutung zu sein^{58,100}.

Viele der modulierenden Eigenschaften werden in der TMD von KCNE1 vermutet^{101,102}. Nach einem Modell von Kang *et al.* sitzt das intrazelluläre Ende der TMD im geschlossenen Zustand des Kanals an der Verbindung zwischen dem Spannungssensor und der Pore von KCNQ1⁹⁸ (Abb. 1.4). Es wird weiterhin vermutet, dass die TMD von dort auf die Helix von S6 des KCNQ1 ‚drückt‘ und so den Kanal im geschlossenen Zustand hält^{103,104}. Das Modell stellt KCNE1 in einer gebogenen Form dar, die es möglich macht, dass das andere Ende der TMD gleichzeitig mit einem anderen Teil der α -Untereinheit interagiert. So ergibt sich zwischen den beiden Peptiden eine große Berührungsfläche, die im Moment der Membran-Depolarisation getrennt wird. Dies geschieht noch bevor die Verbindung zwischen Spannungssensor und S5 aus dem Porenbereich gezogen wird, um die Öffnung des Kanals zu ermöglichen. Diese These würde die verzögerte Aktivierung des I_{Ks} durch das KCNE1 erklären⁹⁸.

Über die Eigenschaften des N-Terminus konnte dagegen bislang weniger gezeigt werden. In einigen Arbeiten wurde ihm eine Rolle in der Modulierung der pH-Sensitivität und der pharmakologischen Eigenschaften zugesprochen^{105,106}. Jedoch machte die Entdeckung eines mit Vorhofflimmern (VHF) assoziierten SNPs auf andere potentielle Aufgaben aufmerksam.

1.3.1.2 KCNE1-SNP G38S

Die Assoziation des KCNE1-SNP G38S mit VHF wurde zuerst von Lai *et al.* beschrieben. Die Autoren zeigten in einer klinischen Studie, dass der Wildtyp ‚38G‘ mit VHF assoziiert ist¹⁰⁷ (Abb. 1.7).

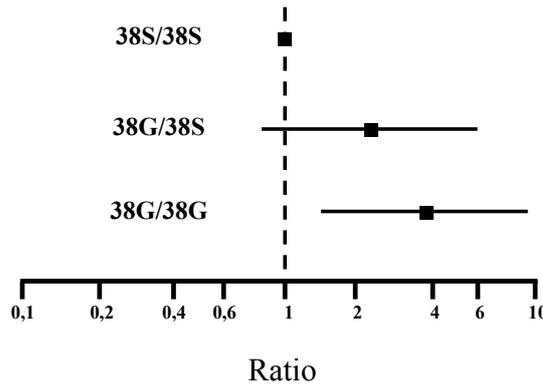


Abb. 1.7: ‚Forest plot‘ zur Darstellung der Wahrscheinlichkeit einer VHF-Erkrankung (nach Lai *et al.*, mit Genehmigung)¹⁰⁷.

Es handelt sich um einen weit verbreiteten SNP. In manchen ethnischen Gruppen ist er bei nahezu 50% der Menschen vertreten (Tab. 1.2).

Tab. 1.2: Vorkommen von SNPs in verschiedenen ethnischen Gruppen¹⁰⁸; n.s. – nicht signifikant

SNP	Schwarz (%)	Weiß (%)	Asiatisch (%)	Hispanisch (%)	p-Wert
K897T-KCNH2	8,2	33,1	7,5	6,8	< 0,001
G38S-KCNE1	36,1	44,9	16,4	48,5	< 0,001
P448R-KCNQ1	0,3	0,0	16,4	48,5	< 0,001
G643S-KCNQ1	5,9	0,0	6,0	1,1	< 0,001
R1047L-KCNH2	0,3	3,7	0,0	0,0	< 0,002
D85N-KCNE1	0,7	1,1	0,7	0,0	n.s.
T8A-KCNE2	0,0	1,1	0,0	0,0	n.s.

Ehrlich *et al.* zeigten, dass die VHF-assoziierte Variante des SNPs eine reduzierte I_{K_S} -Stromdichte bedingt, welche mutmaßlich durch eine verminderte Membranlokalisation von KCNE1 und auch der α -Untereinheit hervorgerufen wird¹⁰⁹.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit Veränderungen, die mit erworbenem Vorhofflimmern einhergehen. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die einwärts gleichrichtenden Ionenkanäle I_{K1} und $I_{K_{ACH}}$ sowie auf die microRNA 1 gelegt.

Es konnte gezeigt werden, dass diese Ionenkanäle entscheidend zum ‚Remodeling‘ beitragen. Die microRNA 1 erwies sich bereits bei anderen Arrhythmien als mitwirkender Faktor. Ein Zusammenhang zwischen dieser microRNA und I_{K1} wird vermutet.

1.3.2 Die einwärts gleichrichtenden Ströme I_{K1} und I_{KACH}

Die einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle (oder Kir-Kanäle – ‚inwardly rectifying K^{+} -Kanäle‘) wurden zuerst in der Skelettmuskulatur entdeckt¹¹⁰. Entgegen der Erwartung zeigten sie einen einwärts gleichrichtenden Strom, weshalb sie zunächst als ‚abnorm‘ beschrieben wurden. Die Aktivität der Ströme schien nicht vom Membranpotential abhängig¹¹¹. Vielmehr zeigten die Ströme eine Abhängigkeit vom elektrochemischen K^{+} -Gradienten. Wie man später herausfand, ist dieser gerichtete Stromfluss durch eine asymmetrische Blockade des geöffneten Kanals mittels intrazellulärer Kationen und anderer Moleküle möglich^{112,113}. Diese Eigenschaften ermöglichen es den Kir-Kanälen einen wichtigen Beitrag zur Erhaltung des Ruhepotentials sowie zur Regulierung der Aktionspotentialsdauer zu leisten¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Die Kir-Proteine werden in sieben Unterfamilien (Kir1-7) unterteilt. Sie alle weisen eine homologe Struktur auf^{117,118}. Sie bestehen aus zwei transmembranären Domänen. Die Verbindung zwischen diesen beiden liegt extrazellulär und bildet die Pore. Sie wird im Allgemeinen als H5 bezeichnet. N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Die Region H5 dient als Selektivitätsfilter für die zu transportierenden Kalium-Ionen¹¹⁹ (Abb. 1.8). Sie beinhaltet dieselbe Sequenz (TXG^Y/_FG), die auch in anderen Ionenkanälen gefunden wurde und hoch konserviert zu sein scheint^{76,120}.

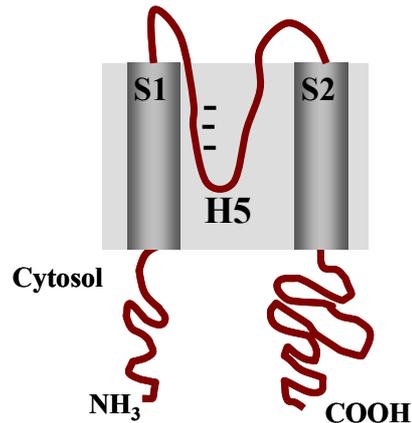


Abb. 1.8: Schematische Darstellung eines Kir-Kanals. Die beiden transmembranären Domänen sind mit S1 und S2 gekennzeichnet. H5 ist die porenbildende Verbindung zwischen S1 und S2. N- und C-Terminus liegen im Cytosol.

Die Kir-Kanäle weisen keinen Spannungssensor auf, wie er in vielen anderen spannungsgesteuerten Ionenkanälen zu finden ist. Sie sind, um nicht ständig aktiv zu sein, von der Regulierung durch andere Faktoren abhängig.

So werden die Kanäle auch von intrazellulärem Mg^{2+} und durch kationische Polyamine reguliert^{112,113,121,122}. Diese beiden Substanzen blockieren physikalisch die K^+ -Permeation, indem sie an transmembranäre und cytosolische Peptidstellen binden. Ein anderer regulierender Faktor ist die extrazelluläre K^+ -Konzentration. Mit steigender Konzentration erhöht sich die Leitfähigkeit der Kanäle^{123,124}. Weiter konnte gezeigt werden, dass PIP2 essentiell für die Funktion der Kir-Kanäle ist. Es interagiert mit positiv geladenen Aminosäuren im C-Terminus des Kanals^{125,126}. Seine genaue Wirkung ist jedoch unklar. Allen Kir-Kanälen ist die Phosphorylierung durch die Proteinkinasen A und C gemeinsam¹¹¹. Die Kir3 Unterfamilie ist G-Protein gekoppelt^{127,128}. Die Kir-Proteine interagieren hierbei direkt mit dem $G_{\beta\gamma}$ -Komplex und werden von diesem aktiviert. Schließlich haben auch andere Faktoren Einfluss auf die Aktivität dieser Kanäle. Beispielsweise wird Kir3.4 durch intrazelluläres Na^+ aktiviert^{129,130}.

Die aus den Kir-Proteinen gebildeten Ionenkanäle sind Homo- und Heterotetramere^{131,132}. Für gewöhnlich setzen sich die Heterotetramere aus Mitgliedern derselben Unterfamilie zusammen^{133,134}. I_{K1} setzt sich entsprechend aus Kir2.X-Proteinen zusammen. Wahrscheinlich bildet Kir2.1 die Kernuntereinheit des

Ionenkanals. Im Herzen werden außerdem Kir2.2 und Kir2.3 exprimiert. Zaritsky *et al.* zeigten, dass der entsprechende Komplex im murinen Herzen aus den Untereinheiten Kir2.1 und Kir2.2 besteht¹³⁵. Eine Untersuchung an Meerschweinherzen konnte einen Kir2.1/Kir2.3-Komplex identifizieren¹³³. I_{KACH} ist ein G-Protein gekoppelter Ionenkanal. Er setzt sich aus den Untereinheiten Kir3.1 und Kir3.4 zusammen¹³⁶.

1.4 Synthese und Funktion von microRNA

Bei der Klasse der microRNA (miRNA) handelt es sich um kleine, nicht kodierende RNA, die typischerweise aus 20 bis 26 Nukleotiden bestehen. In jüngerer Zeit verdichteten sich Hinweise auf die wichtige regulatorische Bedeutung hinsichtlich der Genexpression. Die erste tierische miRNA wurde 1993 in *Caenorhabditis elegans* beschrieben¹³⁷. Aber erst einige Jahre später kam man zu dem Verständnis, dass miRNAs in allen Eukaryoten verbreitet sind und in großer Zahl auftreten¹³⁸⁻¹⁴⁰. Man nimmt an, dass mehr als 650 miRNAs im humanen Genom kodiert sind, von denen jede jeweils mehr als 100 mRNAs regulieren kann¹⁴¹.

Synthese

Die reife miRNA entsteht in einem mehrstufigen Prozess. Das primäre Transkript wird durch die RNA-Polymerase II synthetisiert und ist mehrere Kilobasen lang. Es wird auch als pri-miRNA bezeichnet¹⁴². Einige miRNAs sind zwischen repetitiven DNA-Elementen kodiert und werden durch die RNA-Polymerase III transkribiert¹⁴³. Noch im Nukleus bildet der kodierende Bereich der pri-miRNA eine Haarnadelstruktur aus. Diese wird erkannt und durch einen mikroprozessierenden Komplex abgeschnitten. Dieser Komplex besteht aus der für doppelsträngige RNA spezifischen Nuklease ‚Drosha‘ und deren Co-Faktor ‚DiGeorge syndrome critical region 8‘ (DGCR8)¹⁴⁴. Die hieraus entstandene ‚precursor‘ miRNA (pre-miRNA) besteht aus nur noch 70 Nukleotiden, bildet aber noch immer eine Haarnadelstruktur aus. Das Protein Exportin-5, ein Ran-GTP-abhängiger Transportrezeptor, erkennt einen 2-3 Basenpaare langen Überhang an der Haarnadelstruktur und transportiert die pre-miRNA in das Cytoplasma^{145,146}. Die pre-miRNA wird dann durch einen Komplex bestehend aus der ‚RNase III-like‘ Ribonuklease ‚Dicer‘ und dem ‚Transaktivator RNA-binding‘ Protein in zwei mature miRNAs gespaltet^{147,148}. Für gewöhnlich wird nun die weniger stabile

miRNA in den RNA induzierten ‚Silencing‘ Komplex (RISC) aufgenommen, die andere wird degradiert. In einigen Fällen werden auch beide miRNAs in den RISC aufgenommen¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Dieser Komplex dirigiert die miRNA zu der zu regulierenden mRNA¹⁵².

Funktion

Die Interaktion einer miRNA mit der zu regulierenden mRNA erfordert Sequenzhomologien in der 5' Region der miRNA. Diese bindet im Allgemeinen an die 3' UTR der mRNA^{153,154}. Die Komplementarität dieser Bindung ist allerdings nicht sehr präzise. Signifikante Varianzen erlauben es, dass eine einzelne miRNA viele mRNAs regulieren könnte¹⁵⁵.

Obwohl die Regulation der Genexpression durch miRNAs noch nicht ganz aufgeklärt ist, wird zurzeit von vier verschiedenen Modellen gesprochen¹⁵⁶. Bei dem ersten handelt es sich um einen Postinitiations-Mechanismus. In diesem Fall blockiert die miRNA durch ihre Anlagerung an die mRNA die Translation oder begünstigt eine verfrühte Dissoziation der Ribosomen. Der zweiten Theorie zufolge wird die Proteinsynthese zwar nicht inhibiert, jedoch wird der neu entstehende Peptidstrang co-translationell degradiert. Ein weiteres Modell geht davon aus, dass die miRNA schon während der Initiation der Translation interferiert. Sie verhindert beispielsweise die Assemblierung der ribosomalen Untereinheiten. Die letzte Theorie geht von einer Degradierung der mRNA durch Deadenylierung der mRNA und dem Entfernen der Cap-Struktur aus.

1.4.1 microRNA 1

Die microRNA 1 (*miR-1*) ist herz- und muskelspezifisch^{157,158} und spielt eine wichtige Rolle in der Kardiogenese^{157,159,160}. Allerdings scheint sie auch im adulten Organismus für die kardiale Erregungsleitung von Bedeutung zu sein. So führte der ‚Knockout‘ dieser miRNA bei Mäusen zu vermehrten Fällen von plötzlichem Tod. Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben eine Anfälligkeit für diverse kardiale Arrhythmien. Die Autoren der Studie führten den Transkriptionsfaktor Iroquois homeobox (*Irx*)5 als mögliches ‚Target‘ unter vielen anderen an¹⁶¹. *Irx*5 reguliert die Expression diverser Kaliumionenkanäle und ist daher maßgeblich an der ventrikulären Repolarisation beteiligt¹⁶². Der Transkriptionsfaktor wird direkt durch die *miR-1*

reprimiert¹⁶¹. Einen weiteren Anhaltspunkt bieten die Studien von Yang *et al.* Es wurde eine Heraufregulierung der *miR-1* in Patienten mit koronarer Herzkrankheit gefunden. Entsprechende Überexpression in Herzen gesunder Ratten induzierte Arrhythmien. Die Autoren fanden dies unter anderem in einer Reduktion des I_{K1} und der zugrunde liegenden α -Untereinheit Kir2.1 begründet. Die Behandlung durch spezifische ‚antisense‘-Sequenzen (Antagomirs) hob den Effekt wieder auf¹⁶³.

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der mechanistischen Grundlagen von VHF auf zellulärer Ebene. Hierbei sollte besonderes Augenmerk sowohl auf genetische Prädisposition als auch auf erworbene Veränderungen gerichtet werden. Entsprechend wurde die vorliegende Arbeit in zwei Bereiche unterteilt, die sich beide mit Veränderungen von Kaliumströmen befassen. Der erste Teil dieser Arbeit hatte die Untersuchung einer genetischen Prädisposition zum Ziel. Ein SNP (Austausch eines Glyzins mit einem Serin in Position 38) in der β -Untereinheit KCNE1 des I_{Ks} wurde mit erhöhter VHF-Inzidenz assoziiert. Dieser SNP machte damit auf den bisher wenig untersuchten N-Terminus des Peptids aufmerksam. Die Struktur des N-Terminus scheint pathophysiologisch von Bedeutung zu sein. Ziel der vorliegenden Arbeit war entsprechend, die Auswirkungen dieser Struktur auf die Funktion des KCNE1 und damit auch die zelluläre Relevanz für I_{Ks} zu untersuchen.

Zunächst stellte sich die Frage nach dem Mechanismus, der offenbar durch den Polymorphismus gestört wird. Zudem sollte ein Hinweis dafür gefunden werden, welche Veränderung die Substitution des Serins an der Position 38 mit einem Glycin bewirkt. Schließlich sollte untersucht werden, ob die Position 38 allein von Bedeutung ist, oder ob auch andere Aminosäuren des N-Terminus an diesem Mechanismus beteiligt sind. Neben der vom SNP betroffenen Aminosäure fielen auch drei Arginine, positiv geladene Aminosäuren, in der Nähe des SNP auf. In der Literatur wurde bereits eine reduzierte Stromdichte des VHF-assozierten Allels des SNPs im Rahmen verminderter Plasmamembranlokalisation beschrieben. Allerdings blieben die strukturellen Determinanten des intrazellulären Transports unbekannt.

Für die hier vorliegende Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Beweglichkeit des KCNE1-Proteins an Position 38 oder die Anwesenheit der Arginine mit Transport oder Verankerung des Proteins in der Membran assoziiert waren.

Folglich sollte untersucht werden, ob die Deletion der Aminosäuren 1-38 dem SNP ähnliche Auswirkungen zeigt. Im Vergleich zu einem Serin verleiht ein Glyzin an Position 38 dem N-Terminus möglicherweise eine gesteigerte Beweglichkeit. Dieser Effekt sollte durch Substitution der betroffenen Aminosäure mit fünf Alaninen nachgestellt werden. Durch Substitution der Arginine mit jeweils einem Alanin sollte

geklärt werden, ob diese an dem hier vermuteten Mechanismus teilhaben. Diese Konstrukte sollten mittels verschiedener experimenteller Techniken (,Patch-clamp'-Technik, Analyse der mRNA-Expression mittels Real-time PCR, Zellfraktionierung und konfokaler Mikroskopie) in HEK- und CHO-Zellen analysiert werden. Als Vergleich sollte das nicht VHF-assoziierte Allel des SNPs dienen.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit erworbenen Veränderungen zweier Kaliumströme (I_{K1} und I_{KACH}) im Rahmen von bereits bestehendem VHF. Hierbei sollten insbesondere Veränderungen des linken Vorhofs analysiert werden, der für VHF eine wichtige Bedeutung hat. Über die transkriptionelle und post-transkriptionelle Regulation dieser Kaliumströme ist wenig bekannt. Ziel der Arbeit war, Stromdichte, Expressionsniveau der zugrunde liegenden Proteinuntereinheiten und deren mRNA zu analysieren und in Zusammenhang mit Veränderungen der *miR-1* zu stellen. In ventrikulärem Gewebe wurde bereits eine Regulation der Untereinheit Kir2.1, und somit des I_{K1} , durch die *miR-1* bei koronarer Herzkrankheit nachgewiesen. Eine regulatorische Rolle für die *miR-1* bei VHF war nicht bekannt. Die Veränderungen des I_{KACH} im menschlichen linken Vorhof wurden bislang nicht auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht. Einige Arbeiten verweisen auf eine funktionelle Modulation, etwa durch Phosphorylierung.

Das zu untersuchende Gewebe stammte von Patienten, die an VHF erkrankt waren. Als Kontrolle diente Gewebe von Patienten im Sinusrhythmus (SR). Für beide Ströme (I_{K1} und I_{KACH}) sollten die VHF-induzierten Veränderungen mittels ,Patch-clamp'-Technik untersucht und dann auf Protein- und mRNA-Ebene nachverfolgt werden. Ebenso sollte die Expression der *miR-1* untersucht werden, um zu klären, ob eine Regulierung auf posttranskriptioneller Ebene stattfinden könnte. Die Quantifizierung von mRNA und miRNA sollte mittels Realtime-PCR erfolgen. Für I_{KACH} sollte zusätzlich die Proteinexpression einiger potentieller funktioneller Modulatoren untersucht werden.

3 Methoden

3.1 Synthese der KCNE1-Konstrukte

In Abb. 3.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte schematisch illustriert. Die cDNA der beiden Varianten des SNP standen bereits zur Verfügung. Die cDNA des Wildtyps KCNE1 (,38G') in dem Vektor pCEP4 wurde von J. Ehrlich bereitgestellt¹⁰⁹, ebenso wie der SNP 38S in dem Vektor pcDNA3.1.

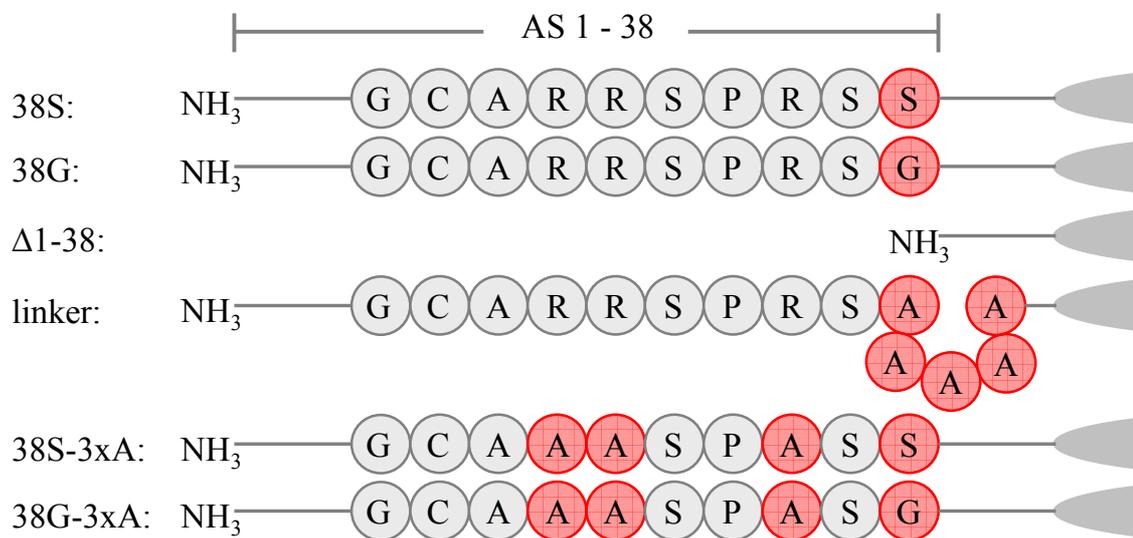


Abb. 3.1: Gezeigt ist der schematische Aufbau des N-Terminus der β -Untereinheit KCNE1. Ein kleiner Bereich der Sequenz ist im Detail dargestellt, um die Unterschiede zwischen den jeweiligen synthetisierten Konstrukten aufzuzeigen. AS – Aminosäuren

Alle zu bearbeitenden Konstrukte sollten in demselben Vektor (pcDNA3.1) untersucht werden. Dies machte es notwendig, den Wildtyp zu subklonieren. Dem ging eine PCR voraus, die die notwendigen Restriktionsschnittstellen vor und nach der Sequenz einfügt. Die hierfür verwendeten Primer sind in Tab. 8.1 dargestellt. Auch die ‚flag‘-Markierung (Tab. 8.3) wurde mittels PCR durchgeführt und das Produkt anschließend wieder in denselben Vektor hineinligiert. Um die Konstrukte mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) zu markieren, wurden diese zunächst mittels PCR und ohne Stop-Codon (Tab. 8.5) amplifiziert und anschließend in den Vektor pEGFP-N2 ligiert. Die Primer für die PCR zum Entfernen der Aminosäuren 1-38 des KCNE1 sind in Tab. 8.2

aufgelistet. Das Anhängen einer ‚flag‘- oder GFP-Markierung für dieses Konstrukt erforderte eine abgewandelte PCR, die Primer sind in Tab. 8.4 und Tab. 8.6 gezeigt. Zum Austausch einzelner Nukleotide innerhalb der cDNA, wie es bei den Konstrukten ‚linker‘, ‚38S-3xA‘ und ‚38G-3xA‘ der Fall ist, wurde eine ‚overlap PCR‘ nach Higuchi¹⁶⁴ durchgeführt. Die zur Synthese des Konstrukts ‚linker‘ verwendeten Primer sind in Tab. 8.7 dargestellt. Die Konstrukte ‚38S-3xA‘ und ‚38G-3xA‘ wurden über einen Zwischenschritt synthetisiert. Es wurde zunächst nur das Arginin in Position 36 ersetzt (Tab. 8.8 und Tab. 8.10). Das Produkt dieser PCR wurde dann als ‚template‘ zur Generierung der beiden hier verwendeten Konstrukte eingesetzt (Tab. 8.9 und Tab. 8.11). Mit Ausnahme der mutationstragenden Primer für die overlap-Synthesen enthalten alle N-terminal flankierenden Primer eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *HindIII*, alle C-terminal gelegenen die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *EcoRI*.

3.1.1 PCR

Alle PCR-Reaktionen wurden nach dem gleichen Versuchsansatz (s. 8.1.5) und nach einem Protokoll durchgeführt:

2 min	94 °C	25 Zyklen
30 sec	94 °C	
30 sec	53 °C	
30 sec	72 °C	
5 min	72 °C	

Der Erfolg der PCR wurde vorerst über ein Agarosegel kontrolliert. Eine kleine Menge der Proben wurde gemeinsam mit einem Größenstandard (pBR 322 DNA, Fermentas, Deutschland) aufgetragen, womit sich die Größe des Produkts grob bestimmen ließ. Es wurden 2% Agarose in TAC-Puffer verwendet. Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde GelRed (VWR, Deutschland) 1:10.000 verdünnt zugegeben.

3.1.2 Klonierung

Die PCR-Produkte wurden mittels des PCR Purification Kits (Qiagen, Deutschland) aufgereinigt. Daraufhin wurde das PCR-Produkt sowie der entsprechende Vektor mittels Restriktionsenzymen, *HindIII* und *EcoRI* (New England Biolabs, USA), geschnitten. Die Restriktion wurde 1 h lang bei 37 °C vorgenommen (für den Restriktionsansatz s. 8.1.5).

Nach erneuter Aufreinigung wurde eine Inkubation des Vektors mit einer Phosphatase für 1,5 h bei 37 °C vorgenommen. Die ‚Calf-Intestine‘-Phosphatase (CIP, New England Biolabs, USA) entfernt hierbei die Phosphatgruppen am 5'-Ende der Sequenz und verhindert somit eine spontane Religation des Vektors (für den Phosphatase-Ansatz s. 8.1.5).

Nach einer weiteren Aufreinigung des Vektors konnten Vektor und Insert ligiert werden. Der Ligationsansatz enthielt für gewöhnlich 50 ng der Vektor-DNA des Vektors und ca. die dreifache molare Menge des Inserts. Die Ligation wurde mithilfe der T4 DNA Ligase (New England Biolabs, USA) für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht durchgeführt (für den Ligationsansatz s. 8.1.5).

Darauf folgte die Transformation des Ligats in Bakterienkolonien (*E. coli*), welche mittels Hitzeschock und dem Zusatz von 5x KCM durchgeführt wurde. Der Ansatz wurde zunächst für 20 min auf Eis inkubiert, dann für 1,5 min bei 42 °C und schließlich 5 min lang bei Raumtemperatur, bevor 400 µl Medium zugegeben wurden (für den Transformationsansatz s.8.1.5).

Die transformierten Bakterien inkubierten dann mindestens eine weitere Stunde bei 37 °C. Die Bakteriensuspension konnte dann auf mit Selektionsantibiotikum (50 µg/ml Ampicillin für den Vektor pcDNA3.1; 50 µg/ml Kanamycin für pEGFP-N2) versetztem Agar ausplattiert werden.

Herstellung kompetenter *E.coli*

Um für die Transformation kompetente *E. coli* herzustellen, wurde ein Aliquot von 100 µl der Bakteriensuspension in 100 ml LB-Medium gegeben. Der Ansatz wurde für ca. 6 h bei 37 °C geschüttelt bis eine optische Dichte (OD) von 0,5 bis 0,6 erreicht war. Die Bakterien wurden dann für 15 min bei 2200 g zentrifugiert und das Pellet in 7,5 ml

TSB-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde anschließend für 45 min auf Eis inkubiert, bevor sie in Aliquots von 100 µl bei -80 °C eingefroren wurde.

Kolonien picken

Waren die Agarplatten nach etwa 24 h Inkubation bewachsen, wurde eine kleine Anzahl der Kolonien einzeln entnommen und in jeweils 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum gegeben. Sie schüttelten anschließend für 12-16 h bei 37 °C.

Für die Koloniesuspensionen wurden Glycerolstocks angefertigt. Hierfür wurde eine kleine Menge abgenommen und mit 15% Glycerol bei -80 °C verwahrt.

Die restliche Suspension wurde nun zentrifugiert. Von diesem Sediment wurde ein wenig abgenommen und in 20 µl dH₂O aufgenommen und davon 0,5 µl als ‚template‘ für eine Kolonie-PCR verwandt. Das restliche Pellet wurde in einer Mini-Plasmid-Isolation aufgearbeitet.

Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde durchgeführt, um festzustellen, ob die gepickten Kolonien tatsächlich ein Plasmid mit dem PCR-Fragment enthielten. Sie wurde in einem Volumen von 12,5 µl durchgeführt, und 0,5 µl der bereits verdünnten Bakteriensuspension dienten als ‚template‘. Die übrigen Zusätze waren wie in 3.1.1 eingesetzt. Das Protokoll entspricht dem der ursprünglichen PCR.

Mini-Plasmid-Isolation

Die Mini-Plasmid-Isolation diente der schnellen Isolation der Plasmid-DNA. Die hier gewonnenen Plasmide wurden zur Sequenzierung eingesetzt, jedoch nicht für spätere Versuche.

Das Sediment wurde in 200 µl des Plasmid-Isolation (PI) Puffers 1 resuspendiert. Um die Bakterien zu lysieren, wurden nun 200 µl PI Puffer 2 zugegeben, und für 5 min auf Eis inkubiert. Zur Neutralisation und somit zum Abstoppen der Reaktion wurden dann 200 µl PI Puffer 3 zugegeben und wiederum 5 min lang auf Eis inkubiert. Die Proben wurden nun für 5 min bei 4 °C und 21.000 g zentrifugiert. Zur Präzipitation der Plasmid-DNA wurde der Überstand 10 min bei Raumtemperatur mit 500 µl Isopropanol inkubiert. Durch erneute Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 21.000 g wurde die DNA präzipitiert. Das Pellet wurde nun mit 70%-igem Ethanol

gewaschen und abermals wie oben zentrifugiert. Das trockene Pellet wurde schließlich in dH₂O aufgenommen.

Die auf diese Weise isolierten Plasmide wurden, um unerwünschte Mutationen ausschließen zu können, extern sequenziert (Eurofins MWG Operon, Deutschland).

Waren die Plasmide einwandfrei, konnte mit der Maxi-Plasmid-Isolation fortgefahren werden. Zu diesem Zweck wurden 100 ml mit Antibiotikum versetztem LB-Medium mit einer geringen Menge der Bakterien aus dem Glycerolstock angeimpft. Diese sollten ebenfalls 12-16 h bei 37 °C schütteln.

Maxi-Plasmid-Isolation

Die sedimentierten Bakterien wurden in 10 ml PI Puffer 1 resuspendiert. Zur Lysierung der Bakterien wurden 10 ml PI Puffer 2 zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml PI Puffer 3, des Neutralisationspuffers, inkubierten die Proben für 20 min auf Eis. Sie wurden anschließend eine halbe Stunde lang bei 21.700 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und die Zentrifugation mit dem Überstand jedoch für nur 10 min wiederholt. Der Überstand wurde nach dieser Zentrifugation über eine Qiagen-tip 500 Säule (Qiagen, Deutschland) aufgereinigt. Diese wurde zuvor mit dem PI Puffer 4 äquilibriert. Der Überstand konnte dann auf die Säule geladen werden. War der Überstand dort hindurch getropft, wurde mit 2x 30 ml des PI Puffers 5 gewaschen. Schließlich wurde die Plasmid-DNA mit 3x 5 ml PI Puffer 6 eluiert. Es wurden 11,5 ml Isopropanol zugegeben und für 30 min bei 15.500 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut für nur 10 min zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 200 µl dH₂O aufgenommen. Konzentration und Reinheit der Plasmide wurden anschließend mittels Bio-Photometer (Eppendorf, Deutschland) bestimmt. Hierbei wurde die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen. Der Quotient aus diesen beiden Werten gab außerdem Aufschluss über die Verunreinigung der Proben wie etwa durch Proteine oder Phenolreste. Der Quotient sollte bei ca. 1,8 liegen.

3.2 Heterologe Expression

3.2.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Bei den für die Versuche verwendeten Zelllinien handelt es sich um CHO- und HEK-293-Zellen. Die HEK-Zellen wurden in ‚Minimum Essential Medium Eagle‘ Medium gehalten, die CHO in ‚F-12 Kaighn’s‘ Medium. Beiden Medien ist zusätzlich 10% FCS zugegeben worden. Die Kultivierung erfolgte in Zellschalen mit einem Durchmesser von 10 cm, in 10 ml Medium. Die Zellen wurden in einem Inkubator mit 5% CO₂ bei 37 °C gehalten.

Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert, wobei die Zellen zunächst mit Dulbecco’s PBS gewaschen und dann mit Trypsin abgelöst wurden. Um das Trypsin zu entfernen, wurde die Suspension anschließend zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in frisches Medium aufgenommen. Ihrem Wachstum entsprechend wurden die Zellen 1:5 oder 1:10 umgesetzt, so dass etwa 1×10^4 Zellen pro 10 cm Schale ausgesät wurden. Sollten Zellen zur Transfektion passagiert werden, so wurden die Zellen entweder, für kleine Ansätze, in Schalen mit 3,5 cm Durchmesser ca. 1:12 bis 1:16 (ca. 5×10^3) umgesetzt, oder zur Transfektion größerer Zellmengen wieder in 10 cm Schalen 1:3 bis 1:5 (ca. 5×10^4). Alle Arbeitsschritte erfolgten unter keimarmen Bedingungen.

3.2.2 Transfektion

Zur Transfektion der Zellen wurde grundsätzlich das Reagenz Polyethylenimin (PEI) verwendet. Hierbei wurden zunächst PEI und die zu transfizierende cDNA getrennt voneinander für 5 min in FCS-freiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen zusammen geführt und für weitere 15 min inkubiert, um schließlich vorsichtig auf die Zellen gegeben zu werden. Als Transfektionskontrolle wurde der für GFP kodierende Vektor mitgeführt. Dies wurde einzig für die konfokale Mikroskopie unterlassen, um Signalstörungen zu vermeiden. Die Transfektion wurde ebenfalls unter keimarmen Bedingungen durchgeführt.

Die Mengen an Transfektionsreagenz und an zu transfizierender cDNA differierten für die jeweiligen Versuche:

Konfokale Mikroskopie:

Expressionstest:

0,5 µg KCNE1	10 µl PEI
100 µl FCS-freies Medium	100 µl FCS-freies Medium

Membranlokalisation:

0,125 µg KCNQ1 0,125 µg KCNE1	10 µl PEI
100 µl FCS-freies Medium	100 µl FCS-freies Medium

Patch-Clamp:

0,5 µg KCNQ1 0,5 µg KCNE1 0,2 µg GFP	10 µl PEI
100 µl FCS-freies Medium	100 µl FCS-freies Medium

Expressionsversuche, Co-Immunopräzipitation und Zellfraktionierung:

Expressionstest:

1 µg KCNE1 0,2 µg GFP	10 µl PEI
100 µl FCS-freies Medium	100 µl FCS-freies Medium

Co-IP und Zellfraktionierung:

2,5 µg KCNQ1 2,5 µg KCNE1 0,4 µg GFP	20 µl PEI
200 µl FCS-freies Medium	200 µl FCS-freies Medium

3.3 Expressionsnachweis

Um zu prüfen, ob die synthetisierten Konstrukte exprimierten, ebenso aber auch, ob die Immunodetektion funktionierte, wurden zunächst Expressionstests sowohl in Form von Western Blots als auch mittels konfokaler Mikroskopie durchgeführt.

Weiterhin wurde die Methode des Western Blots zur Proteinquantifizierung aus humanem Vorhofgewebe eingesetzt.

3.3.1 Western Blot

Gesamtmembran-Aufarbeitung

Nach 24 stündiger Inkubation wurden die transfizierten Zellen zunächst 2x mit PBS gewaschen, dann unter Zugabe von 1 ml Lysepuffer und 1:1000 verdünntem Protease Inhibitor (PI) von den Schalen abgelöst und daraufhin homogenisiert (PowerGen 125, Fisher Scientific, USA).

Die Gewebestücke wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zerkleinert, mit Lysepuffer versetzt und homogenisiert. Die Suspension wurde schließlich für 5 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin in Sorvall-Gefäße (VWR, Deutschland) überführt und weitere 20 min bei 28.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 50 µl Resuspensionspuffer aufgenommen.

Proteinquantifizierung mittels Bradford-Reagenz

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde 1 µl der jeweiligen verarbeiteten Proben zu 800 µl dH₂O zugegeben. Diesem Ansatz wurden 200 µl Bradford-Reagenz (Roth, Deutschland) zugeführt, um nach einer 10 minütigen Inkubation in Quarz-Küvetten (VWR, Deutschland) mittels eines Bio-Photometers (Eppendorf, Deutschland) die Konzentration zu ermitteln.

Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proben wurden nun zunächst mit einem 3x Ladepuffer versetzt, um dann für 10 min bei 95 °C zu inkubieren. Dieser Schritt dient dem Aufschluss der Wasserstoffbrücken und somit der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine. Sie wurden anschließend auf ein denaturierendes, diskontinuierliches Polyacrylamidgel geladen, das in eine mit

Laufpuffer gefüllte Kammer gespannt worden war. Zusätzlich zu den Proben wurde auch ein vorgefärbter Größenstandard („Kaleidoscope Prestained Standard“, BioRad, USA) aufgetragen. Zur Immunodetektion der KCNE1-Konstrukte wurde ein 14%-iges Gel verwendet. Für die Auftrennung der Kir-Proteine wurde ein 10%-iges Gel, für KCNQ1 ein 7%-iges Gel verwendet. Die Auftrennung erfolgte zunächst 20 min lang bei 40 mV, und schließlich für etwa 1 h bei 60 mV.

Proteintransfer

Die so nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine wurden anschließend von dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Whatman, England) transferiert. Dies geschah in einer mit Transferpuffer gefüllten ‚Wetblot‘-Apparatur. Um die KCNE1-Konstrukte zu ‚blotten‘, wurden für 45 min 250 mA angelegt.

Immunodetektion

Die Nitrocellulose-Membran, der nach diesem Schritt die Proteine anhaften, wurde nun 2 h bei Raumtemperatur mit einer Blockierlösung, 3% foetales Rinderserumalbumin (FBS) in TTBS, behandelt und anschließend mit dem Primärantikörper (1:1000 verdünnt in 3% FBS TTBS) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es wurden zu Beginn einige Versuche mit einem anti-KCNE1 Antikörper durchgeführt. Um allerdings die Qualität der Detektion zu verbessern, erhielten die Konstrukte ‚flag‘-Markierungen, was eine Detektion mit einem anti-‚flag‘ Antikörper möglich machte, der die besseren Resultate erzielte. Im weiteren Verlauf wurde die Membran 2x 15 min lang in Waschlösung (TTBS) behandelt. Darauf folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem Sekundärantikörper (1:20.000 in TTBS).

Nach erneutem Waschen mit TTBS wurden die Proteinbanden mittels des Western Lightning Plus-ECL Kits (Perkin Elmer, USA) dargestellt. Hierbei katalysiert die mit dem sekundären Antikörper konjugierte Peroxidase die Umwandlung von Luminol, das in seiner oxidierten Form chemoluminisziert. Für die Sichtbarmachung der Signale wurde Röntgenfilm (FujiFilm, Japan) eingesetzt. Der so exponierte Film wurde weiter mit einer Entwicklerlösung (Tetenal, Deutschland) und schließlich mit einem Fixierer (Tetenal, Deutschland) behandelt.

„Strippen“ einer Membran

Um eine Membran ein zweites Mal mit einem anderen Antikörper anzufärben, wurde sie von den bereits anhaftenden Antikörpern befreit. Dieser Vorgang wird als ‚Strippen‘ bezeichnet. Hierfür wurde die Membran in ‚Stripping‘-Puffer für 30 min bei 50 °C inkubiert. Die Membran wurde einige Male in TTBS gewaschen und konnte anschließend wieder wie zuvor blockiert und angefärbt werden.

3.3.2 Konfokale Mikroskopie

Nach 24 stündiger Inkubation der Transfektion wurden die Zellen 1:4 in Ibidi-Zellschalen (Ibidi, Deutschland) mit 1 ml Medium umgesetzt. Weitere 24 h später wurden die Zellen in 1 ml 2% PFA in PBS 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden daraufhin 3x mit PBS gewaschen und anschließend 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Die Blocklösung enthielt neben FBS und ‚Normal donkey‘-Serum (NDS) auch ein Detergenz, das die Membran passierbar machen sollte, damit auch das Zellinnere angefärbt wurde. Anschließend inkubierten die Zellen mit dem Primärantikörper (1:200 in 1:5 verdünnter Blocklösung) in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C. Sollten in einem Versuch zwei verschiedene Proteine detektiert werden, so konnten die beiden Primärantikörper, solange sie nicht derselben Spezies entstammen, zugleich auf die Zellen gegeben werden. Hierauf wurde der 1:400 verdünnte Sekundärantikörper (in 1:5 verdünnter Blocklösung) auf die Zellen gegeben und 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die hier verwendeten Sekundärantikörper sind mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt, der die Betrachtung unter dem Mikroskop möglich macht. Bei Experimenten, die der Lokalisation der Proteine innerhalb verschiedener Zellorganellen dienen, wurde zur Vereinfachung auch der Zellkern mittels 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Dies erfolgte gleich nach Entnehmen der Sekundärantikörperlösung. Es wurde 1:200 in PBS verdünnt für 5 min und bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden wiederum 2x 5 min in 0,3% Tween in PBS gewaschen und ein weiteres Mal für 5 min in reinem PBS. Zum Eindecken der Zellen wurde eine Lösung aus 0,2% 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (Dabco) in PBS 1:2 mit Glycerin gemischt auf die Zellen gegeben und mit einem Glasplättchen bedeckt.

Es wurden zwei verschiedene fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper verwendet. Bei dem ersten handelt es sich um den ‚Alexa Fluor 488‘ (anti-Ziege, Invitrogen, USA). An den Antikörper ist der ‚Alexa Fluor‘-Farbstoff gekoppelt, der zur Detektion bei 495 nm angestrahlt wird und bei 519 nm emittiert. Der zweite hier verwendete Antikörper ist der ‚Alexa Fluor 555‘ (anti-Kaninchen, Invitrogen, USA). Hier wurde bei 555 nm angeregt und bei 565 nm gemessen. DAPI wurde bei 405 nm angestrahlt, das Emissionsmaximum liegt bei 461 nm. Die Aufnahmen wurden an dem Laser Scanning Mikroskop 510 (Zeiss) mit Argon- und Helium-Neon-Laser gemacht. Sie sind standardmäßig bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen worden. Die Lochblende war für die Messung mit dem ‚Alexa Fluor 488‘ auf 188 µm eingestellt, für die Messung mit dem ‚Alexa Fluor 555‘ auf 204 µm und für DAPI auf 212 µm.

3.4 Immunopräzipitation

48 h nach Transfektion wurden die entsprechend transfizierten Zellen 2x mit PBS gewaschen, anschließend in 1 ml RIPA-Puffer und 1:1000 verdünntem PI geschabt und homogenisiert (PowerGen 125, Fisher Scientific). Die Zellen inkubierten nun für 1 h bei 4 °C unter Rotation. Die homogene Zellsuspension wurde schließlich 10 min lang bei 2800 g und 4 °C zentrifugiert. Um die Proben vor der eigentlichen Präzipitation von einem Übermaß an unspezifischem Protein zu befreien, sollte der Überstand nach Zugabe von 25 µl Protein G Agarose (‚G-beads‘, Pierce Biotechnologies, USA) weitere 30 min bei 4 °C rotieren. Die Protein ‚G-beads‘ wurden mit einer weiteren einminütigen Zentrifugation bei 3000 rpm wieder entfernt.

Von dem Überstand wurde eine Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford durchgeführt (3.3.1).

Für die Immunopräzipitation wurde zu ca. 2 mg Proteinextrakt 1 µg des entsprechenden Primärantikörpers gegeben. Dieser Ansatz sollte über Nacht bei 4 °C inkubieren. Daraufhin wurden nochmals 30 µl Protein ‚G-beads‘ zugegeben, der Ansatz rotierte weitere 3 h bei 4 °C, und wurde schließlich für 1 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment, bestehend aus Protein ‚G-beads‘ und dem präzipitierten Protein, wurde 3x mit 200 µl RIPA-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen.

Zuletzt wurde das Sediment in 50 µl 1x Ladepuffer aufgenommen, auf ein SDS-PAGE Gel geladen und im Weiteren wie ein Western Blot behandelt (3.3.1).

3.5 Quantifizierung von mRNA und miRNA

3.5.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mithilfe des Roti-Quick-Kits (Roth, Deutschland). Bei der Isolation aus Gewebe wurde dieses zunächst in einem Mörser bei Zugabe von flüssigem Stickstoff zerkleinert und anschließend in den Puffer 1 des Kits aufgenommen. Bei Isolierung aus Zellen wurde 2x mit PBS gewaschen, um dann den Puffer 1 direkt auf die Zellen zu geben und diese damit abzulösen. Der weitere Vorgang verlief nach Protokoll des Kits. Zuletzt wurde die RNA in DEPC-dH₂O aufgenommen und die Konzentration bestimmt. Wie bei der DNA-Isolation auch wurden Konzentration und Reinheit mittels Bio-Photometer (Eppendorf, Deutschland) bestimmt. Hierbei wurden Extinktionen bei 260 und 280 nm bestimmt. Die 260/280 Ratio, anhand derer die Kontamination durch Proteine oder Phenolreste bestimmt werden kann, sollte bei ca. 1,8-2 liegen.

3.5.2 Reverse Transkription

Zur Quantifizierung der gewünschten mRNA und miRNA mittels PCR musste zunächst eine Umschreibung der RNA zur cDNA erfolgen. Dies geschah durch reverse Transkription. Dabei wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet.

3.5.3 Reverse Transkription für die nachfolgende mRNA-Quantifizierung

Für die Bestimmung der mRNA wurden statt spezifischer Primer ‚Random Hexamers‘ – also Zufallssequenzen von 6 Basen – und Oligo-dTs, kurze Abfolgen von Thyminen, verwendet.

Zunächst wurden RNA, ‚Random Hexamers‘, Oligo-dTs, dNTPs und RNase Inhibitor für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. In diesem Schritt binden die Primer bereits an die RNA. Der Reaktionspuffer wurde hinzugegeben und daraufhin weitere 2 min bei 37 °C inkubiert. Schließlich kam die Reverse Transcriptase hinzu. Der Ansatz wurde 50 min bei 37 °C inkubiert, gefolgt von

15 min bei 70 °C zur Inaktivierung des Enzyms (für den Reverse-Transkriptionsansatz der Gesamt-RNA s.8.1.6).

3.5.4 Reverse Transkription für die nachfolgende miRNA-Quantifizierung

Für die Bestimmung der miRNA allerdings wurde mittels ‚Universal ProbeLibrary‘ Technologie gearbeitet¹⁶⁵. Hier wurde bereits zur Umschreibung zur cDNA ein spezieller Primer, ein so genannter ‚stem-loop‘ Primer, eingesetzt. Dieser Umstand als auch die Wahl des Transkriptionsprotokolls, eine so genannte gepulste Reverse Transkription, sollten die geringen Mengen an miRNA messbar machen. Die Sequenz der miRNA wurde der Datenbank ‚miRBase Sequence Database‘ des Sanger Instituts entnommen (www.microrna.sanger.ac.uk/sequences/index). Die Sequenz des ‚stem-loop‘ Primers (Tab. 8.12) besteht aus einem ersten Bereich, der in sich eine Schleife bildet, einem weiteren Bereich, der einer später während der Quantifizierung zum Einsatz kommenden Sonde komplementär ist, und einem letzten Bereich, der einem kleinen Stück der abzulesenden miRNA komplementär ist. Die hier verwendete Sonde ist die ‚Universal ProbeLibrary Probe‘ #21 (für den Reverse-Transkriptionsansatz der miRNA s.8.1.6).

Protokoll der gepulsten Reversen Transkription:

30 min	16 °C	60 Zyklen
30 sec	30 °C	
30 sec	42 °C	
1 sec	50 °C	
5 min	85 °C	

3.5.5 Real-time PCR

Die Real-time PCRs zur Quantifizierung der mRNA der Kir-Proteine sowie der miRNA *miR-1* wurden am LightCycler[®] 3.5 (Roche, Deutschland) durchgeführt. Hier wurden das Lightcycler SybrGreen^{plus} I Kit (Roche, Deutschland) für die mRNA-Quantifizierung und das Lightcycler TaqMan Kit (Roche, Deutschland) für die miRNA-Quantifizierung verwendet. Zur Normalisierung der miRNA wurde die ‚small nuclear RNA‘ U48 verwendet. Die hierfür verwendeten Primer sind in Tab. 8.12 und Tab. 8.13

zu finden. Für die Konstrukte Kir2.1 (Tab. 8.17), Kir2.3 (Tab. 8.18), Kir3.1 (Tab. 8.19) und Kir3.4 (Tab. 8.20) wurde GAPDH (Tab. 8.21) als interner Standard benutzt.

Die Tests zur Expression von KCNQ1 (Tab. 8.15) und KCNE1 (Tab. 8.14) wurden dagegen am 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Zur Analyse wurde das Fast SybrGreen Master Kit (Applied Biosystems, USA) angewendet. Als interner Standard wurde β -Aktin (Tab. 8.16) eingesetzt.

In allen Versuchen wurde je ein 1 μ l der synthetisierten cDNA eingesetzt. Die Primer wurden in einer Konzentration von 0,5 μ M verwendet.

3.6 Elektrophysiologische Untersuchung

Elektrophysiologische Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl an aus humanem Vorhofgewebe isolierten Zellen, als auch an transfizierten Zellen aus Kultur durchgeführt. Hierzu wurde die ‚Patch-clamp‘ Technik im ‚whole-cell‘ Modus angewandt.

3.6.1 Enzymatische Isolierung humaner Kardiomyozyten

Sofort nach dem Entfernen der Gewebestücke aus dem linken Vorhof wurden diese in mit Sauerstoff angereicherter Tyrode-Lösung transportiert und innerhalb weniger Minuten, von fibrotischem Gewebe und Fett befreit und in kleinen Stücken in Ca^{2+} -freier HEPES-Tyrode-Lösung mit 0,1% FBS und 140 U/ml Collagenase 2 bei 37 °C inkubiert¹⁶⁶. Zuerst nach etwa 1 h, dann in immer geringer werdenden Zeitabständen, wurde die Lösung abgenommen, und neue Collagenase-haltige Tyrode-Lösung zu den Vorhofstücken gegeben. Die zuvor entnommene Lösung wurde zentrifugiert, die im Sediment enthaltenen bereits abgelösten Zellen in einem stark Kaliumionen-haltigen Aufbewahrungspuffer resuspendiert und bis zu der Durchführung der Versuche bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.6.2 Aufbereitung der Zellen aus Kultur

Die Zellen aus der Kultur wurden 24 h nach der Transfektion im Verhältnis 1:3 umgesetzt (entsprechend etwa 4×10^4 Zellen pro Schale), und erst weitere 24 h später für die elektrophysiologischen Untersuchungen eingesetzt. Das Medium wurde entfernt,

kurz mit geringer Menge PBS (bei Raumtemperatur) gewaschen und dann mit frischem Medium sanft von der Zellschale abgelöst.

3.6.3 Patch-Clamp Technik

Die Aufzeichnung der Ströme erfolgte mittels der ‚whole-cell patch-clamp‘-Methode. Während der Messungen wurde eine Temperatur von $36,5 \pm 0,5$ °C eingehalten (TC-324B, Temperatur-Regulierer, Warner Instruments, USA). Es wurden ein Verstärker, ‚Axopatch 200B Amplifier‘, und eine Software zum Darstellen der Ströme, ‚pClamp 9.1‘, verwendet (Molecular Devices, Deutschland). Die Patch-Pipetten wurden aus Borosilikatglas hergestellt, und wiesen nach Befüllen mit intrazellulärer Lösung Widerstände von etwa 1,5–3 M Ω auf. Im Bad diente als extrazelluläre Lösung ebenfalls Tyrode-Lösung. Die Pipette wurde nun zunächst vorsichtig auf eine intakte Zelle aufgesetzt. Daraufhin wurde über die Pipette ein negativer Druck auf die Zelle ausgeübt. Dieser wurde vorsichtig erhöht, bis sich ein starker Verschluss der Pipette durch die eingesogene Membran ergab. Dieser ließ sich über den Widerstand messen, den nun die Pipette aufwies. War ein so genannter ‚Gigaseal‘ erreicht, konnte die Zelle durch ruckartige Erhöhung des negativen Drucks oder durch einen kurzen elektrischen Impuls zum Aufreißen gebracht werden. In diesem Zustand bildeten der Inhalt der Pipette und das Zellinnere eine Kontinuität, die gegenüber der extrazellulären Lösung durch den hohen Widerstand des ‚Gigaseals‘ isoliert ist. Dies wird als ‚whole-cell-Konfiguration‘ bezeichnet. Die in dieser Konfiguration gemessenen Ströme, stellen Ableitungen der gesamten Zelle dar. Es konnten nun Spannungsprotokolle zur Messung der gewünschten Ströme angelegt werden.

Spannungsprotokoll zur Messung des I_{Ks}

Die zu messende Zellen wurden zunächst auf ein Haltepotential von -80 mV geklemmt. Der I_{Ks} liegt bei diesem Potential bereits in aktivierbarem Zustand vor.

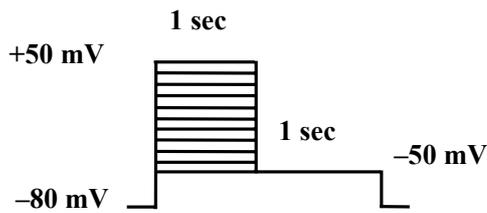


Abb. 3.2: Messprotokoll zur Aktivierung des I_{Ks}

Zur Messung des I_{Ks} (Abb. 3.2) erfolgte als nächstes die schrittweise Depolarisation, angefangen bei -50 mV bis zu +50 mV in Abständen von 10 mV. Die depolarisierenden Pulse hatten eine Dauer von jeweils 1 sec. Darauf folgte das sogenannte tail-Potential bei -50 mV für eine weitere Sekunde, bevor wieder das Haltepotential eingestellt wurde.

Spannungsprotokoll zur Messung der Ströme I_{K1} und I_{KACh}

Zur Messung der einwärts gerichteten Gleichrichterströme (Abb. 3.3) wurden die Zellen zuerst auf einem Potential von -40 mV gehalten. Um die Kanäle in einen offen aktivierbaren Zustand zu überführen, wurden die Zellen als nächstes zu einem Potential von -100 mV hyperpolarisiert.

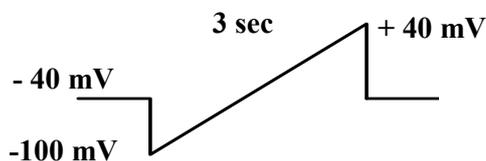


Abb. 3.3: Messprotokoll zur Aktivierung der Ströme I_{K1} und I_{KACh}

Darauf folgte eine stufenlose Erhöhung des Potentials auf +40 mV. Das Protokoll gleicht einer aufsteigenden Rampe. In diesem Fall wurde die instantane Strom-Spannungs-Beziehung ermittelt. Zuletzt wurde wieder das Anfangspotential von -40 mV eingestellt.

3.6.4 Mathematisches Fitten eines Stroms

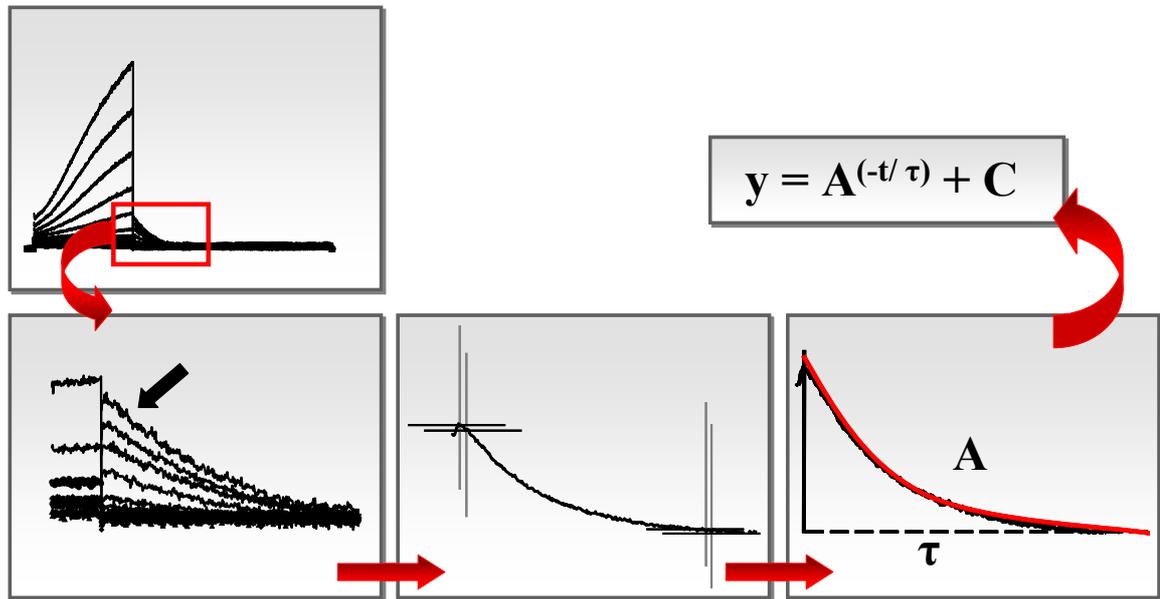


Abb. 3.4: Schema zur Erläuterung eines mathematischen Fits am Beispiel der Deaktivierung der Zelle.

Zur näheren Betrachtung der Kinetik der Ströme wird ein mathematischer Fit durchgeführt. In Abb. 3.4 wird dieser Vorgang schematisch erklärt. In diesem Fall wird die Repolarisation, also die Deaktivierung, der Zelle analysiert. Die verschiedenen Ströme ergeben sich aus der Spannungshöhe der induzierenden Pulse. Der oberste Strom, Reaktion auf einen Puls von +50 mV, ist – aufgrund der höchsten Stromdichte – die am genauesten zu fittende und daher in der Untersuchung am verlässlichsten. Mithilfe des Programms Clampfit 9.2 werden markante Punkte der Spur markiert. Dies sind, wie in der Abbildung zu erkennen, der höchste Punkt sowie ein kurz darauf folgender. An diesen beiden Punkten kann die Steigung zu Beginn der Spur errechnet werden. Außerdem werden auch Informationen zur Position an den beiden Achsen erhoben. Zwei weitere Markierungen sollen die Steigung zu Ende der Spur angeben. Das Programm ermittelt schließlich eine der Spur entsprechenden Funktion und gibt hierfür die Daten an. Dem Programm kann vorgegeben werden, ob eine mono- oder biexponentielle Funktion berechnet werden soll. Hierfür werden diese bildlich dargestellt. Der Deaktivierungsvorgang von I_{Ks} ist typischerweise mit einer monoexponentiellen Funktion zu beschreiben. Alle zu vergleichenden Ströme müssen nach

derselben Art analysiert werden, um die einzelnen Komponenten anschließend vergleichen zu können. In dieser monoexponentiellen Funktion steht y für den Strom zum Zeitpunkt t . A benennt die Amplitude, τ die Zeitkonstante und C den y -Achsenabschnitt. Zur Betrachtung der Kinetik ist neben der Amplitude insbesondere die Zeitkonstante (τ) von Interesse. Bei der Analyse der Aktivierungskinetik der Zelle wurde nicht nur der Strom bei +50 mV untersucht. Es wurde für jedes Testpotential von 0 mV bis 50 mV ein Fit vorgenommen.

Boltzmann-Fit

Mithilfe der Boltzmann-Funktion wurden zwei weitere für die biophysikalischen Charakteristika der Ströme relevante Werte ermittelt.

$$A = \frac{A_0}{1 + e^{\frac{V_{50} - V}{S}}}$$

Abb. 3.5: Formel der Boltzmann-Funktion. A – Amplitude; A_0 – maximale, normierte Amplitude; S – Steigungsfaktor; V – Spannung; V_{50} – Spannung der halbmaximalen Aktivierung

Dafür wurden zunächst alle Werte der Deaktivierung einer Zelle nach dem höchsten Wert normalisiert. Anhand dieser Werte und der in Abb. 3.5 dargestellten Gleichung werden V_{50} , die Spannung der halbmaximalen Aktivierung, und S , der Steigungsfaktor gewonnen.

3.7 Membranlokalisation

Es war für dieses Projekt von Bedeutung zu untersuchen, in welchen Zellkompartimenten die synthetisierten Konstrukte von KCNE1 sowie deren α -Untereinheit KCNQ1 nach ihrer Transfektion zu finden wären. Zu diesem Zweck wurde jedes Konstrukt mit KCNQ1 co-transfiziert und die Zellen wurden 48 h später aufgearbeitet. Zur Lokalisation der Proteine wurden zwei Methoden eingesetzt.

Bei der ersten Methode handelt es sich um die Zellfraktionierung. Das hierbei verwendete Kit (PromoKine) erlaubte eine Auftrennung der isolierten Proteine in eine

Endoplasmatische Retikulum (ER)-Fraktion und eine Plasmamembran-Fraktion. Diese wurden nach einer Konzentrationsbestimmung auf ein SDS-Gel aufgetragen und wie in 3.3.1 behandelt. Neben den Antikörpern für KCNQ1 und ‚flag‘ (KCNE1) wurden außerdem auch als Ladungskontrollen Anti-Spektrin, für die Plasmamembran, und Anti-Calnexin, für das ER eingesetzt.

Als weitere Methode zur Lokalisation dieser Proteine wurde die konfokale Mikroskopie angewandt (3.3.2).

3.8 Statistische Auswertung

Die Daten sind grundsätzlich in Mittelwerten \pm SEM angegeben. Für die statistische Auswertung wurde mit dem Programm ‚Graph Pad Prism 4‘ (Graphpad Software, San Diego, CA, U.S.A.) und Microsoft Office (Microsoft Corporation, Redmond, WA, U.S.A) gearbeitet. Zur Auswertung von Signifikanzen wurde bei Vergleich zweier Mittelwerte miteinander der studentische t-Test verwendet, beim Vergleich von dreien oder mehr Mittelwerten die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA). Sollten mehr als zwei Gruppen, mit jeweils mehreren Datenpunkten, miteinander verglichen werden, wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) eingesetzt. Die Statistik wurde an Rohdaten durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Genetische Prädisposition: der N-Terminus der β -Untereinheit KCNE1

4.1.1 Synthese der KCNE1-Konstrukte

Um die Strukturen des N-Terminus und deren Einfluss auf die I_{Ks} -Modulation zu untersuchen, wurden verschiedene Konstrukte generiert, die in Abb. 3.1 dargestellt sind. Für eines der Konstrukte, im Folgenden ‚ Δ 1-38‘ genannt, wurden die Aminosäuren 1-38 und somit ein Großteil des N-Terminus entfernt. Weiter wurde ein Konstrukt synthetisiert, bei dem die von dem SNP betroffene Aminosäure gegen eine Folge von fünf Alaninen ausgetauscht wurde (‚linker‘). In der Nähe des SNP befinden sich außerdem drei Arginine, positiv geladene Aminosäuren, die möglicherweise aufgrund ihrer Anordnung für die Verankerung des Proteins an der Membran von Bedeutung sind. Sie wurden gegen drei Alanine ausgetauscht. Alanin eignet sich durch Aufbau und Ladung gut dazu, Bindungseigenschaften und Wechselwirkungen der ausgetauschten Aminosäure in der jeweiligen Position zu untersuchen, da es ungeladen ist und selbst keine nicht-kovalenten Bindungen eingeht. So lässt sich die funktionelle Relevanz einzelner Aminosäuren in Schlüsselpositionen ermitteln. Dieses so genannte ‚Alanin-Scanning‘ wurde für beide Varianten des SNP durchgeführt, um den Effekt des Arginin-Austausches vor dem jeweiligen Hintergrund untersuchen zu können.

Zum Austausch einzelner Nukleotide innerhalb der cDNA, wie es bei den Konstrukten ‚linker‘, ‚38S-3xA‘ und ‚38G-3xA‘ der Fall war, wurde eine ‚overlap extension PCR‘ nach Higuchi ¹⁶⁴ durchgeführt. Die Abb. 4.1 erläutert das Vorgehen am Beispiel des Konstrukts ‚linker‘.

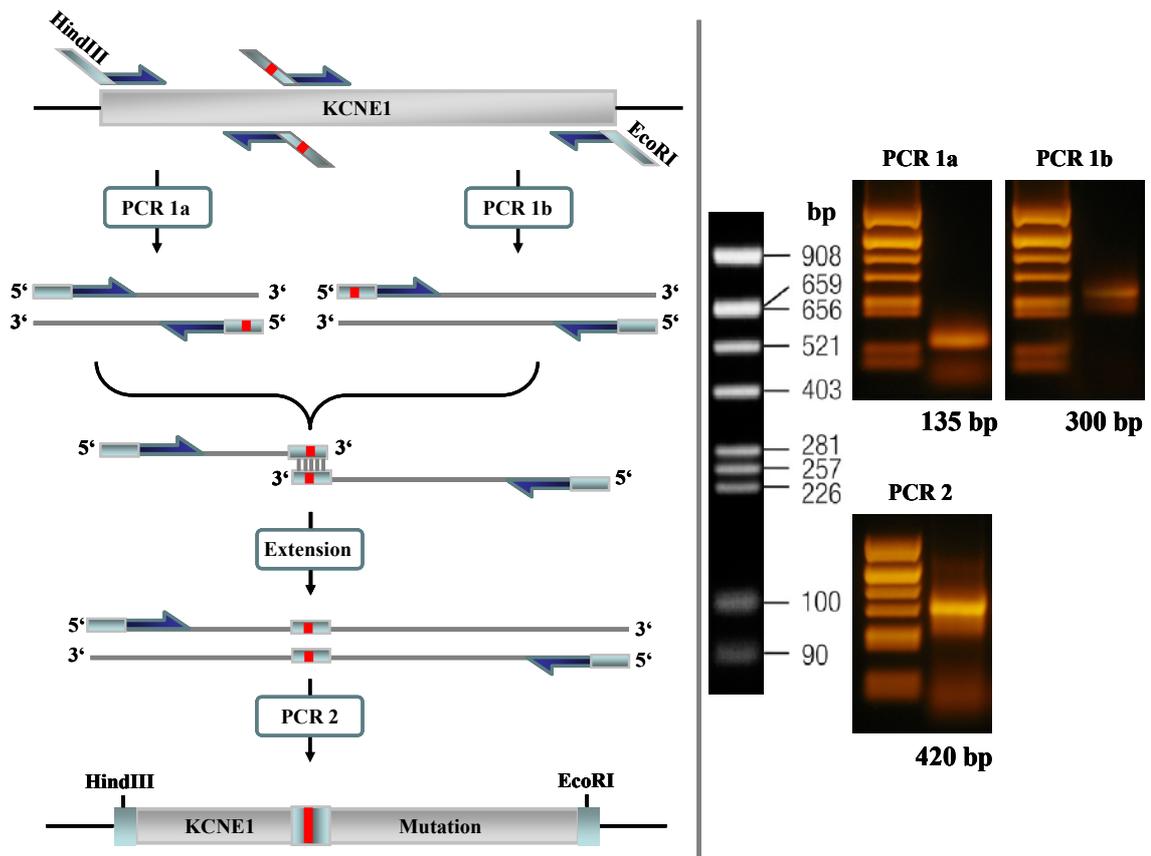


Abb. 4.1: Schema der Mutagenese nach Higuchi (1988) am Beispiel des Konstrukts 'linker'. Bei dem gezeigten Größenstandard handelt es sich um den 'pBR322 DNA-Marker' der Firma Fermentas. bp – Basenpaare

Am PCR template, dem KCNE1 Wildtyp, wurden zunächst zwei PCRs, 1a und 1b, durchgeführt. Für beide PCRs gab es jeweils einen flankierenden Primer, der die Sequenz eines Restriktionsenzym trug, und einen Primer, der die Mutation (rot markiert) enthielt. Somit entstanden zunächst zwei PCR-Produkte, die beide bereits die gewünschte Mutation trugen. Diese wurden dann in einer dritten PCR zusammengeführt. Dabei wurden die leicht überlappenden Enden der PCR-Produkte der ersten Reaktion als Primer genutzt. Zudem wurden auch die flankierenden Primer der ersten beiden PCRs wieder verwendet.

4.1.2 Nachweis der Konstrukte, Auswahl der Antikörper

Um Funktionsfähigkeit und Expression der synthetisierten Konstrukte zu prüfen, wurden sie heterolog exprimiert und mittels Western Blot und konfokaler Mikroskopie nachgewiesen. Die Detektion mit dem anti-KCNE1 Antikörper war relativ schwach und

es traten viele unspezifische Banden auf. Um die Detektion in den nachfolgenden Versuchen zu erleichtern, wurden die Konstrukte mit C-terminalen ‚flag‘- oder GFP-Markierungen versehen. In Abb. 4.2 sind einige Beispiele für die Detektion der unmarkierten Konstrukte sowie mittels dieser Markierungen aufgeführt.

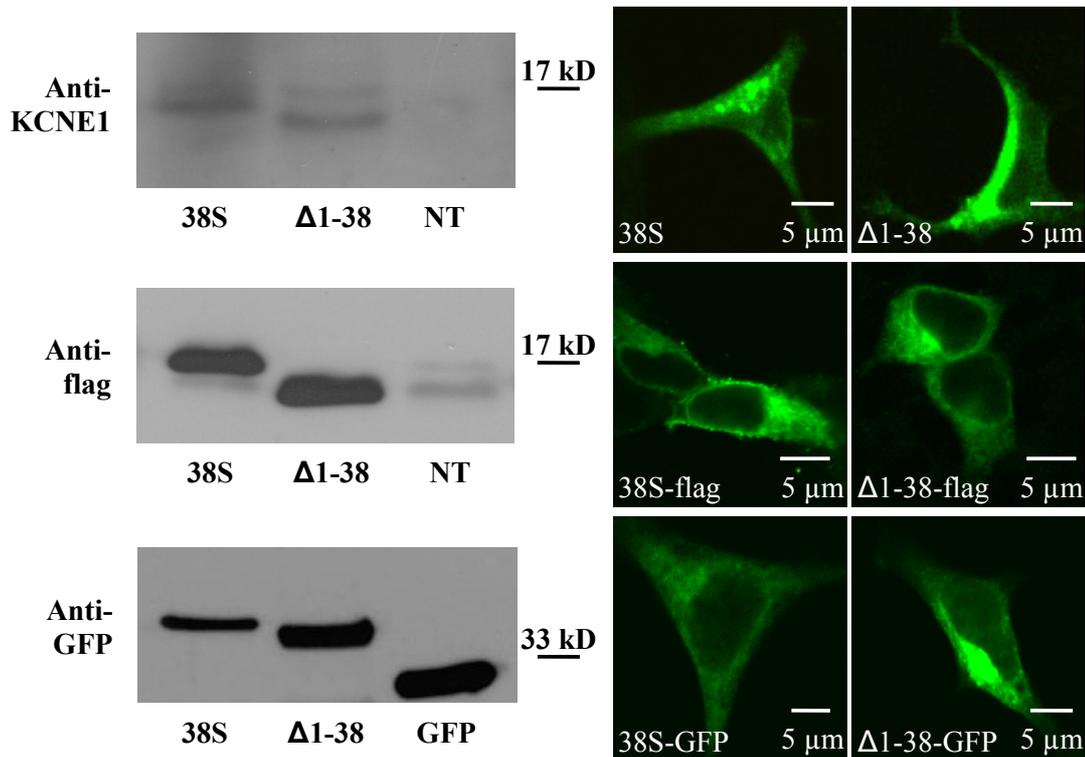


Abb. 4.2: Die links gezeigten Western Blots sind Gesamtmembran-Aufarbeitungen von HEK-Zellen, die mit den KCNE1-Konstrukten ‚38S‘ und ‚ Δ 1-38‘ transfiziert wurden. Rechts sind konfokale Bilder von gleichermaßen transfizierten HEK-Zellen dargestellt. Die oberste Reihe zeigt die unmarkierten KCNE1-Konstrukte, darunter sind die ‚flag‘-markierten, und zuletzt die GFP-markierten Konstrukte zu sehen. Auf dem untersten Blot wurde zudem GFP allein aufgetragen. NT stellt die nicht transfizierte Kontrolle dar. Für die Western Blots wurde der anti-KCNE1 1:400 eingesetzt, anti-‚flag‘ und anti-GFP 1:1000. Für die konfokale Mikroskopie wurde der anti-KCNE1 Antikörper (Exzitation: 495 nm, Emission: 519 nm) in einer 1:200 Verdünnung verwendet, anti-‚flag‘ (Exzitation: 555 nm, Emission: 565 nm) und anti-GFP (Exzitation: 545 nm, Emission: 580 nm) 1:400. GFP – grün fluoreszierendes Protein; kD – Kilodalton

Anti-KCNE1 und anti-‚flag‘ eigneten sich für die konfokale Mikroskopie gleichermaßen. Das Anhängen eines GFPs hatte den großen Vorteil, dass eine weitere Behandlung mit einem Antikörper nicht notwendig war, da dieses Protein selbst detektiert werden konnte. In allen drei Fällen war ungefähr die gleiche Intensität festzustellen.

Im Western Blot waren allerdings große Unterschiede zu erkennen. Während anti-GFP und anti-,flag' scharfe Signale mit wenig Hintergrund produzierten, waren die Banden in dem mit anti-KCNE1 angefärbten Blot schwächer und weniger klar von unspezifischen Banden abzugrenzen. Der Western Blot mit anti-GFP zeigte Signale auf der Höhe von ca. 42 kD. Bei diesen Konstrukten kamen zu den ca. 15 kD des KCNE1 weitere 26,9 kD des GFP hinzu. Bei den nachfolgenden Experimenten, die sich mit den Eigenschaften des KCNE1 innerhalb der Zelle beschäftigten, hätte sich dies allerdings als Nachteil erweisen können. Es war nicht gewährleistet, dass das GFP, das ungleich größer als das KCNE1 ist, auf diese Eigenschaften keinen Einfluss hätte.

Die ,flag'-Markierung weist acht Aminosäuren auf und ist mit ca. 1 kD bedeutend kleiner als GFP. Der anti-,flag' Antikörper produzierte ein unspezifisches Signal auf Höhe des Konstrukts , Δ 1-38'. Dieses war aber sehr viel schwächer als die spezifischen Banden. Die ,flag'-Markierung wurde deshalb der Markierung mit GFP vorgezogen. Alle synthetisierten Konstrukte wurden in der Folge mit ,flag' markiert. Alle Experimente, bei denen eine immunologische Detektion folgte, wurden mit diesen ,flag'-markierten KCNE1-Konstrukten durchgeführt. Eine genaue Auflistung der erstellten Konstrukte findet sich in Tab. 4.1.

Tab. 4.1: Tabelle der für das Projekt synthetisierten Konstrukte der β -Untereinheit KCNE1

KCNE1 Konstrukt	,flag'- Markierung	GFP- Markierung
38S	x	x
38G	x	x
Δ 1-38	x	x
linker	x	
38S-3xA	x	
38G-3xA	x	

4.1.3 Expressionsnachweis

Der Expressionsnachweis wurde mittels Western Blot und konfokaler Mikroskopie geführt (Abb. 4.3).

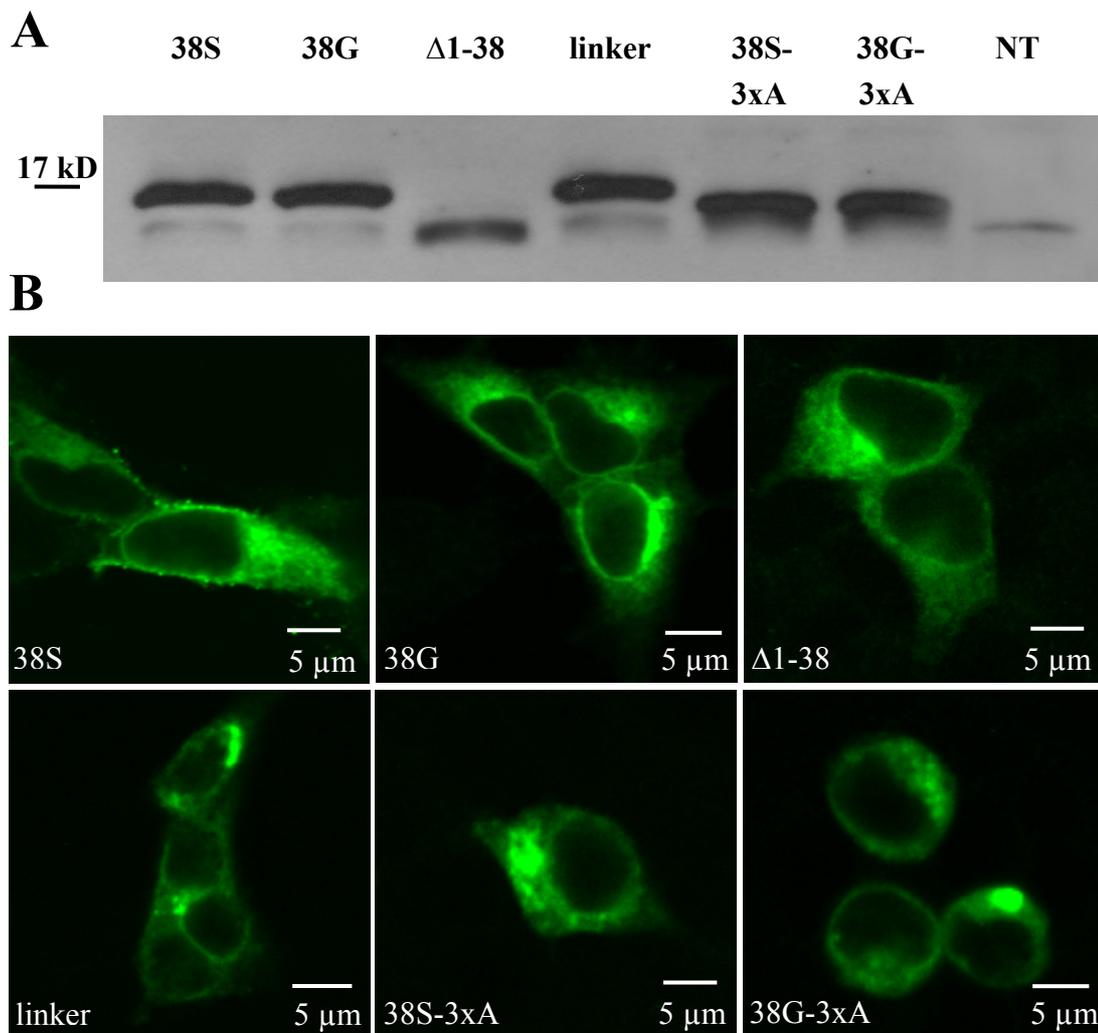


Abb. 4.3: Western Blot und konfokale Mikroskopie dienen zur Überprüfung von Funktionalität und Expression der erstellten KCNE1-Konstrukte. Der in **A** dargestellte Western Blot zeigt Gesamtmembran-Aufarbeitungen von HEK-Zellen, die mit dem mit VHF assoziierten Wildtyp ‚38G‘, dem SNP ‚38S‘ und den anderen diversen ‚flag‘ markierten KCNE1-Konstrukten transfiziert wurden. Zur Detektion wurde ein anti-‚flag‘ (1:1000) Antikörper eingesetzt. In **B** sind konfokale Bilder einzelner ebenfalls mit KCNE1-Konstrukten transfizierter HEK-Zellen dargestellt (anti-‚flag‘, 1:400; Exzitation: 555 nm, Emission: 565 nm). NT – nicht transfizierte Kontrolle; kD – Kilodalton

KCNE1 hat ein Molekulargewicht von 14,6 kD und war im Western Blot in entsprechender Höhe zu erwarten. Die Varianten ‚38S‘ und ‚38G‘ zeigten im Western Blot in Abb. 4.3 A, möglicherweise bedingt durch die ‚flag‘-Markierung, Signale von ca. 17 kD. In der Spur der Mutante ‚ Δ 1-38‘ war durch das Fehlen eines Großteils des N-Terminus ein Protein von geringerer Größe zu beobachten. Das Konstrukt ‚linker‘ erschien dagegen durch das Einfügen von 5 Alaninen etwas größer als ‚38S‘ und ‚38G‘. Die beiden durch das ‚Alanin-Scanning‘ entstandenen Konstrukte waren nur wenig kleiner als ‚38S‘ und ‚38G‘. Hier waren Arginine im N-Terminus durch Alanine (mit geringerem Molekulargewicht) ausgetauscht worden. Beinahe alle Spuren wiesen ein weiteres, schwächeres Signal auf, das auf Höhe des ‚ Δ 1-38‘ lag, und dort auch von diesem Konstrukt verdeckt wurde. Diese Bande war aber ebenso in der nicht transfizierten Kontrolle zu sehen und damit als unspezifisches Signal zu werten.

Die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie bestätigten die heterologe Expression. Die Aufnahmen der jeweiligen Konstrukte zeigten alle eine ähnliche intrazelluläre Expression. Die überexprimierten Proteine erschienen in der Zelle überwiegend im endoplasmischen Retikulum verteilt, befanden sich nicht im Zellkern und scheinbar kaum an der Plasmamembran.

4.1.4 Quantifizierung der Expression

Als nächstes wurde die mRNA-Expression von KCNQ1 und des jeweiligen KCNE1-Konstrukts quantifiziert. Es sollte geprüft werden, ob die Konstrukte gleichermaßen exprimieren. Somit würde eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus den nachfolgenden Versuchen gewährleistet werden.

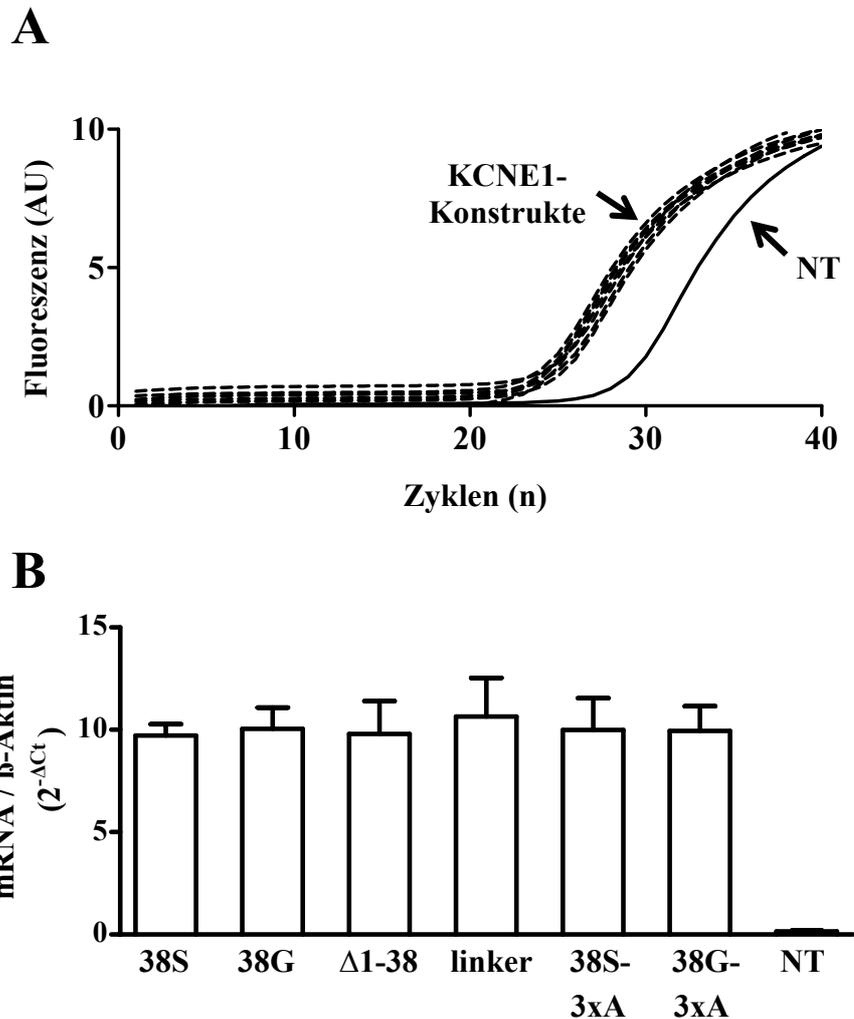


Abb. 4.4: Quantifizierung der KCNE1 mRNA-Expression mittels Realtime-PCR. Die RNA für diese Experimente wurde aus mit KCNQ1 und den jeweiligen ‚flag‘-markierten KCNE1-Konstrukten transfizierten HEK-Zellen isoliert. Repräsentative Beispielkurven sind in **A** zu sehen. Die Normalisierung erfolgte mit β -Aktin als internem Standard. **B** zeigt die Auswertung aus jeweils $n = 4$. $p = 0,99$; AU – ‚arbitrary unit‘

HEK-Zellen wurden mit KCNQ1 und den jeweiligen KCNE1-Konstrukten transfiziert. Aus diesen Zellen wurde RNA isoliert und KCNE1 mRNA quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.4 dargestellt. Anhand der Beispielkurven (A) ist zu erkennen, dass alle durchgeführten PCRs einen ähnlichen sigmoidalen Verlauf hatten.

Alle erreichten gegen Ende die nahezu gleiche Menge ‚Amplicons‘ (DNA-Produkte der Amplifikation). Bei der Realtime-PCR ist jedoch der so genannte Ct-Wert für die Quantifizierung ausschlaggebend. Bei dem Ct-Wert handelt es sich um den Punkt einer PCR, an dem die exponentielle Amplifikation einsetzt. Diese Werte wurden gegen den internen Standard β -Aktin normalisiert und konnten so miteinander

verglichen werden. Da die transfizierten Konstrukte überexprimiert wurden, erschienen die Werte für β -Aktin im Vergleich klein. Nicht transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle der PCR. Sie zeigten erwartungsgemäß keine KCNE1-Expression. Wie in Abb. 4.4 B zu sehen, unterschieden sich die Konstrukte nicht signifikant in ihrer Expression ($p = 0,99$).

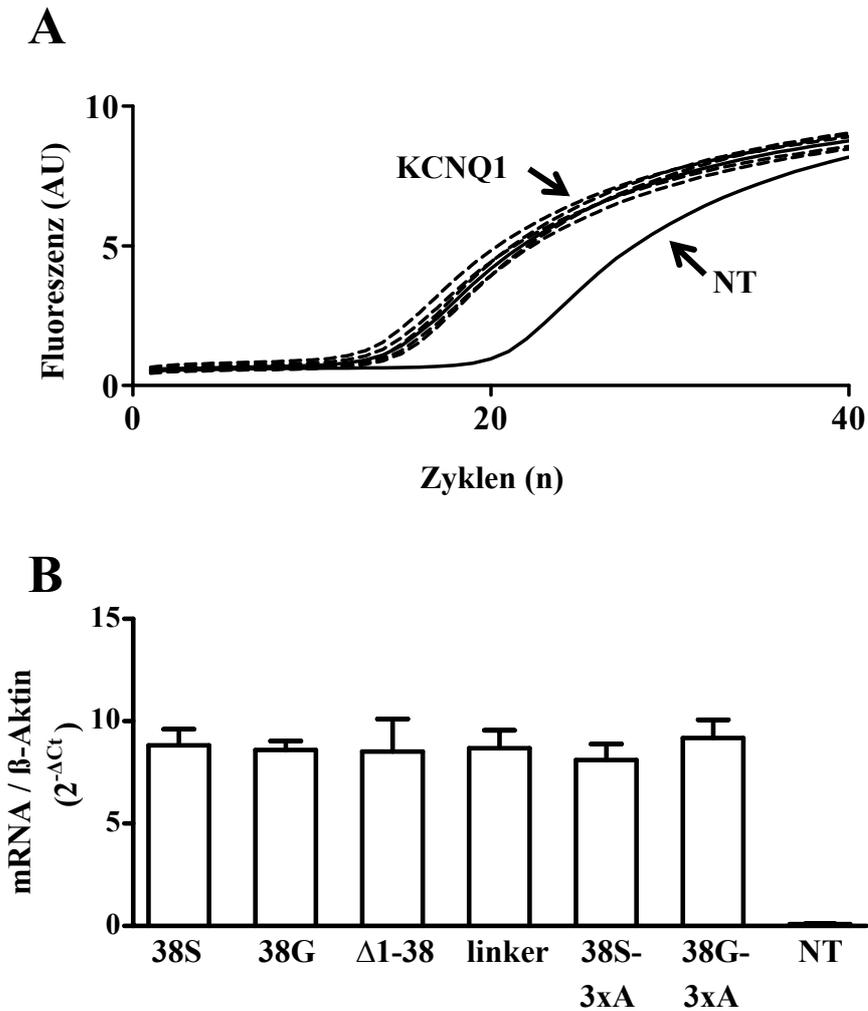


Abb. 4.5: Quantifizierung der mRNA-Expression von KCNQ1 mittels Realtime-PCR. Die RNA hierfür wurde aus mit KCNQ1 und den jeweiligen ‚flag‘-markierten KCNE1-Konstrukten transfizierten HEK-Zellen isoliert. Beispielkurven sind in A zu sehen. Die Normalisierung erfolgte mit β -Aktin als internem Standard. B zeigt die Auswertung aus jeweils $n = 3$. $p = 0,98$; AU – ‚arbitrary unit‘

Weiterhin konnte mit diesen Experimenten ausgeschlossen werden, dass die KCNE1-Konstrukte die Expression der α -Untereinheit KCNQ1 unterschiedlich beeinflussten. Wie in Abb. 4.5 B zu sehen ist, ergab sich auch für KCNQ1 kein Unterschied in der mRNA-Expression ($p = 0,98$).

4.1.5 Co-Immunopräzipitation

Um zu untersuchen, ob die β -Untereinheiten mit der α -Untereinheit interagierten, wurde die Methode der Co-Immunopräzipitation (Co-IP) angewendet. Es wurde eines der Proteine mit einem spezifischen Antikörper präzipitiert (s. 3.4), und das jeweils andere auf dem nachfolgenden Western Blot nachgewiesen.

Input:

KCNQ1	+	+	+	+	+	+	-
38S	+	-	-	-	-	-	-
38G	-	+	-	-	-	-	-
Δ1-38	-	-	+	-	-	-	-
linker	-	-	-	+	-	-	-
38S-3xA	-	-	-	-	+	-	-
38G-3xA	-	-	-	-	-	+	-

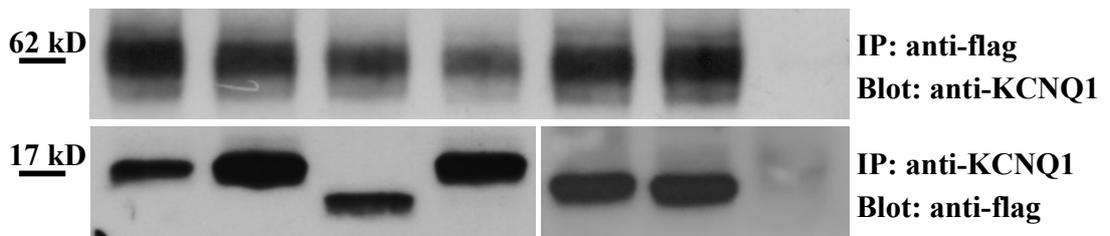


Abb. 4.6: Diese Western Blots zeigen das Ergebnis einer Co-Immunopräzipitation (repräsentativ für mindestens jeweils 5 weitere Experimente). Die Tabelle über den Blots zeigt, welche Konstrukte in den jeweiligen Proben transfiziert wurden (‘Input’). Alle eingesetzten KCNE1-Konstrukte waren ‘flag’ markiert und wurden entsprechend mit dem spezifischen Antikörper präzipitiert und nachgewiesen (anti-‘flag’, 1:1000; anti-KCNQ1, 1:1000). IP - Immunopräzipitation

Der obere der beiden Blots in Abb. 4.6 zeigt das Ergebnis einer Immunopräzipitation von KCNE1 mit dem anti-‘flag’ Antikörper. Die Immundetektion des co-präzipitierten Proteins KCNQ1 erfolgte mittels anti-KCNQ1. Die spezifischen Banden für KCNQ1

waren bei 62 kD zu sehen. Dies entspricht in etwa dem Molekulargewicht der α -Untereinheit. Die nicht transfizierte Kontrolle zeigte keine Bande. Die Co-IP war für alle Konstrukte erfolgreich, unabhängig davon, welcher Interaktionspartner präzipitiert und welcher detektiert wurde. Da die Interaktion selbst bei dem Konstrukt $\Delta 1-38$ erhalten blieb, war davon auszugehen, dass der N-Terminus des KCNE1 für die Interaktion zwischen α - und β -Untereinheit nicht essentiell ist.

4.1.6 Elektrophysiologische Untersuchungen

Wie beschrieben, generieren die beiden Untereinheiten KCNQ1 und KCNE1 gemeinsam I_{Ks} . In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob und in welcher Form die KCNE1-Konstrukte in Co-Transfektion mit der α -Untereinheit die Eigenschaften des Stroms veränderten. Die elektrophysiologischen Messungen wurden mittels ‚Patch-clamp‘-Technik durchgeführt.

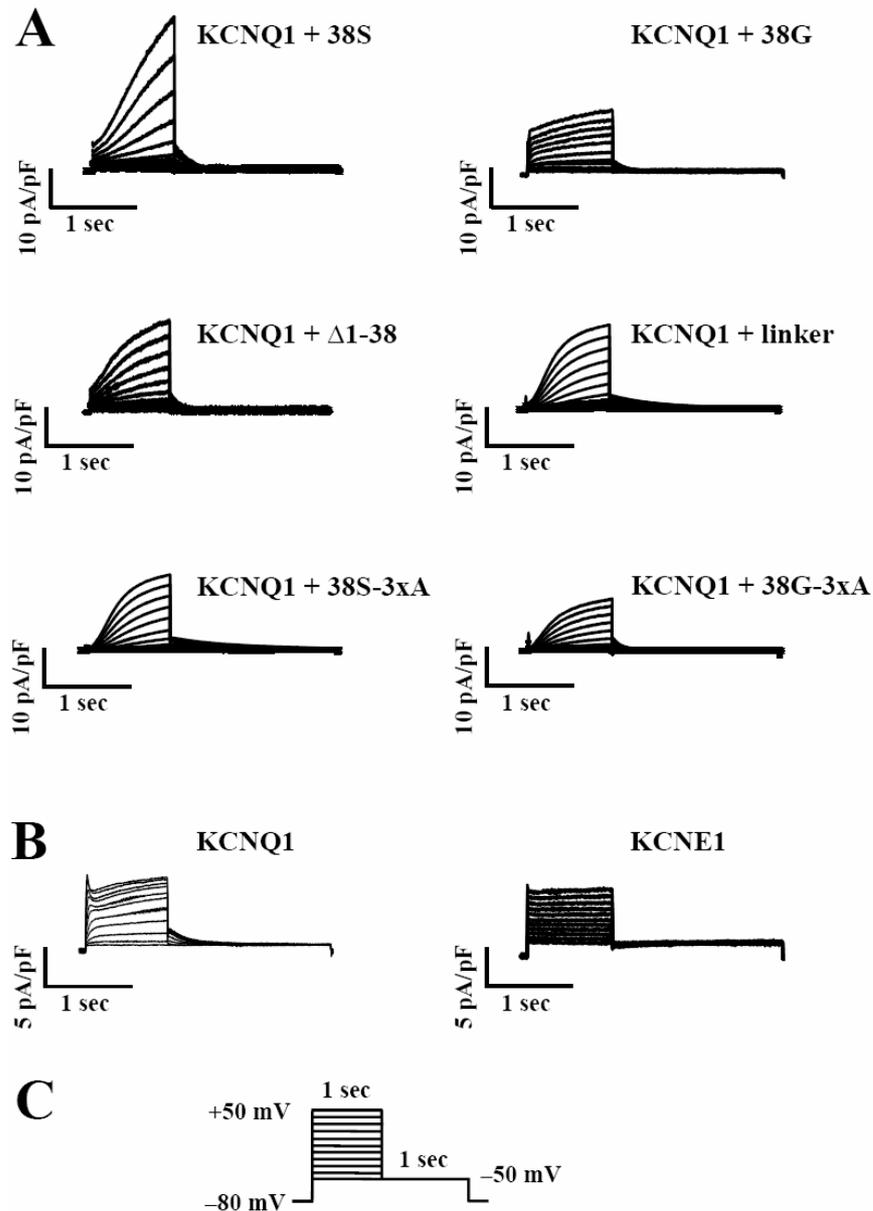


Abb. 4.7: Die Abbildung zeigt in **A** repräsentative Beispielströme, die mithilfe des Spannungsprotokolls in **C** abgeleitet wurden. Die hierfür verwendeten CHO- und HEK-Zellen wurden mit KCNQ1 und den jeweiligen KCNE1-Konstrukten transfiziert. Die Stromdichte ist gegen die Zeit aufgetragen. **B** zeigt Beispielströme von Zellen, die nur mit jeweils einer der beiden Untereinheiten transfiziert wurden. Sie dienten als Kontrolle und wurden unter gleichen Bedingungen gemessen, sind allerdings gegenüber den Strömen in **A** vergrößert dargestellt.

Die Abb. 4.7 **A** zeigt Beispielströme des I_{Ks} mit den verschiedenen KCNE1-Konstrukten. Links oben ist der Strom unter Einfluss der Variante ‚38S‘ zu sehen. Dieser zeigte wie auch ‚38G‘ rechts oben den typischen Verlauf eines I_{Ks} . Durch das Spannungsprotokoll (Abb. 4.7 **C**) wurde die Zelle von einem Haltepotential (-80 mV) mit schrittweise ansteigenden Pulsen zu verschiedenen Testpotentialen depolarisiert.

Die Reaktion der Zelle war eine langsame Zunahme des Ionenstromes (Aktivierung). Die darauf folgende Deaktivierung erfolgte während der Repolarisation. Die α -Untereinheit KCNQ1 allein generiert hingegen einen ganz anderen Strom. Sowohl Aktivierung als auch Deaktivierung waren abrupt (Abb. 4.7 B). Die β -Untereinheit KCNE1 allein konstituiert keinen Strom.

Die beiden Varianten ‚38S‘ und ‚38G‘ ähnelten sich hinsichtlich ihrer Kinetik, unterschieden sich jedoch stark in der Amplitude des resultierenden Stroms. Diese fiel bei ‚38S‘ deutlich größer aus. Die Ströme der anderen Konstrukte zeigten ebenfalls charakteristische Eigenschaften des I_{Ks} . Allerdings wiesen sie alle eine kleinere Amplitude als ‚38S‘ auf und ähnelten darin dem Wildtyp (‚38G‘). Zwei der Konstrukte, ‚linker‘ und ‚38S-3xA‘, bewirkten jedoch darüber hinaus eine weitere Veränderung des Stromes. Beide zeigten eine verlangsamte Deaktivierung.

Da es zwischen verschiedenen Zelllinien zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen kann, wurden diese Versuche sowohl in HEK- als auch in CHO-Zellen durchgeführt. Sie zeigten vergleichbare Ergebnisse, und die Experimente wurden daher zusammengefasst. Abb. 4.8 zeigt die Mittelwerte der Strom-Spannungskurven von Aktivierung und Deaktivierung für die jeweiligen Konstrukte.

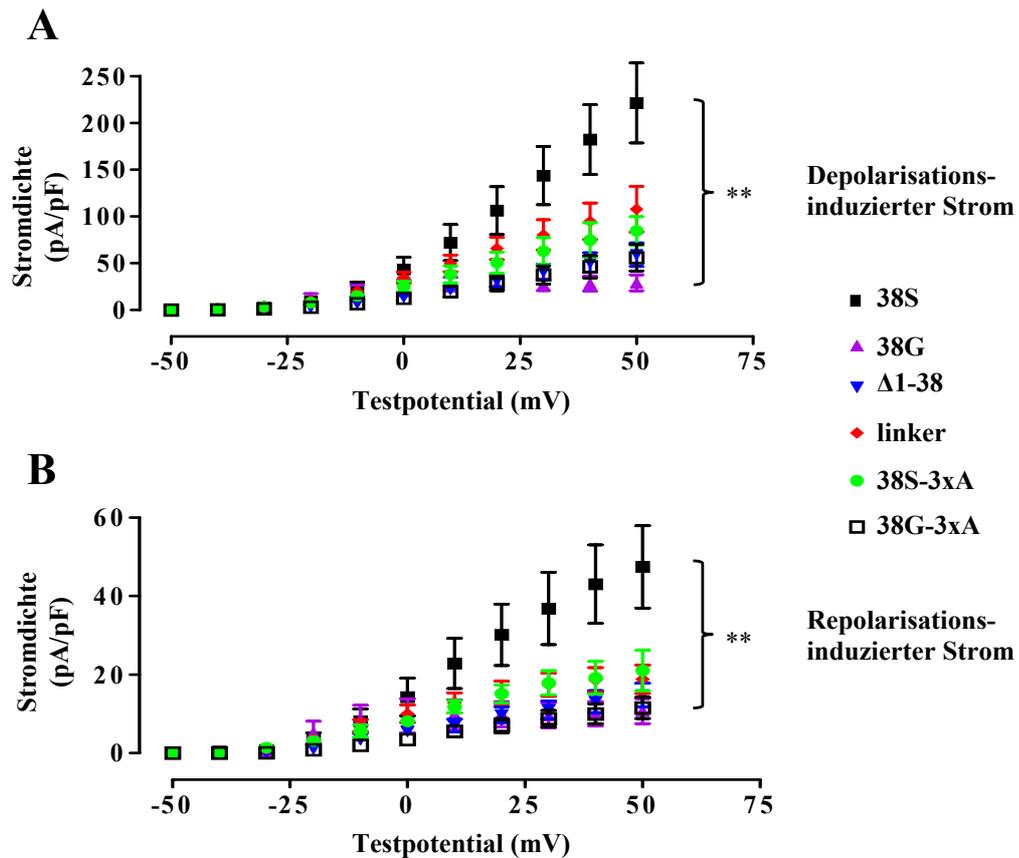


Abb. 4.8: Diese Graphen zeigen Mittelwerte (\pm SEM) der mittels ‚whole cell patch-clamp‘ ermittelten Ströme. Die Stromdichte ist gegen das Testpotential aufgetragen (Strom-Spannungskurve). **A** zeigt den Depolarisations-induzierten Strom (Aktivierung), **B** entspricht der Deaktivierung (n = 9, 6, 9, 5, 4, 6); ** p < 0,005

Abb. 4.8 reflektiert die oben gezeigten Beispielströme. Sowohl während der Aktivierung (Abb. 4.8 A) als auch während der Deaktivierung (Abb. 4.8 B) zeigte die Variante ‚38S‘ eine signifikant höhere Stromdichte. Die verschiedenen Konstrukte unterschieden sich nicht von dem mit VHF assoziierten Wildtyp ‚38G‘. Es wird deutlich, dass sowohl das Glyzin an der Position 38, als auch die drei Arginine in dessen Nähe von Bedeutung sein müssen.

4.1.6.1 Kinetik der Aktivierung

Als Erstes wurde die Kinetik der Aktivierung betrachtet. Für die Ströme wurden jeweils mehrere mathematische Fits vorgenommen. Die Zeitkonstante τ wurde für Testpotentiale von 0 bis 50 mV bestimmt, da Ströme unter 0 mV zu klein für verlässliche mathematische Analysen waren. Der Vergleich der Zeitkonstanten der jeweiligen Ströme ist in Abb. 4.9 gezeigt.

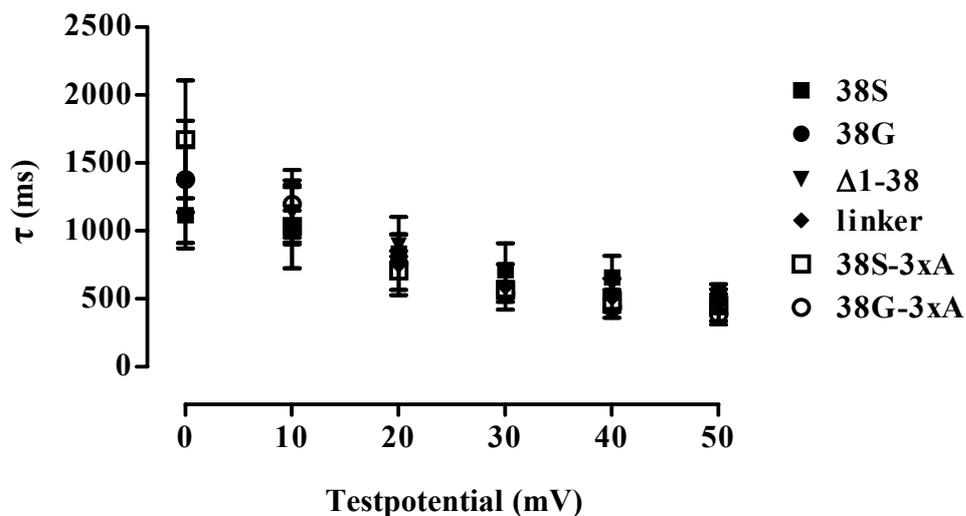


Abb. 4.9: Die Abbildung zeigt die Zeitkonstanten (τ) der Aktivierung der jeweiligen Ströme. Die Zeitkonstante τ wurde für Testpotentiale von 0 bis 50 mV bestimmt. Die Zeitkonstanten sind gegen das Testpotential aufgetragen. Es sind Mittelwerte \pm SEM aus $n = 9, 6, 7, 5, 5, 5$ Zellen dargestellt, $p = n.s.$

Wie erwartet wurden die Zeitkonstanten mit zunehmender Depolarisation kleiner. Je höher also das Testpotential desto schneller war die Aktivierung der Zelle. Dies war gleichermaßen für alle Konstrukte zu beobachten. Die verschiedenen Ströme wiesen außerdem bei keinem der gezeigten Testpotentiale einen wesentlichen Unterschied auf.

4.1.6.2 Kinetik der Deaktivierung

Die Abb. 4.10 vergleicht Zeitkonstanten der Deaktivierung für die verschiedenen Konstrukte. Die Zeitkonstante τ wurde für das Testpotential +50 mV bestimmt. Anders als bei der Depolarisation waren hier nicht unterschiedliche Werte für die jeweiligen Testpotentiale zu erwarten.

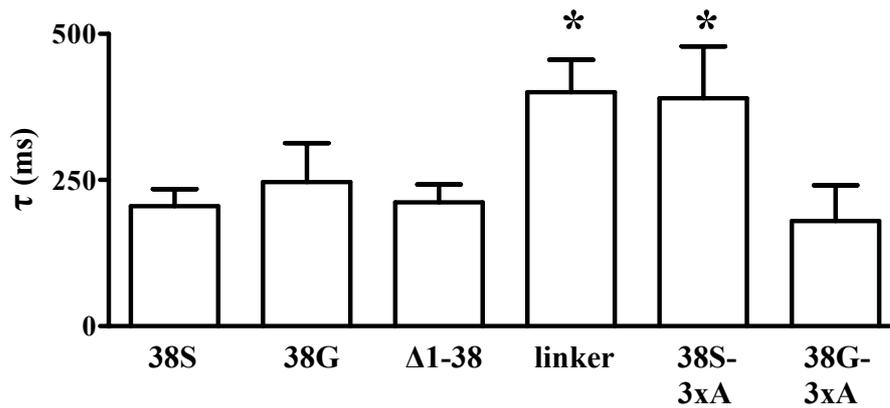


Abb. 4.10: Diese Abbildung zeigt die bei +50 mV ausgewerteten Zeitkonstanten τ der Deaktivierung, welche mittels mathematischem Fit einer mono-exponentiellen Funktion zu deaktivierenden Strömen berechnet wurden. Es sind Mittelwerte \pm SEM aus $n = 9, 6, 7, 5, 5, 4$ dargestellt. * $p < 0,05$

Die Variante ‚38S‘ und das Konstrukt ‚ $\Delta 1-38$ ‘ zeigten dem Wildtyp ‚38G‘ vergleichbare Zeitkonstanten. Auch das Konstrukt ‚38G-3xA‘ wies eine ähnliche Zeitkonstante auf. Diese vier Konstrukte unterschieden sich hinsichtlich der Deaktivierungs-Kinetik nicht signifikant voneinander.

Die beiden Konstrukte ‚linker‘ und ‚38S-3xA‘ wiesen hingegen verlangsamte Repolarisationsströme auf. Je größer die Zeitkonstante desto langsamer verläuft die Deaktivierung der Zelle. In den in Abb. 4.7 dargestellten Beispielströmen war dieser Effekt nachzuvollziehen. Die Zeitkonstanten der Deaktivierung waren beide signifikant größer als die des Wildtyps ‚38G‘.

Die Spannung der halbmaximalen Aktivierung zeigt eine weitere wichtige Eigenschaft von Ionenströmen an. Die Kurven der normalisierten Deaktivierung sind in Abb. 4.11 dargestellt.

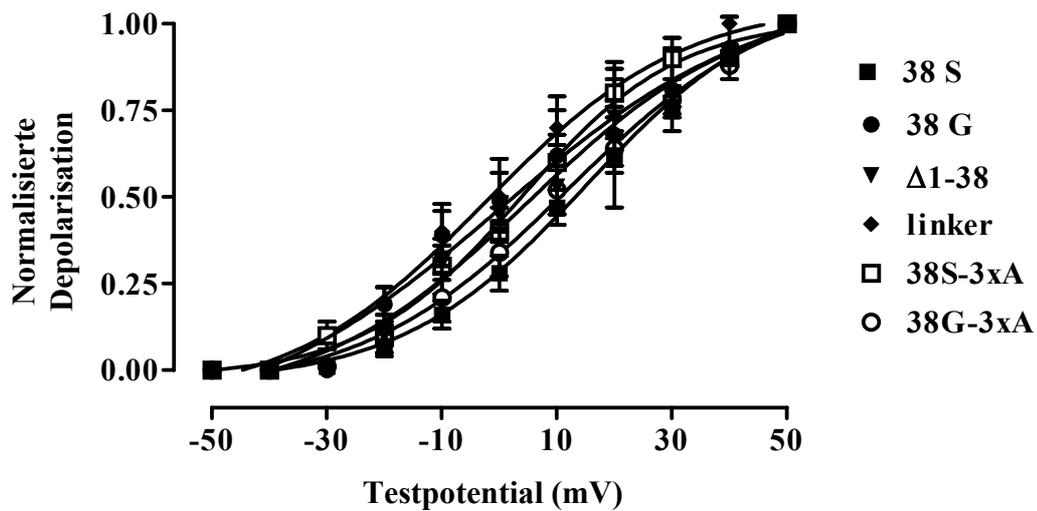


Abb. 4.11: Die Abbildung illustriert die Spannung der halbmaximalen Aktivierung der Ströme, die durch ‚whole cell patch-clamp‘ ermittelt wurden. Die normalisierte Depolarisation ist gegen das Testpotential aufgetragen. Es sind Mittelwerte \pm SEM aus $n = 9, 6, 7, 5, 5, 4$ dargestellt. Die Kurven entsprechen Boltzmann-Funktionen, die über die Mittelwerte gelegt wurden. $p = 0,08$

Die Aktivierung des Stroms verläuft nicht linear sondern sigmoidal. Die Kurve, die in Abb. 4.11 über die Mittelwerte gelegt ist, wurde mithilfe der Boltzmann-Funktion ausgewertet. So konnte außerdem der Steigungsfaktor S , ermittelt werden. Die Mittelwerte im Einzelnen sind in Tab. 4.2 aufgeführt. Es war kein Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen.

Tab. 4.2: Mittelwerte \pm SEM der mittels Boltzmann-Funktion analysierten Werte für V_{50} (die Spannung der halbmaximalen Aktivierung) und S (Steigungsfaktor der Aktivierung)

KCNE1-Konstrukt	V_{50}	S
38S	$13,9 \pm 3,3$	$14,8 \pm 0,8$
38G	$-0,6 \pm 5,0$	$20,1 \pm 6,8$
$\Delta 1-38$	$6,0 \pm 4,1$	$18,4 \pm 2,8$
linker	$-1,4 \pm 3,3$	$14,6 \pm 1,1$
38S-3xA	$3,8 \pm 6,5$	$14,3 \pm 1,2$
38G-3xA	$11,1 \pm 5,8$	$15,7 \pm 0,9$

4.1.7 Lokalisation der Ionenkanalproteine

Es besteht die Möglichkeit, dass der N-Terminus von KCNE1 sowohl die eigene Verankerung an der Plasmamembran als auch den Transport der α -Untereinheit dorthin beeinflusst. Daher zielten die weiteren Versuche darauf ab, KCNQ1 und die jeweiligen KCNE1-Konstrukte innerhalb der Zelle zu lokalisieren.

Der Wildtyp von KCNE1 („38G“) ist mit VHF assoziiert. „38S“ unterschied sich von dem Wildtyp, wie bereits gezeigt, durch die grössere Amplitude des generierten Stroms. Ein Vergleich beider Varianten in einer Lokalisationsstudie könnte Aufschluss darüber geben, ob die Neigung zum VHF in diesem Fall in der gestörten Funktion der Verankerung oder des Transports begründet ist. Träfe dies zu, so käme der Position 38 des N-Terminus eine besondere Rolle in diesen Mechanismen zu. Gleichzeitig sollte die Untersuchung der anderen Konstrukte darüber aufklären, welche weiteren Bereiche des N-Terminus eventuell von Bedeutung sind.

4.1.7.1 Zellfraktionierung

Mittels Zellfraktionierung wurden daher zwei Zellkompartimente analysiert. Das ER ist Syntheseort beider Untereinheiten. Frühere Arbeiten ergaben Hinweise, dass dort die Zusammenführung der beiden Untereinheiten geschieht¹⁶⁷. Die Plasmamembran ist der Wirkungsort des Ionenkanals.

In Abb. 4.12 sind exemplarisch Detektion und Auswertung von KCNQ1 an Zellmembran und im endoplasmatischen Retikulum dargestellt.

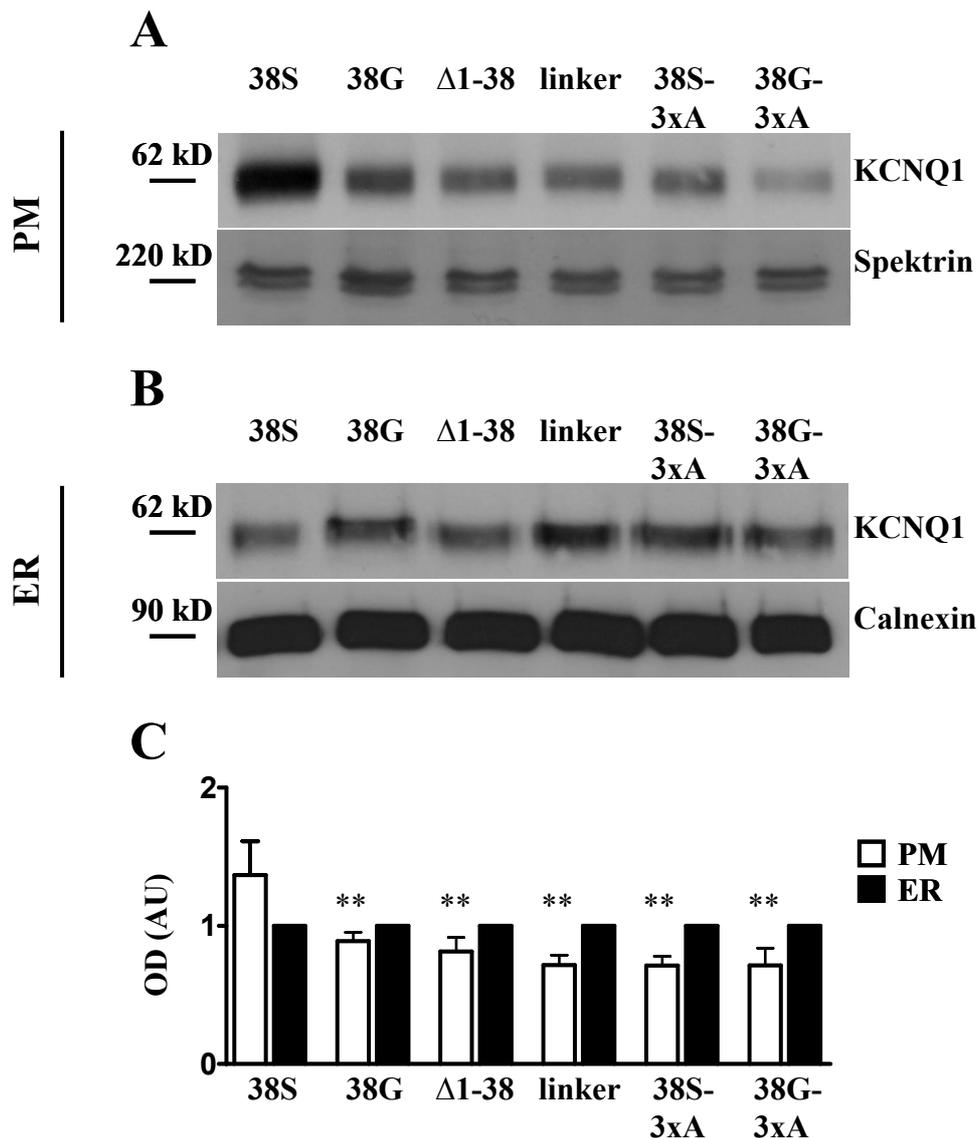


Abb. 4.12: Resultate der Zellfraktionierung für die α -Untereinheit KCNQ1. In **A** sind repräsentative Western Blots aus der Plasmamembran-Fraktion (PM) zu sehen. Es wurden KCNQ1 und als Ladungskontrolle und Membran-Marker Spektrin detektiert. **B** zeigt die KCNQ1-Detektion in der ER-Fraktion. Als Ladungskontrolle wurde das ER-Protein Calnexin gewählt. In Abbildung **C** ist die Auswertung von 4 Experimenten zu finden. Die Plasmamembranwerte wurden gegen die ER-Werte normalisiert. Die Versuche wurden an HEK-Zellen durchgeführt, die mit KCNQ1 und ‚flag‘ markierten KCNE1-Konstrukten transfiziert wurden. (anti-KCNQ1, 1:1000; anti-Spektrin, 1:1000, anti-Calnexin, 1:1000). ** $p < 0,005$; OD – optische Dichte; AU – ‚arbitrary unit‘

Abb. 4.12 A zeigt repräsentative Blots der Plasmamembran-Fraktion. Im oberen der beiden Blots ist die charakteristische KCNQ1-Bande bei 62 kD zu sehen, darunter als Ladungskontrolle ein Spektrin-Blot mit einer Doppelbande bei 220 und 240 kD.

KCNQ1 war in Co-Transfektion mit allen KCNE1-Konstrukten in der Plasmamembran vertreten. Der Wildtyp ‚38G‘ und die Konstrukte ‚ Δ 1-38‘, ‚linker‘ und ‚38S-3xA‘ wiesen bei gleicher Beladung etwa gleich starke Banden auf. Zwei Proben stachen hervor. Gemeinsam mit der Variante ‚38S‘ trat KCNQ1 am stärksten in der Plasmamembran auf, mit dem Konstrukt ‚38G-3xA‘ am schwächsten.

In Abb. 4.12 B sind repräsentative Blots der ER-Fraktion dargestellt. Der obere zeigt die Detektion einer KCNQ1-Bande, der untere Blot zeigt die Detektion einer Calnexin-Bande, das als Ladungskontrolle diente. Wieder stach die Variante ‚38S‘ hervor. In diesem Fall zeigte KCNQ1 in Co-Transfektion ein schwächeres Signal als bei allen anderen Proben. Im Vergleich mit den restlichen Proben produzierte auch die Co-Transfektion mit dem Konstrukt ‚ Δ 1-38‘ eine etwas schwächere Bande.

Um die Reinheit der Auftrennung dieser beiden Zellorganellen zu überprüfen, wurde außerdem auch versucht Calnexin, den ER-Marker, in der Plasmamembran-Fraktion zu detektieren. Der Test war negativ, das Ergebnis ist hier nicht gezeigt.

Die Zellfraktionierung wurde mehrmals wiederholt, die KCNQ1-Banden aufgrund ihrer Signalintensität quantifiziert und gegen die jeweilige Ladungskontrolle normalisiert. Die Auswertung dieser Ergebnisse findet sich in Abb. 4.12 C. Die PM-Daten wurden zusätzlich zu den jeweiligen ER-Werten ins Verhältnis gesetzt. Dabei wurde der ER-Wert auf den Wert 1 gesetzt. Auf diese Weise trat die Verteilung der α -Untereinheit innerhalb der Zelle deutlicher hervor. Die starke Überexpression der Proteine bewirkte wohl das deutliche Auftreten in beiden Zellkompartimenten. Jedoch unterschied sich die Variante ‚38S‘ deutlich von den anderen. KCNQ1 war deutlich stärker in der Plasmamembran vertreten als im ER. Bei allen anderen Konstrukten war es umgekehrt.

Unter identischen Bedingungen wurde auch KCNE1 in der Zelle lokalisiert. Es sollte untersucht werden, ob, bei Co-Transfektion, die KCNE1-Konstrukte dieselbe Verteilung zeigten wie die α -Untereinheit. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abb. 4.13 dargestellt.

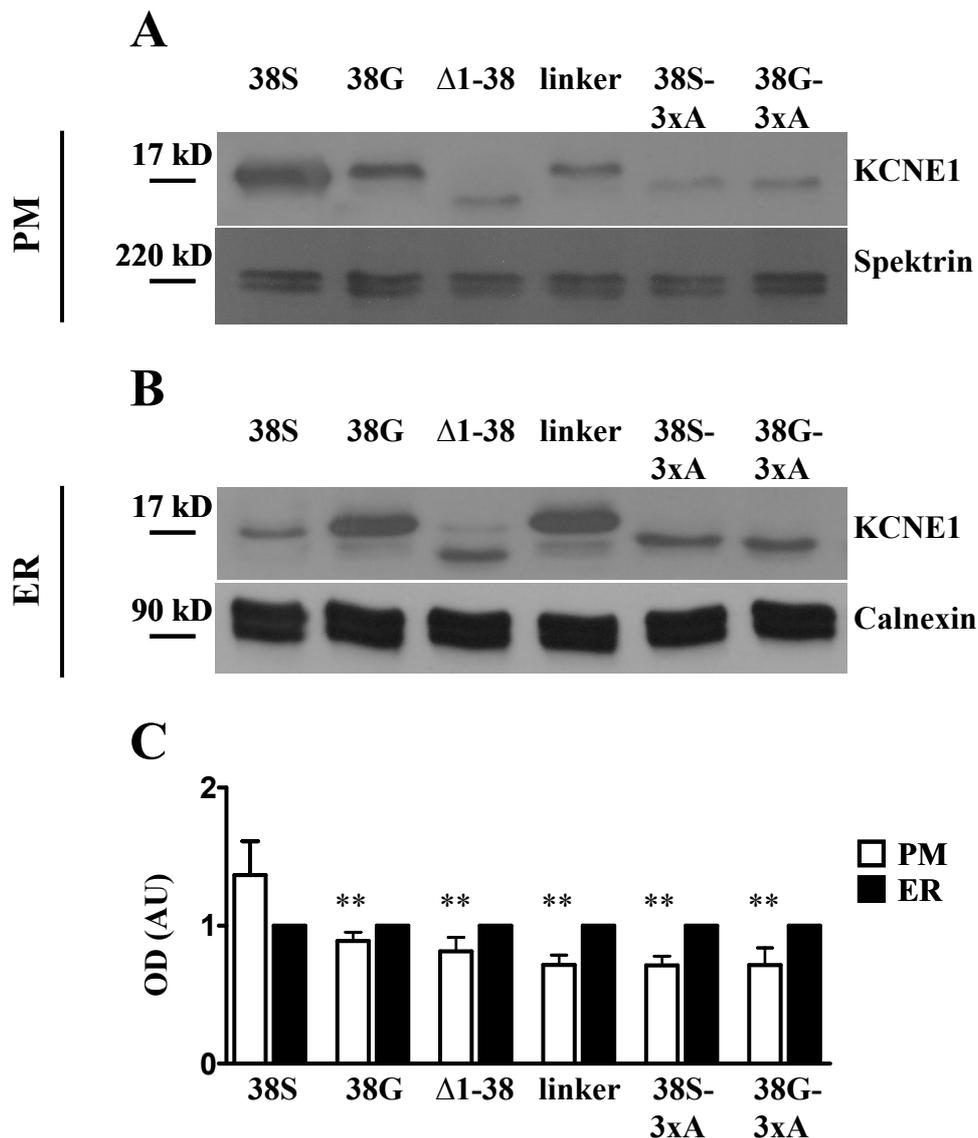


Abb. 4.13: Die Abbildung zeigt die Resultate der Zellfraktionierung mit Detektion der Banden der β -Untereinheit KCNE1. In **A** ist ein repräsentativer KCNE1-Blot aus der Plasmamembran-Fraktion (PM) zu sehen, darunter ist als Ladungskontrolle ein Spektrin-Blot. **B** zeigt die KCNE1-Detektion in der ER-Fraktion. Als Ladungskontrolle wurde Calnexin gewählt. In Abbildung **C** ist die Auswertung aus $n = 4$ zu finden. Die Plasmamembranintensitäten wurden gegen die ER-Werte normalisiert. Die Versuche wurden an HEK-Zellen durchgeführt, die mit KCNQ1 und ‚flag‘ markierten KCNE1-Konstrukten transfiziert wurden. (anti-‚flag‘, 1:1000; anti-Spektrin, 1:1000, anti-Calnexin, 1:1000). ** $p < 0,005$; OD – optische Dichte; AU – ‚arbitrary unit‘

Abb. 4.13 A zeigt repräsentative KCNE1- und Spektrin-Blots. Sie spiegeln die Ergebnisse der KCNQ1-Zellfraktionierung wider. Auch hier war das Signal der Variante ‚38S‘ stärker als die Signale der übrigen Konstrukte. ‚38G‘ und ‚linker‘ wiesen

zwar etwas stärkere Signale auf als die restlichen Konstrukte, waren aber sehr viel schwächer als die Variante ‚38S‘.

Repräsentative Blots der ER-Fraktion aus diesen Experimenten sind in Abb. 4.13 B zu finden. Die KCNE1-Distribution ähnelte auch hier der von KCNQ1. Die Variante ‚38S‘ zeigte das schwächste Signal. Die stärkste Bande trat bei dem Konstrukt ‚linker‘ auf. Die normalisierten Mittelwerte sind in Abb. 4.13 C dargestellt. Die Variante ‚38S‘ trat signifikant stärker in der Plasmamembran auf und war das einzige Konstrukt, dass dort stärker vertreten war als im ER.

Zusammenfassend scheint der N-Terminus von KCNE1 die KCNQ1-Lokalisation innerhalb der Zelle zu beeinflussen. Dies wurde durch die veränderte Verteilung der α -Untereinheit im Beisein der jeweiligen KCNE1-Konstrukte deutlich. Die verschiedenen KCNE1-Konstrukte zeigten dabei eine ähnliche Verteilung. Die mit VHF assoziierte Variante ‚38G‘ war an der Membran schwächer exprimiert und die anderen N-terminalen Mutationen scheinen einer Membranlokalisierung gleichermaßen hinderlich zu sein.

4.1.7.2 Lokalisation von KCNQ1 und KCNE1 mittels konfokaler Mikroskopie

Um die Ergebnisse der Zellfraktionierung zu verifizieren und die Lokalisation der Ionenkanalproteine in der Zelle zu untersuchen, wurde konfokale Mikroskopie eingesetzt. Mit KCNQ1 und dem jeweiligen KCNE1-Konstrukt co-transfizierte Zellen wurden auf Objektträgern fixiert und mehrfach mittels entsprechender fluoreszierender Antikörper angefärbt. Aufnahmen repräsentativer Zellen der jeweiligen Gruppen sind in Abb. 4.14 abgebildet. Neben den beiden gegen die Untereinheiten gerichteten Antikörpern kam auch die DAPI-Färbung zur Markierung der Zellkerne zum Einsatz. Diese erleichterte die Zuordnung der Zellkompartimente.

Es war deutlich zu erkennen, dass alle KCNE1-Konstrukte mit der α -Untereinheit co-lokalisieren. Allerdings ließ sich die Position der Proteine nicht eindeutig den Zellkompartimenten zuordnen. Ein Signal am Rand der Zelle kann unter Umständen ebenso Membran- wie auch ER-Lokalisation bedeuten; dies ist gelegentlich bei Überexpression von rekombinanter DNA in heterologen Zellsystemen ein Problem. Allerdings hilft die Darstellung zweier aneinander liegender Zellen. Die Kontaktstelle kann meist gut als Plasmamembran identifiziert werden.

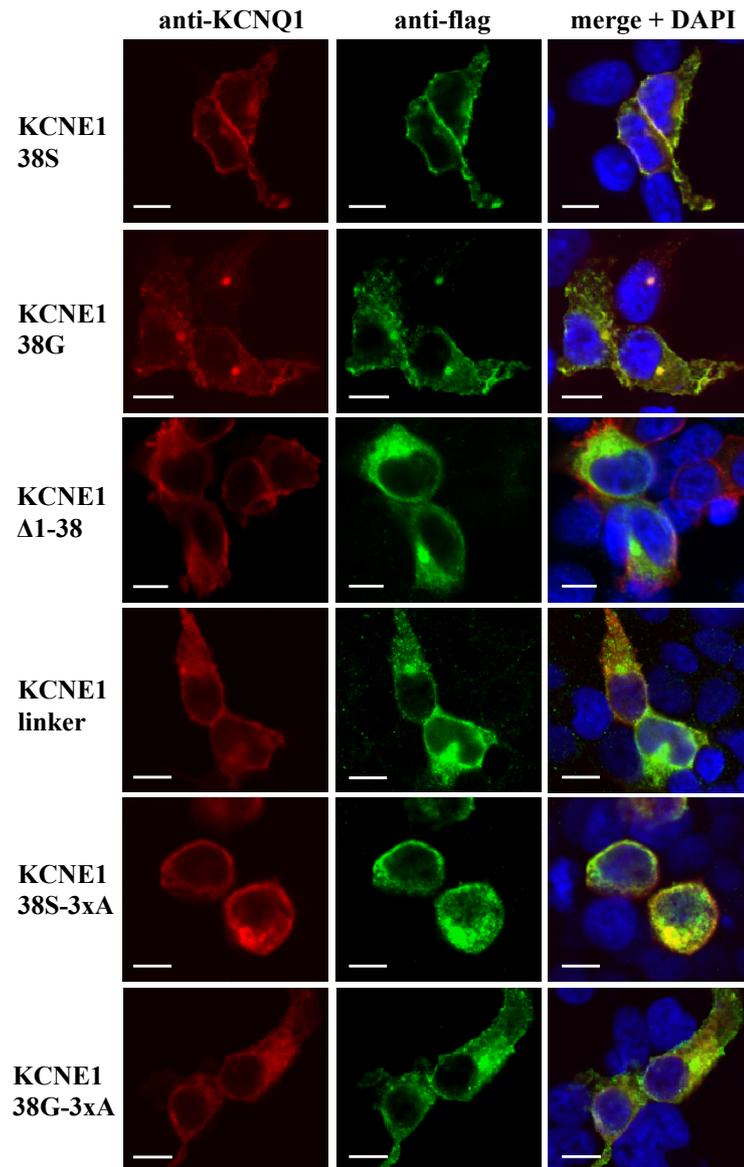


Abb. 4.14: Die hier gezeigten Abbildungen wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen und zeigen mehrfach angefärbte HEK-Zellen, die mit KCNQ1 und ‚flag‘ markierten KCNE1-Konstrukten transfiziert wurden. Die Bilder links zeigen die Verteilung von KCNQ1 (rot), die mittlere Spalte die KCNE1-Konstrukte (grün). Rechts ist eine Zusammenführung („merge“) zu sehen. Die Zellen wurden zusätzlich mit DAPI (blau) angefärbt. KCNE1 wurde mit einem anti-‚flag‘ Antikörper (1:400) angefärbt (Exzitation: 555 nm, Emission: 565 nm). KCNQ1 wurde mit einem anti-KCNQ1 Antikörper (1:400) detektiert (Exzitation: 495 nm, Emission: 519 nm). Der Balken entspricht 10 μm .

Die konfokalen Bilder bestätigten die Ergebnisse der Zellfraktionierung. KCNQ1 war, co-transfiziert mit der Variante ‚38S‘, am stärksten an der Plasmamembran vertreten. Das Signal war für beide Untereinheiten an der Kontaktstelle zwischen den beiden abgebildeten Zellen am stärksten. Ein ähnlich starkes Signal ging außerdem von einigen

wenigen Stellen am Rand der Zellen aus, bei denen es sich am ehesten ebenfalls um Plasmamembran handelt. Diese Zellen unterschieden sich stark von denen der anderen Gruppen. Da jedoch auch funktionelle Ionenströme von analog transfizierten Zellen aufgezeichnet werden konnten, kann man davon ausgehen, dass entsprechende Ionenkanal-Untereinheiten an der Membran vorhanden sind.

Die mit KCNQ1 und der mit VHF assoziierten Variante ‚38G‘ transfizierten Zellen wiesen nur wenig der beiden Proteine an der Plasmamembran auf. Ein Großteil befand sich im Inneren der Zelle, wahrscheinlich im ER.

Alle weiteren Gruppen zeigten eine der Variante ‚38G‘ ähnliche Distribution, wobei das Konstrukt ‚ Δ 1-38‘ besonders hervortrat. Es wies von allen Gruppen die geringste Menge Protein an der Plasmamembran auf.

4.1.8 Zusammenfassung

Der SNP G38S der β -Untereinheit KCNE1 macht auf eine potentielle Bedeutung für den N-Terminus aufmerksam. Das häufigere Allel des SNPs ist mit VHF assoziiert und zeigt einen veränderten I_{Ks} .

Zur Aufklärung der Rolle des N-Terminus hinsichtlich der Modulation von I_{Ks} wurden verschiedene Konstrukte erstellt. So wurde neben dem SNP auch eine Folge von drei positiv geladenen Aminosäuren ausgewählt und mittels ‚Alanin-Scanning‘ ersetzt. Weiterhin wurde für ein Konstrukt der größte Teil des N-Terminus entfernt.

Alle Konstrukte konnten heterolog exprimiert werden. In der Co-Immunopräzipitation wurde weiter gezeigt, dass sich keine der strukturellen Veränderungen des N-Terminus auf die physikalische Interaktion mit der α -Untereinheit auswirkte. Der N-Terminus scheint daran nicht beteiligt zu sein.

Wie bereits in früheren Arbeiten beschrieben, zeigte die mit VHF assoziierte Variante ‚38G‘ eine Reduktion des I_{Ks} . Bei der näheren Untersuchung der anderen Konstrukte konnte gezeigt werden, dass die strukturellen Veränderungen des N-Terminus ebenfalls zu einem verminderten Strom führten.

Auch bei den Experimenten zur Lokalisation der beiden Untereinheiten innerhalb der Zelle zeigten die synthetisierten Konstrukte ein der VHF assoziierten Variante ‚38G‘ entsprechendes Verhalten. Die Variante ‚38S‘ wies für beide Proteine die bei weitem höchste Menge Protein an der Plasmamembran auf.

4.2 Erworbene Veränderungen: Heraufregulation der einwärts gleichrichtenden Ströme I_{K1} und $I_{KACH,c}$

Wenn VHF für eine längere Zeit besteht, kommt es zu Veränderungen auf verschiedenen Ebenen (z.B. Ionenkanäle, Struktur, Kontraktilität und Oberfläche der Vorhöfe). Diese werden als ‚Remodeling‘ bezeichnet. Insbesondere das ‚Remodeling‘ der elektrischen Eigenschaften des Vorhofs begünstigt Auftreten und Fortbestehen von VHF. Eine Heraufregulierung der einwärts gleichrichtenden Ströme (I_{K1} und I_{KACH}) wurde bereits beschrieben. Zudem bedurfte der Strom I_{KACH} bei VHF keiner Aktivierung; er ist ‚konstitutiv‘ aktiv. Der konstitutiv aktive I_{KACH} wird im Folgenden als $I_{KACH,c}$ bezeichnet. In dem zweiten Teil dieser Arbeit wurden zugrunde liegende, regulierende Mechanismen für die Heraufregulierung untersucht.

4.2.1 Patientencharakteristika

Die Versuche wurden an humanem Gewebe des linken Vorhofs durchgeführt, welches routinemäßig im Rahmen herzchirurgischer Mitralklappenrekonstruktionen entfernt wurde. Die klinischen Charakteristika und demografischen Daten der Patienten, die an dieser Studie teilnahmen, sind in Tab. 4.3 aufgelistet. Der Gruppe der Patienten, die an chronischem VHF leiden, standen Patienten im Sinusrhythmus als Kontrollgruppe gegenüber. In beiden Gruppen waren vorwiegend Männer vertreten. Neben einer höhergradigen Mitralklappeninsuffizienz (welche die Operationsindikation darstellte), waren auch andere Herzerkrankungen in beiden Gruppen häufig. Außerdem lagen in vielen Fällen begleitende Hypertonie, Diabetes mellitus oder Hyperlipidämie vor. Bei diesen Komorbiditäten handelt es sich um Faktoren, die das Auftreten von VHF begünstigen. Es wurden konsekutive Patienten eingeschlossen und beide Gruppen unterschieden sich lediglich hinsichtlich der Vorhofgröße. Das linke Atrium ist bei VHF-Patienten deutlich vergrößert. Die beiden Gruppen unterschieden sich darüber hinaus nicht hinsichtlich medikamentöser Therapie.

Tab. 4.3: *Patientencharakteristika; SR – Sinus Rhythmus; VHF – Vorhofflimmern; MKI – Mitralklappeninsuffizienz; LVEF – linksventrikuläre Ejektionsfraktion; LVEDD – linksventrikulärer enddiastolischer Diameter; ACE-I – Angiotensin-converting enzyme Inhibitor; ATRB – Angiotensin Rezeptor Blocker; HMG-CoA – 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A; n.s. – nicht signifikant*

	SR	VHF	p-Wert
Patienten (n)	31	31	
männlich	18 (67%)	20 (63%)	P = n.s.
Alter (Jahr)	67 ± 1	70 ± 1,4	P = n.s.
Koronare Herzkrankheit	13	13	P = n.s.
Zusätzliche Bypass-Operation	7	2	P = n.s.
Grad der MKI	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,1	P = n.s.
Hypertonie	14	12	P = n.s.
Diabetes mellitus	6	5	P = n.s.
Hyperlipidämie	10	10	P = n.s.
LVEF (%)	62 ± 0	58 ± 0	P = n.s.
LVEDD (mm)	55 ± 1	56 ± 2	P = n.s.
linkes Atrium (mm)	45 ± 1	57 ± 2	P < 0,05
Herzglykoside	2	10	P = n.s.
ACE-I/ATRIB	21	27	P = n.s.
β-Blocker	18	20	P = n.s.
Calcium-Kanal Blocker	4	7	P = n.s.
Amiodaron	1	3	P = n.s.
HMG-CoA-Reduktase-Hemmer	9	9	P = n.s.

4.2.2 Elektrophysiologische Untersuchungen

Zunächst sollten die mit VHF assoziierten Veränderungen der Ionenströme nachgewiesen werden. Hierzu wurden die aus dem atrialen Gewebe isolierten Zellen untersucht und die Ströme I_{K1} und $I_{K_{ACH}}$ mittels ‚Patch-clamp‘-Technik gemessen.

4.2.2.1 I_{K1}

Das Verfahren zur Ermittlung von I_{K1} ist in Abb. 4.15 A dargestellt. Zur Messung wurde das oben dargestellte ‚ramp‘-Protokoll verwendet. Der daraus resultierende Strom ist schwarz wiedergegeben. Er stellt die Summe von I_{K1} und $I_{K_{ACH,c}}$ dar.

Um ausschließlich den Strom I_{K1} betrachten zu können, wurde ein weiteres Mal nach Zugabe von Tertiapin-Q gemessen. Bei diesem Peptid handelt es sich um einen hoch selektiven Inhibitor der Kir3 Ströme und damit des I_{KACH}^{168} . Bei dem resultierenden Strom dieser zweiten Messung (rot) handelte es sich also um I_{K1} ohne die I_{KACH} Komponente. Die Ergebnisse für den Strom I_{K1} sind in Abb. 4.15 dargestellt.

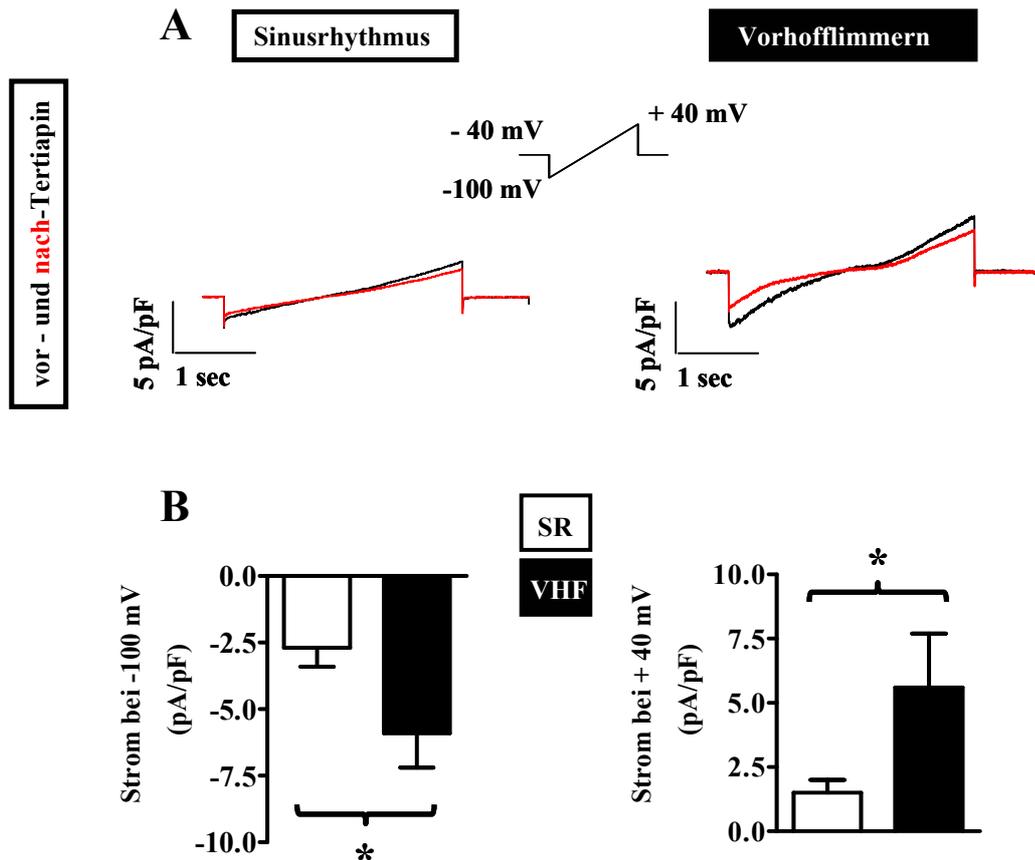


Abb. 4.15: Die Abbildung **A** stellt repräsentative Beispiele einwärts gleichrichtender Ionenströme dar. Es wurden Ströme von Kardiomyozyten von Patienten mit Sinusrhythmus (SR, links) mit solchen von Patienten mit Vorhofflimmern (VHF, rechts) verglichen. **B** zeigt links die Auswertung bei -100 mV aus $n = 5$ (SR) und $n = 3$ (VHF) Zellen und rechts die Auswertung bei +40 mV aus $n = 5$ (SR) und $n = 4$ (VHF). Alle Ströme wurden nach oben gezeigtem Protokoll und bei Zugabe von Tertiapin-Q (100 nM) gemessen. * $p < 0,05$

In der SR-Gruppe bestand nur ein geringer Anteil des I_{KACH} , was daran zu erkennen war, dass die Ionenstromamplituden vor und nach Applikation von Tertiapin-Q nur wenig verschieden waren. Der Verlauf war charakteristisch für einen einwärts gleichrichtenden Ionenstrom.

Die in VHF-Zellen gemessenen Ströme zeigten im Vergleich zur SR-Gruppe auf das vorgegebene Testpotential eine stärkere Reaktion. Die Amplitude war größer, aber auch der Verlauf war verändert. Er teilte sich hier in zwei stärkere Steigungen auf, in der Mitte kam es zu einem Plateau.

Wie in Abb. 4.15 A schon angedeutet wurde, war in der VHF-Gruppe eine signifikante Zunahme des I_{K1} zu beobachten. Die Mittelwerte \pm SEM sind in Abb. 4.15 B dargestellt. Die Stromdichte wurde für zwei Spannungspotentiale analysiert. Links ist die Auswertung bei -100 mV, dem negativsten Testpotential, und rechts die Auswertung bei +40 mV, dem positivsten Potential, zu sehen. In beiden Fällen zeigte die VHF-Gruppe einen stark erhöhten Wert (bei -100 mV: SR = $-2,7 \pm 0,7$; VHF = $-5,9 \pm 1,3$; bei +40 mV: SR = $1,5 \pm 0,5$; VHF = $5,6 \pm 2,1$; $p < 0,05$).

4.2.2.2 Konstitutiv aktiver I_{KACH}

Der ohne die Zugabe von Tertiapin-Q gemessene Strom stellte die Summe aus den beiden Strömen I_{K1} und $I_{KACH,c}$ dar. Nachdem I_{K1} durch Inhibition der Kir3 Ströme gemessen wurde, konnte der blockierte Anteil als $I_{KACH,c}$ identifiziert werden. Um also diesen Tertiapin-Q-sensitiven Strom zu erhalten, wurde I_{K1} von dem Gesamtstrom subtrahiert. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 4.16 gezeigt.

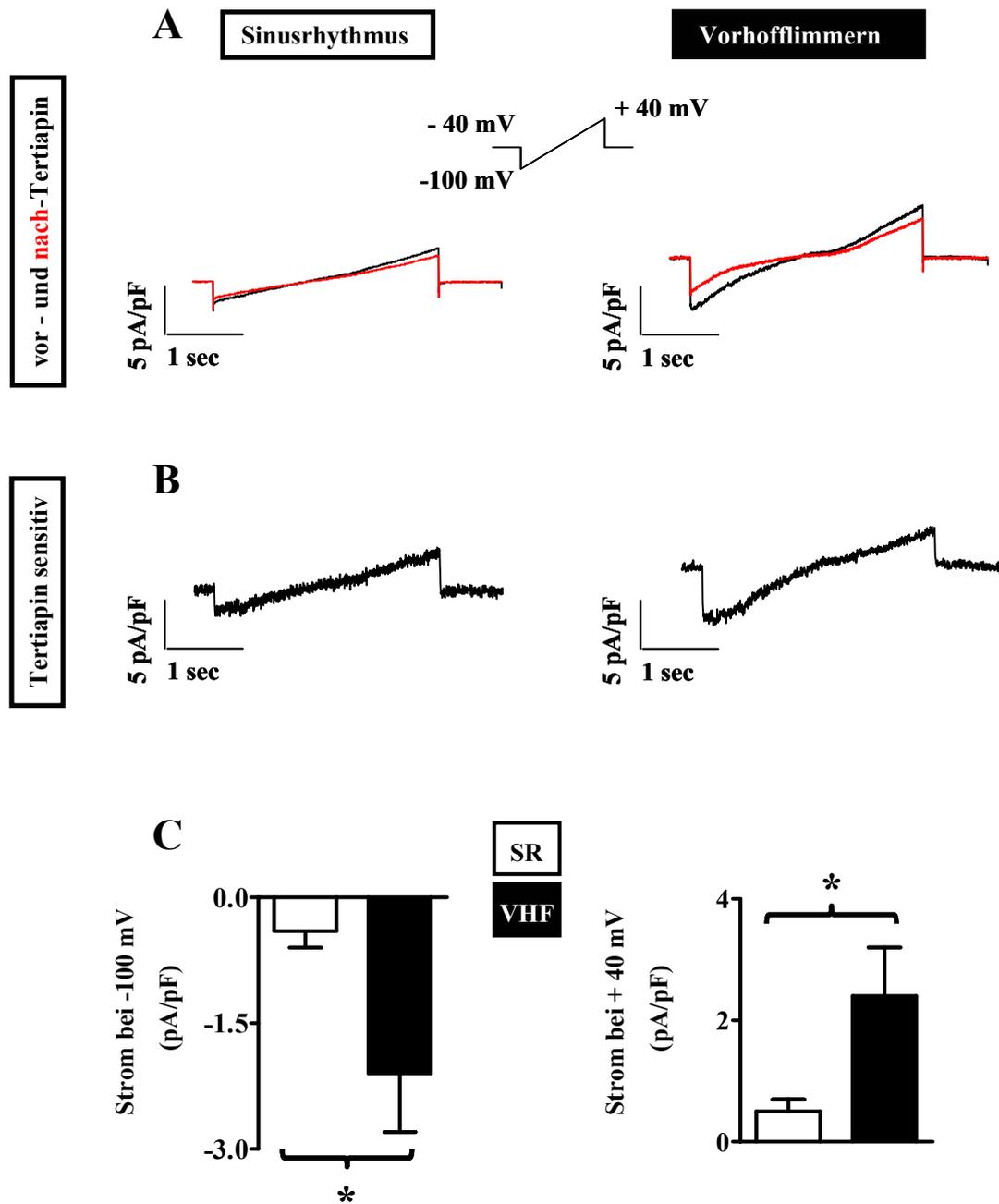


Abb. 4.16: Die Abbildung A stellt repräsentative Beispiele einwärts gerichteter Ionenströme dar. Es werden Kardiomyozyten im Sinusrhythmus (SR, links) mit von Vorhofflimmern geprägten (VHF, rechts) Zellen verglichen. Die roten Kurven zeigen den nach Zugabe von Tertiapin-Q (100 nM) gemessenen Strom. In **B** ist der aus prä- und post-Tertiapin subtrahierte Strom aufgetragen, der $I_{K_{ACh,c}}$. **C** zeigt die Auswertung des Tertiapin-sensitiven Stroms bei -100 mV aus $n = 5$ (SR) und $n = 3$ (VHF) Zellen (links) und rechts die Auswertung bei +40 mV aus $n = 5$ (SR) und $n = 4$ (VHF). * $p < 0,05$

Auch $I_{K_{ACh,c}}$ war, dem I_{K1} ähnlich, bei VHF heraufreguliert. Der Beispielstrom der SR-Gruppe zeigte wieder einen geraden Verlauf und eine flache Steigung. Da es sich hier

um die Differenz aus den beiden in A gezeigten Strömen handelte, war davon auszugehen, dass $I_{K_{ACh}}$ zu Beginn eine etwas niedrigere Stromdichte aufwies als I_{K1} , dann aber mit zunehmend positiverem Membran-Potential etwas steiler verlief. Insgesamt war aber die Stromdichte sehr viel geringer als bei I_{K1} . Der $I_{K_{ACh}}$ stellte einen kleineren Anteil an der Gesamtsumme dar.

Wie zuvor beobachtet werden konnte, war die Differenz zwischen dem Gesamtstrom und dem I_{K1} in der VHF-Gruppe deutlicher aufgetreten. Wie in Abb. 4.16 B zu sehen erklärte sich dies in der gleichermaßen erhöhten Stromdichte des $I_{K_{ACh,c}}$. In Abb. 4.16 C sind die Mittelwerte \pm SEM zu sehen. Auch hier war eine signifikante Erhöhung des Stroms sowohl bei einem Testpotential von -100 mV (SR = $-0,4 \pm 0,2$; VHF = $-2,1 \pm 0,7$; $p < 0,05$) als auch bei +40 mV (SR = $0,5 \pm 0,2$; VHF = $2,4 \pm 0,8$; $p < 0,05$) zu finden.

Beide Ströme zeigten die für VHF charakteristische Heraufregulierung. Die folgenden Versuche dienten der Aufklärung der zugrunde liegenden zellulären Regulationsmechanismen. Hier wurden sowohl transkriptionelle als auch posttranskriptionelle Faktoren in Betracht gezogen.

4.2.2.3 Proteinexpression der α -Untereinheiten des I_{K1}

Es wurden zunächst die α -Untereinheiten der Ionenkanäle untersucht. Eine erhöhte Stromdichte könnte ihre Ursache in ebenfalls erhöhter Proteinexpression haben. Zur Quantifizierung wurde in einer Gesamtmembranaufarbeitung Protein aus dem atrialen Gewebe isoliert und auf einen Western Blot gebracht (Abb. 4.17).

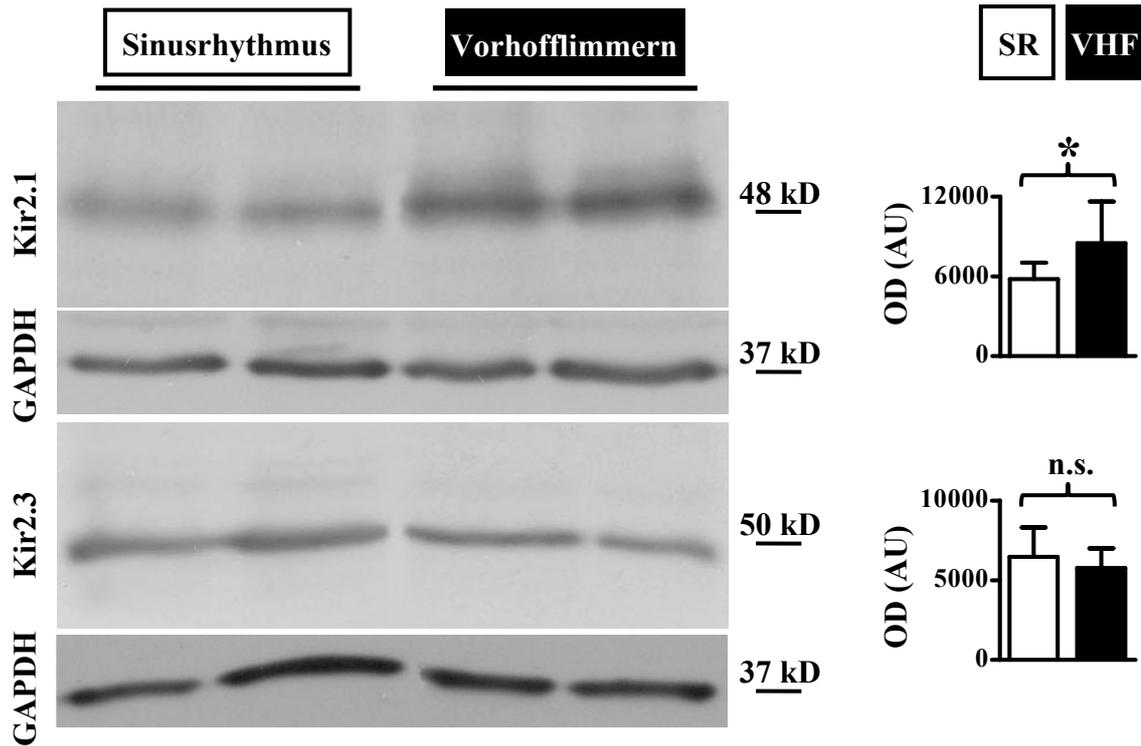


Abb. 4.17: Die Abbildung zeigt repräsentative Western Blots der α -Untereinheiten der Kir2 Ionenkanäle. Die Proben wurden aus humanem atrialen Gewebe mittels Gesamtmembran-Aufarbeitung gewonnen. Es wurden Sinusrhythmus und Vorhofflimmern verglichen, GAPDH diente als Ladungskontrolle. Rechts sind die Auswertungen aus $n = 6$ (SR) und $n = 5$ (VHF) gezeigt. Zur Detektion wurden die Antikörper anti-Kir2.1 (1:1000), anti-Kir2.3 (1:1000) und anti-GAPDH (1:1000) verwendet. * $p < 0,05$; n.s. – nicht signifikant; OD – optische Dichte; AU – ,arbitrary unit'

Zur linken Seite sind Beispielblots von Kir2.1 und Kir2.3 dargestellt. Darunter ist GAPDH als Ladungskontrolle des jeweiligen Blots zu sehen. Für jede Gruppe sind jeweils zwei Beispiele von unterschiedlichen Patienten gezeigt. Der oberste Blot zeigt die Detektion von Kir2.1 (bei ca. 48 kD). Die VHF-Gruppe wies deutlich mehr Kir2.1 auf als die SR-Gruppe. Anhand relativer Quantifizierung mehrerer Versuche konnte gezeigt werden, dass dieser Unterschied signifikant ist. Rechts in Abb. 4.17 sind Mittelwerte (\pm SEM) dargestellt.

Unten links ist ein repräsentativer Blot gegen die α -Untereinheit Kir2.3 (50 kD) mit GAPDH als entsprechender Ladungskontrolle dargestellt. Im Gegensatz zu Kir2.1 war hier aber kein relevanter Unterschied zwischen SR und VHF zu beobachten. Die Auswertung der Mittelwerte rechts reflektierte dieses Ergebnis. Das Protein Kir2.3 zeigte in VHF keine Veränderung.

4.2.2.4 Proteinexpression der α -Untereinheiten des I_{KACH}

Auf die gleiche Weise wurden auch die α -Untereinheiten des I_{KACH} untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 4.18 dargestellt.

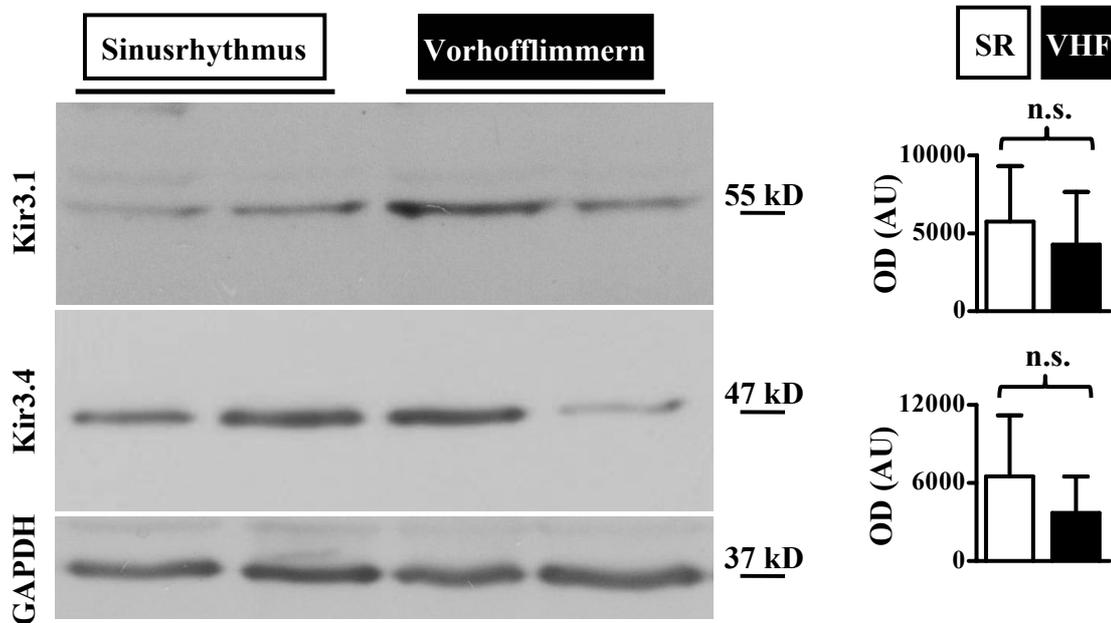


Abb. 4.18: Die Abbildung zeigt repräsentative Western Blots der α -Untereinheiten der Kir3 Ionenkanäle. Die Proben wurden aus humanem atrialen Gewebe mittels Gesamtmembran-Aufarbeitung gewonnen. Es wurden Sinusrhythmus und Vorhofflimmern verglichen, GAPDH diente als Ladungskontrolle. Rechts sind die Auswertungen aus $n = 6$ (SR) und $n = 5$ (VHF) gezeigt. Zur Detektion wurden die Antikörper anti-Kir3.1 (1:1000), anti-Kir3.4 (1:1000) und anti-GAPDH (1:1000) verwendet. n.s. – nicht signifikant; OD – optische Dichte; AU – ,arbitrary unit’

Die repräsentativen Western Blots auf der linken Seite stammen aus einer Aufarbeitung. Die Membran wurde gestrippt und mehrmals angefärbt. Zuletzt ist die Ladungskontrolle GAPDH zu sehen. Kir3.1 ist 55 kD groß, Kir3.4 etwa 47 kD.

Es zeigte sich für die Kir3 Untereinheiten kein signifikanter Unterschied der Proteinexpression zwischen SR und VHF. Beide Proteine zeigten bei gleicher Beladung starke Schwankungen innerhalb der Gruppen. Entsprechend sahen die Standardfehler in der Zusammenfassung der Mittelwerte (Abb. 4.18, rechts) aus. Es war keine signifikante Veränderung zu sehen.

Die Heraufregulierung von I_{K1} bei VHF ist in unseren Experimenten (in Einklang mit früheren Arbeiten) zumindest teilweise auf die erhöhte Expression von

Kir2.1 zurückzuführen. Die anderen α -Untereinheiten wiesen keine Veränderung auf. Die Veränderung des $I_{K_{ACH,c}}$ hat demnach eine andere Ursache.

4.2.2.5 Potentielle funktionelle Modulatoren des $I_{K_{ACH}}$

Möglich wäre auch eine funktionelle Regulierung des $I_{K_{ACH}}$ durch Modulatoren. Der Kir3-Strom ist G-Protein gekoppelt und seine Aktivierung erfordert unter anderem die Phosphorylierung durch die Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII)¹⁶⁹. Als nächstes sollte daher untersucht werden, ob die Proteine $G_{\alpha i-3}$ und Calmodulin in Gewebeproben von Patienten mit VHF eine veränderte Expression zeigen. Es wurde wie bei der Quantifizierung der α -Untereinheiten verfahren. Das Resultat ist in Abb. 4.19 illustriert.

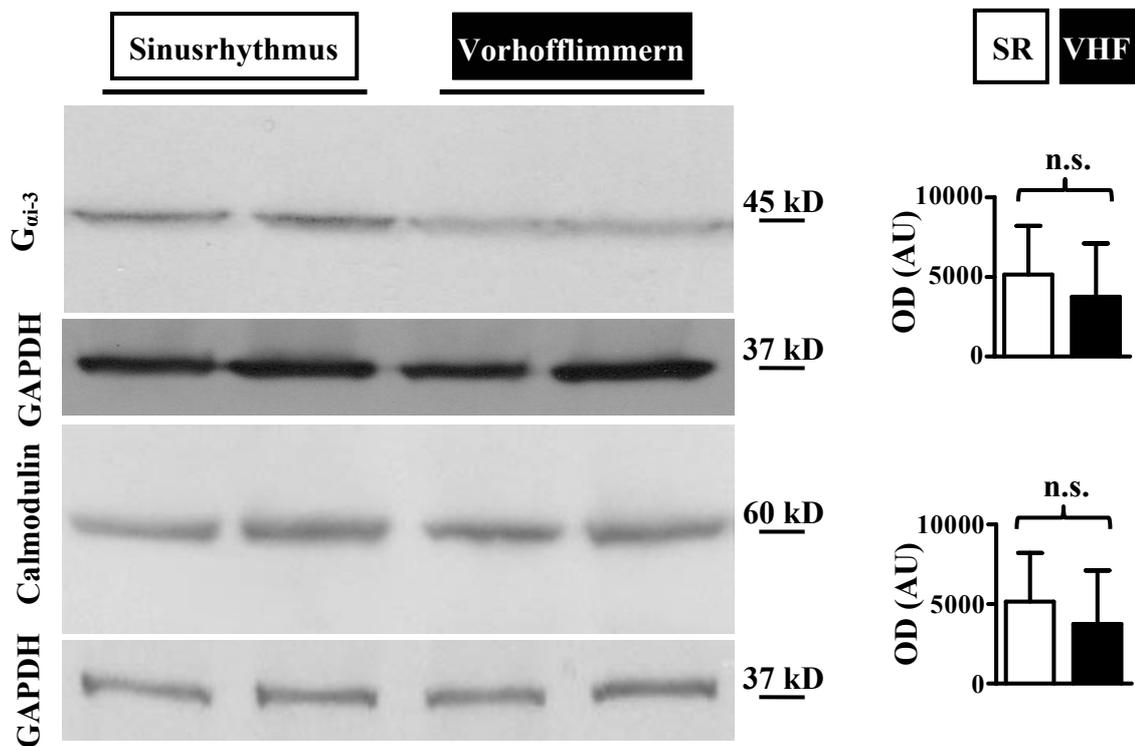


Abb. 4.19: Gezeigt werden repräsentative Western Blots von $G_{\alpha i-3}$ und Calmodulin. Die Proben wurden aus humanem atrialen Gewebe mittels Gesamtmembran-Aufarbeitung gewonnen. Es wurden Sinusrhythmus und Vorhofflimmern verglichen, GAPDH diente als Ladungskontrolle. Rechts sind die Auswertungen aus $n = 8$ ($G_{\alpha i-3}$) und $n = 3$ (Calmodulin) gezeigt. Zur Detektion wurden die Antikörper anti- $G_{\alpha i-3}$ (1:1000), anti-Calmodulin (1:1000) und anti-GAPDH (1:1000) verwendet. n.s. – nicht signifikant; OD – optische Dichte; AU – ‚arbitrary unit‘

Die Beispielblots in Abb. 4.19 links zeigen die Detektion von $G_{\alpha i-3}$ (45 kD) und Calmodulin (60 kD) mit der jeweils zugehörigen Ladungskontrolle GAPDH. In beiden Fällen zeigten die Gruppen unter sich eine einheitliche Proteinexpression.

Bei Calmodulin war kein Unterschied zwischen SR und VHF zu sehen. Dies bestätigten die Mittelwerte auf der rechten Seite.

Bei $G_{\alpha i-3}$ konnte zunächst eine statistisch nicht signifikante Tendenz zur Reduktion in VHF beobachtet werden. Da in diesem Fall eine inhibierende Funktion vermutet wurde, schien eine Regulierung durch dieses Protein möglich. Zwar zeigten die Mittelwerte dieselbe Tendenz, allerdings mit hohem Standardfehler. Zu diesem Zeitpunkt kann nicht von einer Inhibierung des $I_{KACH,c}$ durch $G_{\alpha i-3}$ gesprochen werden.

4.2.2.6 mRNA-Quantifizierung der α -Untereinheiten

Die folgenden Versuche sollten klären, ob die für VHF charakteristischen Veränderungen auch auf mRNA-Ebene geschehen. Aus dem atrialen Gewebe wurde deshalb Gesamt-RNA isoliert und dann zu cDNA umgeschrieben. Mithilfe von Realtime-PCRs wurde die mRNA der Ionenkanaluntereinheiten quantifiziert. Das Resultat ist in Abb. 4.20 dargestellt.

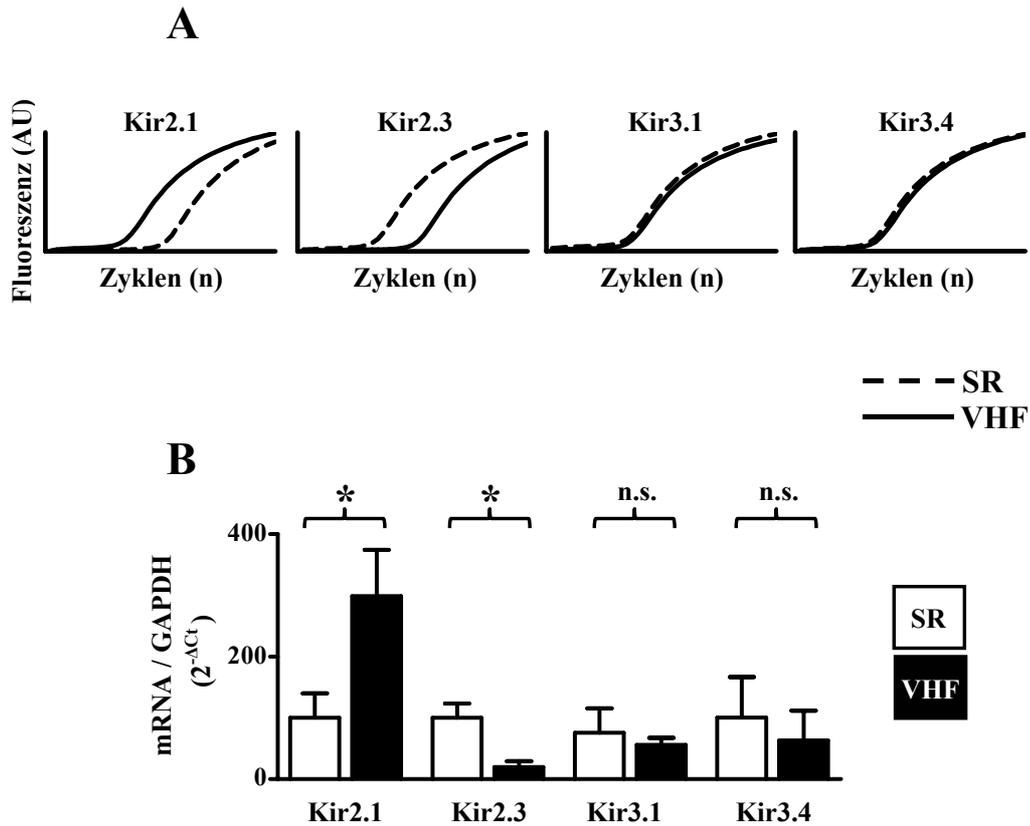


Abb. 4.20: Die Abbildung zeigt die mRNA-Quantifizierung der Kir2 und Kir3 Ionenkanalproteine. Die RNA wurde aus humanem atrialen Gewebe von Patienten mit Sinusrhythmus (SR) und Vorhofflimmern (VHF) isoliert. In **A** sind Beispielkurven der Realtime-PCR zu sehen. **B** zeigt die Mittelwerte \pm SEM. Die Werte sind gegen GAPDH als internem Standard normalisiert. Kir2.1 n = 8 (SR), n = 7 (VHF); Kir2.3, Kir3.1 und Kir3.4 jeweils n = 6; * p < 0,05; n.s. – nicht signifikant

Abb. 4.20 A zeigt repräsentative Kurven der Realtime-PCR. Abb. 4.20 B zeigt Mittelwerte der normalisierten Ct-Werte (\pm SEM). Die Expression der Kir2.1 mRNA war bei VHF im Vergleich zum Sinusrhythmus signifikant heraufreguliert. Dies deutet darauf hin, dass der Heraufregulierung von I_{K1} ein transkriptioneller Mechanismus zugrunde liegt.

Bei der mRNA von Kir2.3 war ein anderes Ergebnis zu beobachten. Hier erschien die mRNA-Expression in der VHF-Gruppe geringer. Für die Untereinheiten Kir3.1 und Kir3.4 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen SR und VHF festgestellt werden. Es zeigten sich ähnliche Tendenzen wie in der Proteinquantifizierung – zu einer reduzierten Expression in VHF.

4.2.2.7 Quantifizierung des Expressionsniveaus der microRNA 1

Yang *et al.* haben gezeigt, dass die muskelspezifische *miR-1* bei koronarerkrankten Patienten überexprimiert wird. Weiter zeigte die Studie, dass *miR-1* unter anderem inhibierend auf die Proteinexpression von Kir2.1 wirkt¹⁶³. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob auch VHF eine Veränderung der *miR-1* Expression bewirkt. Aus der isolierten Gesamt-RNA wurde also *miR-1* spezifische cDNA synthetisiert und ebenfalls per Realtime-PCR quantifiziert. Abb. 4.21 gibt die Ergebnisse wieder.

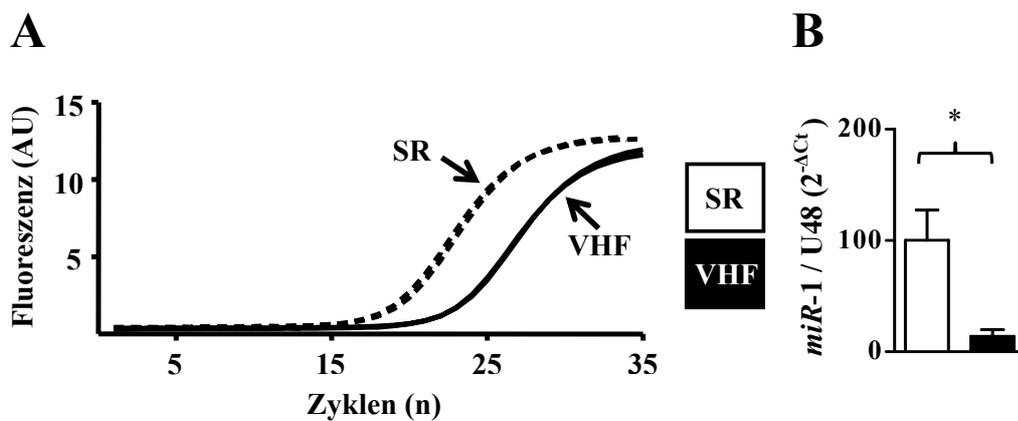


Abb. 4.21: Abbildung A zeigt Beispielkurven für die Realtime-PCR für die miRNA *miR-1*. Die miRNA wurde aus humanem atrialen Gewebe isoliert. B zeigt die Auswertung aus $n = 9$ (SR) und $n = 7$ (VHF). Als interner Standard wurde hier die ‚small nuclear RNA‘ U48 verwendet. * $p < 0,05$; AU – ‚arbitrary unit‘

Auch hier konnte eine Veränderung der Expression der *miR-1* festgestellt werden. Wie auch die Beispielkurven deutlich zeigten, war die inhibitorische *miR-1* wesentlich stärker in den SR-Proben vertreten als in VHF.

Die Reduktion der miRNA könnte ein weiterer Grund für die erhöhte Proteinexpression von Kir2.1 sein.

4.2.2.8 Zusammenfassung

VHF geht einher mit einer Heraufregulierung der einwärts gleichrichtenden Ionenströme I_{K1} und $I_{K_{ACh,c}}$. Ziel dieser Studie war, zugrunde liegende Mechanismen für diese Regulierung zu untersuchen. Die Versuche wurden an humanem atrialen Gewebe des Vorhofs vorgenommen. Als Kontrolle diente atriales Gewebe von SR-Patienten.

Protein- und mRNA-Quantifizierung der α -Untereinheiten ergab, dass Kir2.1 transkriptionell heraufreguliert wurde. Weiter fiel eine Reduktion der *miR-1* auf, welche der Zunahme von Kir2.1 mRNA bei VHF zugrunde liegen mag.

Die Heraufregulierung des I_{K1} wird also potentiell durch transkriptionelle sowie posttranskriptionelle Mechanismen moduliert.

Es konnten keine Hinweise auf eine transkriptionelle oder posttranskriptionelle Regulierung des $I_{K_{ACh,c}}$ gefunden werden. Sowohl Protein- als auch mRNA-Expression waren unverändert. Die Ursachen sind in diesem Fall möglicherweise funktioneller Natur. In dieser Studie wurden die beiden potentiellen Faktoren, Calmodulin und $G_{\alpha i-3}$, untersucht. Jedoch konnte auch hier keine Veränderung in der Proteinexpression festgestellt werden, so dass dieser Aspekt der Regulation nicht abschließend geklärt werden konnte.

5 Diskussion

5.1 Genetische Disposition für Vorhofflimmern: Rolle der β -Untereinheit KCNE1

5.1.1 Struktur und Funktion der β -Untereinheit KCNE1

Die Modulation der α -Untereinheit KCNQ1 durch die β -Untereinheit KCNE1 ist teilweise bereits bestimmten Regionen des KCNE1 insbesondere im Bereich der TMD und des C-Terminus zugeordnet. Eine Rolle des N-Terminus hinsichtlich der Modulation von KCNQ1 (und dem resultierenden I_{Ks}) ist hingegen weniger gut beschrieben.

Transmembranäre Domäne der β -Untereinheit

Die Aminosäuren 44–67 stellen die TMD des KCNE1 dar. Sie bilden eine α -helikale Sekundärstruktur aus^{170,171}, die mit der von KCNQ1 gebildeten Pore des Ionenkanals interagiert^{100,101}. Interaktionen der TMD sind vor allem mit dem Segment S6 des KCNQ1 zu beobachten^{102,172-175} (Abb. 5.1).

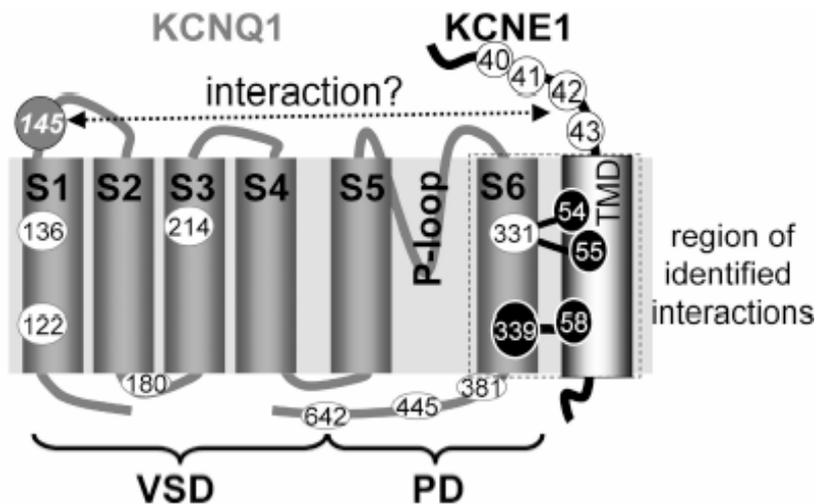


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Ionenkanaluntereinheiten KCNQ1 und KCNE1 (nach Xu *et al.*, mit Genehmigung)¹⁷⁶. TMD – transmembranäre Domäne; S – Segment; PD – Poren-Domäne; VSD – (voltage sensing) spannungssensitive Domäne

Aber es gibt auch Hinweise auf eine Interaktion mit anderen Segmenten des KCNQ1. So ist die KCNE1-Modulation von der Ladungsverteilung der Carboxylhälfte des S4 abhängig¹⁰⁴. Weiterhin kommen sich die extrazellulären Enden der TMD und des S4 in aktiviertem Zustand des Ionenkanals räumlich sehr nahe¹⁷⁷. Dies konnten Nakajo und Kubo nachweisen, indem sie einzelne Aminosäuren auf beiden Seiten durch Cysteine ersetzten. War die räumliche Distanz zwischen diesen Cysteinen gering genug, konnte die Ausbildung von Disulfidbrücken beobachtet werden. Schließlich wurde auch über eine mögliche Interaktion zwischen den Aminosäuren 40 und 41, die sich schon im N-Terminus des KCNE1 befinden, und der Position 226 des N-Terminus des KCNQ1 berichtet (Abb. 5.1). Diese beiden Positionen nähern sich in ruhendem Zustand stark an¹⁷⁶. Xu *et al.* entwarfen mittels dieser Informationen ein Modell, in dem die ungefähre Lage des KCNE1 zwischen den α -Untereinheiten des Proteinkomplexes angezeigt wird¹⁷⁶ (Abb. 5.2).

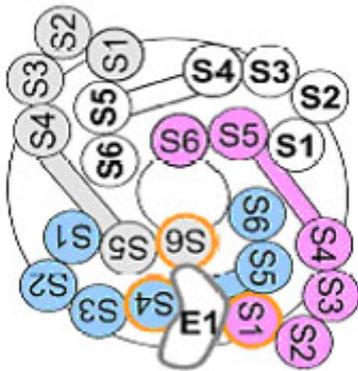


Abb. 5.2: Schematische Darstellung einer Aufsicht auf das KCNQ1-Homotetramer mit einem KCNE1-Peptid, das sich zwischen die α -Untereinheiten einlagert (nach Xu *et al.*, mit Genehmigung)¹⁷⁶. E1 – KCNE1; S – Segment

Mögliche Interaktionspartner des KCNE1 innerhalb KCNQ1 sind gelb umrandet. Nach diesem Modell interagiert ein KCNE1-Protein mit dreien der vier KCNQ1-Untereinheiten des Ionenkanal-Komplexes¹⁷⁶.

Melman *et al.* kamen außerdem zu dem Schluss, dass die Kinetik des I_{Ks} -Stroms mithilfe einer Sequenz in der TMD (Aminosäuren 48-59) von KCNE1 kontrolliert wird (s. 5.1.4).

C-Terminus

Auch dem C-Terminus der β -Untereinheit wird hinsichtlich der Interaktion mit und der Modulation von KCNQ1 einige Bedeutung beigemessen. Die Funktionalität des KCNE1 wird durch Mutationen im C-Terminus empfindlich beeinträchtigt^{59,178}. Einige dieser Mutationen (z.B. S74L und D76N) wurden mit dem LQT-Syndrom assoziiert⁵⁸. Romey *et al.* zeigten darüber hinaus eine direkte Interaktion des C-Terminus mit der Porenregion des Ionenkanals, den sie bildlich als einen ‚foot-in-the-door‘ Mechanismus beschrieben¹⁷⁹. Eine Deletion des C-Terminus von KCNE1 (Aminosäuren 94-129) resultierte in einem sehr rasch aktivierenden Strom, der hinsichtlich Amplitude und biophysikalischen Eigenschaften insgesamt einem aus KCNQ1 allein konstituierten Strom ähnelte¹⁰⁰. Dieses Ergebnis steht jedoch zumindest teilweise im Widerspruch zu einer anderen Arbeit von Melman *et al.* Zwar machen die Autoren der ersten Studie deutlich, dass der C-Terminus allein zur Kontrolle der Kinetik nicht reicht, sondern mindestens die C-terminale Hälfte der TMD notwendig ist. Jedoch waren es Melman *et al.*, die den für die Aktivierung des Ionenkanals verantwortlichen Bereich auf eine kurze Sequenz in der TMD (Aminosäuren 57-59, s. 5.1.4) eingrenzen konnten¹⁰².

N-Terminus

Im Vergleich zu C-Terminus und TMD sind nur wenige LQT-Syndrom Mutationen im Bereich des N-Terminus von KCNE1 bekannt¹⁸⁰⁻¹⁸⁴. Bei dem SNP G38S handelt es sich um einen hoch prävalenten SNP, der bereits in mehreren Populationsstudien mit VHF assoziiert wurde^{107,185}. Die mit VHF assoziierte Variante des SNPs (38G, der Wildtyp) weist einen kleineren Strom wahrscheinlich aufgrund geringerer Membranlokalisation auf¹⁰⁹. Im Falle dieses SNPs macht der Austausch des Glyzins mit einem Serin einen funktionell bedeutenden Unterschied. Im Gegensatz zu dem sehr kleinen Glyzin (75,07 g/mol) weist das größere Serin (105,09 g/mol) eine Hydroxymethylgruppe auf und ist deshalb zu kovalenten Bindungen in der Lage¹⁸⁶. Ein Austausch kann also eine Veränderung der Tertiärstruktur, potentielle Interaktion des Proteins, aber auch die Modifikation des Proteins zur Folge haben. Herlyn *et al.* fanden, dass die Position 38 in KCNE1 möglicherweise Teil einer Glykosylierungsstelle (Positionen 37-40) mit dem Motiv SGXG ist¹⁸⁷. Die Autoren zeigten aber dennoch, dass beide Varianten des SNP gleichermaßen glykosyliert wurden. Eine Beeinflussung des Glykosylierungsverhaltens

scheint also nicht der Grund für die funktionellen Auswirkungen des SNPs zu sein. Es fand sich bislang kein Hinweis für eine Interaktion der vom SNP betroffenen Aminosäure (Position 38) mit der α -Untereinheit, obwohl die Positionen 40 und 41, von denen eine solche Interaktion berichtet wird (Abb. 5.1), räumlich nahe beieinander liegen.

Eine mögliche Hypothese wäre, dass das Glyzin an dieser Position dem weiteren N-Terminus eine größere Beweglichkeit ermöglicht und wie ein Gelenk fungiert. Die Struktur im näheren Umfeld erscheint auffällig. Drei Arginine, und somit positiv geladene Aminosäuren sind zu finden, außerdem ein Prolin, das einen Knick in der Kette verursacht und dadurch eine Konformation teilweise mitbestimmt¹⁸⁶. Dies könnte die hier vorliegende Struktur stärken.

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit neben den beiden Varianten des SNP ‚38S‘ und ‚38G‘ auch weitere Konstrukte untersucht. Darunter der ‚linker‘, der anstelle des Glyzins in Position 38 fünf Alanine aufweist, die ebenfalls keine kovalenten Bindungen eingehen. Dies hatte den Zweck, die Beweglichkeit, die bei ‚38G‘ vermutet wurde, in größerem Ausmaß nachzuahmen. Der Effekt, den ein ‚Glyzin-Gelenk‘ haben könnte, sollte verstärkt werden. Tatsächlich wies dieses Konstrukt dem ‚38G‘ ähnliche Eigenschaften auf – einen verminderten Strom sowie geringere Membranlokalisation.

Während bei C-Terminus und TMD des KCNE1 Interaktionen mit der α -Untereinheit zu erwarten sind, ist das eher unwahrscheinlich für den N-Terminus. Alle in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte, selbst die N-terminal trunke Mutante (‚ Δ 1-38‘), co-immunopräzipitierten mit der α -Untereinheit. Wie Aufnahmen des konfokalen Mikroskops zeigten, trat außerdem bei allen Konstrukten eine Co-Lokalisation mit der α -Untereinheit ein.

Dennoch scheint der N-Terminus eine Aufgabe zu erfüllen, da ‚ Δ 1-38‘ ebenso wie ‚linker‘ und die Produkte des ‚Alanin-Scannings‘ einen veränderten Strom bewirkten. Diese Aufgabe liegt möglicherweise im Transport zu der Plasmamembran oder der Verankerung beider Untereinheiten des Ionenkanals.

5.1.2 N-Terminus beeinflusst Transport oder Verankerung an Plasmamembran

Die Assemblierung der beiden Untereinheiten geschieht wahrscheinlich bereits im ER^{167,188}. Es wäre also möglich, dass der N-Terminus des KCNE1 für den weiteren Transport zur Plasmamembran oder auch die Verankerung dort verantwortlich ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin.

Die konfokalen Bilder zeigten vermehrte Membranlokalisation für KCNQ1 in Co-Expression mit ‚38S‘. Alle anderen Konstrukte wiesen, wie das VHF assoziierte ‚38G‘, nur wenig von beiden Proteinen an der Plasmamembran auf. ‚Δ1-38‘ stach besonders hervor. Es schien, dass es gar keine Membranlokalisation aufwies. Es war jedoch bei Co-Expression mit KCNQ1 ein kleiner aber für I_{Ks} typischer Strom zu beobachten. Der Strom unterschied sich deutlich von dem der mit KCNQ1 allein transfizierten Kontrolle. Es war daher anzunehmen, dass immerhin ein Mindestmaß beider Untereinheiten an der Plasmamembran lokalisierte. In allen Fällen war eine Co-Lokalisation zu beobachten. Die Interpretation der konfokalen Bilder war schwierig, da durch Überexpression der Proteine große Bereiche der Zelle angefärbt waren. Das ER war unabhängig davon, ob der Transport zur Plasmamembran funktionell war, mit den überexprimierten Proteinen angefüllt. Dadurch war eine Unterscheidung zwischen den Organellen Plasmamembran und ER schwierig und allein auf dieser Methode basierende Aussagen erschienen nicht ausreichend.

Die proteinbiochemische Zellfraktionierung zeigte jedoch konsistente und eindeutige Ergebnisse, welche die Aufnahmen des konfokalen Mikroskops bestätigten. Die Untereinheiten in den fraktionierten Organellen Plasmamembran und ER konnten aufgrund der Intensität der den Proteinen entsprechenden Banden auf den Western Blots miteinander verglichen werden. ‚38S‘ zeigte signifikant stärkere Plasmamembranlokalisation und ebenso signifikant geringere ER-Lokalisation für beide Untereinheiten. Die anderen Konstrukte, darunter auch das VHF-assoziierte ‚38G‘, unterschieden sich nur geringfügig voneinander. Die Deletion des Großteils des N-Terminus zeigte die gleichen Eigenschaften wie das Glyzin in Position 38 und die Produkte des ‚Alanin-Scannings‘ an den Positionen der Arginine. Dies spricht dafür, dass das Glyzin – ebenso wie die Arginine in dessen Nähe – essentiell für die Rolle des N-Terminus ist.

Es wurde außerdem deutlich, dass die Membranlokalisation der α -Untereinheit KCNQ1 von der Struktur des N-Terminus des KCNE1 abhängig ist. Dies könnte bedeuten, dass das KCNQ1 allein nicht an die Plasmamembran transportiert wird. Das scheint aber nicht der Fall zu sein¹⁸⁹. Die α -Untereinheit allein konstituiert ebenfalls einen Strom. Bei diesem handelt es sich aber nicht um den nativen I_{Ks} , sondern einen schneller aktivierenden Strom mit geringerer Amplitude^{56,57}.

Die KCNE1-Konstrukte zeigten sowohl bei der konfokalen Mikroskopie als auch bei der Zellfraktionierung eine der α -Untereinheit ähnliche Verteilung. Dies spricht für einen gemeinsamen Transport des Proteinkomplexes an die Plasmamembran. Zudem konnte in einer früheren Arbeit gezeigt werden, dass die β -Untereinheit KCNE1 allein nicht an der Plasmamembran präsent ist¹⁹⁰.

Der Transport des Proteinkomplexes aus beiden Untereinheiten kann anders beeinflusst werden als der des KCNQ1 allein. So fördert die Stimulation durch die Glucocorticoid-induzierbare Kinase (SGK) 1 den Transport von KCNQ1 an die Plasmamembran. KCNE1 muss für diese Stimulation nicht anwesend sein. Wenn aber KCNQ1 im Komplex mit der β -Untereinheit vorliegt, so ist ein bestimmter Bereich des C-Terminus von KCNE1 (Positionen 73-79) zur Stimulation notwendig; bei Fehlen des entsprechenden C-terminalen Segmentes kann diese Stimulation sonst nicht eintreten¹⁹¹.

Peroz *et al.* fanden, dass KCNE1 als Chaperon für die α -Untereinheit agiert. Beim intrazellulären Transport schützte es das KCNQ1 vor verfrühter proteasomaler Degradation¹⁹². Nach Chandrasekhar *et al.* war jedoch die Anwesenheit der α -Untereinheit KCNQ1 für die Plasmamembranlokalisation des KCNE1 notwendig¹⁹³. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind eher mit ersterer Studie konsistent.

Die Arginine in der N-terminalen Struktur des KCNE1 könnten aufgrund ihrer Ladung strukturell wichtige Elemente für eine Interaktion mit den hydrophilen Köpfen der Phospholipide in der Plasmamembran darstellen und somit für die Verankerung der Proteine eine Rolle spielen¹⁹⁴. In der Literatur finden sich allerdings auch Beispiele für positiv geladene Aminosäuren als Teil eines ER-Retentions-Motivs (beispielsweise RXX, wobei X vorzugsweise für eine große neutrale oder positiv geladene Aminosäure steht). Es dient bei Kaliumkanälen und verschiedenen Rezeptoren als ER-Retentionssignal¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Bei der in KCNE1 vorliegenden Sequenz handelt es sich aber kaum um ein solches ER-Motiv. Keines der ‚Alanin-Scanning‘ Konstrukte zeigte ein

verändertes Vorkommen im ER im Vergleich mit den anderen N-terminalen Mutationen.

In der Literatur finden sich außerdem einige Beispiele von positiv geladenen Aminosäuren, die erhöhte Membranlokalisation von Proteinen begünstigen. So berichteten Jaskolski *et al.* von zwei Splice-Varianten eines Glutamatrezeptors. Nur in einer der Varianten war eine Folge von zwei Argininen und zwei Lysinen zu beobachten. Diese Variante zeigte im Vergleich zur anderen eine höhere Membranlokalisation¹⁹⁸. Ein weiteres Beispiel wurde von Liu *et al.* gezeigt. Die Autoren fanden heraus, dass die Verankerung des Membranproteins Saposin C stark vom Vorhandensein zweier Lysine (in den Positionen 13 und 17) abhängig ist. Ein Austausch dieser Aminosäuren mit einer beliebigen anderen führte zu schwächerer Verankerung in der Zellmembran. Bei Austausch mit einem Arginin konnte dagegen eine im Vergleich mit dem Wildtyp stärkere Verankerung beobachtet werden¹⁹⁹.

Spielen TMD und C-Terminus eine Rolle bei dem Transport an die Plasmamembran?

Auch die TMD kommt als möglicher verantwortlicher Bereich für den Membran-Transport in Frage. Eine Studie von Krumerman *et al.* befasste sich mit einer anderen Mutation des KCNE1, L51H, die zu einer Defizienz des intrazellulären Transportes („trafficking“) führte¹⁶⁷. An Position 51 steht anstelle eines Lysins ein Histidin. Allerdings befand sich diese Mutation nicht in der hier für das „trafficking“ vermuteten Region des N-Terminus. Die Autoren spekulierten, dass dieser Austausch mit einem vergleichsweise großen Histidin zu fehlerhafter Faltung oder veränderter Konformation führen könnte. Desweiteren wurden die Glykosylierungs-Muster von Mutante und Wildtyp miteinander verglichen. Hinzu kam außerdem ein Konstrukt, dem mittels Mutagenese ein zusätzliches ER-Retentionssignal angehängt wurde. Man vermutet für das KCNE1 zwei Glykosylierungsstellen (die Position dieser Stellen ist umstritten, nach Takumi *et al.* sind es die Aminosäuren 3-5 und 24-28¹⁷⁸, Herlyn *et al.* hielten die Positionen 37-40 für eine Glykosylierungsstelle). Man geht weiter davon aus, dass diese Glykosylierungen im ER oder Golgi-Apparat geschehen¹⁶⁷. Während der Wildtyp ein weiteres Signal, ein glykosyliertes Protein, zeigte, war bei der Mutation L51H überhaupt nichts zu beobachten. Das Konstrukt mit dem ER-Retentionssignal dagegen wies eine viel stärkere Glykosylierung auf. Die Autoren schlossen daraus, dass dieses

letztgenannte Konstrukt mehrmals glykosyliert wurde, weil es in das ER zurück transportiert wurde. Die Mutation L51H war dagegen überhaupt nicht aus dem ER hinausgelangt. Es ist daher wahrscheinlicher, dass diese Mutation so schwerwiegend war, dass sie bereits einer ersten Überprüfung nicht standhielt. Obwohl die Mutation L51H also dazu führt, dass das Peptid nicht an die Plasmamembran gelangt, ist möglicherweise trotzdem nicht von einer kausalen ‚trafficking‘ Defizienz auszugehen. Vielmehr könnte auch eine starke Missfaltung zu einer vollständigen ER-Retention führen.

Melman *et al.* stellten die Vermutung an, dass der C-Terminus bei dem Transport zu der Plasmamembran eine Rolle spielen könnte. Dieser ist offensichtlich von Bedeutung, da Mutationen in diesem Bereich stark beeinträchtigend sind^{59,178} und hier außerdem eine Interaktion mit der Pore des Ionenkanals vermutet wird¹⁷⁹. Dennoch ist eine genaue Rolle des C-Terminus hinsichtlich des intrazellulären Transports nicht näher bekannt. Wie zuvor erwähnt, sahen Tapper und George eine Bedeutung eher in der Kontrolle der Kinetik¹⁰⁰. Melman *et al.* sahen dafür eher die TMD verantwortlich und nahmen daher an, dass der C-Terminus den Transport beeinflusst¹⁰².

Tapper *et al.* zeigten, dass KCNQ1 zusammen mit einem C-terminal trunkierten KCNE1 im Vergleich mit dem Wildtyp einen schwächeren I_{K_S} -Strom konstituierte. Insofern wäre es zwar möglich, dass es sich hier um eine ‚trafficking‘-Defizienz handelt. Außerdem zeigte dieser Strom aber auch eine veränderte Aktivierung, die dem aus KCNQ1 allein resultierenden Strom ähnelte. Es schien hier also auch die Modulation der Kinetik gestört¹⁰⁰. Die Ströme der N-terminal veränderten KCNE1-Konstrukte, die ebenfalls schwächer waren aber größtenteils unveränderte Kinetik zeigten, sprechen eher für eine ‚trafficking‘-Defizienz.

Seeböhm *et al.* schließlich zeigten, dass für die Stimulation des Proteinkomplexes durch die SGK 1, die den Transport des Ionenkanals an die Plasmamembran fördert, ein bestimmter Bereich des C-Terminus notwendig war¹⁹¹. Es scheint daher möglich, dass der C-Terminus in gewissem Maße in das ‚trafficking‘ involviert ist.

5.1.3 KCNE-Familie

Die β -Untereinheit KCNE1 ist Mitglied der KCNE-Gen-Familie. Insgesamt gibt es in dieser Familie fünf bekannte Proteine, die alle als modifizierende β -Untereinheiten für Kaliumkanäle fungieren. Dabei ist nicht immer ausschließlich eine α -Untereinheit kompatibel, die Untereinheiten sind zum Teil ‚promisk‘²⁰⁰. Die Produkte dieser Gen-Familie zeichnen sich durch homologen Aufbau aus: eine transmembranäre Domäne, ein extrazellulär lokalisierter N-Terminus und ein C-Terminus, der in das Zellinnere reicht. Sie bestehen aus 103-177 Aminosäuren. Die Proteine unterscheiden sich teilweise stark in der Modifikation, die sie bei der α -Untereinheit bewirken. Die KCNE-Proteine erzeugen, auch mit derselben α -Untereinheit, phänotypisch unterschiedliche Ströme. Nicht alle Proteine der Familie werden im menschlichen Herzen exprimiert und manche assemblieren abhängig von dem Ort ihrer Expression. Als erstes aus dieser Gruppe wurde KCNE1 entdeckt und erhielt zunächst den Namen minK⁹². Die später entdeckten heißen deshalb auch ‚minK-related peptides‘ (MiRPs)1-4 oder aber systematisch KCNE2-5^{97,201,202}. KCNE2 ist KCNE1 mit 28% Homologie am ähnlichsten – KCNE1 und KCNE3 sind zu 15% identisch²⁰³. Es wird vermutet, dass die KCNE-Proteine für die ventrikuläre Repolarisation essentiell sind, da einige Mutationen in den Proteinen mit dem LQT-Syndrom assoziiert sind.

KCNE2

KCNE2 wird ebenfalls im menschlichen Herzen exprimiert^{201,204}. Am Herzen wird es überwiegend im Purkinje System exprimiert²⁰⁵. Hier bildet es unter anderem mit der α -Untereinheit KCNH2 einen nativen Kaliumkanal. Diese Interaktion beschleunigt die Deaktivierung des Kanals um das zwei bis dreifache und reduziert die Leitfähigkeit um 40%²⁰⁶. KCNE2 konnte *in vitro* eine Interaktion mit KCNH2 nachgewiesen werden. ‚Loss-of-function‘ Mutationen in diesem Protein wurden mit dem LQT-Syndrom assoziiert¹⁸¹. Unter anderem wurde eine N-terminale Mutation entdeckt, T10M, die mit dem LQT-Syndrom assoziiert ist²⁰⁷. Eine weitere Interaktion besteht mit HCN-Kanälen²⁰⁸. Diese Kanäle liegen dem Schrittmacher-Strom I_f zugrunde^{209,210}.

KCNE2 konnte *in vitro* auch eine Interaktion mit KCNQ1 nachgewiesen werden. Dabei kommt ein pH-sensitiver konstitutiv aktiver Kanal zustande. Man nimmt an, dass eine solche Assemblierung im Darm zu finden ist²¹¹. KCNE2 und KCNQ1

werden auch in parietalen Zellen des Darms exprimiert. KCNE2 ‚Knockout‘-Mäuse entwickelten Achlorhydrie, gastrische Hyperplasie und Hypergastrinämie durch beeinträchtigte Protonensekretion der parietalen Zellen^{212,213}. Über eine solche Interaktion im Herzen ist nichts bekannt.

KCNE3

KCNE3 bildet ebenfalls mit der α -Untereinheit KCNQ1 zusammen einen rasch aktivierenden, konstitutiv-aktiven Kaliumkanal, der im Kolon funktionell aktiv ist²¹⁴. KCNE3 wird ebenfalls in Skelettmuskulatur exprimiert und assembliert dort mit der α -Untereinheit KCNC4²¹⁵. Schließlich ist es auch im Herzen zu finden, ob aber dort auch eine Assemblierung mit KCNQ1 geschieht, ist bisher unbekannt. In diesem Protein konnte eine N-terminale Mutation, V17M, mit VHF assoziiert werden²¹⁶.

KCNE4

KCNE4 sticht besonders aus der KCNE-Familie hervor. Die Co-Expression dieser β -Untereinheit mit KCNQ1 führt zur Inhibierung des aus KCNQ1 gebildeten Ionenkanals²¹⁷. Auch hier konnten Mutationen mit dem LQT-Syndrom oder VHF assoziiert werden^{218,219}.

KCNE5

Die Assemblierung von KCNQ1 mit KCNE5 verursacht einen ‚Shift‘ der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des Stroms in einen positiveren Bereich. Ein weiterer Effekt ist die Verlangsamung der Aktivierung. Insgesamt ist hier eine Modifikation ähnlich der des KCNE1 zu beobachten²²⁰. Wieder stehen Mutationen der β -Untereinheit in Zusammenhang mit dem LQT-Syndrom oder VHF^{221,222}.

Alle KCNE-Proteine scheinen in der Lage, wenn auch in unterschiedlichen Geweben oder auch nur *in vitro*, mit KCNQ1 zu assemblieren. Dasselbe gilt auch für andere α -Untereinheiten. Zwar bewirken die resultierenden Modifikationen unterschiedliche Veränderungen, trotzdem wird vermutet, dass die Funktionsweise der Interaktion ähnlich ist²²³. Abbott *et al.* (2002) untersuchten auf dieser These aufbauend zwei Punktmutationen in KCNE1 und KCNE3. Die Mutation D76N des KCNE1 ist mit dem LQT-Syndrom assoziiert. Der daraus resultierende Strom zeichnet sich unter anderem

durch eine geringere Stromdichte aus. Die Aminosäure in dieser Position ist konserviert und mit Ausnahme von KCNE4 in allen KCNE-Proteinen zu finden. Die Autoren der Studie untersuchten die Auswirkungen der Mutationen an analoger Stelle in KCNE3. Das mutierte KCNE3-Protein zeigte in Co-Expression sowohl mit der α -Untereinheit KCNC4 als auch mit KCNQ1 Veränderungen, die denen von KCNE1 D76N entsprechen. Die Mutation R83H des KCNE3 wurde gleichermaßen untersucht. Die Mutation hatte auf beide α -Untereinheiten einen ähnlichen Effekt. Das Analogon des KCNE1 zeigte vergleichbare Veränderungen bei KCNQ1²²³.

Vor diesem Hintergrund erscheint es möglich, dass auch der SNP G38S ähnliche Auswirkungen in anderen Geweben zeigt. Zunehmend wird auch vermutet, dass an dem I_{Ks} -Komplex gleichzeitig mehrere KCNE-Proteintypen beteiligt sind. So zeigten Wu *et al.*, dass KCNE2 in Kardiomyozyten mit dem KCNQ1/KCNE1-Komplex co-lokalisiert. Die Autoren erwogen daher die Möglichkeit einer negativen Modulation des I_{Ks} durch KCNE2²²⁴. Weiter wird über die potentielle Existenz eines dynamischen makromolekularen Komplexes diskutiert, der möglicherweise durch ein wechselndes Zusammenspiel zwischen β -Untereinheiten und KCNQ1 den Stromfluss reguliert^{224,225}.

5.1.4 Kinetik des I_{Ks}

Melman *et al.* machten sich die Unterschiede zwischen KCNE1 und KCNE3 in der Modifikation des Ionenkanals für eine Kinetik-Studie zunutze. Sie fanden eine Sequenz in der TMD (Aminosäure-Positionen 57-59), die durch Interaktion mit KCNQ1 die Aktivierungskinetik des resultierenden Ionenstromes bestimmt. Bei einem Austausch dieser drei Aminosäuren von KCNE1 mit der analogen Sequenz von KCNE3 konnte eine Veränderung der Ionenstrom-Kinetik beobachtet werden. Der resultierende Strom glich hinsichtlich der Aktivierung dem des KCNE3. Weiter schlussfolgerten die Autoren aufgrund ihrer Daten, dass eine Region, die N-terminal dieser Sequenz liegt (Aminosäure-Positionen 48-56), für die Deaktivierung verantwortlich ist. Sie gingen jedoch davon aus, dass der N-Terminus von KCNE1 für die Modulation der I_{Ks} -Kinetik keine Rolle spielt. Hierfür erbrachten sie folgende Evidenz: mittels Mutagenese wurden die N-Termini der beiden KCNE-Proteine vertauscht. Beide Chimären wiesen aber keine Änderung der Kinetik auf, lediglich beide Stromdichten waren reduziert¹⁰².

Im Gegensatz zu diesen zuvor publizierten Daten wurde in der vorliegenden Arbeit bei zwei KCNE1-Konstrukten Veränderungen der Kinetik beobachtet. Die Mutanten ‚linker‘ und ‚38S-3xA‘ wiesen eine signifikant verlangsamte Deaktivierung auf. Welche Rolle der N-Terminus hinsichtlich der Modulation der Kinetik spielt, bleibt letztendlich in zukünftigen Arbeiten zu klären. Auffälligerweise unterschied sich die Deaktivierung des N-terminal trunkierten ‚ Δ 1-38‘ nicht von der des Wildtyps. Da anhand der Arbeiten von Melman *et al.* bekannt ist, dass die Aminosäuren 48-56 mutmaßlich für die Deaktivierung des Ionenkanals verantwortlich sind, könnten die Strukturen der beiden Konstrukte ‚linker‘ und ‚38S-3xA‘ möglicherweise durch veränderte Faltung oder Konformation Einfluss auf diese Region nehmen.

5.1.5 physiologische Implikationen

Lai *et al.* beschrieben als Erste, dass die Variante ‚38G‘ des SNPs G38S mit VHF assoziiert war¹⁰⁷. Später konnte in zwei weiteren Populationen eine Assoziation von ‚38G‘ zu Herzmuskelschwäche gefunden werden¹⁸⁵. Weiter wurde eine Verbindung zu QT Verlängerung gefunden^{226,227}.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine reduzierte Stromdichte für die VHF-assozierte Variante des SNPs (‚38G‘). Die anderen N-terminal veränderten Konstrukte reduzierten den resultierenden Ionenstrom in vergleichbarer Weise. Sie waren daher hinsichtlich der Stromdichte der Variante ‚38G‘ gleichzusetzen. Die Aktivierung des Stroms veränderte sich mit keinem der Konstrukte. Allerdings war bei ‚linker‘ und ‚38S-3xA‘ die Deaktivierung deutlich verlangsamt. Auch die Spannung der halbmaximalen Aktivierung war bei allen Konstrukten gleich. Das stärkste Unterscheidungsmerkmal zwischen der nicht VHF-assozierten Variante ‚38S‘ und den anderen Konstrukten war die verringerte Stromdichte. Daraus resultierte ein geringerer Kaliumionenfluss, der atriale Aktionspotentiale und Refraktärphasen verlängert.

Ehrlich *et al.* erstellten ein Modell, das die Auswirkungen des SNP G38S auf das Aktionspotential unter verschiedenen Simulationen untersuchen sollte. Der Effekt der VHF-assozierten Variante wurde hier mit Simulation von 50% I_{Ks} Leitfähigkeit nachgeahmt.

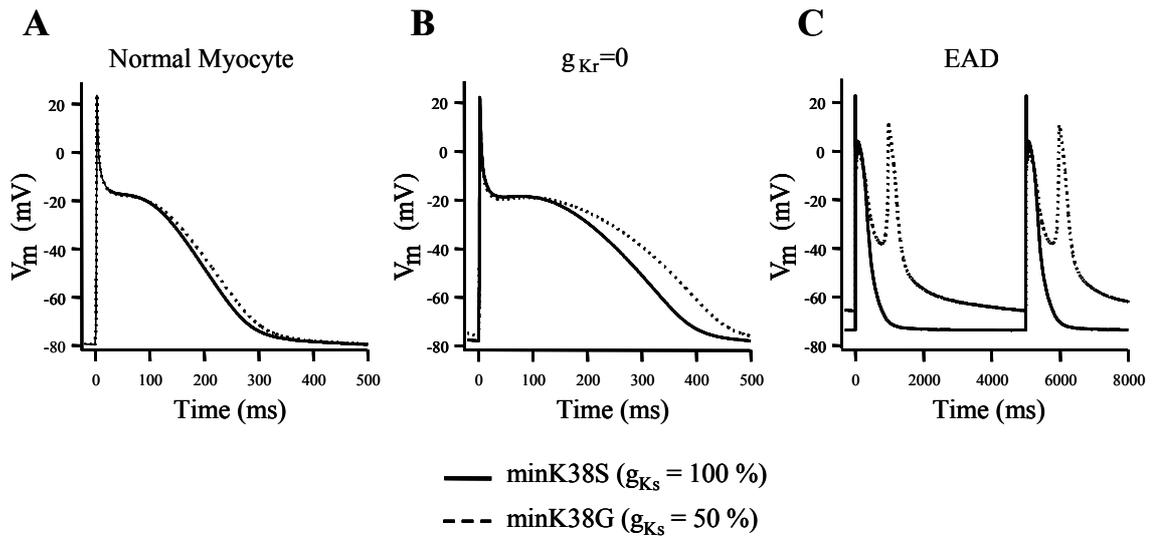


Abb. 5.3: Mathematisches Modell eines atrialen Aktionspotentials (nach Ehrlich *et al.*, mit Genehmigung)¹⁰⁹. Die durchgezogene Linie stellt die Variante ‚38S‘ dar, die gestrichelte Linie die VHF-assoziierte Variante ‚38G‘. Verschiedene Simulationen wurden durchgeführt: **A** zeigt ein Aktionspotential beider Varianten im Model eines normalen Vorhofmyozyten, **B** zeigt das Aktionspotential ohne I_{Kr} , da die Rolle von I_{Ks} bei Wegfall von I_{Kr} schwerer ins Gewicht fällt. Für **C** waren die Parameter ($g_{K1} = 52,2\%$, $g_{CaL} = 200\%$, $g_{Kr} = 0\%$, und Stimulation bei 0,2 Hz) so erstellt, dass frühe Nachdepolarisationen provoziert werden konnten. g – Leitfähigkeit; EAD – frühe Nachdepolarisation

Wie hier zu sehen, fiel die Reduktion des I_{Ks} unter normalen Bedingungen kaum auf (Abb. 5.3 A). Erst wenn zusätzlich eine Suppression des I_{Kr} simuliert wurde (Abb. 5.3 B), konnte ein Unterschied zwischen den atrialen Aktionspotentialen (‚38S‘ vs. ‚38G‘) beobachtet werden. Abb. 5.3 C zeigt, dass die Variante ‚38G‘ im Gegensatz zu ‚38S‘ unter extremen Bedingungen elektrisch instabil war und zu frühen Nachdepolarisationen führte. Die Parameter dieser Simulation waren allerdings sehr speziell. Unter physiologischen Bedingungen ist der Einfluss der Variante ‚38G‘ auf das Aktionspotential mutmaßlich gering.

So entwickelten KCNE1 Knockout-Mäuse eine Degeneration des Innenohrs einhergehend mit Taubheit^{228,229}, die kardiovaskulären Funktionen waren jedoch nur minimalen Änderungen unterworfen^{230,231}.

Andererseits ist I_{Ks} gerade von Bedeutung, wenn etwa das β -adrenerge Niveau hoch ist oder aber wenn I_{Kr} unterdrückt wird. Stresssituationen (mit entsprechend erhöhtem Sympathikotonus) sind deshalb oftmals Auslöser einer solchen Arrhythmie^{232,233}. Es wird außerdem angenommen, dass I_{Ks} eine Art Sicherheitsreserve der kardialen Repolarisation darstellt²³⁴⁻²³⁶. KCNE1 könnte eine Akkumulation von

KCNQ1 in geschlossenem Zustand ermöglichen, wodurch eine Reserve gewährleistet werden würde²³⁷. Es wäre möglich, dass ein in seiner Funktion veränderter KCNE1 N-Terminus diese Vorgänge beeinflusst.

Obwohl I_{Ks} hinsichtlich der ventrikulären Repolarisation im Ruhezustand anscheinend nur geringen Anteil hat, gehen Mutationen der α - oder β -Untereinheit mit einer Veränderung des QT-Intervalls einher. Mutationen, die Untereinheiten des I_{Ks} betreffen, treten typischerweise als LQT-Syndrome in Erscheinung. Die α -Untereinheit KCNQ1 ist mit dem LQT-Syndrom Typ 1 assoziiert²³⁸, die β -Untereinheit KCNE1 mit dem selteneren LQT-Syndrom Typ 5⁶¹. Darüber hinaus prädisponieren Mutationen des KCNE1 oft zu medikamenten-induziertem LQT-Syndrom⁵⁸. Die in dieser Arbeit beobachtete verringerte Stromdichte bei der VHF-assoziierten Variante sowie bei den anderen Konstrukten lässt vermuten, dass auch hier ein verlängertes QT besteht.

Eine weitere Studie konnte die These, es handle sich hier um ein LQT-Syndrom, zusätzlich stützen. Husser *et al.* vermuteten, dass die Flimmerrate bei VHF von dem Genotyp abhängig und als EKG-Phänotyp betrachtet werden kann. Sie fanden, dass die Variante ‚38G‘ bei Eintritt von VHF eine niedrigere Flimmerrate aufwies als die Variante ‚38S‘²³⁹. Eine niedrigere Flimmerrate konnte bereits mit längeren Refraktärphasen assoziiert werden²⁴⁰.

Im Gegensatz hierzu steht eine Populationsstudie von Friedlander *et al.* Hier wurde der Zusammenhang zwischen dem SNP G38S und der Veränderung des QT-Intervalls untersucht. Die Teilnehmer wurden unter Einwohnern mehrerer Kibbuze in Israel gewählt, da diese eine relativ homologe Gruppe darstellen. Bei allen Probanden wurde das KCNE1-Gen sequenziert und die korrigierte QT-Zeit bestimmt. Das Ergebnis der Studie zeigte ein signifikant verlängertes QT-Intervall bei der nicht VHF-assoziierten Variante ‚38S‘²⁴¹. Interessanterweise konnte dieser Effekt jedoch nur bei den Männern der Gruppe festgestellt werden. Die Studie wurde an einer relativ großen Gruppe durchgeführt und andere physiologische, QT-Intervall beeinflussende Faktoren wurden berücksichtigt. Jedoch beschränkte sich die Sequenzierung auf das Gen KCNE1. Es besteht daher die Möglichkeit, dass in dieser relativ homologen Gruppe andere nicht erkannte Mutationen zugrunde liegen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass das QT-Intervall hauptsächlich durch die Repolarisation des Ventrikels bestimmt wird.

Kontrastierende Effekte hinsichtlich atrialer und ventrikulärer Repolarisation könnten durch regional verschiedene elektrophysiologische Charakteristika erklärt werden²⁴².

5.1.6 Evolutionärer Vorteil durch SNP 38 G/S?

Herlyn *et al.* fanden, dass der SNP G38S des KCNE1 in der Klasse der Säugetiere ausschließlich beim Menschen zu finden ist. Bei allen anderen Primaten und nahezu allen anderen Ordnungen steht an analoger Stelle ein Aspartat¹⁸⁷. Dazu kommt, dass der SNP durch alle ethnischen Gruppen hinweg in großer Zahl präsent ist. Es stellt sich daher die Frage, ob ein relativ neu entstandener und so stark vertretener SNP nicht einen Vorteil bietet. Wie oben beschrieben sind beide den I_{Ks} bildenden Untereinheiten in verschiedenen Geweben exprimiert. Weiter wird vermutet, dass KCNE-Proteine an verschiedenen Proteinkomplexen beteiligt sind. Daher könnten die Eigenschaften der VHF-assoziierten Variante ‚38G‘ in einem anderen Gewebe oder Proteinkomplex von evolutionärem Vorteil sein.

5.2 Erworbene Veränderungen: Heraufregulation von I_{K1} und $I_{KACH,c}$

5.2.1 Regulation einwärts gleichrichtender Ströme bei VHF – Stand der Forschung

Andauernde atriale Tachykardie (wie beispielsweise im Rahmen von VHF oder experimenteller Stimulation) führt zu elektrischen, kontraktile und strukturellen Veränderungen beider Herzvorhöfe. Diese Veränderungen wiederum fördern das Bestehen von VHF⁵. Zu den auftretenden Veränderungen gehört der Anstieg einwärts gleichrichtender K^+ -Ströme. Hunde, die im Vorhof tachykard stimuliert wurden, entwickelten einen stark erhöhten einwärts gleichrichtenden Strom mit den Eigenschaften des konstitutiv aktiven I_{KACH} ^{17,243}. Noujaim *et al.* konnten zeigen, dass ein heraufregulierter I_{K1} im Mausventrikel die Aufrechterhaltung von Rotoren und somit Kammerflimmern begünstigt²⁴⁴. Ähnliche Veränderungen konnten auch bei Patienten mit anhaltendem VHF beobachtet werden¹⁸.

Es beschäftigten sich bereits einige Studien mit den VHF-induzierten Veränderungen, die der Heraufregulierung dieser beiden Ströme zugrunde liegen. In humanem Gewebe beschränkten sich diese allerdings auf das rechte Atrium. Sie zeigten eine erhöhte Stromdichte des I_{K1} in VHF¹⁵, zudem war der muscarinerge Strom I_{KACH}

zwar verringert, jedoch konstitutiv aktiv¹⁸. Die mRNA der α -Untereinheit von I_{K1} , Kir2.1, war in VHF-Zellen stärker exprimiert als in SR. Dagegen war die mRNA der α -Untereinheit von I_{KACH} , Kir3.4, in VHF reduziert^{245,246}.

Das Herz weist allerdings bei der Expression von Ionenkanälen große regionale Heterogenität auf²⁴⁷. Konstitutiv aktiver I_{KACH} ist beispielsweise insbesondere im linken Atrium von Hunden erhöht²⁴⁸.

5.2.2 Ergebnisse dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersuchte humane Kardiomyozyten des linken Atriums. Beide Ströme, I_{K1} und $I_{KACH,c}$, waren in Zellen von Patienten mit VHF signifikant erhöht. Außerdem konnten erhöhte mRNA- und Proteinexpression für die α -Untereinheit des I_{K1} , Kir2.1, festgestellt werden. Die zweite α -Untereinheit für diesen Strom, Kir2.3, zeigte (bei gleichzeitiger Reduktion der mRNA) keine Veränderung der Proteinexpression bei Patienten mit VHF. Keine der beiden α -Untereinheiten des I_{KACH} zeigte eine Veränderung der mRNA- oder Proteinexpression. Es scheint, dass die erhöhte Proteinexpression von Kir2.1 bei der Heraufregulierung des I_{K1} bei VHF von Bedeutung ist. Da auch die mRNA-Expression erhöht ist, besteht Evidenz für eine transkriptionelle Regulation.

Im Gegensatz zu den Veränderungen bei I_{K1} können die Proteinuntereinheiten des I_{KACH} die Heraufregulierung dieses Stroms nicht erklären. Es wurde deshalb die Proteinexpression zweier funktioneller Modulatoren quantifiziert. I_{KACH} ist G-Protein gekoppelt¹²⁸ und die Aktivierung des Stroms erfordert die Phosphorylierung durch die CaMKII¹⁶⁹, weshalb $G_{\alpha i3}$ und Calmodulin untersucht wurden. Während bei Calmodulin kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu beobachten war, zeichnete sich bei $G_{\alpha i-3}$ eine schwache Reduktion bei VHF ab. Da dieses Protein inhibierend auf die Aktivierung des I_{KACH} wirkt, würde eine Reduktion die Heraufregulierung erklären. Allerdings zeigten die Werte hier hohe inter-individuelle Varianz und waren nicht signifikant.

Voigt *et al.* (2007) untersuchten Kinasen im Umfeld des I_{KACH} . Mithilfe Subtypselektiver Inhibitoren konnten sie die Proteinkinase G und ebenfalls die CaMKII als Ursache für die Veränderungen des Stroms ausschließen. Die Heraufregulierung schien auf die Proteinkinase C (PKC) zurückzuführen zu sein. Sie fanden eine erhöhte

Proteinexpression bei PKC ϵ , nicht aber bei PKC α , PKC β 1 oder PKC δ ¹⁶⁹. Allerdings sind die Ergebnisse dieser Arbeit nicht direkt übertragbar, da hier zum Teil andere Veränderungen von I_{KACH,c} beobachtet und außerdem rechtsatriale Zellen untersucht wurden.

5.2.3 Die Rolle der microRNA 1 in der Arrhythmogenese

Yang *et al.* waren die Erstbeschreiber einer pathophysiologisch relevanten Überexpression der *miR-1* bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Durch experimentelle *miR-1* Überexpression in Rattenherzen generierten die Autoren ventrikuläre Arrhythmien, die durch eine begleitende Reduktion von I_{K1} und der zugrunde liegenden α -Untereinheit Kir2.1 hervorgerufen wurden. Inhibition der microRNA durch eine spezifische ‚antisense‘-Sequenz hob den Effekt wieder auf¹⁶³.

In der vorliegenden Arbeit sollte getestet werden, ob die *miR-1* ebenfalls in VHF involviert ist. Eine Überexpression der inhibierenden *miR-1* geht mit einer Reduktion von I_{K1} einher, während bei VHF eine Heraufregulierung zu beobachten ist. Es wurde daher eine Reduktion der *miR-1* bei VHF postuliert. Tatsächlich war die Expression bei Patienten mit VHF im Vergleich zur SR-Gruppe signifikant reduziert. Zudem konnte, ebenfalls in humanem Gewebe des linken Vorhofs, eine Reduktion der *miR-1* und eine Heraufregulierung von I_{K1} und Kir2.1 durch *ex-vivo* tachykarde Stimulation gesunden Gewebes erreicht werden²⁴⁹.

Bei der Überexpression der mRNA und des Kir2.1-Proteins lag somit am ehesten eine Reduktion der *miR-1* zugrunde. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Kir2.1-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf translationaler Ebene durch die *miR-1* reguliert wird²⁵⁰.

5.2.4 Einwärts gleichrichtende Ströme tragen zur Erhaltung von Vorhofflimmern bei

Der Wiedereintritt der elektrischen Impulse, die sich selbst stabilisieren und kreisende Erregungen ausbilden, ist typisch für VHF⁶. Es ist anzunehmen, dass die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse, die ein verkürztes Aktionspotential und damit auch eine verkürzte Refraktärphase zur Folge haben, dieses Verhalten begünstigen.

Eine Studie von Pandit *et al.* konnte mithilfe mathematischer Modelle zeigen, dass der Anstieg der einwärts gleichrichtenden K⁺-Ströme bei der Erhaltung von VHF

eine große Rolle spielte²⁵¹. Erhöhte Stromdichten von I_{K1} und I_{KACH} hyperpolarisierten die Zelle, wodurch die spannungsabhängige Inaktivierung des I_{Na} aufgehoben wurde. Durch die daraus folgende größere Verfügbarkeit des Natrium-Kanals könnten Rotoren schneller kreisen. Die Autoren argumentierten weiterhin, dass die Heraufregulierung dieser beiden Ströme damit bedeutender für Stabilisierung und Beschleunigung der Aufrechterhaltung von VHF-Rotoren wäre als die beobachteten Veränderungen in anderen Ionenkanälen, die eine ähnliche Verkürzung des Aktionspotentials erreichen. So könnte ein Anstieg der einwärts gleichrichtenden Ströme wichtig für die Erhaltung von VHF sein. Zum Beispiel führt die Inhibition des I_{KACH} durch Tertiapin-Q zu einer Verlängerung des Aktionspotentials und unterdrückt außerdem atriale Tachyarrhythmien²⁴³.

Sowohl die Heraufregulierung des I_{K1} , wie in VHF zu beobachten, als auch die Herabregulierung, bei Herzmuskelschwäche, ist ein für die Arrhythmogenese wichtiger Mechanismus. Ein verminderter I_{K1} kann pro-arrhythmische Nachdepolarisationen fördern. Während ein erhöhter I_{K1} die Stabilisierung der den ‚Reentry‘-Arrhythmien zugrunde liegenden Rotoren begünstigt^{244,252}.

5.2.5 Regionale Unterschiede im Herzen

Der linke Vorhof spielt bei VHF eine große Rolle. In einer tierexperimentellen Arbeit herrschte hinsichtlich der Aktivierung der beiden Vorhöfe ein Ungleichgewicht vor; die Aktivierung des linken Atriums war prädominant. Dies führte zur Ausbildung eines ‚links-rechts‘ Frequenzgradienten, der die rapide Aktivierung beider Vorhöfe gewährleistete und somit VHF weiter stabilisierte⁴⁴. Atienza *et al.* konnten in einer klinischen Studie ähnliches über einen ‚links-rechts‘ Frequenzgradienten bei Patienten mit VHF zeigen²⁵³.

Auch in der Expression des I_{K1} kann im Herzen regionale Heterogenität beobachtet werden. Während Kir2.1 in den Ventrikeln sehr viel höher exprimiert wird als in den Vorhöfen, ist Kir2.3 in den Atrien vorherrschend²⁴⁷. Kir2.3 ist weniger stark in der Pulmonalvene exprimiert als im linken Vorhof. Dieser Unterschied kann den Wiedereintritt des Impulses während der Depolarisation begünstigen^{254,255}. Die Expression von Kir2.1 unterscheidet sich dagegen nicht zwischen diesen beiden Regionen.

Insgesamt scheint die unterschiedliche Expression des Kir2.3 haupttragend für die regionalen Unterschiede des I_{K1} . Bei Krankheits-induzierten Veränderungen aber, wie etwa bei VHF oder koronarer Herzkrankheit, liegt hauptsächlich eine Modulation des Kir2.1 zugrunde^{163,256}.

6 Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wird eine genetische Disposition für Vorhofflimmern (VHF) untersucht. Der Einzelnukleotidpolymorphismus („single nucleotide polymorphism“, SNP) 38G/S befindet sich im N-Terminus der β -Untereinheit KCNE1. Diese β -Untereinheit konstituiert gemeinsam mit der α -Untereinheit KCNQ1 die langsame Komponente des verzögerten Gleichrichterstromes, I_{Ks} . In den meisten Fällen ist VHF allerdings eine erworbene Krankheit. Der zweite Teil der Arbeit untersucht erworbene elektrophysiologische Veränderungen im Rahmen von VHF am Beispiel der einwärts gleichrichtenden Kaliumströme I_{K1} und I_{KACh} .

Die α -Untereinheit KCNQ1 bildet die Pore eines Ionenkanals und kann selbständig einen Kaliumstrom konstituieren. Die Assemblierung mit der β -Untereinheit KCNE1 verändert die biophysikalischen Eigenschaften des Stroms. Diese Änderungen umfassen beispielsweise den zeitlichen Ablauf der Aktivierung und die Amplitude des Ionenstroms. Einige dieser Modulationen konnten bereits in früheren Arbeiten Bereichen der β -Untereinheit zugeordnet werden. Diese Studien beschäftigten sich hauptsächlich mit der transmembranären Domäne (TMD) und dem C-Terminus. Über die Rolle des N-Terminus war bislang wenig bekannt. Der SNP G38S machte auf den N-Terminus aufmerksam. Das ‚38G‘ Allel ist mit einer erhöhten VHF-Inzidenz assoziiert. Die Assemblierung mit dieser Untereinheit führt zu einer geringeren Stromdichte, aufgrund geringerer Plasmamembranlokalisation des Ionenkanal-Komplexes. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Aufgabe des N-Terminus bei der Modulation der α -Untereinheit zu identifizieren. Außerdem sollte festgestellt werden, welche Aminosäuren hierbei besonders von Bedeutung sind.

Zu diesem Zweck wurden diverse Konstrukte synthetisiert. Für das Konstrukt ‚ $\Delta 1-38$ ‘ wurden die Aminosäuren 1-38 und damit der Großteil des N-Terminus entfernt. Das Konstrukt ‚linker‘ enthält anstelle des Glyzins oder Serins an Position 38 fünf Alanine. In der Nähe der von dem SNP betroffenen Aminosäure befinden sich des Weiteren drei Arginine, die mit jeweils einem Alanin substituiert wurden. Dieser Austausch wurde für beide Varianten des SNPs vorgenommen. Alle Konstrukte wurden zur immunologischen Detektion auch mit einem ‚flag‘-Anhang markiert. Für alle Versuche diente die nicht VHF-assozierte Variante des SNPs als Kontrolle. Die

Experimente wurden an HEK- und CHO-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse beider Zelllinien unterschieden sich nicht voneinander und wurden daher zusammengefasst. Alle Konstrukte konnten erfolgreich heterolog exprimiert werden und gleichermaßen mit der α -Untereinheit immunopräzipitiert werden. Die aus der Co-Transfektion von KCNQ1 und KCNE1 resultierende Stromdichte wurde mittels ‚Patch-clamp‘-Technik untersucht. Im Vergleich zum Kontrollstrom (KCNQ1 + KCNE1-38S) waren die Ströme aller anderen Gruppen während De- und Repolarisation signifikant kleiner. Sowohl die Aminosäure in Position 38 als auch die drei N-terminalen Arginine in der Nähe schienen für den hier gesuchten Mechanismus von Bedeutung zu sein. Die Kinetik von I_{Ks} war größtenteils unverändert. Lediglich die Konstrukte ‚linker‘ und ‚38S-3xA‘ zeigten eine verlangsamte Deaktivierung. Zellfraktionierung und konfokale Mikroskopie zeigten, dass im Vergleich zur Kontrolle alle anderen Konstrukte eine verminderte Plasmamembranlokalisation aufwiesen.

Die Aufgabe des N-Terminus liegt offensichtlich im Transport beider Untereinheiten an die Plasmamembran und/oder der Verankerung dort. Das mit VHF assoziierte Allel weist an Position 38 ein Glyzin statt eines Serins auf. Möglicherweise verschafft es dem N-Terminus damit eine größere Beweglichkeit und fungiert als Gelenk. Der ‚linker‘, der diesen Effekt verstärkt wiedergeben dürfte, zeigte dem ‚38G‘ ähnliche Ergebnisse und stützt damit diese Theorie. Der Austausch der drei Arginine führte ebenfalls zu verminderter Plasmamembranlokalisation. Diese würden sich durch die positive Ladung gut für die Verankerung an der Plasmamembran eignen. Zwar zeigten zwei der Konstrukte bei der Deaktivierung veränderten Zeitkonstanten, jedoch konnte eine Regulierung der I_{Ks} -Kinetik bereits durch die TMD der β -Untereinheit erklärt werden. Möglicherweise bewirkten die hier synthetisierten Mutationen des N-Terminus eine Konformations- oder Faltungsänderung, deren Folgen auch den in der TMD benannten Bereich (und damit die Kinetik) beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit konnte dem N-Terminus des KCNE1 eine neue Rolle zugeordnet werden. Einzelne für diesen Mechanismus wichtige Aminosäuren wurden identifiziert. Es wurde eine These zu den spezifischen Wirkungsweisen der genannten Strukturen innerhalb dieses Mechanismus formuliert. Zukünftige Experimente könnten beispielsweise 3D-Simulationen der Proteinfaltung beinhalten, um die potentielle Membranverankerung weiter zu untersuchen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Heraufregulierung einwärts gleichrichtender Kaliumströme (I_{K1} und I_{KACH}) und deren zugrunde liegenden regulatorischen Mechanismen. Alle Experimente wurden an humanem Gewebe des linken Vorhofs durchgeführt. Das Gewebe stammt von VHF-Patienten, die sich einer Mitralklappen-Operation unterzogen. Als Kontrolle wurde Gewebe von Patienten im Sinusrhythmus (SR) verwendet. Zunächst wurde untersucht, ob transkriptionelle und/oder posttranskriptionelle Veränderungen oder funktionelle Effekte der Heraufregulierung der Ströme zugrunde liegen. Entsprechend wurde die Proteinexpression mittels Western Blot quantifiziert. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte per Realtime-PCR. Veränderungen für I_{K1} konnten sowohl auf mRNA- als auch auf translationaler Ebene beobachtet werden. Protein- und mRNA-Expression von Kir2.1, der zugrunde liegenden Proteinuntereinheit, waren bei VHF signifikant erhöht; die Expression der inhibitorischen *miR-1* war reduziert.

Die Bestimmung der Protein- und mRNA-Expression der zugrunde liegenden Proteinuntereinheiten für den Strom I_{KACH} zeigte dagegen keinen Unterschied zwischen Gewebe von Patienten mit VHF und SR. Eine funktionelle Regulierung schien daher möglich, weshalb potentiell modulierende Proteine untersucht wurden. Die Proteinexpression von Calmodulin und $G_{\alpha i-3}$ unter VHF zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zu der SR-Gruppe. Es war eine Tendenz zur Reduktion des inhibierenden $G_{\alpha i-3}$ zu beobachten. Andere Arbeiten führten die Heraufregulierung des $I_{KACH,c}$ auf eine erhöhte Expression der Proteinkinase C zurück. Möglicherweise sind diese Ergebnisse aber, da sie im rechten Vorhof dokumentiert wurden, nicht auf den linken Vorhof übertragbar.

Die Regulierung von $I_{KACH,c}$ bei VHF bleibt in zukünftigen Arbeiten zu untersuchen. Besonderes Augenmerk sollte bei den nächsten Schritten wohl auf dem Signalweg und potentiellen Modulatoren liegen. Die Arbeit in humanem Gewebe brachte Limitationen mit sich. So konnten Experimente, die einen direkten Nachweis für die Regulierung durch die *miR-1* erbringen würden (wie genetischer ‚Knockout‘ oder Anwendung von gegen microRNA gerichteten ‚Antagomirs‘), nicht durchgeführt werden. Zukünftige Studien könnten versuchen, therapeutisch in die Regulation der Kir-Untereinheiten einzugreifen, um das VHF-unterstützende, elektrische ‚Remodeling‘ des I_{K1} zu verhindern.

7 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
μ	micro
Ω	Ohm
τ	Zeitkonstante
°C	Grad Celsius
A	Ampere, Amplitude
A ₀	maximale, normierte Amplitude
ACE	„Angiotensin converting enzyme“
Ach	Acetylcholin
ANOVA	Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
AU	„Arbitrary unit“
bp	Basenpaare
Ca	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaMKII	Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cDNA	„copy“ Desoxyribonukleinsäure
CHO	„Chinese hamster ovary“
CIP	„Calf-Intestine“-Phosphatase
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGCR8	„DiGeorge syndrome critical region 8“
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIDS	4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-Disulphonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EAD	Frühe Nachdepolarisation
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EKG	Oberflächen-Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und Mitarbeiter
F	Farad
FBS	Foetales Rinderserumalbumin
g	Gramm; Erdbeschleunigung; Leitfähigkeit
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
‚G-beads‘	Protein G Agarose
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	human; Stunde
HCl	Hydrogenchlorid
HEK	‚Human embryonic kidney‘
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
$I_{Ca,L}$	L-Typ Kalziumstrom
I_{K1}	einwärts gleichrichtender Kaliumstrom 1
I_{KACh}	Acetylcholin-aktivierter einwärts gleichrichtender Kaliumstrom
$I_{KACh,c}$	konstitutiv aktiver Acetylcholin-aktivierter einwärts gleichrichtender Kaliumstrom
I_{Kr}	schneller verzögerter Gleichrichter-Kaliumstrom
I_{Ks}	langsamer verzögerter Gleichrichter-Kaliumstrom
I_{Kur}	sehr schneller verzögerter Gleichrichter-Kaliumstrom
I_{Na}	Natriumstrom
IP	Immunopräzipitation
Irx5	Iroquois homeobox 5
K	Kalium
K_2 -ATP	Adenosin 5'-triphosphat Dikaliumsalz Hydrat

kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
Kir-Kanal	einwärts gleichrichtender Kaliumkanal
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB-Medium	‚lysogeny broth’-Medium
LQT	langes QT
M	Mol
m	milli; Meter
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
miRNA	micro-Ribonukleinsäure
<i>miR-1</i>	micro-Ribonukleinsäure 1
MiRP	‚minK-related’ Peptid
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	‚messenger’ Ribonukleinsäure
n	nano; Anzahl
Na	Natrium
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NDS	‚Normal donkey’-Serum
n.s.	nicht signifikant
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
p	pico
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PD	Poren-Domäne
PEI	Polyethylenimin
PI	Protease Inhibitor
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pre-miRNA	pre-micro-Ribonukleinsäure
pri-miRNA	pri-micro-Ribonukleinsäure
QTc	frequenzkorrigierte QT-Zeit
RISC	Ribonukleinsäure induzierter ‚Silencing‘ Komplex
RT	Raumtemperatur
S	Segment; Steigungsfaktor
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGK 1	Serum- und Glucocorticoid-induzierbare Kinase 1
SNP	‚Single nucleotide polymorphism‘
SR	Sinusrhythmus
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMD	transmembranäre Domäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
V ₅₀	Spannung der halbmaximalen Aktivierung
VHF	Vorhofflimmern
VSD	spannungssensitive Domäne
WT	Wildtyp

8 Anhang

8.1 Material

8.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden sowohl HEK-293-Zellen („Human Embryonic Kidney“) als auch CHO-Zellen („Chinese Hamster Ovaries“) verwendet (ATCC, USA).

8.1.2 Bakterienkultur

Die in dieser Arbeit verwendete cDNA wurde zur Vermehrung in den *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm DH5 α transformiert (Invitrogen, USA).

8.1.3 Patientenmaterial

In dieser Arbeit wurde außerdem humanes Gewebe des linken Vorhofs verwendet. Dieses stammte von Patienten, die sich einer Mitralklappen-Rekonstruktion unterzogen. Alle Patienten waren zuvor aufgeklärt worden und unterzeichneten eine Einverständniserklärung. Die Studie wurde vom Ethikausschuss der Goethe-Universität, Frankfurt (Nr. 54/05) genehmigt. Die Patienten waren > 18 Jahre alt und wiesen eine regelrechte systolische Funktion des linken Ventrikels auf. Als Ausschlusskriterien galten: paroxysmales VHF, hämodynamische Instabilität, aktive Endocarditis, systemische Inflammation oder die Behandlung mit Immunsuppressiva. Die Gruppe der Patienten mit persistierendem VHF beinhaltete Patienten, denen diese Diagnose bereits zuvor gestellt worden war und die bei Aufnahme auf der Station ein entsprechendes EKG aufwiesen. Patienten wurden in die SR-Gruppe eingeteilt, wenn bisher kein VHF festgestellt wurde.

8.1.4 Primersequenzen

Tab. 8.1: Primer zur Subklonierung des Wildtyps *KCNE1*, 38G'

Primer	Sequenz
vorwärts	5'-CGCAAGCTTATGATCCTGTC-3'
revers	5'-CTCGAATTCTCATGGGGAAGGC-3'

Tab. 8.2: Primer für das Entfernen der Aminosäuren 1-38 des N-Terminus

Primer	Sequenz
vorwärts	5'-CGCAAGCTTATGGACGGCAAGCTGGAG-3'
revers	5'-CTCGAATTCTCATGGGGAAGGC-3'

Tab. 8.3: Primer zur C-terminalen „flag“-Markierung

Primer	Sequenz
vorwärts	5'-CGCAAGCTTATGATCCTGTC-3'
revers	5'-CTCGAATTCTCACTTGTCGTCGTCGTC CTTGTAGTCTGGGGAAGGCTTCGTC-3'

Tab. 8.4: Primer zur C-terminalen „flag“-Markierung für das Konstrukt „ Δ 1-38’

Primer	Sequenz
vorwärts	5'-CGCAAGCTTATGGACGGCAAGCTGGAG-3'
revers	5'-CTCGAATTCTCACTTGTCGTCGTCGTC CTTGTAGTCTGGGGAAGGCTTCGTC-3'

Tab. 8.5: Primer zur C-terminalen GFP-Markierung

Primer	Sequenz
vorwärts	5'-CGCAAGCTTATGATCCTGTC-3'
revers	5'-ATCGAATTCTGGGGAAGGC-3'

Tab. 8.6: Primer zur C-terminalen GFP-Markierung für das Konstrukt „ Δ 1-38’

Primer	Sequenz
vorwärts	5'-CGCAAGCTTATGGACGGCAAGCTGGAG-3'
revers	5'-ATCGAATTCTGGGGAAGGC-3'

Tab. 8.7: Die Primer für die Synthese des Konstrukts „linker’

Primer	Sequenz
flankierend vorwärts	5'-CGCAAGCTTATGATCCTGTC-3'
flankierend revers	5'-CTCGAATTCTCATGGGGAAGGC-3'
mutierend vorwärts	5'-CAGCAGCAGCAGCAGACGGCAAGCTGGAG-3'
mutierend revers	5'-TGCTGCTGCTGCTGCGCTGCGGGGGACCTGC-3'

Tab. 8.8: Primer zur Synthese des Zwischenprodukts für das ‚Alanin-Scanning‘ des Wildtyps

Primer	Sequenz
flankierend vorwärts	5'-CGCAAGCTTATGATCCTGTC-3'
flankierend revers	5'-CTCGAATTCTCATGGGGAAGGC-3'
mutierend vorwärts	5'-CAGGTCCCCAGCCAGCGGTGACGGCAAG-3'
mutierend revers	5'-CACCGCTGGCTGGGGACCTG-3'

Tab. 8.9: Primer für das ‚Alanin-Scanning‘ des Wildtyps

Primer	Sequenz
flankierend vorwärts	5'-CGCAAGCTTATGATCCTGTC-3'
flankierend revers	5'-CTCGAATTCTCATGGGGAAGGC-3'
mutierend vorwärts	5'-GCCTGGCCGCAGCGTCCCCAGCCAGCGGTG-3'
mutierend revers	5'-GGGACGCTGCGGCCAGGCCCGACAT-3'

Tab. 8.10: Primer zur Synthese des Zwischenprodukts für das ‚Alanin-Scanning‘ des SNPs G38S

Primer	Sequenz
flankierend vorwärts	5'-CGCAAGCTTATGATCCTGTC-3'
flankierend revers	5'-CTCGAATTCTCATGGGGAAGGC-3'
mutierend vorwärts	5'-CAGGTCCCCAGCCAGCAGTGACGGCAAG-3'
mutierend revers	5'-CACTGCTGGCTGGGGACCTG-3'

Tab. 8.11: Primer für das ‚Alanin-Scanning‘ des SNPs G38S

Primer	Sequenz
flankierend vorwärts	5'-CGCAAGCTTATGATCCTGTC-3'
flankierend revers	5'-CTCGAATTCTCATGGGGAAGGC-3'
mutierend vorwärts	5'-GCCTGGCCGCAGCGTCCCCAGCCAGCAGTG-3'
mutierend revers	5'-GGGACGCTGCGGCCAGGCCCGACAT-3'

Tab. 8.12: Primer zur Quantifizierung der miRNA miR-1

Primer	Sequenz
‚Stem-loop‘	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG CACCAGAGCCAA CATA CAT-3'
Vorwärts	5'-CGGCGGTGGAATGTAAAGAAG-3'
Revers	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

Tab. 8.13: Primer für den internen Standard U48

Primer	Sequenz
‚Stem-loop‘	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCG CACCAGAGCCAA CGGTCAG-3'
vorwärts	5'-CGACGAGTGATGATGAC-3'
revers	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

Tab. 8.14: Primer zur mRNA-Quantifizierung von *KCNE1*

Primer	Sequenz
vorwärts	5'-GAGGCCCTCTACGTCCTCATG-3'
revers	5'-TGATGCCCAGGGTGAAGAA-3'

Tab. 8.15: Primer zur mRNA-Quantifizierung von *KCNQ1*

Primer	Sequenz
vorwärts	5'-AGACGTGGGTCCGGGAAGAC-3'
revers	5'-CAAAGAAGGAGATGGCAAAGACA-3'

Tab. 8.16: Primer für den internen Standard β -Aktin

Primer	Sequenz
vorwärts	5'-TGGATCAGCAAGCAGGAGTATG-3'
revers	5'-GCATTTGCGGTGGACGAT-3'

Tab. 8.17: Primer zur mRNA-Quantifizierung von *Kir2.1*

Primer	Sequenz
vorwärts	5'-CGCCAGCAACAGGACAT-3'
revers	5'-GACGCATGGAGCAGAGCTATC-3'

Tab. 8.18: Primer zur mRNA-Quantifizierung von *Kir2.3*

Primer	Sequenz
vorwärts	5'-TCAGGACATGCACGGACAC-3'
revers	5'-AGAAGGCGATACACCAG-3'

Tab. 8.19: Primer zur mRNA-Quantifizierung von Kir3.1

Primer	Sequenz
vorwärts	5'-CACGTCGGTAACTACAC-3'
revers	5'-AGCTTGCAGCGAATC-3'

Tab. 8.20: Primer zur mRNA-Quantifizierung von Kir3.4

Primer	Sequenz
vorwärts	5'-AACGCAGTCATCTCCA-3'
revers	5'-GGTGTGTAGTCCACCTCAT-3'

Tab. 8.21: Primer für den internen Standard GAPDH

Primer	Sequenz
vorwärts	5'-ATCTTCCAGGAGCGAGATCC-3'
revers	5'-ACCACTGACACGTTGGCAGT-3'

8.1.5 Versuchsansätze zur Klonierung

PCR-Ansatz (90 µl):

,template'	300 ng
dNTP mix	10 mM
10x Puffer	
Vorwärts Primer	50 pmol
Revers Primer	50 pmol
DMSO	3%
Taq-Polymerase	1 U

Restriktionsansatz:

PCR-Produkt/Plasmid	
10x Reaktionspuffer	
Restriktionsenzym	2,5 U/µg

Phosphatase-Ansatz:

Aufgereinigter Vektor

10x NEB3

,Calf Intestine'

Phosphatase 0,5 U/ μ g DNA**Ligationsansatz:**

Vektor 50 ng

PCR-Produkt 3x molare Menge des Vektors (10 ng)

2x Quick Ligation Puffer

Quick T4 Ligase 1 μ l**Transformationsansatz:**dH₂O 35 μ l5x KCM 10 μ lLigat 5 μ lkompetente *E.coli* 50 μ l**8.1.6 Versuchsansätze zur Realtime-PCR****Reverse Transkription der Gesamt-RNA:**Gesamt-RNA 1 μ gRandom Hexamers 1,25 μ MOligo-dT 1,25 μ M

dNTPs mix 1 mM

Reverse Transcriptase 200 U

5x Transcriptase Puffer

RNase Inhibitor 40 U

Gepulste RNA zum Abschreiben der miRNA:

Gesamt-RNA	1 µg
„Stem-loop“ Primer	50 nM
dNTP mix	1 mM
Reverse Transcriptase	50 U
5x Transcriptase Puffer	
RNase Inhibitor	4 U

8.1.7 Puffer**8.1.7.1 DNA-Elektrophorese****TAC Puffer, pH 7,78 (Essigsäure):**

NaAcetat	10 mM
EDTA	1 mM
Tris	0,04 M

Ladepuffer

Glycerin	60%
EDTA	60 mM
Tris	60 mM
Orange G	0,5 mM

8.1.7.2 Transformation**LB-Medium:**

Trypton	1%
Hefeextrakt	0,5%
NaCl	0,17 M

TSB-Puffer:

MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
DMSO	5%
PEG 6000	10%
in LB-Medium	

5x KCM:

KCl	500 mM
CaCl ₂	150 mM
MgCl ₂	250 mM

8.1.7.3 Plasmidisolation**Plasmid-Isolation Puffer 1, pH 8,0 (NaOH):**

10 mM EDTA
50 mM Tris

Plasmid-Isolation Puffer 2:

200 mM NaOH
35 mM SDS

Plasmid-solution Puffer 3, pH 5.5 (Essigsäure):

3 M KaAcetat

Plasmid-Isolation Puffer 4, pH 7,0 (NaOH):

750 mM NaCl
50 mM MOPS
2 mM Triton X-100
Ad 425 ml dH₂O
Nach Einstellen des pH 75 ml Isopropanol zugeben

Plasmid-Isolation Puffer 5, pH 7,0 (NaOH):

1 M NaCl

50 mM MOPS

Ad 425 ml dH₂O

Nach Einstellen des pH 75 ml Isopropanol zugeben

Plasmid-Isolation Puffer 6, pH 8,5 (HCl):

1,25 M NaCl

50 mM Tris

Ad 425 ml dH₂O

Nach Einstellen des pH 75 ml Isopropanol zugeben

8.1.7.4 Proteinaufarbeitung**Protease Inhibitor (PI):**

Benzamidin 1%

Leupeptin 0,5%

Trypsin Inhibitor 0,5%

Lyse Puffer:

Tris pH 7 5 mM

EDTA 2 mM

Protease Inhibitor (1000 x)

Resuspensionspuffer:

Tris pH 7,4 5 mM

EDTA 2 mM

MgCl₂ 12,5 mM

Protease Inhibitor (1000 x)

RIPA-Puffer:

NP-40	1%
Tris-HCl pH 7,4	1 M
NaCl	500 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
SDS	0,1%
Natriumdeoxycholat	5%
Protease Inhibitor (1000 x)	

8.1.7.5 Western Blot**Trenngel:**

Acrylamid	7/10/14%
Tris, pH 8,8	0,4 M
SDS	0,1%
APS	0,08%
TEMED	0,12%

Sammelgel:

Acrylamid	3,5/5/7%
Tris, pH 8,8	125 mM Tris
SDS	0,1%
APS	0,08%
TEMED	0,12%

Ladepuffer:

Tris-HCL (pH 6.8)	50 mM
β -mercaptoethanol	500 mM
Glycerin	10%
SDS	2,5%
Bromophenol Blau	0,01%

Laufpuffer:

Tris	25 mM
Glycin	0,2 M
SDS	0,1%

Transferpuffer:

Tris	25 mM
Glycin	0,2 M

TBS Waschpuffer, pH 7,5 (HCl):

Tris	50 mM
NaCl	0,15 mM

TTBS, pH 7,5 (HCl):

Tris	50 mM
NaCl	0,15 mM
Tween 20	0,3%

‘Stripping’-Puffer, pH 6,8 (HCl):

Tris	6,25 mM
SDS	2%
β -Mercaptoethanol	0,7%

8.1.7.6 Elektrophysiologie**HEPES-Tyrode-Lösung, pH 7,4 (NaOH):**

NaCl	132 mM
KCl	4,7 mM
MgCl ₂	1,0 mM
CaCl ₂	1,0 mM
NaH ₂ PO ₄	0,36 mM
HEPES	10,0 mM
Glucose	5,0 mM

Calciumfreie HEPES-Tyrode-Lösung, pH 7,4 (NaOH):

NaCl	132 mM
KCl	4,7 mM
MgCl ₂	1,0 mM
NaH ₂ PO ₄	0,36 mM
HEPES	10,0 mM
Glucose	5,0 mM

Aufbewahrungspuffer (stark Kaliumionen-haltig), pH 7,4 (KOH):

KCl	20 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM
Glucose	10 mM
L-Glutaminsäure	70 mM
Buttersäure	10 mM
EGTA	10 mM
Mannitol	40 mM
FBS	0,1%

Pipettenlösung (Patch-Clamp), pH 7.3 (KOH):

KCl	110 mM
K ₂ -ATP	5 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	10 mM
EGTA	5 mM

8.1.7.7 Konfokale Mikroskopie**PBS:**

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
MgCL ₂	0,5 mM

Blocklösung:

FBS	5%
NDS	5%
Triton X-100	0,2%
in PBS	

8.1.8 Chemikalien

100 bp DNA Standard	New England Biolabs, USA
1 kb DNA Standard	New England Biolabs, USA
Accutase	PAA, Österreich
Aceton	Riedel-de Haën, Deutschland
35% Acrylamid	Sigma Aldrich, USA
Agarose	Biozym, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, USA
Ampicillin	AppliChem, Deutschland
β-Mercaptoethanol	AppliChem, Deutschland
Benzamidin	Sigma Aldrich, USA
Bradford-Reagenz	BioRad, USA
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, USA
Buttersäure	Sigma Aldrich, USA
Chloroform	AppliChem, Deutschland
,Calf-Intestine'-Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, USA
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Sigma Aldrich, USA
Diaminobenzidin	Roth, Deutschland
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	AppliChem, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Deutschland
dNTP mix	New England Biolabs, USA
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Deutschland
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma Aldrich, USA

Entwicklerlösung	Tetenal, Deutschland
Essigsäure	Sigma Aldrich, USA
Ethanol	Riedel-de Haën, Deutschland
F12-Kaighn's Zellmedium	Invitrogen, USA
Fixierlösung	Tetenal, Deutschland
Foetales Rinderserumalbumin (FBS)	PAA, Österreich
Formaldehyd	Sigma Aldrich, USA
GelRed	VWR, Deutschland
Glucose	Roth, Deutschland
Glycerin	Roth, Deutschland
Glycin	Roth, Deutschland
Harnstoff	Roth, Deutschland
Hydrogenchlorid (HCl)	Sigma Aldrich, USA
Hefeextrakt	Difco, USA
Hepes	Roth, Deutschland
<i>Hind III</i>	New England Biolabs, USA
Isopropylalkohol	Apotheke des Uniklinikums Frankfurt
Leupeptin	Sigma Aldrich, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, USA
Adenosin 5'-triphosphat Dikaliumsalz Hydrat (K ₂ -ATP)	Sigma Aldrich, USA
Kaleidoscope Prestained Standards	BioRad, USA
Kaliumacetat	AppliChem, Deutschland
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma Aldrich, USA
Kaliumchlorid	KMF, Deutschland
Kalciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma Aldrich, USA
Kanamycin	Sigma Aldrich, USA
L-Glutaminsäure	PAA, Österreich
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Deutschland
Mannitol	ABCR, Deutschland

Minimum Essential Medium Eagle (MEM)	Sigma Aldrich, USA
Methanol	Sigma Aldrich, USA
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	AppliChem, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Deutschland
Natriumdeoxycholat	AppliChem, Frankfurt
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma Aldrich, USA
Natriumhydroxid (NaOH)-Plätzchen	AppliChem, Deutschland
Nonidet-P40	Biomol, Deutschland
„Normal donkey“-Serum (NDS)	Jackson Immuno Research, USA
Oligo dT	Invitrogen, USA
Orange G	Sigma Aldrich, USA
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, USA
pBR322 DNA/AluI Marker	Fermentas, Deutschland
PEG 6000	Roth, Deutschland
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences Inc., USA
Phenol	Sigma Aldrich, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Österreich
Primer	Sigma Aldrich, USA
Protein G Agarose („G-beads“)	Pierce Biotechnologies, USA
Random Hexamers	Invitrogen, USA
M-MLV Reverse Transkriptase	Fermentas, Deutschland
RiboLock Ribonuclease Inhibitor	Fermentas, Deutschland
RNase Away	Roth, Deutschland
Rotiphorese Gel 30	Roth, Deutschland
Saccharose	Roth, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, USA
Taq Polymerase	New England Biolabs, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka Biochemika, Schweiz
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma Aldrich, USA
Triton X100	Sigma Aldrich, USA

Trizol	Sigma Aldrich, USA
Trypsin	PAA, Österreich
Trypsin Inhibitor	Sigma Aldrich, USA
Trypton	Difco, USA
Tween 20	AppliChem, Deutschland
,Universal Probe library probe' #21	Roche, Deutschland

Kits

Qiaquick Gel Extraktion	Qiagen, Deutschland
Qiaquick PCR Purification	Qiagen, Deutschland
Fast Sybr Green Master	Applied Biosystems, USA
Lightcycler SYBR Green ^{plus} I	Roche, Deutschland
Lightcycler Taqman	Roche, Deutschland
Western Lightning Plus-ECL	Perkin Elmer, USA
,Cell fractionation Kit'	PromoKine, Deutschland

cDNA und Plasmide

pCEP4 hminK (Wildtyp)	Dr. M. Sanguinetti
pcDNA3.1 hminK G38S	Dr. J. Ehrlich
pcDNA3.1 hKvLQT1	Dr. M. Sanguinetti
pcDNA3.1	Invitrogen, USA
pEGFP-N2	Clontech, Japan

Antikörper

Anti-Calmodulin (Maus)	Lab Vision, USA
Anti-Calnexin (Maus)	Abcam, USA
Anti-,flag' (Kaninchen)	Sigma Aldrich, USA
Anti-G _{αi-3} (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-GAPDH (Ziege)	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-GFP (Kaninchen)	Sigma Aldrich, USA
Anti-Kir2.1 (Ziege)	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-Kir2.3 (Kaninchen)	Alomone, Israel

Anti-Kir3.1 (Kaninchen)	Alomone, Israel
Anti-Kir3.4 (Kaninchen)	Dr. G. B. Krapivinsky
Anti-KvLQT1/KCNQ1 (Kaninchen)	Alomone, Israel
Anti-KvLQT1/KCNQ1 (Ziege)	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-KCNE1 (sc-16796; Ziege)	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-Spektrin (Kaninchen)	Sigma Aldrich, USA
Anti-Ziege (Kaninchen)	EMD4Biosciences, USA
Anti-Maus (Ziege)	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-Kaninchen (Ziege)	EMD4Biosciences, USA
Alexa Fluor 488 nm Anti-Ziege (Esel)	Invitrogen, USA
Alexa Fluor 555 nm Anti-Kaninchen (Esel)	Invitrogen, USA

9 Literaturverzeichnis

1. Benjamin EJ, Chen PS, Bild DE, Mascette AM, Albert CM, Alonso A et al. Prevention of atrial fibrillation: report from a national heart, lung, and blood institute workshop. *Circulation* 2009; 119(4):606-618.
2. Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *JAMA* 1994; 271(11):840-844.
3. Vonken EP, Velthuis BK, Wittkamp FH, Rensing BJ, Derksen R, Cramer MJ. Contrast-enhanced MRA and 3D visualization of pulmonary venous anatomy to assist radiofrequency catheter ablation. *J Cardiovasc Magn Reson* 2003; 5(4):545-551.
4. Katz AM. *Physiology of the Heart*. 2001. Philadelphia, PA, USA, Lippincott Williams and Wilkins.
5. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995; 92(7):1954-1968.
6. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002; 415(6868):219-226.
7. Sun H, Chartier D, Leblanc N, Nattel S. Intracellular calcium changes and tachycardia-induced contractile dysfunction in canine atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 2001; 49(4):751-761.
8. Courtemanche M, Ramirez RJ, Nattel S. Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: insights from a mathematical model. *Am J Physiol* 1998; 275(1 Pt 2):H301-H321.
9. Yue L, Melnyk P, Gaspo R, Wang Z, Nattel S. Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1999; 84(7):776-784.
10. Brundel BJ, Van Gelder IC, Henning RH, Tuinenburg AE, Deelman LE, Tieleman RG et al. Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999; 42(2):443-454.
11. Lai LP, Su MJ, Lin JL, Lin FY, Tsai CH, Chen YS et al. Down-regulation of L-type calcium channel and sarcoplasmic reticular Ca(2+)-ATPase mRNA

- in human atrial fibrillation without significant change in the mRNA of ryanodine receptor, calsequestrin and phospholamban: an insight into the mechanism of atrial electrical remodeling. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33(5):1231-1237.
12. Grammer JB, Zeng X, Bosch RF, Kuhlkamp V. Atrial L-type Ca²⁺-channel, beta-adrenoreceptor, and 5-hydroxytryptamine type 4 receptor mRNAs in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2001; 96(1):82-90.
 13. Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1997; 81(4):512-525.
 14. Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 1999; 85(5):428-436.
 15. Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kuhlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999; 44(1):121-131.
 16. Christ T, Boknik P, Wohrl S, Wettwer E, Graf EM, Bosch RF et al. L-type Ca²⁺ current downregulation in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation* 2004; 110(17):2651-2657.
 17. Ehrlich JR, Cha TJ, Zhang L, Chartier D, Villeneuve L, Hebert TE et al. Characterization of a hyperpolarization-activated time-dependent potassium current in canine cardiomyocytes from pulmonary vein myocardial sleeves and left atrium. *J Physiol* 2004; 557(Pt 2):583-597.
 18. Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T et al. The G protein-gated potassium current I(K,ACh) is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2005; 112(24):3697-3706.
 19. Davis LM, Rodefeld ME, Green K, Beyer EC, Saffitz JE. Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1995; 6(10 Pt 1):813-822.
 20. Polontchouk L, Haefliger JA, Ebel B, Schaefer T, Stuhlmann D, Mehlhorn U et al. Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(3):883-891.
 21. Wilhelm M, Kirste W, Kuly S, Amann K, Neuhuber W, Weyand M et al. Atrial distribution of connexin 40 and 43 in patients with intermittent, persistent, and postoperative atrial fibrillation. *Heart Lung Circ* 2006; 15(1):30-37.

22. Kostin S, Klein G, Szalay Z, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc Res* 2002; 54(2):361-379.
23. Ausma J, Wijffels M, Thone F, Wouters L, Allessie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* 1997; 96(9):3157-3163.
24. Henry WL, Morganroth J, Pearlman AS, Clark CE, Redwood DR, Itscoitz SB et al. Relation between echocardiographically determined left atrial size and atrial fibrillation. *Circulation* 1976; 53(2):273-279.
25. Keren G, Etzion T, Sherez J, Zelcer AA, Megidish R, Miller HI et al. Atrial fibrillation and atrial enlargement in patients with mitral stenosis. *Am Heart J* 1987; 114(5):1146-1155.
26. Ehrlich JR, Hohnloser SH, Nattel S. Role of angiotensin system and effects of its inhibition in atrial fibrillation: clinical and experimental evidence. *Eur Heart J* 2006; 27(5):512-518.
27. Goette A, Staack T, Rocken C, Arndt M, Geller JC, Huth C et al. Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35(6):1669-1677.
28. Goette A, Arndt M, Rocken C, Spiess A, Staack T, Geller JC et al. Regulation of angiotensin II receptor subtypes during atrial fibrillation in humans. *Circulation* 2000; 101(23):2678-2681.
29. Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(18):6940-6943.
30. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y et al. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 1996; 271(6):3221-3228.
31. Sugden PH, Clerk A. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal* 1997; 9(5):337-351.
32. Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S et al. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res* 1998; 83(10):1035-1046.
33. Sun Y, Ramires FJ, Weber KT. Fibrosis of atria and great vessels in response to angiotensin II or aldosterone infusion. *Cardiovasc Res* 1997; 35(1):138-147.

34. Goette A, Hoffmanns P, Enayati W, Meltendorf U, Geller JC, Klein HU. Effect of successful electrical cardioversion on serum aldosterone in patients with persistent atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2001; 88(8):906-9, A8.
35. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 1999; 100(1):87-95.
36. MOE GK, RHEINBOLDT WC, ABILDSKOV JA. A COMPUTER MODEL OF ATRIAL FIBRILLATION. *Am Heart J* 1964; 67:200-220.
37. Allesie MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. III. The "leading circle" concept: a new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle. *Circ Res* 1977; 41(1):9-18.
38. Rensma PL, Allesie MA, Lammers WJ, Bonke FI, Schalij MJ. Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. *Circ Res* 1988; 62(2):395-410.
39. Mandapati R, Skanes A, Chen J, Berenfeld O, Jalife J. Stable microreentrant sources as a mechanism of atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 2000; 101(2):194-199.
40. Mansour M, Mandapati R, Berenfeld O, Chen J, Samie FH, Jalife J. Left-to-right gradient of atrial frequencies during acute atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 2001; 103(21):2631-2636.
41. Derakhchan K, Li D, Courtemanche M, Smith B, Brouillette J, Page PL et al. Method for simultaneous epicardial and endocardial mapping of in vivo canine heart: application to atrial conduction properties and arrhythmia mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001; 12(5):548-555.
42. Nattel S, Li D, Yue L. Basic mechanisms of atrial fibrillation--very new insights into very old ideas. *Annu Rev Physiol* 2000; 62:51-77.
43. Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* 1995; 91(5):1588-1595.
44. Sarmast F, Kolli A, Zaitsev A, Parisian K, Dhamoon AS, Guha PK et al. Cholinergic atrial fibrillation: I(K,ACh) gradients determine unequal left/right atrial frequencies and rotor dynamics. *Cardiovasc Res* 2003; 59(4):863-873.
45. Li D, Zhang L, Kneller J, Nattel S. Potential ionic mechanism for repolarization differences between canine right and left atrium. *Circ Res* 2001; 88(11):1168-1175.

46. Klos M, Calvo D, Yamazaki M, Zlochiver S, Mironov S, Cabrera JA et al. Atrial septopulmonary bundle of the posterior left atrium provides a substrate for atrial fibrillation initiation in a model of vagally mediated pulmonary vein tachycardia of the structurally normal heart. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008; 1(3):175-183.
47. Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* 1998; 339(10):659-666.
48. Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K. Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev* 1999; 79(4):1317-1372.
49. Bazett HC. The time relations of the blood-pressure changes after excision of the adrenal glands, with some observations on blood volume changes. *J Physiol* 1920; 53(5):320-339.
50. Goldenberg I, Moss AJ, Zareba W. QT interval: how to measure it and what is "normal". *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006; 17(3):333-336.
51. Jackman WM, Friday KJ, Anderson JL, Aliot EM, Clark M, Lazzara R. The long QT syndromes: a critical review, new clinical observations and a unifying hypothesis. *Prog Cardiovasc Dis* 1988; 31(2):115-172.
52. Crumb W, Cavero I, I. QT interval prolongation by non-cardiovascular drugs: issues and solutions for novel drug development. *Pharm Sci Technol Today* 1999; 2(7):270-280.
53. Keating MT, Sanguinetti MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 2001; 104(4):569-580.
54. Hedley PL, Jorgensen P, Schlamowitz S, Wangari R, Moolman-Smook J, Brink PA et al. The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Hum Mutat* 2009; 30(11):1486-1511.
55. Keating M, Atkinson D, Dunn C, Timothy K, Vincent GM, Leppert M. Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras-1 gene. *Science* 1991; 252(5006):704-706.
56. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 1996; 384(6604):78-80.
57. Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL et al. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 1996; 384(6604):80-83.
58. Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT. Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet* 1997; 17(3):338-340.

59. Sesti F, Goldstein SA. Single-channel characteristics of wild-type IKs channels and channels formed with two minK mutants that cause long QT syndrome. *J Gen Physiol* 1998; 112(6):651-663.
60. Tyson J, Tranebjaerg L, Bellman S, Wren C, Taylor JF, Bathen J et al. IsK and KvLQT1: mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; 6(12):2179-2185.
61. Duggal P, Vesely MR, Wattanasirichaigoon D, Villafane J, Kaushik V, Beggs AH. Mutation of the gene for IsK associated with both Jervell and Lange-Nielsen and Romano-Ward forms of Long-QT syndrome. *Circulation* 1998; 97(2):142-146.
62. Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J et al. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet* 1997; 15(2):186-189.
63. JERVELL A, LANGE-NIELSEN F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J* 1957; 54(1):59-68.
64. Noble D, Tsien RW. Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1969; 200(1):205-231.
65. Yue L, Feng J, Li GR, Nattel S. Characterization of an ultrarapid delayed rectifier potassium channel involved in canine atrial repolarization. *J Physiol* 1996; 496 (Pt 3):647-662.
66. Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res* 1997; 80(4):572-579.
67. Dubin D. *Ion Adventure in the Heartland*. 2003. Tampa, Florida, Cover Publishing Co.
68. Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ Res* 1993; 72(1):75-83.
69. 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(1):195-215.
70. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK, Scott A, Siegl PK. Isoproterenol antagonizes prolongation of refractory period by the class III antiarrhythmic agent E-

- 4031 in guinea pig myocytes. Mechanism of action. *Circ Res* 1991; 68(1):77-84.
71. Virag L, Iost N, Opincariu M, Szolnoky J, Szecsi J, Bogats G et al. The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2001; 49(4):790-797.
 72. Matsuura H, Ehara T, Imoto Y. An analysis of the delayed outward current in single ventricular cells of the guinea-pig. *Pflugers Arch* 1987; 410(6):596-603.
 73. Towbin JA. Cardiac arrhythmias: the genetic connection. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000; 11(5):601-602.
 74. Barry DM, Nerbonne JM. Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annu Rev Physiol* 1996; 58:363-394.
 75. Jan LY, Jan YN. Potassium channels and their evolving gates. *Nature* 1994; 371(6493):119-122.
 76. MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 1991; 350(6315):232-235.
 77. Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 1998; 280(5360):69-77.
 78. Roux B, MacKinnon R. The cavity and pore helices in the KcsA K⁺ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* 1999; 285(5424):100-102.
 79. Sigworth FJ. Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 1994; 27(1):1-40.
 80. Yellen G. The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q Rev Biophys* 1998; 31(3):239-295.
 81. Wang KW, Goldstein SA. Subunit composition of minK potassium channels. *Neuron* 1995; 14(6):1303-1309.
 82. Pusch M, Magrassi R, Wollnik B, Conti F. Activation and inactivation of homomeric KvLQT1 potassium channels. *Biophys J* 1998; 75(2):785-792.
 83. Tristani-Firouzi M, Sanguinetti MC. Voltage-dependent inactivation of the human K⁺ channel KvLQT1 is eliminated by association with minimal K⁺ channel (minK) subunits. *J Physiol* 1998; 510 (Pt 1):37-45.
 84. Busch AE, Busch GL, Ford E, Suessbrich H, Lang HJ, Greger R et al. The role of the IsK protein in the specific pharmacological properties of the IKs channel complex. *Br J Pharmacol* 1997; 122(2):187-189.

85. Kurokawa J, Chen L, Kass RS. Requirement of subunit expression for cAMP-mediated regulation of a heart potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(4):2122-2127.
86. Kurokawa J, Motoike HK, Rao J, Kass RS. Regulatory actions of the A-kinase anchoring protein Yotiao on a heart potassium channel downstream of PKA phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(46):16374-16378.
87. Loussouarn G, Park KH, Bellocq C, Baro I, Charpentier F, Escande D. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *EMBO J* 2003; 22(20):5412-5421.
88. Park KH, Piron J, Dahimene S, Merot J, Baro I, Escande D et al. Impaired KCNQ1-KCNE1 and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate interaction underlies the long QT syndrome. *Circ Res* 2005; 96(7):730-739.
89. Busch AE, Lang F. Effects of [Ca²⁺]_i and temperature on minK channels expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 1993; 334(2):221-224.
90. Seeböhm G, Lerche C, Busch AE, Bachmann A. Dependence of I(K_s) biophysical properties on the expression system. *Pflügers Arch* 2001; 442(6):891-895.
91. Shamgar L, Ma L, Schmitt N, Haitin Y, Peretz A, Wiener R et al. Calmodulin is essential for cardiac IKS channel gating and assembly: impaired function in long-QT mutations. *Circ Res* 2006; 98(8):1055-1063.
92. Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 1988; 242(4881):1042-1045.
93. Marcus DC, Sunose H, Liu J, Bennett T, Shen Z, Scofield MA et al. Protein kinase C mediates P2U purinergic receptor inhibition of K⁺ channel in apical membrane of strial marginal cells. *Hear Res* 1998; 115(1-2):82-92.
94. Shen Z, Marcus DC. Divalent cations inhibit IsK/KvLQT1 channels in excised membrane patches of strial marginal cells. *Hear Res* 1998; 123(1-2):157-167.
95. Murai T, Kakizuka A, Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Molecular cloning and sequence analysis of human genomic DNA encoding a novel membrane protein which exhibits a slowly activating potassium channel activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161(1):176-181.
96. Splawski I, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH, Keating MT. Genomic structure of three long QT syndrome genes: KVLQT1, HERG, and KCNE1. *Genomics* 1998; 51(1):86-97.

97. Abbott GW, Goldstein SA. A superfamily of small potassium channel subunits: form and function of the MinK-related peptides (MiRPs). *Q Rev Biophys* 1998; 31(4):357-398.
98. Kang C, Tian C, Sonnichsen FD, Smith JA, Meiler J, George AL, Jr. et al. Structure of KCNE1 and implications for how it modulates the KCNQ1 potassium channel. *Biochemistry* 2008; 47(31):7999-8006.
99. Furukawa T, Ono Y, Tsuchiya H, Katayama Y, Bang ML, Labeit D et al. Specific interaction of the potassium channel beta-subunit minK with the sarcomeric protein T-cap suggests a T-tubule-myofibril linking system. *J Mol Biol* 2001; 313(4):775-784.
100. Tapper AR, George AL, Jr. MinK subdomains that mediate modulation of and association with KvLQT1. *J Gen Physiol* 2000; 116(3):379-390.
101. Chen H, Goldstein SA. Serial perturbation of MinK in IKs implies an alpha-helical transmembrane span traversing the channel corpus. *Biophys J* 2007; 93(7):2332-2340.
102. Melman YF, Krumerman A, McDonald TV. A single transmembrane site in the KCNE-encoded proteins controls the specificity of KvLQT1 channel gating. *J Biol Chem* 2002; 277(28):25187-25194.
103. Yarov-Yarovoy V, Baker D, Catterall WA. Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K(+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(19):7292-7297.
104. Panaghie G, Abbott GW. The role of S4 charges in voltage-dependent and voltage-independent KCNQ1 potassium channel complexes. *J Gen Physiol* 2007; 129(2):121-133.
105. Heitzmann D, Koren V, Wagner M, Sterner C, Reichold M, Tegtmeier I et al. KCNE beta subunits determine pH sensitivity of KCNQ1 potassium channels. *Cell Physiol Biochem* 2007; 19(1-4):21-32.
106. Peretz A, Schottelndreier H, Aharon-Shamgar LB, Attali B. Modulation of homomeric and heteromeric KCNQ1 channels by external acidification. *J Physiol* 2002; 545(Pt 3):751-766.
107. Lai LP, Su MJ, Yeh HM, Lin JL, Chiang FT, Hwang JJ et al. Association of the human minK gene 38G allele with atrial fibrillation: evidence of possible genetic control on the pathogenesis of atrial fibrillation. *Am Heart J* 2002; 144(3):485-490.
108. Ackerman MJ, Tester DJ, Jones GS, Will ML, Burrow CR, Curran ME. Ethnic differences in cardiac potassium channel variants: implications for genetic susceptibility to sudden cardiac death and genetic testing for congenital long QT syndrome. *Mayo Clin Proc* 2003; 78(12):1479-1487.

109. Ehrlich JR, Zicha S, Coutu P, Hebert TE, Nattel S. Atrial fibrillation-associated minK38G/S polymorphism modulates delayed rectifier current and membrane localization. *Cardiovasc Res* 2005; 67(3):520-528.
110. Katz B. Les constantes electriques de la membrane du muscle. 3, 285. 1949.
111. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 2010; 90(1):291-366.
112. Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg²⁺. *Nature* 1987; 325(7000):156-159.
113. Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 1994; 372(6504):366-369.
114. Hagiwara S, Takahashi K. The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell. *J Membr Biol* 1974; 18(1):61-80.
115. Miyazaki SI, Takahashi K, Tsuda K, Yoshii M. Analysis of non-linearity observed in the current-voltage relation of the tunicate embryo. *J Physiol* 1974; 238(1):55-77.
116. Sakmann B, Trube G. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J Physiol* 1984; 347:641-657.
117. Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV et al. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993; 362(6415):31-38.
118. Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 1993; 362(6416):127-133.
119. Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J* 1994; 66(4):1061-1067.
120. Bichet D, Haass FA, Jan LY. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4(12):957-967.
121. Vandenberg CA. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(8):2560-2564.
122. Yamada M, Kurachi Y. Spermine gates inward-rectifying muscarinic but not ATP-sensitive K⁺ channels in rabbit atrial myocytes. *Intracellular*

- substance-mediated mechanism of inward rectification. *J Biol Chem* 1995; 270(16):9289-9294.
123. Doring F, Derst C, Wischmeyer E, Karschin C, Schneggenburger R, Daut J et al. The epithelial inward rectifier channel Kir7.1 displays unusual K⁺ permeation properties. *J Neurosci* 1998; 18(21):8625-8636.
 124. Krapivinsky G, Medina I, Eng L, Krapivinsky L, Yang Y, Clapham DE. A novel inward rectifier K⁺ channel with unique pore properties. *Neuron* 1998; 20(5):995-1005.
 125. Huang CL, Feng S, Hilgemann DW. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* 1998; 391(6669):803-806.
 126. Lopes CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in conserved Kir channel-PIP₂ interactions underlie channelopathies. *Neuron* 2002; 34(6):933-944.
 127. Chan KW, Sui JL, Vivaudou M, Logothetis DE. Specific regions of heteromeric subunits involved in enhancement of G protein-gated K⁺ channel activity. *J Biol Chem* 1997; 272(10):6548-6555.
 128. Huang CL, Jan YN, Jan LY. Binding of the G protein betagamma subunit to multiple regions of G protein-gated inward-rectifying K⁺ channels. *FEBS Lett* 1997; 405(3):291-298.
 129. Ho IH, Murrell-Lagnado RD. Molecular determinants for sodium-dependent activation of G protein-gated K⁺ channels. *J Biol Chem* 1999; 274(13):8639-8648.
 130. Petit-Jacques J, Sui JL, Logothetis DE. Synergistic activation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channels by the betagamma subunits of G proteins and Na⁽⁺⁾ and Mg⁽²⁺⁾ ions. *J Gen Physiol* 1999; 114(5):673-684.
 131. Glowatzki E, Fakler G, Brandle U, Rexhausen U, Zenner HP, Ruppersberg JP et al. Subunit-dependent assembly of inward-rectifier K⁺ channels. *Proc Biol Sci* 1995; 261(1361):251-261.
 132. Yang J, Jan YN, Jan LY. Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron* 1995; 15(6):1441-1447.
 133. Preisig-Muller R, Schlichthorl G, Goerge T, Heinen S, Bruggemann A, Rajan S et al. Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(11):7774-7779.

134. Schram G, Melnyk P, Pourrier M, Wang Z, Nattel S. Kir2.4 and Kir2.1 K(+) channel subunits co-assemble: a potential new contributor to inward rectifier current heterogeneity. *J Physiol* 2002; 544(Pt 2):337-349.
135. Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL. The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K(+) current (I(K1)) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol* 2001; 533(Pt 3):697-710.
136. Krapivinsky G, Gordon EA, Wickman K, Velimirovic B, Krapivinsky L, Clapham DE. The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K(+) -channel proteins. *Nature* 1995; 374(6518):135-141.
137. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5):843-854.
138. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; 408(6808):86-89.
139. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403(6772):901-906.
140. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294(5543):862-864.
141. Cordes KR, Srivastava D. MicroRNA regulation of cardiovascular development. *Circ Res* 2009; 104(6):724-732.
142. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004; 10(12):1957-1966.
143. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13(12):1097-1101.
144. Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* 2004; 14(23):2162-2167.
145. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004; 10(2):185-191.
146. Zeng Y, Cullen BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(16):4776-4785.

147. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006):350-355.
148. Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005; 132(21):4645-4652.
149. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003; 115(2):199-208.
150. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115(2):209-216.
151. Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(17):5944-5953.
152. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2):281-297.
153. Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* 2005; 123(6):1133-1146.
154. Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet* 2006; 38 Suppl:S8-13.
155. Chaudhuri K, Chatterjee R. MicroRNA detection and target prediction: integration of computational and experimental approaches. *DNA Cell Biol* 2007; 26(5):321-337.
156. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 2008; 132(1):9-14.
157. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 2005; 436(7048):214-220.
158. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006; 38(2):228-233.
159. Kwon C, Han Z, Olson EN, Srivastava D. MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(52):18986-18991.
160. Sokol NS, Ambros V. Mesodermally expressed *Drosophila* microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. *Genes Dev* 2005; 19(19):2343-2354.

161. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 2007; 129(2):303-317.
162. Costantini DL, Arruda EP, Agarwal P, Kim KH, Zhu Y, Zhu W et al. The homeodomain transcription factor *Irx5* establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell* 2005; 123(2):347-358.
163. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting *GJA1* and *KCNJ2*. *Nat Med* 2007; 13(4):486-491.
164. Higuchi R, Krummel B, Saiki RK. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(15):7351-7367.
165. Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 2007; 3:12.
166. Yue L, Feng J, Li GR, Nattel S. Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods. *Am J Physiol* 1996; 270(6 Pt 2):H2157-H2168.
167. Krumerman A, Gao X, Bian JS, Melman YF, Kagan A, McDonald TV. An LQT mutant minK alters KvLQT1 trafficking. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286(6):C1453-C1463.
168. Jin W, Lu Z. A novel high-affinity inhibitor for inward-rectifier K⁺ channels. *Biochemistry* 1998; 37(38):13291-13299.
169. Voigt N, Friedrich A, Bock M, Wettwer E, Christ T, Knaut M et al. Differential phosphorylation-dependent regulation of constitutively active and muscarinic receptor-activated IK_{ACh} channels in patients with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2007; 74(3):426-437.
170. Aggeli A, Bannister ML, Bell M, Boden N, Findlay JB, Hunter M et al. Conformation and ion-channeling activity of a 27-residue peptide modeled on the single-transmembrane segment of the IsK (minK) protein. *Biochemistry* 1998; 37(22):8121-8131.
171. Tian C, Vanoye CG, Kang C, Welch RC, Kim HJ, George AL, Jr. et al. Preparation, functional characterization, and NMR studies of human KCNE1, a voltage-gated potassium channel accessory subunit associated with deafness and long QT syndrome. *Biochemistry* 2007; 46(41):11459-11472.
172. Goldstein SA, Miller C. Site-specific mutations in a minimal voltage-dependent K⁺ channel alter ion selectivity and open-channel block. *Neuron* 1991; 7(3):403-408.

173. Tai KK, Goldstein SA. The conduction pore of a cardiac potassium channel. *Nature* 1998; 391(6667):605-608.
174. Tapper AR, George AL, Jr. Location and orientation of minK within the I(Ks) potassium channel complex. *J Biol Chem* 2001; 276(41):38249-38254.
175. Panaghie G, Tai KK, Abbott GW. Interaction of KCNE subunits with the KCNQ1 K⁺ channel pore. *J Physiol* 2006; 570(Pt 3):455-467.
176. Xu X, Jiang M, Hsu KL, Zhang M, Tseng GN. KCNQ1 and KCNE1 in the IKs channel complex make state-dependent contacts in their extracellular domains. *J Gen Physiol* 2008; 131(6):589-603.
177. Nakajo K, Kubo Y. KCNE1 and KCNE3 stabilize and/or slow voltage sensing S4 segment of KCNQ1 channel. *J Gen Physiol* 2007; 130(3):269-281.
178. Takumi T, Moriyoshi K, Aramori I, Ishii T, Oiki S, Okada Y et al. Alteration of channel activities and gating by mutations of slow ISK potassium channel. *J Biol Chem* 1991; 266(33):22192-22198.
179. Romey G, Attali B, Chouabe C, Abitbol I, Guillemare E, Barhanin J et al. Molecular mechanism and functional significance of the MinK control of the KvLQT1 channel activity. *J Biol Chem* 1997; 272(27):16713-16716.
180. Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y et al. KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet* 1997; 17(3):267-268.
181. Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL et al. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000; 102(10):1178-1185.
182. Jongbloed R, Marcelis C, Velter C, Doevendans P, Geraedts J, Smeets H. DHPLC analysis of potassium ion channel genes in congenital long QT syndrome. *Hum Mutat* 2002; 20(5):382-391.
183. Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Bloise R, Ronchetti E, Nastoli J et al. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA* 2005; 294(23):2975-2980.
184. Shim SH, Ito M, Maher T, Milunsky A. Gene sequencing in neonates and infants with the long QT syndrome. *Genet Test* 2005; 9(4):281-284.
185. Fatini C, Sticchi E, Marcucci R, Verdiani V, Nozzoli C, Vassallo C et al. S38G single-nucleotide polymorphism at the KCNE1 locus is associated with heart failure. *Heart Rhythm* 2010; 7(3):363-367.
186. Stryer L. *Biochemistry*. 2002. New York, NY, W.H. Freeman and Co.

187. Herlyn H, Zechner U, Oswald F, Pfeufer A, Zischler H, Haaf T. Positive selection at codon 38 of the human KCNE1 (= minK) gene and sporadic absence of 38Ser-coding mRNAs in Gly38Ser heterozygotes. *BMC Evol Biol* 2009; 9:188.
188. Nagaya N, Papazian DM. Potassium channel alpha and beta subunits assemble in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1997; 272(5):3022-3027.
189. Biliczki P, Girmatsion Z, Brandes RP, Harenkamp S, Pitard B, Charpentier F et al. Trafficking-deficient long QT syndrome mutation KCNQ1-T587M confers severe clinical phenotype by impairment of KCNH2 membrane localization: evidence for clinically significant IKr-IKs alpha-subunit interaction. *Heart Rhythm* 2009; 6(12):1792-1801.
190. Chandrasekhar KD, Bas T, Kobertz WR. KCNE1 subunits require co-assembly with K⁺ channels for efficient trafficking and cell surface expression. *J Biol Chem* 2006; 281(52):40015-40023.
191. Seeböhm G, Strutz-Seeböhm N, Ureche ON, Henrion U, Baltaev R, Mack AF et al. Long QT syndrome-associated mutations in KCNQ1 and KCNE1 subunits disrupt normal endosomal recycling of IKs channels. *Circ Res* 2008; 103(12):1451-1457.
192. Peroz D, Dahimene S, Baro I, Loussouarn G, Merot J. LQT1-associated mutations increase KCNQ1 proteasomal degradation independently of Derlin-1. *J Biol Chem* 2009; 284(8):5250-5256.
193. Chandrasekhar KD, Bas T, Kobertz WR. KCNE1 subunits require co-assembly with K⁺ channels for efficient trafficking and cell surface expression. *J Biol Chem* 2006; 281(52):40015-40023.
194. Gallusser A, Kuhn A. Initial steps in protein membrane insertion. Bacteriophage M13 procoat protein binds to the membrane surface by electrostatic interaction. *EMBO J* 1990; 9(9):2723-2729.
195. Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 1999; 22(3):537-548.
196. Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 2000; 27(1):97-106.
197. Ma D, Jan LY. ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Curr Opin Neurobiol* 2002; 12(3):287-292.
198. Jaskolski F, Normand E, Mülle C, Coussen F. Differential trafficking of GluR7 kainate receptor subunit splice variants. *J Biol Chem* 2005; 280(24):22968-22976.

199. Liu A, Wenzel N, Qi X. Role of lysine residues in membrane anchoring of saposin C. *Arch Biochem Biophys* 2005; 443(1-2):101-112.
200. McCrossan ZA, Abbott GW. The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 2004; 47(6):787-821.
201. Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW et al. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999; 97(2):175-187.
202. Piccini M, Vitelli F, Seri M, Galletta LJ, Moran O, Bulfone A et al. KCNE1-like gene is deleted in AMME contiguous gene syndrome: identification and characterization of the human and mouse homologs. *Genomics* 1999; 60(3):251-257.
203. Kurokawa J, Bankston JR, Kaihara A, Chen L, Furukawa T, Kass RS. KCNE variants reveal a critical role of the beta subunit carboxyl terminus in PKA-dependent regulation of the IKs potassium channel. *Channels (Austin)* 2009; 3(1):16-24.
204. Sesti F, Abbott GW, Wei J, Murray KT, Saksena S, Schwartz PJ et al. A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(19):10613-10618.
205. Pourrier M, Zicha S, Ehrlich J, Han W, Nattel S. Canine ventricular KCNE2 expression resides predominantly in Purkinje fibers. *Circ Res* 2003; 93(3):189-191.
206. Anantharam A, Abbott GW. Does hERG coassemble with a beta subunit? Evidence for roles of MinK and MiRP1. *Novartis Found Symp* 2005; 266:100-112.
207. Gordon E, Panaghie G, Deng L, Bee KJ, Roepke TK, Krogh-Madsen T et al. A KCNE2 mutation in a patient with cardiac arrhythmia induced by auditory stimuli and serum electrolyte imbalance. *Cardiovasc Res* 2008; 77(1):98-106.
208. Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J et al. MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ Res* 2001; 88(12):E84-E87.
209. Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA et al. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 1998; 93(5):717-729.
210. Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 1998; 393(6685):587-591.

211. Dedek K, Waldegger S. Colocalization of KCNQ1/KCNE channel subunits in the mouse gastrointestinal tract. *Pflugers Arch* 2001; 442(6):896-902.
212. Grahammer F, Herling AW, Lang HJ, Schmitt-Graff A, Wittekindt OH, Nitschke R et al. The cardiac K⁺ channel KCNQ1 is essential for gastric acid secretion. *Gastroenterology* 2001; 120(6):1363-1371.
213. Roepke TK, Anantharam A, Kirchhoff P, Busque SM, Young JB, Geibel JP et al. The KCNE2 potassium channel ancillary subunit is essential for gastric acid secretion. *J Biol Chem* 2006; 281(33):23740-23747.
214. Schroeder BC, Waldegger S, Fehr S, Bleich M, Warth R, Greger R et al. A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* 2000; 403(6766):196-199.
215. Abbott GW, Butler MH, Bendahhou S, Dalakas MC, Ptacek LJ, Goldstein SA. MiRP2 forms potassium channels in skeletal muscle with Kv3.4 and is associated with periodic paralysis. *Cell* 2001; 104(2):217-231.
216. Lundby A, Ravn LS, Svendsen JH, Hauns S, Olesen SP, Schmitt N. KCNE3 mutation V17M identified in a patient with lone atrial fibrillation. *Cell Physiol Biochem* 2008; 21(1-3):47-54.
217. Grunnet M, Jespersen T, Rasmussen HB, Ljungstrom T, Jorgensen NK, Olesen SP et al. KCNE4 is an inhibitory subunit to the KCNQ1 channel. *J Physiol* 2002; 542(Pt 1):119-130.
218. Zeng Z, Tan C, Teng S, Chen J, Su S, Zhou X et al. The single nucleotide polymorphisms of I(Ks) potassium channel genes and their association with atrial fibrillation in a Chinese population. *Cardiology* 2007; 108(2):97-103.
219. Ma KJ, Li N, Teng SY, Zhang YH, Sun Q, Gu DF et al. Modulation of KCNQ1 current by atrial fibrillation-associated KCNE4 (145E/D) gene polymorphism. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120(2):150-154.
220. Angelo K, Jespersen T, Grunnet M, Nielsen MS, Klaerke DA, Olesen SP. KCNE5 induces time- and voltage-dependent modulation of the KCNQ1 current. *Biophys J* 2002; 83(4):1997-2006.
221. Hofman-Bang J, Jespersen T, Grunnet M, Larsen LA, Andersen PS, Kanters JK et al. Does KCNE5 play a role in long QT syndrome? *Clin Chim Acta* 2004; 345(1-2):49-53.
222. Ravn LS, Hofman-Bang J, Dixen U, Larsen SO, Jensen G, Haunso S et al. Relation of 97T polymorphism in KCNE5 to risk of atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2005; 96(3):405-407.

223. Abbott GW, Goldstein SA. Disease-associated mutations in KCNE potassium channel subunits (MiRPs) reveal promiscuous disruption of multiple currents and conservation of mechanism. *FASEB J* 2002; 16(3):390-400.
224. Wu DM, Jiang M, Zhang M, Liu XS, Korolkova YV, Tseng GN. KCNE2 is colocalized with KCNQ1 and KCNE1 in cardiac myocytes and may function as a negative modulator of I(Ks) current amplitude in the heart. *Heart Rhythm* 2006; 3(12):1469-1480.
225. Lundquist AL, Manderfield LJ, Vanoye CG, Rogers CS, Donahue BS, Chang PA et al. Expression of multiple KCNE genes in human heart may enable variable modulation of I(Ks). *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38(2):277-287.
226. Aydin A, Bahring S, Dahm S, Guenther UP, Uhlmann R, Busjahn A et al. Single nucleotide polymorphism map of five long-QT genes. *J Mol Med* 2005; 83(2):159-165.
227. Lai LP, Deng CL, Moss AJ, Kass RS, Liang CS. Polymorphism of the gene encoding a human minimal potassium ion channel (minK). *Gene* 1994; 151(1-2):339-340.
228. Vetter DE, Mann JR, Wangemann P, Liu J, McLaughlin KJ, Lesage F et al. Inner ear defects induced by null mutation of the *isk* gene. *Neuron* 1996; 17(6):1251-1264.
229. Letts VA, Valenzuela A, Dunbar C, Zheng QY, Johnson KR, Frankel WN. A new spontaneous mouse mutation in the *Kcne1* gene. *Mamm Genome* 2000; 11(10):831-835.
230. Kupersmidt S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Niswender KD, Magnuson MA et al. Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res* 1999; 84(2):146-152.
231. Charpentier F, Merot J, Riochet D, Le Marec H, Escande D. Adult KCNE1-knockout mice exhibit a mild cardiac cellular phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251(3):806-810.
232. Eliot RS, Buell JC. Role of emotions and stress in the genesis of sudden death. *J Am Coll Cardiol* 1985; 5(6 Suppl):95B-98B.
233. Schwartz PJ, Zaza A, Locati E, Moss AJ. Stress and sudden death. The case of the long QT syndrome. *Circulation* 1991; 83(4 Suppl):II71-II80.
234. Varro A, Balati B, Iost N, Takacs J, Virag L, Lathrop DA et al. The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *J Physiol* 2000; 523 Pt 1:67-81.
235. Lengyel C, Iost N, Virag L, Varro A, Lathrop DA, Papp JG. Pharmacological block of the slow component of the outward delayed rectifier current

- (I(Ks)) fails to lengthen rabbit ventricular muscle QT(c) and action potential duration. *Br J Pharmacol* 2001; 132(1):101-110.
236. Stengl M, Volders PG, Thomsen MB, Spatjens RL, Sipido KR, Vos MA. Accumulation of slowly activating delayed rectifier potassium current (IKs) in canine ventricular myocytes. *J Physiol* 2003; 551(Pt 3):777-786.
237. Silva J, Rudy Y. Subunit interaction determines IKs participation in cardiac repolarization and repolarization reserve. *Circulation* 2005; 112(10):1384-1391.
238. Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ et al. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 1996; 12(1):17-23.
239. Husser D, Stridh M, Sornmo L, Roden DM, Darbar D, Bollmann A. A genotype-dependent intermediate ECG phenotype in patients with persistent lone atrial fibrillation genotype ECG-phenotype correlation in atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2009; 2(1):24-28.
240. Capucci A, Biffi M, Boriani G, Ravelli F, Nollo G, Sabbatani P et al. Dynamic electrophysiological behavior of human atria during paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation* 1995; 92(5):1193-1202.
241. Friedlander Y, Vatta M, Sotoodehnia N, Sinnreich R, Li H, Manor O et al. Possible association of the human KCNE1 (minK) gene and QT interval in healthy subjects: evidence from association and linkage analyses in Israeli families. *Ann Hum Genet* 2005; 69(Pt 6):645-656.
242. Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY et al. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003; 299(5604):251-254.
243. Cha TJ, Ehrlich JR, Chartier D, Qi XY, Xiao L, Nattel S. Kir3-based inward rectifier potassium current: potential role in atrial tachycardia remodeling effects on atrial repolarization and arrhythmias. *Circulation* 2006; 113(14):1730-1737.
244. Noujaim SF, Pandit SV, Berenfeld O, Vikstrom K, Cerrone M, Mironov S et al. Up-regulation of the inward rectifier K⁺ current (I_{K1}) in the mouse heart accelerates and stabilizes rotors. *J Physiol* 2007; 578(Pt 1):315-326.
245. Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hala O, Doerfel C et al. Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K(+) current (I_(K,ACh)) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced I_(K,ACh) and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation* 2001; 104(21):2551-2557.

246. Gaborit N, Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Bouter S, Lande G et al. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation* 2005; 112(4):471-481.
247. Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 2002; 90(9):939-950.
248. Voigt N, Maguy A, Yeh YH, Qi X, Ravens U, Dobrev D et al. Changes in I_K, ACh single-channel activity with atrial tachycardia remodelling in canine atrial cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2008; 77(1):35-43.
249. Girmatsion Z, Biliczki P, Bonauer A, Wimmer-Greinecker G, Scherer M, Moritz A et al. Changes in microRNA-1 expression and IK1 up-regulation in human atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2009; 6(12):1802-1809.
250. Guarnieri DJ, DiLeone RJ. MicroRNAs: a new class of gene regulators. *Ann Med* 2008; 40(3):197-208.
251. Pandit SV, Berenfeld O, Anumonwo JM, Zaritski RM, Kneller J, Nattel S et al. Ionic determinants of functional reentry in a 2-D model of human atrial cells during simulated chronic atrial fibrillation. *Biophys J* 2005; 88(6):3806-3821.
252. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 2007; 13(4):486-491.
253. Atienza F, Almendral J, Moreno J, Vaidyanathan R, Talkachou A, Kalifa J et al. Activation of inward rectifier potassium channels accelerates atrial fibrillation in humans: evidence for a reentrant mechanism. *Circulation* 2006; 114(23):2434-2442.
254. Ehrlich JR, Cha TJ, Zhang L, Chartier D, Melnyk P, Hohnloser SH et al. Cellular electrophysiology of canine pulmonary vein cardiomyocytes: action potential and ionic current properties. *J Physiol* 2003; 551(Pt 3):801-813.
255. Cherry EM, Ehrlich JR, Nattel S, Fenton FH. Pulmonary vein reentry--properties and size matter: insights from a computational analysis. *Heart Rhythm* 2007; 4(12):1553-1562.
256. Ehrlich JR. Inward rectifier potassium currents as a target for atrial fibrillation therapy. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008; 52(2):129-135.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Promotion unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Joachim Ehrlich und Herrn Professor Dr. Stefan Hohnloser, die es möglich machten, dass ich die Promotion an der Uniklinik Frankfurt in der Abteilung Kardiologie durchführen konnte. Die Arbeit erweiterte, nicht zuletzt durch Einblicke in die Medizin, meinen Horizont.

Privatdozent Dr. Joachim Ehrlich möchte ich außerdem dafür danken, dass ich mich stets auf seine Unterstützung verlassen konnte. Sein Engagement und seine Begeisterung waren für den Erfolg dieser Arbeit ausschlaggebend. Die an mich gestellten Anforderungen trugen in erheblichem Maße zu meiner fachlichen und auch persönlichen Weiterentwicklung bei.

Bei Herrn Professor Dr. Jürgen Bereiter-Hahn möchte ich mich herzlich für Rat und Hilfe bedanken. Er steuerte mit seinem reichen Erfahrungsschatz viele Anregungen bei. Dr. Peter Biliczki danke ich für seine Hilfe und Unterstützung sowie die Anleitung bei den Patch-Clamp-Untersuchungen.

Dr. Ina Takac danke ich für die Aufnahmen am konfokalen Mikroskop.

Christin Schwerthelm und Sabine Harenkamp möchte ich für die praktische Unterstützung sowie das freundschaftliche Verhältnis und die angenehme Zusammenarbeit danken.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für das Korrekturlesen und die anschließende konstruktive Auseinandersetzung bedanken.

Schließlich danke ich herzlich meiner Familie und Phillip für den privaten Rückhalt, für die fortwährende Unterstützung und ihre Anteilnahme.

Publikationen

Einzelne Kapitel der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. vorgestellt:

Publikationen

Girmatsion Z, Biliczki P, Takac I, Hohnloser SH, Ehrlich JR. Role of KCNE1 N-terminus for membrane trafficking and anchoring of KCNQ1/KCNE1 channel complexes – Implications for atrial fibrillation (in Revision).

Girmatsion Z, Biliczki P, Bonauer A, Wimmer-Greinecker G, Scherer M, Moritz A, Bukowska A, Goette A, Nattel S, Hohnloser SH, Ehrlich JR. Changes in microRNA-1 expression and IK1 up-regulation in human atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2009; 6(12):1802-9.

Wissenschaftliche Abstracts

Girmatsion Z, Biliczki P, Takac I, Bereiter-Hahn J, Hohnloser SH, Ehrlich JR. Atrial-fibrillation associated KCNE1 polymorphism: role of serine 38 for I_{Ks} constitution. *ECCPS Retreat 2010*.

Girmatsion Z, Biliczki P, Takac I, Bereiter-Hahn J, Hohnloser SH, Ehrlich JR. Role of KCNE1 residue 38 for trafficking and anchoring of I_{Ks} channel α -subunits. *Heart Rhythm* 2010 (abstract #5196).

Girmatsion Z, Biliczki P, Takac I, Bereiter-Hahn J, Hohnloser SH, Ehrlich JR. Atrial-fibrillation associated KCNE1 polymorphism: role of serine 38 for I_{Ks} constitution. *ECAS 2010* (abstract #14-06).

Girmatsion Z, Biliczki P, Kuehbacher A, Scherer M, Wimmer-Greinecker G, Nattel S, Hohnloser SH, Ehrlich JR. Molecular Basis of Inward-Rectifier Potassium Current Upregulation in Human Atrial Fibrillation: Contrasting Mechanisms for I_{K1} versus Constitutive I_{KACH} . *Circulation* 2008 (abstract #1880).

Lebenslauf

Zenawit Girmatsion, Diplom-Biologin

*30.09.1980 in Frankfurt am Main

Ledig, keine Kinder

Hochschulbildung

- | | |
|-------------------|---|
| seit 01/2007 | Promotionsstudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität:
,Substrate für Vorhofflimmern: genetische Prädisposition und erworbene Veränderungen', betreut durch Priv.-Doz. Dr. J. Ehrlich und Professor J. Bereiter-Hahn |
| 01/2005 – 12/2005 | Diplomarbeit: ',Untersuchungen zur Interaktion des Photosystems I mit Fucoxanthin-Chlorophyll-Proteinen bei der der Diatomee <i>Cyclotella meneghiniana</i> ' |
| 11/2004 | Praktikum zur Einführung in arbeitstechnische Methoden für die Diplomarbeit |
| 10/2004 | Mündliche Diplomprüfungen in dem Hauptfach Pflanzenphysiologie und den Nebenfächern Genetik und Tierphysiologie |
| 10/2002 – 10/2004 | Hauptstudium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main |
| 09/2002 | Vordiplom |
| 10/2000 – 10/2002 | Grundstudium der Biologie (Nebenfächer Chemie und Physik) an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main |

Schulbildung

- | | |
|-------------|---|
| 1997 – 2000 | Friedrich-Dessauer-Gymnasium mit Abschluss (Abitur) |
| 1990 – 1997 | Leibnizschule, Gymnasium |
| 1986 – 1990 | Eichendorffschule, Grundschule |

Auszeichnungen und Forschungsförderung

- Posterpreis bei dem Kongress der 'European Cardiac Arrhythmia Society', 2010
,Role of KCNE1 residue 38 for trafficking and anchoring of IKs channel α -subunits'
- HeartRhythm Journal Outstanding Publication Award for Young Electrophysiologists, 2009
,Changes in microRNA-1 expression and IK1 up-regulation in human AF'
- Forschungsförderung der ',August Scheidel-Stiftung' (Frankfurt), September 2008