

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

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

**Untersuchung des  $I_{K,PO}$  und seiner zugrundeliegenden Untereinheiten in primären  
Zellkulturen atrialer Kardiomyozyten des Schweines mittels Patch-Clamp-Technik  
und molekularbiologischer Untersuchungen**

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

vorgelegt von

Claudia Scherer

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2014

**Dekan:** Prof. Dr. med. Josef M. Pfeilschifter

**Referent:** Prof. Dr. med. Joachim Ehrlich

**Korreferent:** Prof. Dr. Rüdiger Hilker-Roggendorf

Tag der Disputation: 26. Februar 2015

Meiner Familie  
Meinen Freunden

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	iv
1 Einleitung.....	1
1.1 Vorhofflimmern .....	1
1.2 Elektrophysiologie der Zelle.....	3
1.3 Das kardiale Aktionspotential .....	4
1.4 Kaliumkanäle.....	9
1.4.1 Aufbau von Kaliumkanälen.....	9
1.4.2 Aktivierungszustände von Kaliumkanälen.....	11
1.5 Antiarrhythmika .....	13
1.5.1 Der Kaliumkanalinhibitor AVE0118 .....	13
1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit .....	15
2 Methoden .....	17
2.1 Überblick.....	17
2.2 Gewebepräparation.....	18
2.3 Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen.....	20
2.4 Primäre Zellkultur atrialer Kardiomyozyten des Schweines.....	20
2.5 Patch-Clamp-Technik .....	21
2.5.1 Prinzip der Patch-Clamp-Technik .....	22
2.5.2 Durchführung der Messung.....	24
2.5.3 Protokolle zur Messung von Ionenströmen (voltage clamp) oder Aktionpotentialen (current-clamp).....	25
2.5.4 Auswertung der Daten .....	26
2.6 Real-time-PCR .....	26

2.6.1	Prinzip der Real-time-PCR mit TaqMan-Sonden .....	27
2.6.2	mRNA-Isolation.....	29
2.6.3	Durchführung der Real-time-PCR mittels TaqMan-Sonden .....	30
2.7	Western-Blot-Analyse .....	31
2.7.1	Prinzip des Western-Blots .....	31
2.7.2	Durchführung des Western-Blots.....	32
2.8	Small interfering RNA (siRNA) / Knockdown .....	33
2.8.1	Prinzip des mRNA-Knockdowns mittels siRNA .....	34
2.8.2	Durchführung des „Knockdowns“ mit siRNA .....	35
3	Materialien und Lösungen.....	37
4	Ergebnisse.....	38
4.1	Morphologische Veränderungen .....	38
4.2	Signifikante Stromzunahme des $I_{K,PO}$ nach 24h Primärkultur.....	39
4.2.1	Spannungsabhängige Aktivierung des $I_{K,PO}$ .....	39
4.2.2	Spannungsabhängige Inaktivierung des $I_{K,PO}$ .....	41
4.2.3	Erholung von der Inaktivierung des $I_{K,PO}$ .....	43
4.3	Unveränderte Wirkung verschiedener Pharmaka auf den $I_{K,PO}$ .....	45
4.3.1	AVE0118.....	45
4.3.2	Heteropodatoxin .....	46
4.3.3	5-(4-Phenoxybutoxy)Psoralen .....	48
4.4	Keine Veränderung des $I_{K1}$ .....	49
4.5	Keine Veränderung des Aktionspotentials .....	50
4.6	Zunahme des Kv1.5-Proteins .....	51
4.7	Veränderung der mRNA für die Kanaluntereinheiten Kv1.5 und Kv4.3 sowie KChiP2 .....	52

4.8	„Knockdown“ des Kv1.5 mit siRNA.....	53
4.8.1	Keine Veränderung des $I_{K,PO}$ in mit siRNA herunter regulierter mRNA für Kv1.5 in atrialen Schweinekardiomyozyten im Vergleich zu den kultivierten Zellen.	56
5	Diskussion.....	57
5.1	Primäre Zellkulturen atrialer Kardiomyozyten des Schweines.....	57
5.1.1	Morphologische Veränderungen.....	57
5.1.2	Verstärkte Proteinexpression des Kv1.5 in den kultivierten Zellen .....	59
5.1.3	Zunahme des $I_{K,PO}$ unter Kulturbedingungen .....	59
5.2	Mögliche molekulare Grundlage des $I_{K,PO}$ .....	61
5.2.1	$I_{Kur}$ wird durch Kv1.5 gebildet.....	61
5.2.2	$I_{to}$ wird durch Kv4.3 gebildet .....	62
5.2.3	Dem $I_{K,PO}$ unterliegen der $I_{to}$ und $I_{Kur}$ .....	62
5.3	Vergrößerung des $I_{K,PO}$ trotz vermindertem Kv1.5-mRNA in Anwesenheit des KChIP2 .....	63
5.3.1	KChIP2 hemmt Kv1.5 .....	64
5.3.2	KChIP2 verstärkt Kv4.3 .....	64
5.3.3	Der $I_{K,PO}$ wird durch die Kanaleinheit Kv1.5 und Kv4.3 gebildet und wesentlich durch KChIP2 beeinflusst.....	65
5.3.4	KChIP2 in der Pathogenese von Arrhythmien .....	66
5.4	„Knockdown“ des Kv1.5 mit siRNA.....	67
5.5	Herausforderungen bei der Erforschung kardialer Ionenkanäle.....	68
5.5.1	Heterogenität des Herzgewebes .....	68
5.6	Kultivierte Kardiomyozyten für die Erforschung neuer antiarrhythmischer Substanzen.....	68
6	Zusammenfassung.....	70

Summary.....	72
7 Literaturverzeichnis .....	74
8 Anhang.....	82
8.1 Materialien.....	82
8.2 Lösungen .....	84
8.3 Verwendete Kanalinhhibitoren.....	85
8.3.1 Cadmiumchlorid .....	85
8.3.2 HMR1556 .....	85
8.3.3 AVE0118.....	85
8.3.4 Heteropodatoxin .....	86
8.3.5 5-(4-Phenoxybutoxy)Psoralen .....	86
8.4 Real-time-PCR Sonden .....	87
8.5 SiRNAs .....	87
9 Abkürzungsverzeichnis .....	88
10 Danksagung .....	90
11 Curriculum vitae .....	91
12 Ehrenwörtliche Erklärung.....	94

Abbildung 1: Vorhofflimmern.....	2
Abbildung 2: Entstehung des Membranpotentials. ....	4
Abbildung 3: Anatomie des Herzens mit Darstellung des Reizleitungssystems. ....	5
Abbildung 4: Schematische Aufzeichnung eines kardialen Aktionspotentials und der Ionenströme durch spezifische Ionenkanäle einer einzelnen Ventrikelzelle mittels Patch-Clamp-Technik. ....	7
Abbildung 5: Am Herzaktionspotential beteiligte Kaliumkanäle. ....	8
Abbildung 6: Aufbau eines spannungsabhängigen Kaliumkanals. ....	10
Abbildung 7: Darstellung der den $I_{Ks}$ -Strom bildenden Untereinheiten. ....	11
Abbildung 8: Aktivierungszustände spannungsabhängiger Kaliumkanäle.....	12
Abbildung 9: Darstellung des Versuchsaufbaus. ....	18
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Patch-Clamp-Technik. ....	22
Abbildung 11: 4 mögliche Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik. ....	24
Abbildung 12: Prinzip der Real-time-PCR mit TaqMan-Sonden.....	28
Abbildung 13: RNA-Isolation. ....	29
Abbildung 14: Darstellung des Knockdowns mit siRNA. ....	34
Abbildung 15: Mikroskopische Aufnahme kultivierter atrialer Kardiomyozyten. ....	39
Abbildung 16: Untersuchung der Aktivierung des $I_{K,PO}$ unter dem Einfluss der Zellkultur. ....	40
Abbildung 17: Relative Stromzunahme des $I_{K,PO}$ . ....	41
Abbildung 18: Untersuchung der spannungsabhängigen Inaktivierung des $I_{K,PO}$ . ....	42
Abbildung 19: Erholung von der Inaktivierung des $I_{K,PO}$ . ....	44
Abbildung 20: Wirkung der Substanz AVE0118 auf den $I_{K,PO}$ . ....	45
Abbildung 21: Testung der Substanz Heteropodatoxin (HpTX). ....	47
Abbildung 22: Untersuchung der Substanz 5-(4-Phenoxybutoxy)Psoralen (PAP1) .....	48
Abbildung 23: Messung des $I_{K1}$ . ....	49
Abbildung 24: Darstellung von Aktionspotentialen. ....	50
Abbildung 25: Proteinanalysen des Kv1.5 in Schweineatriumzellen .....	51
Abbildung 26: Darstellung der mRNA-Expression in atrialen Kardiomyozyten des Schweines .....	53



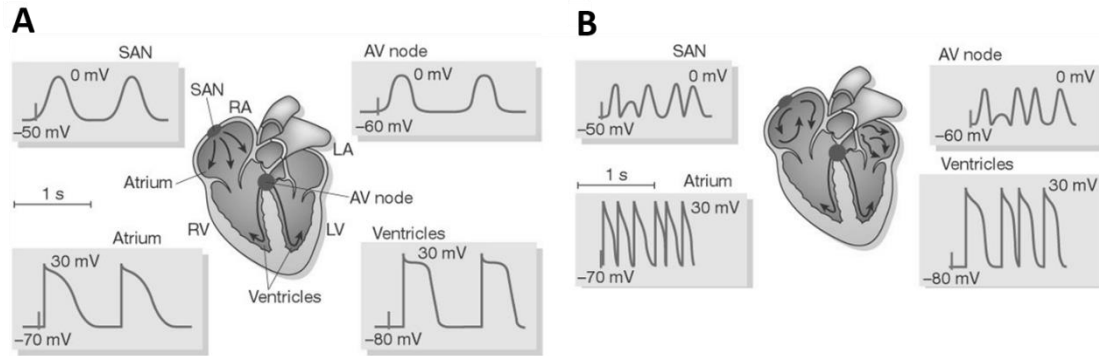
Abbildung 27: Mikroskopische Aufnahme transfizierter Atriumzellen.....	54
Abbildung 28: „Knockdown“ der mRNA für Kv1.5 mit siRNA.....	55
Abbildung 29: Messung des $I_{K,PO}$ nach „Knockdown“ des Kv1.5 mittels siRNA nach 24 und 48 h.....	56

Tabelle 1: Ansatz für die Transfektion mit siRNA gegen den Kv1.5 .....	35
Tabelle 2: Extrazellulär-Lösung (Storage) .....	84
Tabelle 3: Extrazellulär-Lösung (Tyrode) .....	84
Tabelle 4: Intrazelluläre Lösung (Pipettenlösung) .....	85
Tabelle 5: Sequenz der PCR-Sonden .....	87
Tabelle 6: Sequenzen der siRNAs .....	87

# 1 Einleitung

## 1.1 Vorhofflimmern

Vorhofflimmern ist eine in unserer Gesellschaft weit verbreitete Herzrhythmusstörung, die nicht nur mit einer erhöhten Mortalität einhergeht sondern auch eine wesentliche Einschränkung der Lebensqualität nach sich zieht <sup>1</sup>. Vorhofflimmern ist dabei eine der häufigsten Ursachen für ambulante Arztbesuche und Krankenhausaufenthalte. Nach aktuellen Schätzungen des statistischen Bundesamtes von Deutschland war in 2007 ein Prozent der Bevölkerung von Vorhofflimmern betroffen. Erkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems nehmen in der westlichen Welt ca. 34 % der Todesursache ein, wobei Herzrhythmusstörungen und insbesondere auch Vorhofflimmern sehr oft mit diesen vergesellschaftet sind. Aufgrund der sich ändernden Altersstruktur in den westlichen Ländern und der Zunahme von Risikofaktoren wie Bluthochdruck und Übergewicht steigt die Zahl der Patienten mit Erkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems ständig <sup>2</sup>. Zudem führt die bessere Therapie und Überlebenschancen nach Herzinfarkten sowie die heutigen Möglichkeiten an Therapie von Herzerkrankungen generell (z.B. operative Korrekturen angeborener Herzfehler oder Katheter-basierte Implantation von Herzklappen bei inoperablen Patienten) zu einer Steigerung der Inzidenz von Herzrhythmusstörungen. Typische Beschwerden zeigen sich in Symptomen wie Palpitationen und Unruhe, aber auch der Herzinsuffizienz sowie in Brustschmerzen. Ein besonderes Risiko des Vorhofflimmerns ist die Bildung von Blutgerinnseln in den Herzhöhlen der Herzvorhöfe. Diese können zu Organinfarkten führen, wobei der Schlaganfall (Apoplex) aufgrund seiner Mortalität einen besonderen Stellenwert einnimmt <sup>3, 4</sup>.



**Abbildung 1: Vorhofflimmern.**

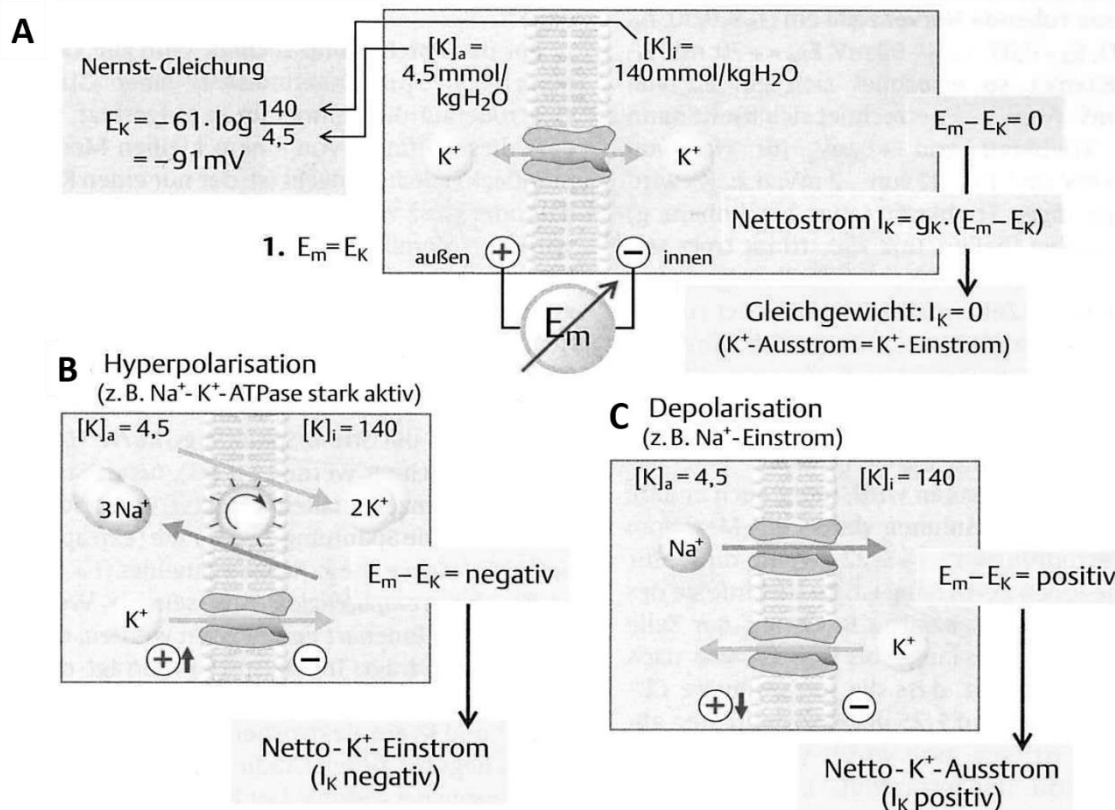
**A** normaler Sinusrhythmus mit geordneter elektrischer Aktivierung zunächst des Sinusknoten, dann der Vorhöfe und letztlich des Ventrikels. **B** Vorhofflimmern, das durch eine chaotische Aktivierung der Vorhöfe geprägt ist und entsprechend zu einer raschen, unregelmässigen Aktivierung der Kammern führt. Repräsentative Aktionspotentiale sind gezeigt für den Sinusknoten („sinoatrial node“ (SAN)), Vorhof („atrium“), AV-Knoten („AV node“) und Ventrikel („ventricles“). Die Aufzeichnungen der Aktionspotentiale finden zum gleichen Zeitpunkt statt. LA, linker Vorhof („left atrium“); LV, linker Ventrikel („left ventricle“); RA, rechter Vorhof („right atrium“); RV, rechter Ventrikel („right ventricle“). (Abbildung aus<sup>5</sup>)

Nach den heutigen Leitlinien der „European Society of Cardiology“<sup>3, 4</sup> sehen die Therapieansätze des Vorhofflimmerns neben der Prävention von Risikofaktoren und der Behandlung der Grunderkrankung immer eine antithrombotische Therapie vor. Diese Säule der Behandlung führt zu einer Reduktion der Rate von Schlaganfällen. Die konsequente antithrombotische Behandlung umfasst bei den meisten Patienten eine orale Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten (z.B. Marcumar®). In jüngster Zeit sind insbesondere die neuen oralen Antikoagulantien in den Vordergrund gerückt. Darüber hinaus wird eine Regulierung der Herzfrequenz und bei symptomatischen Patienten auch eine rhythmuserhaltende (Sinusrhythmus) Behandlung empfohlen. Die frequenzregulierende Behandlung beinhaltet mehrere Optionen. Hier kommen Betablocker und Calcium-Antagonisten zum Einsatz. Bei einer rhythmuserhaltenden Behandlung sollte die Sicherheit der gewählten Behandlung im Vordergrund stehen, sie ist vor allem den individuellen Begleiterkrankungen des Patienten anzupassen. Die langfristige Einstellung des Rhythmus stellt eine besondere Herausforderung dar und umfasst die Anwendung von Antiarrhythmika sowie interventionelle Therapieformen mit Katheterablation, operative Maßnahmen und bei persistierendem Vorhofflimmern steht die elektrische Kardioversion zur Verfügung<sup>6</sup>. Dabei stellen trotz der zunehmend

erfolgreichen Katheterablation Antiarrhythmika immernoch eine wichtiges Standbein in der Therapie von Vorhofflimmern dar <sup>7</sup>.

## 1.2 Elektrophysiologie der Zelle

Der Intrazellulärraum der Zellen wird durch eine Zellmembran vom Extrazellulärraum getrennt, wodurch ein Transport für Ionen nur durch Kanäle möglich ist. Die Zellmembran besteht aus einer doppelschichtigen Lipidmembran, eingelagerte Ionenkanäle oder Rezeptoren sind aus Proteinen und Kohlenhydraten aufgebaut. Man unterscheidet den passiven von dem aktiven Transport. Die Natriumkalium-Adenosintriphosphatase ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ) stellt einen aktiven Transporter dar, der in fast allen Zellen unter Verbrauch von ATP (Adenosintriphosphat) drei Natriumionen in den Extrazellulärraum im Austausch gegen zwei Kaliumionen in den Intrazellulärraum transportiert. Durch den Austausch der Ionen entsteht ein Konzentrationsgefälle zwischen Intra- und Extrazellulärraum, welches den elektrochemischen Gradienten bedingt. Die Konzentration von Kaliumionen im Zytoplasma ist dadurch um ein Vielfaches höher als im Extrazellulärraum (Verhältnis 150 mmol / l zu 4,5 mmol / l). Passive Ionenkanäle verbrauchen keine Energie bei dem Transport von Ionen sondern nutzen den transmembranären Ionenfluss entlang des elektrochemischen Gradienten. Unter Ruhebedingungen ist die Zellwand überwiegend für Kaliumionen passierbar, wodurch Kaliumionen dem elektrochemischen Gradienten folgend aus dem Zellinneren passiv in den Extrazellulärraum fließen. Nach der Nernst-Gleichung errechnet sich ein Kaliumgleichgewichtspotential über der Zellmembran von ca.  $-90\text{mV}$  <sup>8</sup>. Durch einen Kaliumkanal fließen im geöffneten Zustand in einer Sekunde bis zu  $10^8$  Ionen. Hierbei werden elektrische Ströme in der Größenordnung von  $10^{-12}$  bis  $10^{-10}$  Ampere pro Kanal erzeugt. Diese Ionenströme können mit der Patch-Clamp-Technik gemessen werden (siehe Methoden).



**Abbildung 2: Entstehung des Membranpotentials.**

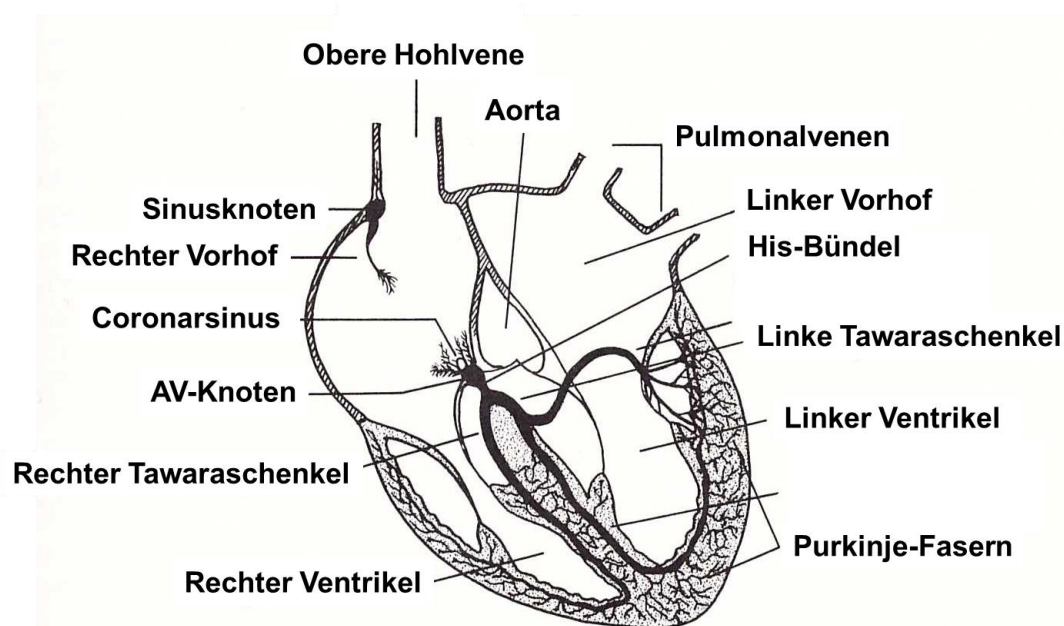
**A** Ruhemembranpotential **B** Hyperpolarisation **C** Depolarisation. Die Konzentration von Kaliumionen im Zellinneren ist um ein Vielfaches höher als im Extrazellulärraum. Der Kaliumgradient über die Zellmembran wird durch die Natriumkalium- Adenosintriophosphatase ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase) aufrecht gehalten. Diese transportiert Kaliumionen unter dem Verbrauch von ATP in den Innenraum der Zelle im Austausch gegen Natriumionen. Ein passiver Transport der Ionen folgt entlang des elektrochemischen Gradienten, Kaliumionen wandern passiv durch Kaliumkanäle von innen nach außen. (Abbildung aus <sup>8)</sup>)

### 1.3 Das kardiale Aktionspotential

Das kardiale Aktionspotential der Zelle wird durch das Zusammenspiel zahlreicher aufeinander abgestimmter Einwärts- und Auswärtsströme von Ionen gebildet. Die Verschiebung der Ionen durch die Zellmembran führt zu einer Änderung des Membranpotentials der Zelle. Das Ruhemembranpotential der Kardiomyozyten wird wie in den meisten anderen Zellen maßgeblich vom Kaliumgleichgewichtspotential bestimmt.

Den Ablauf des Aktionspotentials kann man im Wesentlichen in 5 Phasen aufteilen (siehe Abbildung 4): Phase 0 - schnelle Depolarisation, Phase 1 - frühe Repolarisation,

Phase 2 – Plateauphase, Phase 3 - späte Repolarisation, Phase 4 - Erreichen des Ruhemembranpotentials. Die einzelnen Phasen gehen mit unterschiedlichen Aktivitäten von Ionenkanälen einher und können mit der Patch-Clamp-Technik aufgezeichnet werden. In die Zelle einströmende positive Ladung ist depolarisierend, die Zelle verlassende positive Ladung repolarisierend. Depolarisierende Einwärts-Ströme werden hauptsächlich durch Natrium- und Kalziumkanäle, repolarisierende Auswärtsströme durch Kaliumkanäle getragen. Das kardiale Aktionspotential unterscheidet sich von dem der Skelettmuskelzellen durch ein Plateau sowie eine langsamere Repolarisation (hierfür ist insbesondere ein anhaltender Kalziueinstrom verantwortlich), wodurch ein mehrere hundert Millisekunden dauerndes Herzaktionspotential entsteht.



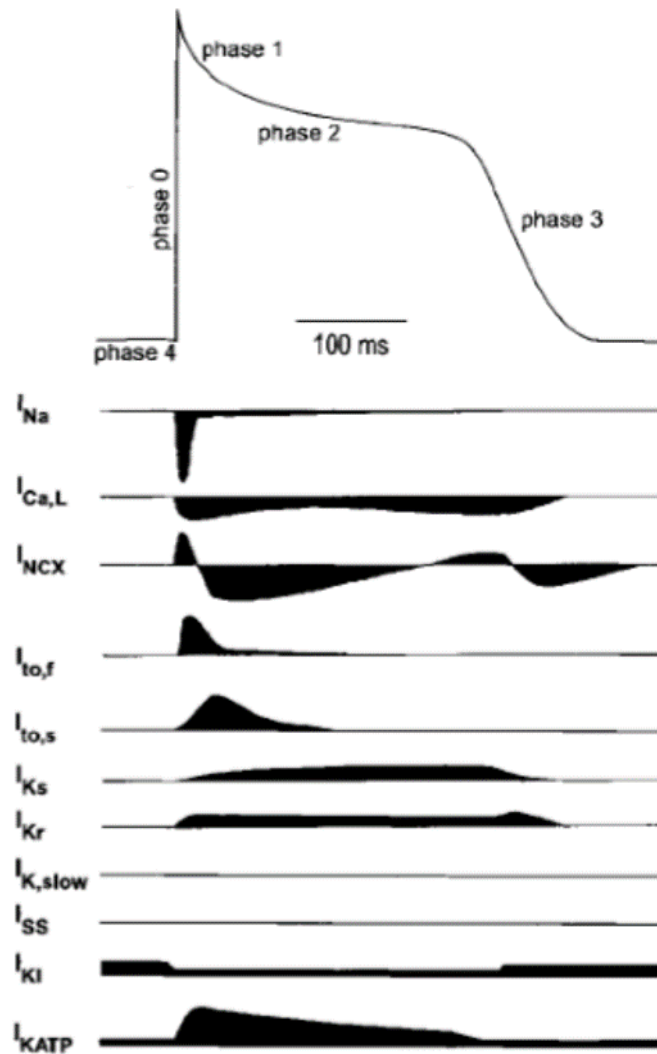
**Abbildung 3: Anatomie des Herzens mit Darstellung des Reizleitungssystems.**

Im rechten Vorhof befindet sich der Sinusknoten. Dort beginnt die Erregung des Herzens und breitet sich über den AV-Knoten weiter über die Tawaraschenkel und die Purkinje-Fasern in die Muskelzellen des Ventrikels aus (Abbildung aus<sup>9</sup>).

Das kardiale Aktionspotential wird kontinuierlich von Zelle zu Zelle fortgeleitet durch einen Natriumeinstrom in einer vorgeschalteten Purkinjezelle, Zellen des atrialen Reizleitungssystems oder einer benachbarten depolarisierten Zelle initiiert <sup>10</sup>. Der

sogenannte Natrium „boost“ depolarisiert das Membranpotential auf -70 mV. Durch die Depolarisation öffnen sich die schnellen Natriumkanäle der Herzmuskelzelle wodurch es zu einem weiteren Einstrom von Natriumionen ( $I_{Na}$ ) in das Zellinnere kommt. Diese schnelle Depolarisation (Phase 0) zeigt sich in der Spannungsableitung der Zelle in einem schnellen Aufstrich (Einwärtsstrom) des Aktionspotentials. Das Membranpotential erreicht hierbei Werte im positiven Bereich bis +10 mV, welcher als „overshoot“ bezeichnet wird. Die schnellen Natriumkanäle, die in der Phase 0 aktiviert wurden, sind während des „overshoot“ wieder zu über 90 % geschlossen. Die frühe Repolarisation (Phase 1) wird bereits bei Erreichen einer Spannung des Membranpotentials von -40 mV durch die Aktivierung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen ( $I_{to1}$  „transient outward current 1“) initiiert. Der  $I_{to1}$  wird in der Literatur des Öfteren nur als  $I_{to}$  benannt. Die anschließende Plateauphase (Phase 2) bestimmen ausbalancierte de- und repolarisierende Ströme. Der langsame, spannungsgesteuerte Kalziumkanal vom L-Typ ( $I_{Ca,L}$ ) führt zu einer dauerenden Depolarisation der Membran. Die hohe Konzentration des intrazellulären Kalziums aktiviert Chloridkanäle, die den Strom  $I_{to2}$  („transient outward current 2“), oder auch  $I_{CL(Ca)}$  genannt, tragen und hyperpolarisierend wirken. In der Plateauphase fließt nur noch durch einige wenige Natriumkanäle ein sogenannter „später“ Natriumstrom ( $I_{Na,late}$ ), der zu einer anhaltenden, geringen Depolarisation führt. Der Natrium-Kalzium-Austauscher ( $I_{Na/Ca}$ ) wird je nach Membranpotential depolarisierend („forward mode“) oder repolarisierend („reverse mode“) angetrieben.





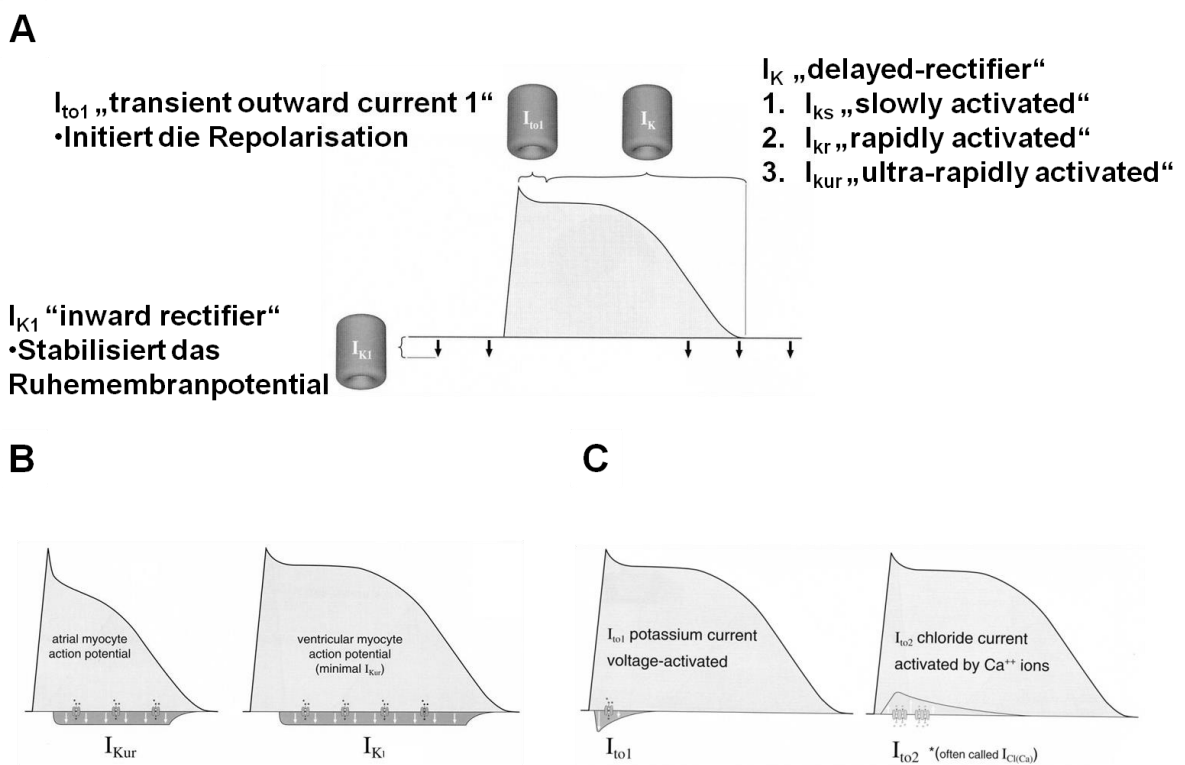
**Abbildung 4: Schematische Aufzeichnung eines kardialen Aktionspotentials und der Ionenströme durch spezifische Ionenkanäle einer einzelnen Ventrikelzelle mittels Patch-Clamp-Technik.**

Die depolarisierenden (in das Zellinnere gerichteten) Ströme sind konventionsgemäß nach unten und die repolarisierenden (die Zelle verlassenden) Ströme nach oben gerichtet.  $I_x$ : I steht für Strom, x steht für das entsprechende Ion, das den Strom hervorruft.  $K_x$ : K steht für Kanal, x steht für die Art des Kanals.

Phase 0 - schnelle Depolarisation ( $I_{Na}$ ), Phase 1 - frühe Repolarisation ( $I_{to1}$ ), Phase 2 – Plateauphase ( $I_{Ca,L}$ ,  $I_{to2}$  (=  $I_{Cl(Ca)}$ ),  $I_{Na,late}$  und  $I_{Na/Ca}$ ), Phase 3 - späte Repolarisation ( $I_{Kr}$  und  $I_{Ks}$  bzw.  $I_{Kur}$  (Atrium)), Phase 4 - Erreichen des Ruhemembranpotentials ( $I_{K1}$ ).

Die späte Repolarisation (Phase 3) wird durch den anhaltenden Auswärtsstrom von Kaliumionen eingeleitet, hier sind vor allem die „delayed rectifier“  $I_K$  ( $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$  bzw.  $I_{Kur}$ ) zu erwähnen (siehe Abbildung 5). Die Leitfähigkeit von  $I_{Ca,L}$  (Einwärtsstrom) nimmt in der Phase 3 weiter ab. Die „delayed rectifier“ zeigen eine spezifische Verteilung in den

Herzzellen. In Vorhofzellen überwiegt der  $I_{Kur}$  („ultrapid delayed-rectifier“), während in Kammerzellen des Herzens vorwiegend  $I_{Kr}$  und  $I_{Ks}$  („rapid bzw. slow delayed-rectifier“) gefunden werden. Der  $I_{Kur}$  des Vorhofs erreicht seine volle Aktivierung sehr früh in der Repolarisation, wodurch sich die kürzere Dauer des APs im Vergleich zur Ventrikelzelle erklären lässt. In der letzten Phase (Phase 4) wird das Ruhemembranpotential wieder durch einwärts gleichrichtende Kaliumströme ( $I_{K1}$  „inward rectifier“) erreicht. In dieser Phase findet zudem das „Recovery“ der Natriumkanäle statt (siehe Abschnitt 1.5.2).



**Abbildung 5: Am Herzaktionspotential beteiligte Kaliumkanäle.**

**A** Aktionspotential einer Ventrikelzelle mit Darstellung der beteiligten Kaliumkanäle.  $I_{K1}$  stabilisiert das Ruhemembranpotential,  $I_{to1}$  wird in der Phase 1 (frühe Repolarisation) aktiv,  $I_K$  ist in der Phase 3 aktiv. **B** Aktionspotential einer Atriumzelle links, rechts einer Ventrikelzelle. Das kürzere Aktionspotential der Atriumzelle wird durch den  $I_{Kur}$  hervorgerufen. **C** Aktionspotential einer Ventrikelzelle mit Darstellung des  $I_{to}$  ( $I_{to1}$  und  $I_{to2}$ ). (Abbildung modifiziert nach <sup>10</sup>)

## 1.4 Kaliumkanäle

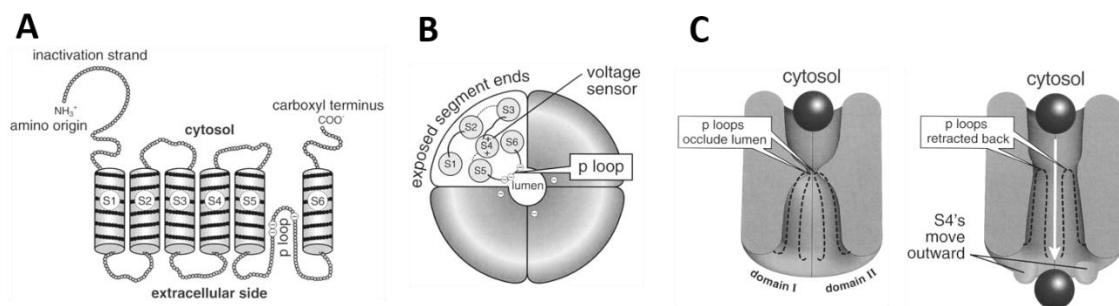
Kaliumkanäle sind die häufigsten und vielfältigsten aller bekannten Ionenkanäle. Sie erlauben den passiven Transport von Kaliumionen durch die Zellmembran. Aufgrund des herrschenden elektrochemischen Gradienten verläuft der Fluss von Kaliumionen meist von innen nach außen. Kaliumkanäle sind in fast allen Zellgeweben zu finden und spielen eine wichtige Rolle bei der Funktion von Herz, Darm und Niere, neuronaler Erregbarkeit oder Kontraktion glatter Muskeln sowie bei der Neurotransmitter- und Hormonfreisetzung. Ihre Funktion besteht dabei unter anderem in der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials und der Repolarisation depolarisierter Membranen.

Neben Kaliumkanälen, welche durch Liganden oder Stoffe aus dem Zellinneren aktiviert werden, steht die – insbesondere für das kardiale Aktionspotential wichtige - weitaus größere Gruppe der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Kv). Analog zu der Einteilung spannungsabhängiger Kaliumkanäle der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* unterscheidet man vier Typen; Shaker (Kv1), Shab (Kv2), Shaw (Kv3) und Shal (Kv4) <sup>11</sup>. Zu den klassischen Mitgliedern zählen die Subfamilien Kv1.1-1.6., welche auch als erstes kloniert wurden <sup>12</sup>. Entsprechend der Nomenklatur Kv n.m bezeichnet „n“ die Subfamilie und „m“ das Mitglied. Spannungsabhängige Kaliumkanäle des Herzens sind z.B. der Kv4.3 der den  $I_{to1}$  („transient outward current 1“)-Strom erzeugt, der Kv1.5, der den  $I_{Kur}$  („ultrarapid“)-Strom vermittelt. Weitere spannungsabhängige Kaliumströme des Herzens sind der,  $I_{K1}$  („inward-rectifier“) und die  $I_k$  („delayed rectifier  $K^+$  channels“) mit seinen drei Typen  $I_{ks}$  („slow“),  $I_{kr}$  („rapid“) und  $I_{Kur}$  („ultrarapid“).

### 1.4.1 Aufbau von Kaliumkanälen

Der funktionelle porenbildende Kaliumkanal entsteht durch Zusammenlagerung von 4  $\alpha$ -Untereinheiten, die jeweils aus 6 transmembranären Segmenten (S1 bis S6) gebildet werden (siehe Abbildung 6). Die einzelnen Untereinheiten können homotetramere oder auch heterotetramere Kanäle mit  $\alpha$ -Untereinheiten ihrer Subfamilien bilden. Das

Carboxyl- und Aminoende der einzelnen Segmente ragen in den Intrazellulärraum hinein. S5 und S6 und die sie verbindenden Aminosäuren (Peptidschleife = „p-loop“) bilden die Kanalpore. Das Segment 4 fungiert als Spannungssensor des Ionenkanals. Die Peptidschleifen der  $\alpha$ -Untereinheiten ragen im geschlossenen Zustand des Kanals in die Porenregion hinein und verschließen so den Kanal. Eine Depolarisation über der Zellmembran verursacht eine rotierende Bewegung des Segments 4, wodurch die Peptidschleifen die Porenregion durchgängig für Kaliumionen machen.

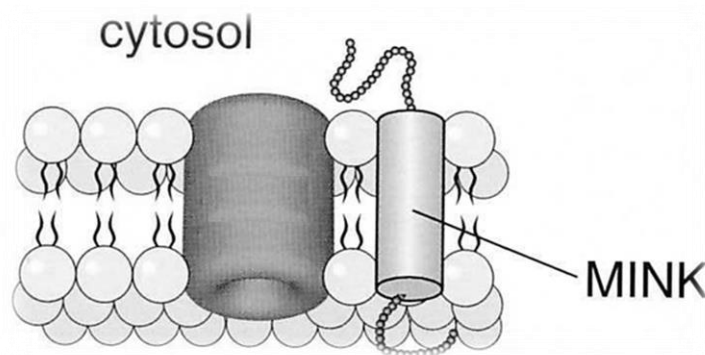


**Abbildung 6: Aufbau eines spannungsabhängigen Kaliumkanals.**

**A** Darstellung der  $\alpha$ -Untereinheiten aus sechs transmembranären Segmenten (S1-S6). N- und C-Terminus der Peptidkette ragen dabei ins Zytosol hinein. Der „p-loop“ befindet sich zwischen S5 und S6. **B** Darstellung der die Kanalpore bildenden  $\alpha$ -Untereinheiten nach dem Modell der tetrameren Zusammenlagerung. Die Kanalpore befindet sich in der Mitte der  $\alpha$ -Untereinheiten (lumen), Aufsicht auf den Kanal von extrazellulär. **C** Darstellung der Aktivierung des Kanals. links: geschlossener Kaliumkanal, rechts: offener Kaliumkanal mit Transport eines Kaliumions (Kugel) durch die Kanalpore. Die Porenregion öffnet sich durch eine rotierende Bewegung des Segment 4, wodurch die Peptidschleife zwischen S5 und S6 die Porenregion frei macht. (Abbildung modifiziert nach <sup>10</sup>)

Neben den  $\alpha$ -Untereinheiten stehen die  $\beta$ -Untereinheiten, welche die Funktion spannungsabhängiger Kaliumkanäle beeinflussen können <sup>13, 13</sup> (siehe Abbildung 7). In Gegenwart einer  $\beta$ -Untereinheit kann zum Beispiel die Expression der  $\alpha$ -Untereinheiten auf der Zelloberfläche erhöht <sup>14</sup>, oder die spannungsabhängige Aktivierung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle verändert werden <sup>15</sup>. Es handelt sich bei den  $\beta$ -Untereinheiten um zytoplasmatische Strukturen, die an die porenformenden Elemente der  $\alpha$ -Untereinheiten assoziiert sind <sup>16</sup>. Im Myokard findet man an  $\beta$ -Untereinheiten die Spleißvarianten Kv $\beta$ 1.2 und Kv $\beta$ 1.3 sowie Kv $\beta$ 2.1 <sup>17</sup>.

Veränderte Kanalfunktionen werden mit zahlreichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Mögliche Ursache hierfür ist z.B. die Mutation in kodierenden Genen. Schon kleine Funktionsänderungen der „delayed rectifier“ können zu einer lebensbedrohlichen Krankheit führen. So sind beispielsweise für das Long-QT-Syndrom Mutationen der Untereinheiten, die zusammen den  $I_{Ks}$ -Strom bilden, bekannt. Mutationen in der Alpha-Untereinheit KvLQT1 ist mit langem QT Syndrom Typ 1 vergesellschaftet. Das membranständige Peptid Mink („minimal  $K^+$  channel peptide“) wird für das Long-QT-Syndrom-5 (LQTS5) verantwortlich gemacht<sup>18</sup> (siehe Abbildung 7). Ein Defekt in dem für  $I_{Kr}$  kodierenden HERG-Gen („human ether à go-go related gene“) ist Ursache für das Long-QT-Syndrom-2 (LQTS2)<sup>10</sup>.



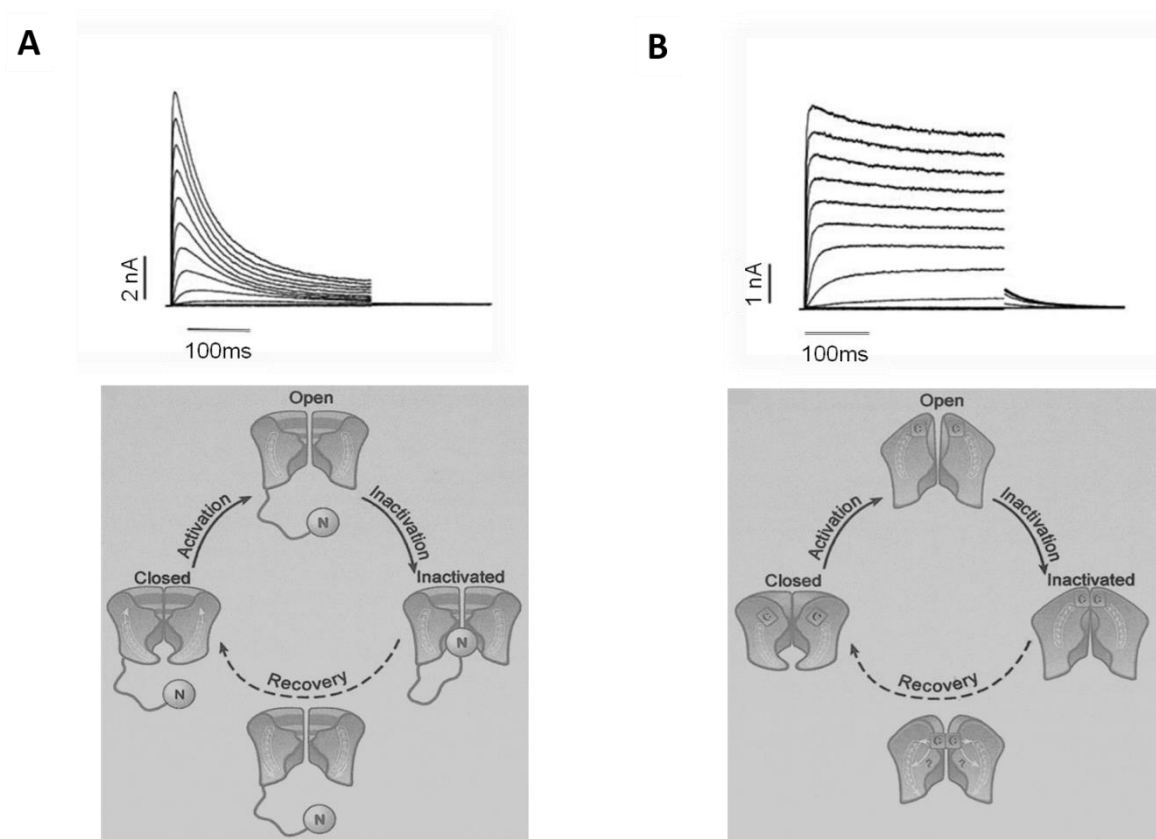
**Abbildung 7: Darstellung der den  $I_{Ks}$ -Strom bildenden Untereinheiten.**

Eine Mutation in der  $\beta$ -Untereinheit MINK (minimal  $K^+$  channel peptide) führt zum Long-QT-Syndrom-5 (LQTS5)<sup>18</sup>. (Abbildung aus<sup>10</sup>)

### 1.4.2 Aktivierungszustände von Kaliumkanälen

Prinzipiell können spannungsabhängige Kaliumkanäle in drei unterschiedlichen Zuständen vorliegen - geschlossen, aktiviert (offen) und inaktiviert. Inaktivierung bezeichnet den Übergang des geöffneten, aktivierten Ionenkanals in den geschlossenen Zustand. Bevor es zu einer erneuten Aktivierung und somit Öffnung des Kanals kommen kann, muss zunächst eine Erholung von der Inaktivierung („Recovery“) stattfinden. Man unterscheidet zwei Inaktivierungstypen (siehe Abbildung 8). Die schnelle N-Typ-

Inaktivierung läuft innerhalb weniger Millisekunden ab, sie wird auch als „ball and chain“-Mechanismus bezeichnet. Hierbei bindet der „Peptid-Ball“, der aus Aminosäureresten des N-Terminus besteht, an den „p-loop“ und verschließt auf diese Weise die Pore von innen<sup>19</sup>. Kanäle, die diesen schnellen Inaktivierungsweg aufweisen nennt man auch A-Typ Kanäle. N-Typ Vertreter sind Kv1.4 und Kv4.3. Beide sind am  $I_{to}$  beteiligt. Die C-Typ Inaktivierung ist sehr viel langsamer, da sie über eine Konformationsänderung aller Untereinheiten abläuft. C-Typ Vertreter sind Kv1.5 (IKur), Kv7.1 (KvLQT1, IKs) und Kv11.1 (HERG, IKr). In Einzelzelleitungen von Kanalströmen lässt sich der Inaktivierungstyp des Kanals durch die Patch-Clamp-Technik darstellen.



**Abbildung 8: Aktivierungszustände spannungsabhängiger Kaliumkanäle.**

Der Kanal wird aktiviert und öffnet sich. Danach folgt eine Inaktivierung, die je nach Typ schnell oder langsam verläuft. Ist der Kanal geschlossen, muss vor einer erneuten Aktivierung eine Erholung von der Inaktivierung folgen („Recovery“). Diese dauert je nach Kanal länger oder kürzer. **Unten A** Schematische Darstellung einer N-Typ Inaktivierung. Hier wird die Kanalpore von innen (Zytosol) durch den „Peptid-Ball“ des N-Terminus verschlossen. **B** Die C-Typ Inaktivierung erfolgt über Konformationsänderung der gesamten Kanalpore und dauert länger (Abbildung aus<sup>20</sup>). **Oben** sind jeweils Beispielströme für die schnelle N-Typ und langsame C-Typ Inaktivierung aufgeführt. **A** Kv4.3 in CHO-Zellen, schnelle Inaktivierung **B** Kv1.5 in CHO-Zellen, langsame Inaktivierung (Abbildung aus<sup>21</sup>).

## 1.5 Antiarrhythmika

Arzneimittel, die gegen Rhythmusstörungen eingesetzt werden – insbesondere gegen Vorhofflimmern - haben häufig Ionenkanäle zum Angriffspunkt, durch deren Inhibition beispielsweise pathologische Automatie oder eine kreisende elektrische Aktivität im Herzgewebe unterdrückt werden soll. Bei einer Vielzahl dieser Pharmaka besteht dabei jedoch auch wieder das Risiko einer proarrhythmischen Wirkung, wobei die proarrhythmische Wirkung auf das Ventrikelmyokard besonders ernst zu nehmen ist, da sie zu QT Verlängerung und letalen Herzrhythmusstörungen (Kammerflimmern) führen kann <sup>22, 23</sup>. Die Antiarrhythmika wurden durch E.M. Vaughan Williams 1975 in vier Klassen unterteilt (Klasse I-IV) <sup>24</sup>: Klasse I Antiarrhythmika richten sich gegen Natriumkanäle, Klasse II umfasst  $\beta$ -Rezeptoren-Blocker, in Klasse III finden sich Kaliumkanalblocker und Klasse IV beinhaltet Kalziumkanalblocker. Das Amiodaron, welches einen Multikanalblocker darstellt, zeigt im Gegensatz zu vielen anderen Antiarrhythmika wenig proarrhythmische Wirkung <sup>25</sup>. Trotz seiner guten antiarrhythmischen Wirkung ist aufgrund seiner extrakardialen Nebenwirkungen jedoch eine dauerhafte Anwendung problematisch <sup>26</sup>. Substanzen, die ausschließlich auf atriale Ionenkanäle wirken, sogenannte „vorhofselektive“ Antiarrhythmika, stellen eine vielversprechende Therapieoption dar, da sie keine ventrikulären Arrhythmien begünstigen <sup>27-30</sup>. Eines dieser vorhofselektiven Antiarrhythmika ist die Substanz AVE0118, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde.

### 1.5.1 Der Kaliumkanalinhibitor AVE0118

AVE0118 gilt als vorhofselektives Antiarrhythmikum, das primär den  $I_{to}$  („transient outward current 1“) und  $I_{Kur}$  („ultrarapid delayed rectifier“) blockiert <sup>31</sup>. AVE0118 zeigte eine Reduktion des Stromes in Zellen, die h („human“) Kv1.5 und Kv4.3 / KChIP2.2 (KChIP2.2 = „K<sup>+</sup> channel-interacting protein 2.2“)-Kanäle exprimierten <sup>32</sup>.

In *in vivo* Experimenten mit Schweinen hatte AVE0118 durch Verlängerung der Refraktärzeit einen antiarrhythmischen Effekt aufgewiesen <sup>33</sup>. In *in vitro* Versuchen

zeigte sich die Substanz hier als Blocker des als  $I_{K,PO}$  („porcine outward current“) beschriebenen Kaliumstroms des Schweines<sup>34</sup>. Nach weiterer Charakterisierung wurde dieser  $I_{K,PO}$  auf einen spannungsabhängigen, kalziumunabhängigen Kaliumkanal zurückgeführt, dessen Inaktivierungsmechanismus zwischen der schnellen N-Typ-Inaktivierung und der langsamen C-Typ-Inaktivierung zu liegen scheint. Der  $I_{K,PO}$  wird vermutlich wesentlich durch die  $\alpha$ -Untereinheit Kv1.5 getragen<sup>34</sup>, womit er Gemeinsamkeiten mit dem  $I_{to}$  aufweist. Die letztlich zugrunde liegenden Kanäle des  $I_{K,PO}$  sind zwar bisher nicht genau bekannt, aufgrund von gemeinsamen Charakteristika wurde der  $I_{K,PO}$  des Schweines jedoch bereits als Korrelat des humanen  $I_{Kur}$  gesehen<sup>35</sup>.  $I_{Kur}$ -Blocker wiederum werden in der Entwicklung von neuen Antiarrhythmika gegen Vorhofflimmern intensiv erforscht, da sie durch ihre Vorhofselektivität besonders attraktiv sind (siehe 1.6.1.). Die Ähnlichkeit des  $I_{K,PO}$  zu dem humanen  $I_{Kur}$  und die antiarrhythmische Wirkung der Substanz AVE0118 in den Tierversuchen, welche vermutlich auf einen Block des  $I_{K,PO}$  zurückzuführen ist, lässt daher auch eine Wirkung der Substanz AVE0118 am Menschen vermuten.

Bei der Entwicklung von Antiarrhythmika stellt sich im besonderem die Frage, ob die neue zu untersuchende Substanz auch an Ionenkanälen Wirkung zeigt, die aufgrund des „elektrischen remodeling“ durch das Vorhofflimmern verändert sind. In humanen atrialen Herzzellen von Patienten mit chronischem Vorhofflimmern findet sich z.B. eine Herabregulierung des  $I_{to}$ <sup>36</sup>. Neben der Reduktion des  $I_{to}$  und  $I_{Ksus}$  („sustained outward K current“) ist eine verminderte Proteinexpression des Kv1.5 zu beobachten<sup>37</sup>. Die Amplitude des  $I_{Kur}$  ist unter dem Einfluss von Vorhofflimmern reduziert<sup>38</sup>. In *in vivo* Experimenten an Schweinen und Ziegen mit der Substanz AVE0118 ist ein sehr gute Wirksamkeit in der Behandlung von Vorhofflimmern gefunden worden<sup>27,33</sup>. Diese Ergebnisse sprechen daher gegen eine theoretisch reduzierte Wirksamkeit von  $I_{Kur}$  Blockern bei Vorhofflimmern<sup>39</sup>. Obwohl der  $I_{Kur}$  unter chronischem Vorhofflimmern herabreguliert zu sein scheint, kann er dennoch mit der Substanz AVE0118 weiter geblockt werden. Die Substanz wird deswegen als pathologiespezifisch eingestuft<sup>40</sup>.



## 1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Repolarisation atrialer Kardiomyozyten des Schweines. Die Entwicklung des vorhofselektiven Antiarrhythmikums AVE0118 hat bereits am Schwein vielversprechende Ergebnisse geliefert <sup>33</sup>. Der genaue antiarrhythmische Wirkmechanismus der Substanz im Schwein konnte dabei bis jetzt noch nicht geklärt werden. Es wird angenommen, dass AVE0118 im Schweineherzen den als  $I_{K,PO}$  beschriebenen Strom blockiert. Die weitere Erforschung der Wirkung der Substanz auf den  $I_{K,PO}$  beziehungsweise auf atriale Kardiomyozyten des Schweineherzens wird vor allem dadurch erschwert, dass der umfangreiche Einsatz des Schweinmodells aus ökonomischen und ethischen Gründen limitiert ist. Ein Ziel der Arbeit war daher, eine Methode zu etablieren, die Zellkulturen atrialer Kardiomyozyten des Schweines für molekularbiologische und elektrophysiologische Untersuchungen zugänglich macht. Ziel ist es dabei die Ausbeute der für die Experimente zu Verfügung stehenden Zellen einer Herzpräparation eines Tieres zu erhöhen, um die benötigte Anzahl an Tieren für die Erforschung zu verringern. In der Grundlagenforschung sind Zellkulturen eine schon lange etablierte Methode, jedoch sind primäre Kulturen differenzierter Zellen (insbesondere Herzzellen) technisch sehr anspruchsvoll und werden nicht standardmässig durchgeführt.

Zur Benutzung in Kultur gehaltener atrialer Kardiomyozyten des Schweines für Forschungszwecke war es essentiell zunächst das Verhalten der Zellen unter eben den Bedingungen der Zellkultur zu beschreiben. Im Hinblick auf die Entwicklung kaliumkanalspezifischer Antiarrhythmika wie die Substanz AVE0118 stehen die Kaliumkanäle in besonderem Interesse. In dieser Arbeit sollten dementsprechend folgenden Eigenschaften an frisch isolierten Vorhofzellen, unter Kontrollbedingungen (0h) und nach 24 Stunden in Zellkultur untersucht werden:

1. Die Funktion und das kinetische Verhalten des Kaliumstroms  $I_{K,PO}$  unter Kontrollbedingungen und nach Kultivierung der nativen Myozyten
2. Die Wirkung der Substanz AVE0118 auf den Ionenstrom nach Kultivierung der myozyten.

3. Analyse der Proteinexpression von Kv1.5 in kultivierten Myozyten mittels „Western-Blot“ Methode.
4. Analyse der mRNA Expression der Gene, die den Kaliumströmen der atrialen Kardiomyozyten des Schweines zugrunde liegen könnten.
5. Zudem sollte untersucht werden, wie sich eine Herunterregulation des Kv1.5 (KCNA5) Gens mit Hilfe einer siRNA auf die Ionenströme auswirkt.

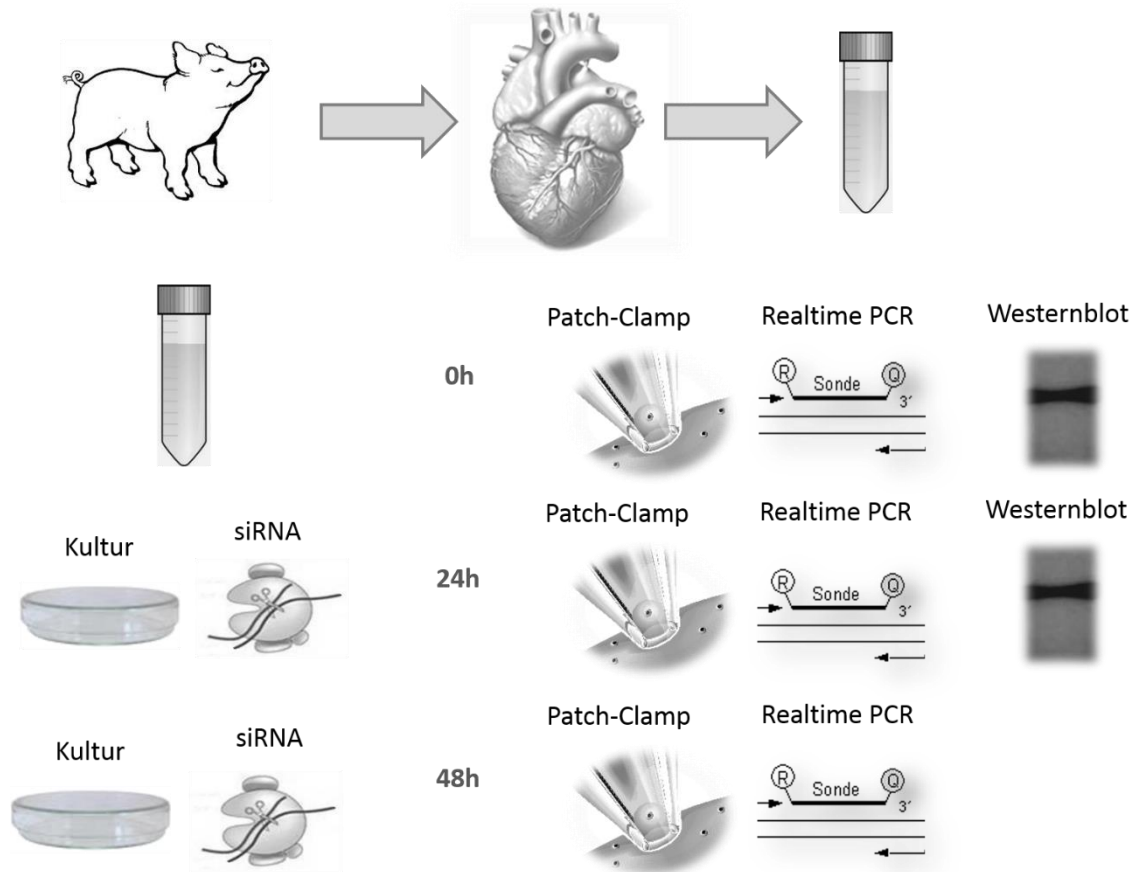
## 2 Methoden

### 2.1 Überblick

Die atrialen Kardiomyozyten des Schweines wurden in primären Zellkulturen mittels elektrophysiologischer und molekularbiologischer Methoden untersucht und die Ergebnisse mit denen von Zellen direkt nach Zellisolation verglichen. Ionenströme und Aktionspotentiale wurden mit der Patch-Clamp-Technik gemessen. Zur Identifizierung von Ionenströmen kamen selektive Ionenkanalblocker zum Einsatz.

Im Mittelpunkt des Interesses stand der  $I_{K,PO}$  („porcine outward current“) des Schweineherzens<sup>34</sup>. Aufgrund der bisherigen Daten geht man davon aus, dass der Kv1.5 die zugrundeliegende Kaliumkanaluntereinheit des  $I_{K,PO}$  bildet. Die Expression von Kv1.5 wurde im Rahmen dieser Studie auf mRNA-Ebene semi-quantitativ mittels Real-time-PCR und auf Proteinebene mittels Western-Blot analysiert. Ein „Knockdown“ des Kv1.5 mittels siRNA („small interfering“ RNA) und die anschließende Messung des  $I_{K,PO}$  sollte dessen Bedeutung als Kanaluntereinheit für diesen Strom verdeutlichen.

Desweiteren wurden Untereinheiten untersucht, die möglicherweise auch mit dem  $I_{K,PO}$  in Verbindung stehen. Real-time-PCR-Analysen wurden dabei für die Gentranskripte Kv4.3, KCHIP2 und TASK-1 durchgeführt.



**Abbildung 9: Darstellung des Versuchsaufbaus.**

Nach Isolierung der atrialen Kardiomyozyten des Schweines wurden entweder direkt (0 h) oder nach einem Tag in Zellkultur (24 h) die auf der rechten Seite der Abbildung aufgeführten Untersuchungen durchgeführt. Nach „knockdown“ des Kv1.5 mit siRNA (nach 24 und 48 h) wurde die mRNA für Kv1.5 mittels Real-time-PCR gemessen und der  $I_{K,PO}$  mit der Patch-Clamp-Technik aufgezeichnet. Western-Blot-Analysen wurden direkt nach der Isolation der Zellen und nach 24 h Kultur durchgeführt.

## 2.2 Gewebepräparation

Die atrialen Kardiomyozyten des Schweines wurden wie bereits beschrieben<sup>34</sup> isoliert. Die Zellen entstammten männlichen, kastrierten Tieren der Rasse „deutsches Landschwein“ (n = 23,  $19 \pm 0.5$  kg). Nachdem die Tiere mit Pentobarbital-Na 30 mg / kg i.v. (Narcoren®, Hersteller: Merial GmbH) unter Zugabe von 10.000 IE Na-Heparin (Liquemin®, Hersteller: Roche) narkotisiert waren, erfolgte die Herzentnahme über linksseitige Thorakotomie. Das Organ wurde direkt in Storage-Lösung (siehe Tabelle 3) überführt. Nach Entfernung der ventrikulären Anteile der Herzen erfolgte die

Kanülierung des *Ramus circumflexus* der *A. coronaria sinistra* zur antegraden Perfusion des Gewebes. Die den Vorhof nicht versorgenden Arterien wurden mit Einknopfnähten ligiert, um eine hohe Perfusion des Vorhofs zu gewährleisten. Während dieser Prozedur wurde mit kalziumhaltiger Tyrode-Lösung perfundiert (siehe Tabelle 4). Im Anschluss folgte eine zehn minütige belaufende Perfusion mit kalziumfreier Tyrode-Lösung. Der Verdau des Gewebes wurde unter Zugabe von Kollagenase (Worthington Typ II, Biochemical Corp.) für 45-70 Minuten durchgeführt. Das angedaute Gewebe wurde vorsichtig mit einer Pinzette abgezupft und die Zellen umgehend in Albumin haltige Storage-Lösung suspendiert. Durch leichtes Rühren und langsames Auf- und Abziehen in der Pipette wurde die Zellsuspension homogenisiert. Anschließend wurde die Zellsuspension filtriert, um größere Gewebepartikel zu entfernen. Während aller Präparations- und Perfusionsschritte erfolgte eine Begasung der verwendeten Lösungen mit 100 % Sauerstoff.

Die gewonnene Zellsuspension (ca. 80 ml je Präparation eines Tieres) wurde gleichmäßig auf vier 50 ml Falconröhrchen aufgeteilt. Um die Suspension von Zelldetritus zu reinigen wurden zwei Waschgänge durchgeführt. Die Falconröhrchen wurden hierfür mit Albumin haltiger Storage-Lösung aufgefüllt, die Zellen durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert und anschließend bei 600 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen nochmals resuspendiert. Der zweite Waschschrift erfolgte durch Zentrifugation bei 500 rpm für fünf Minuten, der Überstand wurde erneut verworfen.

Für Patch-Clamp Untersuchungen wurden die Zellen in Albumin-versetzter Storage-Lösung aufgenommen. Zellen zur Kultivierung wurden in Storage-Lösung ohne Albumin resuspendiert und das Pellet nach einem letzten Waschschrift bei 400 rpm für 5 min in Medium (M199, Gibco) aufgenommen.

### **2.3 Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen**

CHO-Zellen stammen aus dem Ovar des chinesischen Hamsters. Die immortalisierte Zelllinie wurde ursprünglich im Jahr 1957 von Theodore T. Puck aus einer Primärkultur isoliert <sup>41</sup>. Wir verwendeten die Zelllinie Flp-In-T-Rex-CHO-Kv1.5 (Sanofi-Aventis). In die Zelle wurden DNA-Abschnitte eingebracht, die eine leichte Rekombination (Flp-In) und eine konditionale Expression (T-Rex) ermöglichen sowie die Sequenz von Kv1.5 des Schweines. Die Kv1.5 cDNA ist gemeinsam mit Antibiotikaresistenzen in die Zellen eingebracht worden, um eine Selektion auf Zellen zu ermöglichen, die die gewünschte Kv1.5 cDNA tragen. Als Antibiotika wurden Blasticidin und Hygromycin dem Medium zugesetzt, damit die fremden DNA-Abschnitte erhalten blieben. Die Induktion der heterologen Expression des Kv1.5 erfolgte mit Doxycyclin über Nacht.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH) mit HAM's 12 (PAA Laboratories GmbH) kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurden die CHO-Zellen nach lichtmikroskopischer Kontrolle auf neue Zellkulturflaschen umgesetzt. Nach einem Waschschrift mit PBS (Gibco®) wurden die Zellen mit Trypsin (Biochrom AG) von Zellkulturschalenböden abgelöst.

### **2.4 Primäre Zellkultur atrialer Kardiomyozyten des Schweines**

Für die vorliegende Arbeit wählten wir die „rapid attachment“ Methode mit serumhaltigem Medium <sup>42</sup>. Die Atriumzellen wurden so auf die Kulturschalen verteilt, dass die Kulturschalenböden dicht bedeckt waren, sich die Zellen dabei aber nicht berührten (60-70 % Konfluenz). Die optimale Dichte der Aussaat wurde während der Waschschrift lichtmikroskopisch ermittelt. Die in M199 Medium (Gibco®) aufgenommen frisch isolierten Zellen wurden umgehend in die mit Laminin (Pan-Biotech GmbH) beschichteten Schalen überführt. Die lamininbeschichteten Kulturschalen wurden hierzu bereits am einen Tag zuvor vorbereitet und mit M199 (Gibco®) im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> bereitgestellt. Die großen Petrischalen (58 cm<sup>2</sup>) wurden mit 6 ml, in die kleinen Petrischalen (9,6 cm<sup>2</sup>) mit 1 ml Medium bedeckt. Die

gleiche Menge an Zellsuspension wurde gleichmäßig auf das angewärmte Medium geträufelt. Als Antibiotika gegen eine bakterielle Besiedlung der Kultur wurde dem Medium Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich) zugesetzt.

Für die Kultivierung der Kardiomyozyten und die anschließenden Real-time-Analysen wurden große Petrischalen verwendet. Für „Knockdown“-Versuche mit „small interfering-RNA“ (siRNA) wurden 6-Well Platten verwendet. Zellen für Patch-Clamp Experimente wurden in kleinen Petrischalen kultiviert. Es wurde stets darauf geachtet, dass die Zellen nie ganz trocken lagen. Erschütterungen der Zellen wurden vermieden.

Die Lamininbeschichtung erfolgte 24 h vor Kultivierung der Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. 1 mg Laminin wurde hierfür in 300 ml M199 gelöst. 6 ml der Lamininlösung wurden auf eine Petrischale von 58 cm<sup>2</sup> ausgelegt. Vor der Benetzung der Kulturschalen mit Medium wurde das Laminin komplett abgesaugt. Für eine mit Glassplittern ausgelegte Petrischale von 9,6 cm<sup>2</sup> wurden 2 ml Lamininlösung benötigt.

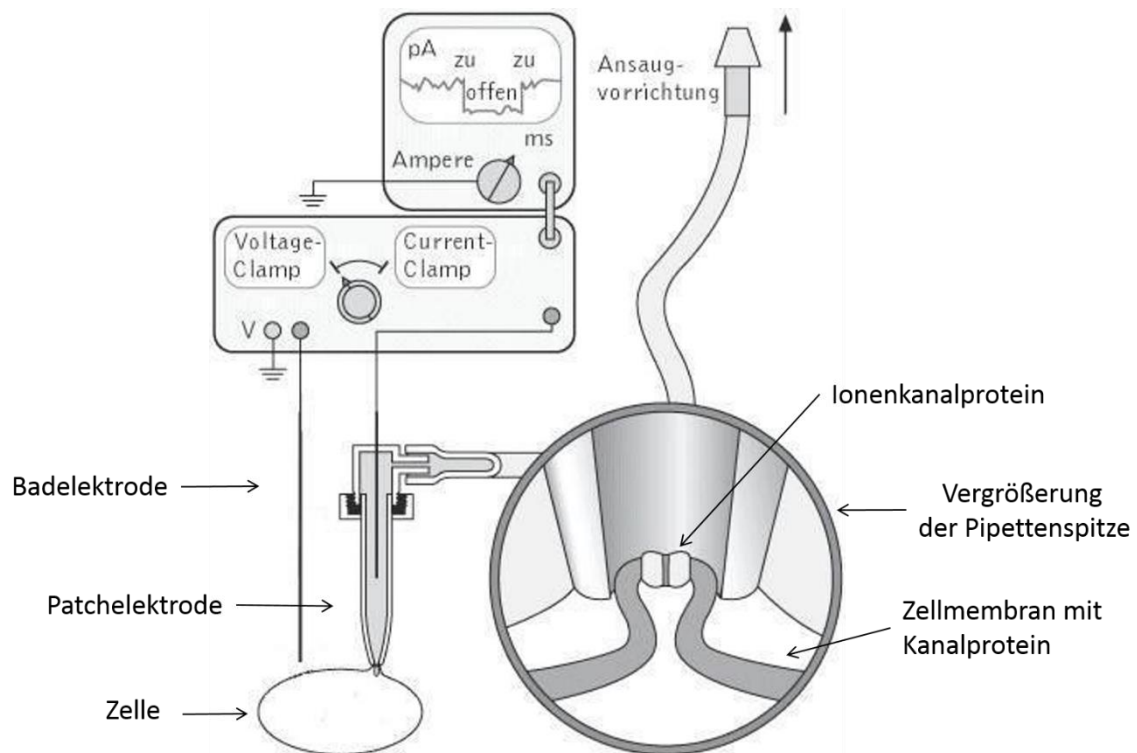
Für die Patch-Clamp Untersuchungen erwies es sich als vorteilhaft, die Zellen auf Glassplitter, welche auf den Böden der Kulturschalen ausgelegt wurden, zu kultivieren. So war es möglich, nach und nach einzelne Glassplitter mit den sich darauf befindenden Kardiomyozyten aus der Kulturschale erst kurz vor der Messung in die Messkammer der Patch-Clamp Apparatur zu überführen, ohne dabei die restlichen Zellen in der Kulturschale durch Erschütterung zu beschädigen. Die Glassplitter wurden aus Deckgläschen gebrochen, autoklaviert und unter sterilen Bedingungen mit der Pinzette in die Petrischalen gelegt. Anschließend wurden sie wie oben beschrieben mit Laminin beschichtet.

### **2.5 Patch-Clamp-Technik**

Mit der Patch-Clamp-Technik wurden Ionenströme und Aktionspotentiale in atrialen Kardiomyozyten des Schweines und die Aktivität heterolog exprimierter Kv1.5 und hKv4.3/KChIP2.2 Ströme in CHO-Zellen aufgezeichnet. Für ihre Forschungsarbeiten an einzelnen Ionenkanälen erhielten Neher und Sakmann 1991 den Nobelpreis für

Medizin <sup>43</sup>. Die Technik ermöglichte erstmals das Erfassen der Aktivität von einzelnen Ionenkanälen in verschiedenen Geweben oder einzelnen Zellen im Bereich von  $10^{-12}$  pA.

### 2.5.1 Prinzip der Patch-Clamp-Technik



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Patch-Clamp-Technik.**

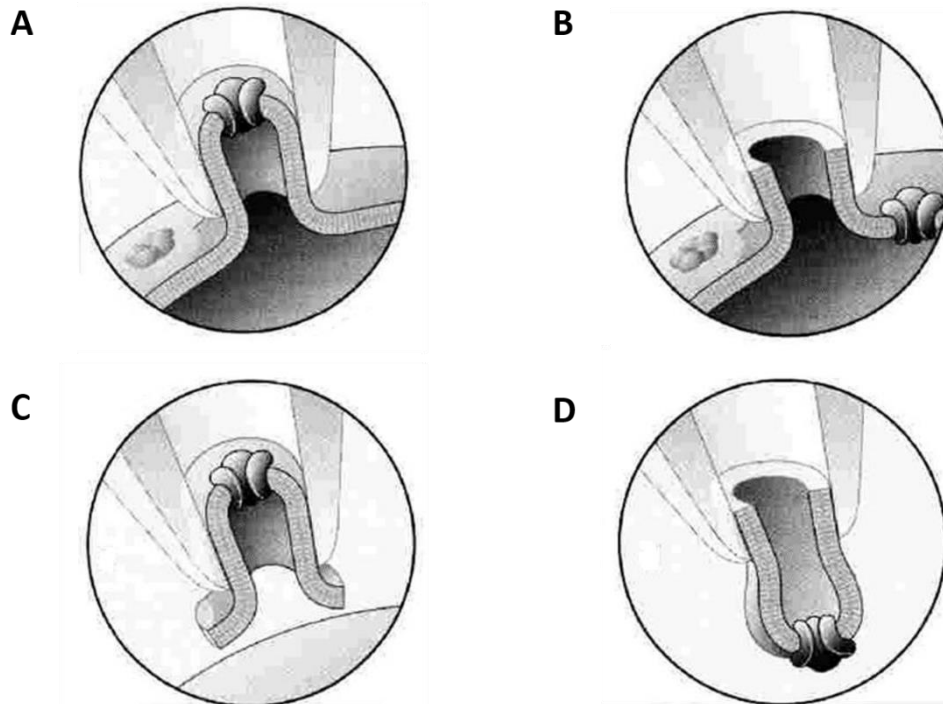
Aufbau einer Patch-Clamp Apparatur. Die Glaspipette hat Kontakt zu der Zelle und isoliert einen Membranfleck („Patch“). Durch die unterschiedliche Ionenverteilung über die Zellmembran entsteht ein elektrisches Potential, das über eine Elektrode in der Pipette gemessen werden kann. Der Widerstand ist wiederum abhängig von der Aktivität der sich in dem „Patch“ befindenden Ionenkanäle. (Abbildung aus [http://www.wissenschaft-online.de/lexika/showpopup.php?lexikon\\_id=11&art\\_id=8703&nummer=740](http://www.wissenschaft-online.de/lexika/showpopup.php?lexikon_id=11&art_id=8703&nummer=740))

Die Durchführung der Patch-Clamp-Technik erfolgt zunächst durch vorsichtiges Aufsetzen einer mit Intrazellulär-Lösung gefüllten Glaskapillare auf die Zellmembran einer intakten Zelle. Die Spitze der Glaskapillare ist auf ca. 1  $\mu\text{m}$  dünn ausgezogen. Unterhalb der Pipettenspitze befindet sich ein Stück Zellmembran – der sogenannte „Patch“. Durch Erzeugung eines leichten Unterdruckes, der am hinteren Ende der



Pipette angelegt wird, entsteht ein enger Kontakt zwischen Zellmembran und Pipette. Zwischen dem Inneren der Pipette und der Außenlösung besteht dadurch ein elektrischer Widerstand von mehreren Giga Ohm, der sogenannte „Gigaseal“ (engl. „to seal“ – abdichten). Mit Herstellung des „Gigaseals“ ist die sogenannte „cell attached“ Konfiguration der Patch-Clamp-Technik erreicht. In die Pipettenlösung ist eine dünne Silberchlorid-Elektrode eingetaucht, die mit einem Vorverstärker verbunden ist, der das Signal an einen elektronischen Verstärker weiterleitet. Mit Hilfe der Elektronik kann eine elektrische Spannung an den Membranfleck angelegt und gleichzeitig der elektrische Strom registriert werden. Befinden sich in dem isolierten Membranfleck ein oder mehrere Kanalproteine, so wird der Strom durch diese einzelne Ionenkanäle gemessen.

Durch Anlegen eines stärkeren Unterdrucks oder einer Applikation von kurzen Spannungspulsen kann der „Patch“ geöffnet werden, während der „Gigaseal“ intakt bleibt. Zwischen dem Inneren der Zelle und dem Inneren der Pipette besteht nun eine Verbindung, während die Pipette weiterhin festen Kontakt zur Zellmembran aufweist. Diese Konfiguration der Patch-Clamp-Technik wird als „whole cell“ Konfiguration bezeichnet und erlaubt das Ableiten von Ionenströmen der gesamten Zellmembran. Da die Pipettenlösung das Innere der Zelle füllt, muss sie in ihrer Zusammensetzung dem Zytosol ähnlich sein. Andererseits ermöglicht dieser Zugang eine klare Definition der ionalen Bestandteile des Zytosols, da das Pipettenvolumen ungleich größer ist als das einer einzelnen Zelle und sich somit die Ionenkonzentrationen in der Zelle und in der Pipette angleichen. Neben der „cell attached“- und „whole cell“-Konfiguration gibt es noch weitere Messkonfigurationen: die „inside out“- und „outside out“-Konfiguration. Da diese in unserer Arbeit nicht angewandt wurden, werden sie nicht näher beschrieben.



**Abbildung 11: 4 mögliche Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik.**

A "on cell" B "whole cell" C "inside out" D "outside in". (Abbildung aus Numberger, M., Draguhn, A. (1996))

## 2.5.2 Durchführung der Messung

Die Patch-Clamp-Messungen wurden in der „whole cell“-Konfiguration durchgeführt<sup>44</sup>. Als Verstärker wurde das Gerät Heka, EPC-9 verwendet. Pipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren gezogen. Nach dem Befüllen mit interner Pipettenlösung (siehe Tabelle 5) wiesen die Pipetten einen Widerstand von 1.5 bis 3.0 M $\Omega$  auf. Die Serienwiderstände betragen kompensiert  $7,24 \pm 1,08$  M $\Omega$  (n = 22 Messungen). Die mittlere Zellkapazität der atrialen Kardiomyozyten des Schweines betrug  $47.6 \pm 1.9$  pF (n = 141). Um die Variabilität der Zellgrößen kontrollieren zu können, wurde die Größe der Ströme in der Einheit „Stromdichte“ (pA / pF) aufgetragen. Offset-Potentiale zwischen Bad- und Pipettenlösung betragen  $-0,03 \pm 1,66$  mV (n = 25 Messungen). Die Pipetten wurden über den Pipettenhalter mit dem Vorverstärker verbunden, der an einem elektrischen Mikromanipulator befestigt war. Die Pipettenlösung entsprach dem Zytosol. Frische Lösungen wurden täglich zubereitet. Zur Durchführung der Experimente wurden ca. 500  $\mu$ l der Zellsuspension in die auf  $36 \pm 0,5$  °C geheizte Perfusionskammer

(Feinmechanik und elektronische Werksstätten von Sanofi-Aventis, Deutschland GmbH) überführt. Zur visuellen Auswahl der Zellen und zur Positionierung der Pipette wurde ein inverses Mikroskop (Zeiss, Axiovert 35) verwendet. Die für die Messungen ausgewählten, atrialen Kardiomyozyten zeigten ihre charakteristische Streifung und waren von stäbchenförmiger Zellform. Zur Inhibierung von  $I_{Ca,L}$  und  $I_{Ks}$  wurden der extrazellulären Tyrode-Lösung  $CdCl_2$  (200  $\mu\text{mol} / \text{l}$ , Sigma) und HMR 1556 (1  $\mu\text{mol} / \text{l}$ , Sanofi-Aventis) hinzugefügt. Ionenströme wurden im „Voltage-clamp“-Modus ausgehen vom einem Haltepotential von -80mV gemessen. Aktionspotentiale wurden im „Current-clamp“-Modus aufgezeichnet.

### 2.5.3 Protokolle zur Messung von Ionenströmen (voltage clamp) oder Aktionspotentialen (current-clamp)

#### Messung des $I_{K,PO}$ in atrialen Kardiomyozyten des Schweines:

**Aktivierung:** Pulssprung in 20 mV Schritten von -80 mV auf +60 mV für 1 s. Pause zwischen den Pulsen von 30 s. **Inaktivierung:** Erster Pulssprung in 20 mV Schritten von -80 mV bis +60 mV für 1 s. Zweiter Pulssprung auf 60 mV für 750 ms. Pause zwischen den Pulsen von 30 s.

**Erholung von der Inaktivierung:** Zwei Pulssprünge von -80 mV auf 60 mV für jeweils 700 ms. Pause zwischen den Pulsen von 1 ms bis 40 s. Pause zwischen den Pulspaaren von 40 s.

**Umkehrpotential atrialer Kardiomyozyten des Schweines:** Puls von -100mV bis -40 mV in 10 mV Schritten über 5 ms. Pause zwischen den Pulsen von 30 s.

**Messung des  $I_{K1}$  atrialer Kardiomyozyten des Schweines:** Pulssprünge von -120mV bis -40 mV in 20 mV Schritten für 300 ms. Pause zwischen den Pulsen von 5 s.

**Messung von Aktionspotentialen im „Current-clamp“-Modus:** Puls über 3-4 ms von 250-1000 pA bei einer Pulsfrequenz von 2 Hz.

**Messung des Stromes in heterolog exprimierenden CHO-hKv1.5 und CHO-hKv4.3/KCHIP2.2 Zellen:** Pulssprung auf 30 mV für 250 ms. Pause zwischen den Pulsen von 10 s.

**Messungen des  $I_{K,PO}$  in atrialen Kardiomyozyten des Schweines mit Kaliumkanalinhibitoren:** Pulssprung auf +60 mV für 1 s. Pause zwischen den Pulsen von 50 s. Die Inhibitoren wurden durch einen Austausch der extrazellulären Flüssigkeit mit Hilfe einer Pumpe auf die untersuchten Zellen gebracht. Nach Erreichen des Äquilibriums erfolgte die Messung der Ionenströme. **AVE0118** wurde den Atriumzellen in aufsteigender Konzentration mit der extrazellulären Lösung zugeführt. Für die Substanzen **PAP-1** und **Heteropodatoxin** wurde eine Konzentration gewählt.

#### 2.5.4 Auswertung der Daten

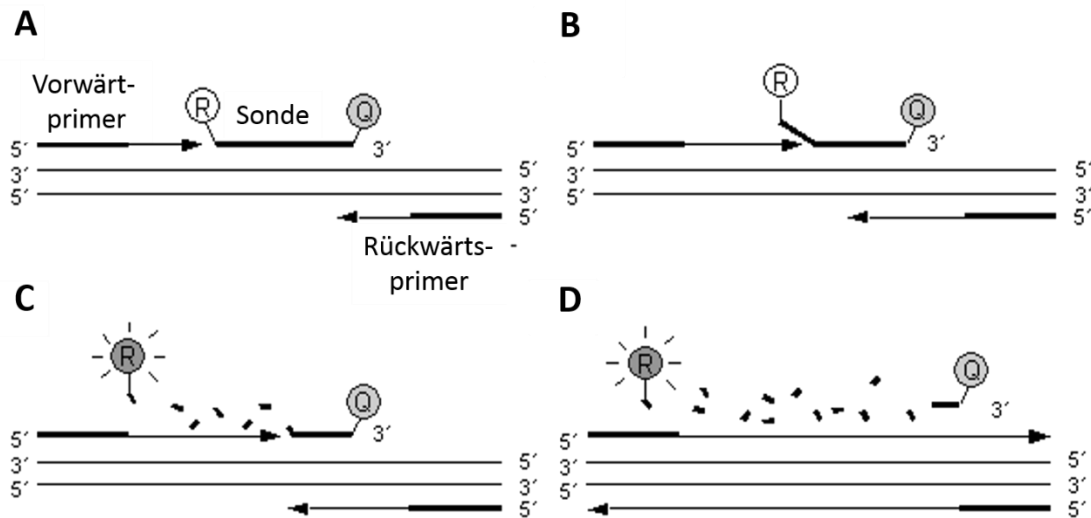
Ausgewertet wurden die Daten mit den Programmen Pulsfit (HEKA), GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.), IGOR (WaveMetrics) und Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, U.S.A.). Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Zum Vergleichen von Variablen wurden T-Tests angewandt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von weniger 0,05 angenommen.

#### 2.6 Real-time-PCR

Mittels der Real-time-PCR wurde die mRNA für die Kanaluntereinheiten Kv1.5, Kv4.3, KCHIP2 und TASK-1 in frisch isolierten Atriumzellen sowie nach 24 und 48 Stunden Kultivationszeit semi-quantitativ gemessen. Der Erfolg des „Knockdown“ des Kv1.5 mit siRNA wurde an transfizierten Zellen nach 24 und 48 Stunden untersucht.

### 2.6.1 Prinzip der Real-time-PCR mit TaqMan-Sonden

Die TaqMan™ PCR basiert auf dem ursprünglichen 5'-Nuclease-Assay und macht sich die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase zunutze. Wie auch bei der PCR hybridisiert die Sonde zunächst fest, an die Zielsequenz des Gens/mRNA. Zum Einsatz kommen spezielle fluorogene Sonden, an deren 5'-Ende ein fluoreszenter Reporter (Donor)-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) sitzt. Das 3'-Ende trägt einen Quencher (Akzeptor)-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) und ist außerdem mit einem Phosphatrest blockiert. Ein Fluoreszenzsignal des Reporters wird in intakten Sonden durch die räumliche Nähe zum Quencher über einen Fluoreszenz-Energietransfer (FRET) unterdrückt. Während der PCR hybridisieren die ausgewählte Sonde und die Primer mit dem komplementären DNA-Strang. In der Extensionsphase trifft die Taq Polymerase auf die fluorogene Sonde, beginnt sie zu verdrängen und baut aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuklease Aktivität die Sonde vom 5'-Ende her beginnend hydrolytisch ab. Hierdurch werden die räumliche Nähe und damit auch der FRET zwischen Reporter und Quencher der Sonde unterbrochen und das Fluoreszenzsignal wird messbar. Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produkts steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an. Nicht 100 %ig bindende Sondenmoleküle werden verdrängt bevor die Exonukleaseaktivität der *Taq* Polymerase aktiviert ist. Dabei kann kein Fluoreszenzsignal freigesetzt werden, da freie, nicht-hybridisierte Sonden nicht hydrolysiert werden. Die Veränderung der Fluoreszenzsignale der verschiedenen Farbstoffe wurde mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detectors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst.



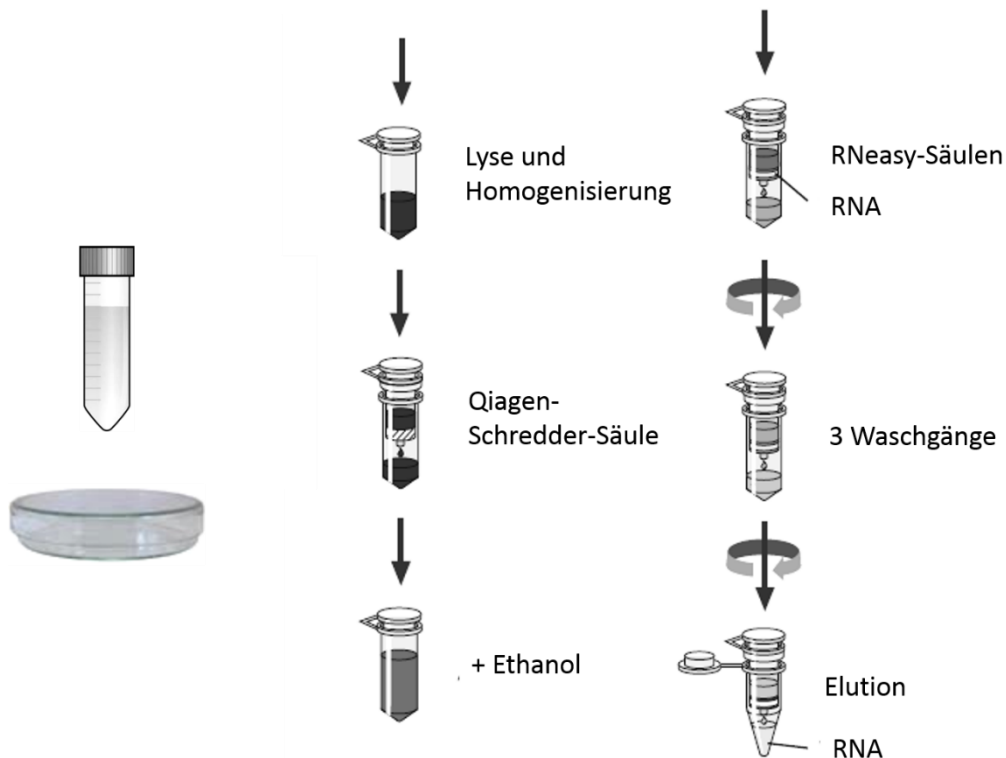
**Abbildung 12: Prinzip der Real-time-PCR mit TaqMan-Sonden.**

**A** Primer-Extension und Hybridisierung der fluorogenen Sonde an die Zielsequenz der zu untersuchenden Probe. **B** In der Extensionsphase hydrolysiert die Taq Polymerase die Sonde vom 5'-Ende her. **C** Hydrolyse der Sonde und räumliche Trennung des „Reporters“ (R) und „Quencher“ (Q). **D** Der Fluoreszenz-Energietransfer (FRET) zwischen „Reporter“ und „Quencher“ wird unterbrochen und das Fluoreszenzsignal kann gemessen werden (Abbildung modifiziert aus der Dissertation von Frau Dipl.-Biol. Kerstin Gorzelnia, „Untersuchung zur quantitativen Genexpression in Primärkulturen humaner Adipocyten am Beispiel ausgewählter Gene des Renin-Angiotensin-Systems“, März 2002).

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

## 2.6.2 mRNA-Isolation

Die mRNA-Isolation wurde unter Verwendung des Qiagen RNeasy Mini Kits gemäß dem Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt (siehe Abbildung 13). Die Proben wurden aus den Zellkulturen nach unterschiedlich langer Kulturdauer, nach Behandlung mit siRNA gegen Kv1.5 und direkt nach Zellisolation gewonnen. Zunächst wurde die Probe unter stark denaturierenden Bedingungen lysiert und homogenisiert. Der Lysispuffer enthielt Guanidium Isothiocyanat und  $\beta$ -Mercaptoethanol, um RNasen zu inaktivieren. In mehreren Waschsritten wurden Kontaminationen entfernt und die RNA nachfolgend mit DEPC-Wasser von der Membran eluiert.



**Abbildung 13: RNA-Isolation.**

Die RNA-Isolation wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen durchgeführt. Nach der Zellyse und Homogenisierung wurde das Zellysat in Ethanol aufgenommen und auf RNeasy-Säulen aufgetragen. Die RNA haftet an der Membran der Säule. Nach mehreren Waschgängen wurde die RNA schließlich mit Wasser eluiert. (Abbildung modifiziert aus RNeasy® Mini Handbook (Qiagen))

600 µl RLT Buffer wurden auf eine große Petrischale (58cm<sup>2</sup>) gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber von den Böden gelöst. Anschließend wurde die Suspension mit einer Pipette gut resuspendiert und in vorgekühlte Eppendorftubes überführt. Das Zelllysate wurde sofort auf Trockeneis und bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt. Zu je 1 ml Buffer RLT wurden 10 µl β-Mercaptoethanol (β-ME) pipettiert.

Zum einem späteren Zeitpunkt wurden die gefrorenen Zelllysate auf Eis aufgetaut und erneut mit der Pipette resuspendiert. Die Zellhomogenisation wurde mittels Scherkraft durch eine Liquorpunktionsnadel mit einem Durchmesser von 0,9 mm durchgeführt. Je 600 µl des Lysates wurden schließlich zur weiteren Homogenisierung auf eine Qiagen-Schredder-Säule gegeben und diese 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert (siehe Abbildung 13). Das Lysat befand sich nun im Eluat und wurde mit 70 % Ethanol aufgefüllt. Durch Auf- und Abpipettieren wurde das Lysat gemischt, bis keine Schlieren mehr vorhanden waren. Die Probe wurde anschließend auf RNeasy-Säulen geladen und 3 mal 15 s bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die RNA befand sich nun auf der Membran der Säulen. Nach dem Waschen der Säulen mit je 700 µl Puffer RW1 wurden die Säulen in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zweimalig mit 500 µl Waschpuffer RPE gewaschen. Der zweite Zentrifugationsschritt betrug 15 s und erfolgte um die Membran zu trocknen. Die Säulen wurden in neuen 1,5 ml-Reaktionsgefäßen platziert und 50 µl DEPC-Wasser auf die Mitte der Membran pipettiert, um die RNA von der Membran zu lösen. Nach einer fünf-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben 15 s bei 14.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Die RNA befand sich nun in dem Eluat und stand für die Real-time-PCR zu Verfügung.

### **2.6.3 Durchführung der Real-time-PCR mittels TaqMan-Sonden**

Die Analyse wurde mit dem TaqMan® Universal PCR Master Mix und dem spezifischem FAM<sup>TM</sup>-markierten Gen Assay durchgeführt. Alle genspezifischen Assays beinhalteten FAM<sup>TM</sup> farbmarkierte TaqMan® MGB-Proben. Die PCR wurde mit dem ABI Prism 7900 (Life Technologies) durchgeführt. Das ribosomale Protein L37a (RPL37a) wurde als



Referenzgen genutzt. Für das ribosomale Protein L37a wurden die folgenden Sequenzen ausgesucht: Referenz „forward primer“: GGCAGTGTGGTTCCTGCAT, Referenz „reverse primer“: 5'-ACAGCGGAAGTGGTATTGTACGT-3'. Die TaqMan® Universal PCR Master Mix Referenzprobe war mit VIC markiert und hatte die Sequenz 5'-CCGCCAGCCACTGTCT-3'. Für die Analyse der Expression wurde die vergleichende Ct-Methode angewandt.

Die Real-time-PCR wurde unter Mithilfe von Christiane Metz-Wiedmann bei Sanofi-Aventis in Frankfurt am Main durchgeführt.

## **2.7 Western-Blot-Analyse**

Der Western-Blot diente der Proteindetektion des Kv1.5 in Atriumzellen direkt nach deren Isolation aus dem Gewebe und nach 24 h in Kultur. Als Positivkontrolle wählten wir induzierbare CHO Kv1.5-Zellen (Flp-In-T-Rex-CHO-Kv1.5, Sanofi-Aventis GmbH). Die Negativkontrollen stellten die parentalen CHO-Zellen und die nicht induzierten CHO Kv1.5 Zellen dar.

### **2.7.1 Prinzip des Western-Blots**

Für die Western-Blot-Analyse werden zunächst die Proteine aus der zu untersuchenden Probe isoliert und meist noch denaturiert. Nach der Proteinbestimmung wird eine bestimmte Menge des Proteingemischs in einer SDS („sodium dodecyl sulfate“)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Größe getrennt. Die Proteine können im Gel mit Coomassie angefärbt werden.

Der Transfer der Proteine von dem Gel auf eine Membran erlaubt die Identifizierung der Proteine. Der Transfer erfolgt durch ein elektrisches Feld. Das Gel wird dazu auf die Trägermembran gelegt und senkrecht zu der Auflagefläche eine Spannung angelegt. Nach einiger Zeit ist das Protein in die Membran gewandert und auf der Oberfläche der Membran fixiert. Die Membran besteht aus Nitrocellulose (NC) oder Polyvinylidendifluorid

(PVDF) und hat eine sehr hohe Proteinbindungskapazität. Die Proteine können direkt mit Ponceau-Rot angefärbt werden.

Das Immunoblotting oder auch Immunprint genannt, erlaubt die Identifizierung der Proteine mit spezifischen Antikörpern. Die Membran wird dazu mit einem Primärantikörper behandelt, der spezifisch mit nur einem der geblotteten Proteine eine Antigen-Antikörper-Reaktion eingeht. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Membran selbst zu verhindern (die sonst jegliche Proteine und damit auch Antikörper binden würden), müssen freie Bindungsstellen der Membran vor der Antikörperbehandlung blockiert werden. Dies kann durch Vorbehandlung mit einer konzentrierten Proteinlösung (z.B. Milchpulver, Rinderserumalbumin) erreicht werden. Bei der nachfolgenden Antikörperbehandlung bindet der Sekundärantikörper nur an sein Antigen des Primärantikörpers, also indirekt an das gesuchte Protein. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgt dann mit Hilfe eines an den Sekundärantikörper gekoppelten Enzyms und nachfolgender enzymatischer Reaktion oder mit Sekundärantikörper, die z.B. einen fluorogenen Farbstoff tragen.

### **2.7.2 Durchführung des Western-Blots**

Die Zellyse wurde nach dem Protokoll von Cell Signaling Technology mit dem RIPA-Buffer durchgeführt. Die Kulturschalen wurden zunächst auf Eis platziert und dann mit eiskaltem PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen. Als nächstes erfolgte die Zellyse mit dem RIPA-Lyse-Buffer. Das Zellysat wurde mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Eppendorftube überführt und für 30 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde das Eppendorftube bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

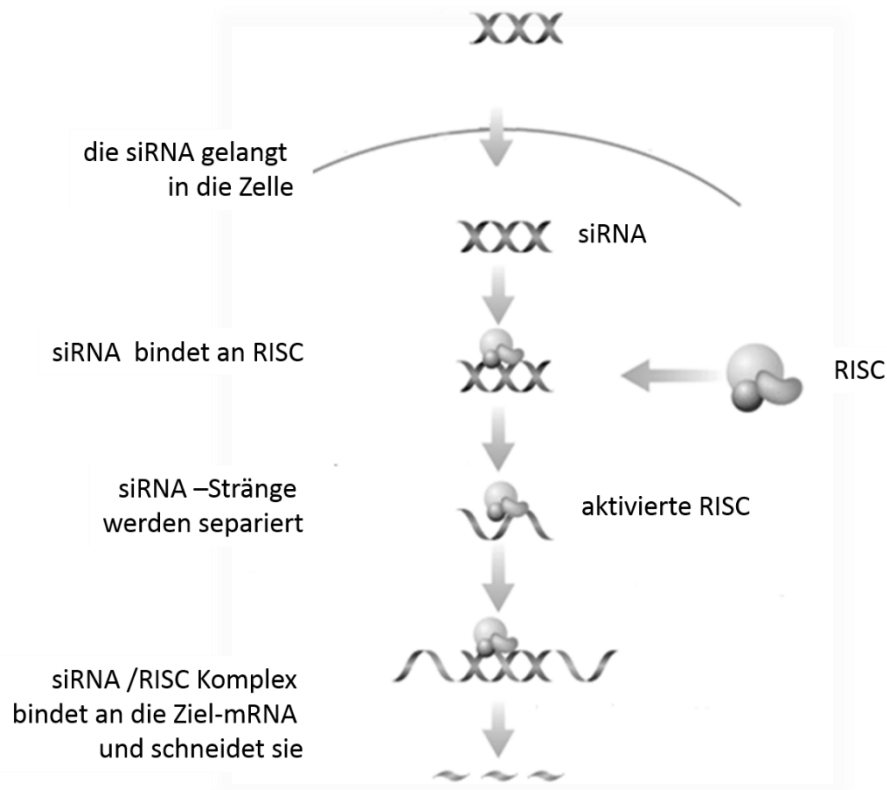
Zu einem späteren Zeitpunkt wurde nach Zentrifugation der Überstand in ein frisches Eppendorftube überführt und das Pellet verworfen. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA Protein Assay Reagenz (Thermo Fisher Scientific Inc.). Als nächstes wurde die Proteindenaturierung vorgenommen. Hierfür wurde die Probe mit SDS-haltigem Probenpuffer (sodium dodecyl sulfate) vermischt und bei  $95-100^{\circ}\text{C}$  gekocht.

Die Proteinbestimmung des Kv1.5-Proteins in atrialen Kardiomyozyten des Schweines und CHO-Zellen wurde durch Western-Blot-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden Gesamtzelllysate hergestellt, die mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wurden. Je Tasche des Polyacrylamidgels wurden 25 µg Protein der atrialen Kardiomyozyten des Schweines aufgetragen und jeweils 10 µg Protein der CHO-Zellen. Das Kv1.5-Protein wurde mit einem Kv1.5-spezifischen Antikörper (Anti-Kv1.5 (Kcna5), alomone labs) in der Verdünnung von 1:1000 markiert und dieser anschließend durch eine enzymatische Chemilumineszenz (ECL) Reaktion detektiert. Die ECL betrug 5 min. Der Erstantikörper wurde aus Hasen gewonnen, der Zeitantikörper ((goat anti rabbit-HRP linked, Jackson/Dianova)) war mit einer „Horse Raddish Peroxidase“ versehen und wurde gewählt um mit der ECL (Enhanced ChemiLuminescence) Detektion zu arbeiten. Es handelt sich bei der Proteinanalyse um das Gesamtprotein der Zelle. Der Antikörper wurde gegen den Kv1.5 in Mäusen entwickelt (Host: rabbit). Das Mäuse-Kv1.5-Protein zeigt dabei eine hohe Homologie zum humanen Kv1.5-Protein (79 / 90). Der humane Kv1.5 (613aa) kann nicht präzise mit der Kv1.5-Schweinesequenz verglichen werden, da nur Teile des porcinen Kanals bisher sequenziert wurden. In der Western-Blot-Analyse aus Zelllysaten des Rattengehirns beschreibt der Hersteller (alomone labs) ein Proteindetektion bei ca. 70 kD. Als Protein-Marker wurde der Prestained Protein Standard Kaleidoscope von der Firma BioRad gewählt.

## **2.8 Small interfering RNA (siRNA) / Knockdown**

In dieser Studie sollte die dem  $I_{K,PO}$  unterliegende Kanaluntereinheit Kv1.5 mittels siRNA herab reguliert werden. Durch synthetisch hergestellte siRNAs kann die Expression von spezifischen Zielgenen verringert werden. Die resultierende Verringerung der Genprodukte (Gen-Knockdown) ermöglicht es, Hinweise auf die physiologische Bedeutung des betreffenden Genes zu erhalten.

### 2.8.1 Prinzip des mRNA-Knockdowns mittels siRNA



**Abbildung 14: Darstellung des Knockdowns mit siRNA.**

Die siRNA wird in die Zelle gebracht. Durch den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) werden die siRNA-Stränge voneinander separiert. Komplementäre mRNA-Stränge zur siRNA werden geschnitten und stehen nicht zu weiterer Proteinexpression zur Verfügung. (Abbildung aus santacruz bioTechnology, inc.)

siRNA ist eine kurze doppelsträngige RNA, deren Sequenz komplementär bzw. auf dem Gegenstrang identisch zur Ziel-mRNA ist. Synthetisch hergestellte siRNAs können mittels Lipidreagenzien in Zellen eingebracht werden. Die mit kationischen Lipiden komplexierte siRNA wird über die Zellmembran aufgenommen. Im Zytoplasma wird die siRNA in den Enzymkomplex RISC („RNA-induced silencing complex“) eingebaut (siehe Abbildung 14). Durch Hybridisierung an die komplementäre Sequenz in der Ziel-mRNA wird eine Endonuclease in RISC aktiviert und schneidet die Ziel-mRNA, was anschließend zur vollständigen Degradierung führt.

## 2.8.2 Durchführung des „Knockdowns“ mit siRNA

Für den „Knockdown“ wurden zwei verschiedene siRNAs gegen den Kv1.5 gewählt (siehe Tabelle 7): Oligo2 und Oligo3. Die siRNA LV2 stellte die Negativkontrolle dar. Die Transfektion wurde in 6-Well Platten durchgeführt.

Die bei -80°C gelagerte siRNA und Dharmafect (Thermo Scientific Inc.) wurden zunächst langsam auf Eis aufgetaut. 1 µl der siRNA wurden in 100µl serumfreies Medium (OPTI-MEM, Invitrogen) aufgenommen. 4 µl des Dharmafects wurden ebenfalls in 100 µl OPTI-MEM aufgenommen und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die beiden Ansätze aus siRNA + OPTI und Dharmafect + OPTI zusammengefügt und 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Vermischen durch Auf- und Abpipettieren wurden je 200 µl des Gemischs vorsichtig auf ein Well der mit Atriumzellen ausgelegten 6-Well Platten geträufelt.

**Tabelle 1: Ansatz für die Transfektion mit siRNA gegen den Kv1.5**

Ansatz für ein Well einer 6-Well Platte	
1 µl siRNA + 100 µl OPTI-MEM	4 µl Dharmafect + 100 µl OPTI-MEM
5 min bei RT stehen lassen	5 min bei RT stehen lassen
Vermischen und 20 min bei RT stehen lassen	
Je 200 µl des Gemischs auf ein Well einer 6-Well Platte mit 800 µl Zellsuspension	

Aufbereitung der Zellkulturen für die Transfektion. Nach der Isolation der nativen Atriumzellen wurden diese auf 6-Well Platten verteilt und zwei Stunden bei 37.5°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Bis zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen auf dem Laminin beschichteten Boden adhärirt. Kurz vor der Transfektion wurde die Zellkultur durch Absaugen von 200 µl Medium an der Oberfläche von Zelltrümmern und toten Zellen gereinigt. Nach einer Inkubationszeit des Transfektionsansatzes von 6 Stunden im Brutschrank bei 37.5°C und 5 % CO<sub>2</sub> folgte der Mediumwechsel mit M199 mit 1 %PenStrep. und 10 %FCS.

Die Probenentnahme für die Real-time-PCR erfolgte 24 und 48 h nach der Transfektion.

Alle verwendeten Materialien wie z.B. Bechergläser, Pinzetten und Schläuche waren mit Ethanol behandelt worden, autoklaviert oder standen als sterile Einmalpräparate zur Verfügung.

Als Positivkontrolle der siRNA Aufnahme in die Zelle verwendete ich Silencer® Cy<sup>TM</sup>3-labeled GAPDH siRNA (human, mouse, rat) Ambion® und Control siRNA (FITC Conjugate)-A von Santa Cruz Biotechnology.

### **3 Materialien und Lösungen**

Siehe Anhang

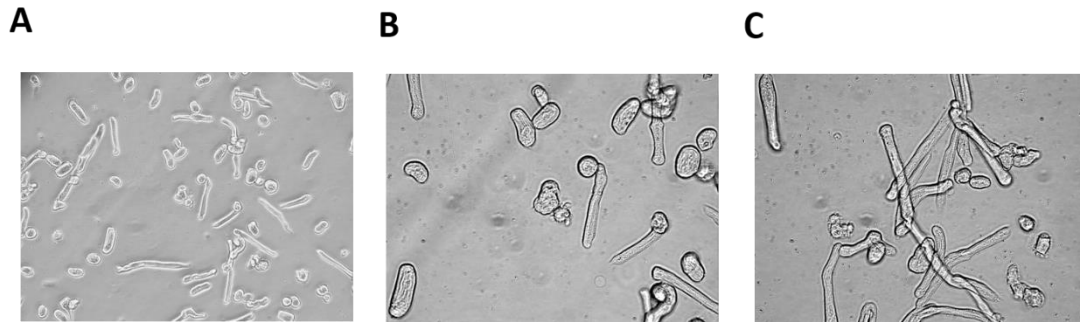
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Morphologische Veränderungen

Die direkt nach Zellisolation im Lichtmikroskop betrachteten Atriumzellen waren stäbchenförmig, von glatter Oberfläche und zeigten die für die Herzzellen charakteristische Querstreifung. Die kultivierten Zellen hatten bereits nach 24 h eine etwas rauere Oberfläche angenommen. Ihre Querstreifung war dabei noch gut zu erkennen, die Zellenden waren meist abgerundet und einige Zellen hatten sich komplett kontrahiert. Die Zellen zeigten sich in der Handhabung insgesamt als empfindlich. Eine Erschütterung, ein zu rascher Medienwechsel, rasche Temperaturveränderung oder unvorsichtiges Aufsetzen der Glaskapillare für die Patch-Clamp-Messungen führte unter anderem zu einer zunehmenden pulsierenden Kontraktion. Nach weiteren Kontraktion kam es schließlich zu einer kompletten Abrundung der Zelle.

In Vorversuchen wurde die ideale Lamininbeschichtung der Kulturschalen ausgewählt. Eine zu starke Adhäsion der Zelle an den Boden ließ die Zellen flach erscheinen und erschwerte die Patch-Clamp Experimente, da es kaum möglich war ein „Gigaseal“ aufzubauen. Zudem konnte lichtmikroskopisch beobachtet werden, dass die Zellen mit der Zeit Kontakt zueinander aufbauten, was ebenso kontraproduktiv war, da jeweils immer nur eine Zelle untersucht werden sollte. Eine zu sparsame Lamininbeschichtung führte hingegen dazu, dass sich die Zellen komplett kontrahierten und sich zu runden pulsierenden Zellen zusammenzogen. Zellen ohne jeglichen Kontakt zum Boden verloren innerhalb kurzer Zeit (Sekunden bis Minuten) komplett ihre charakteristischen morphologischen Eigenschaften.





**Abbildung 15: Mikroskopische Aufnahme kultivierter atrialer Kardiomyozyten.**

In den beiden Vergrößerungen A und B ist die charakteristische Querstreifung der Zellen zu erkennen. Neben den vollkommen abgerundeten Zellen befinden sich solche, die noch fast vollständig ihre ursprüngliche Form behalten haben. Einige Zellen sind von runder Form. Die Aufnahmen wurden nach 24h in Kultur gefertigt.

## 4.2 Signifikante Stromzunahme des $I_{K,PO}$ nach 24h Primärkultur

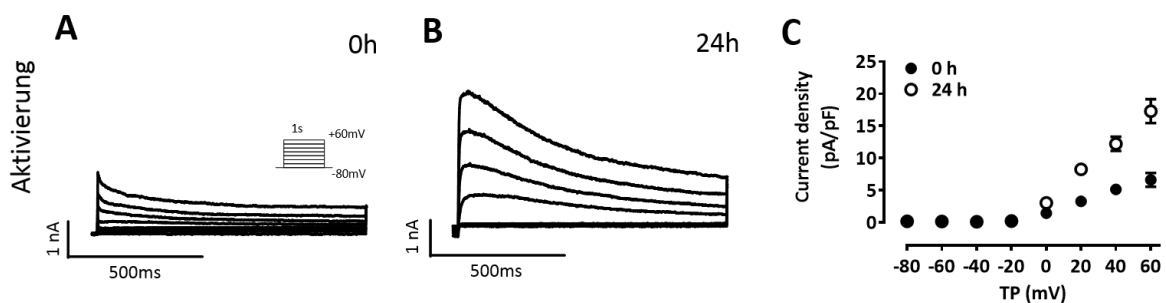
Der  $I_{K,PO}$  wurde in atrialen Kardiomyozyten des Schweines direkt nach Zellisolation (Kontrollen, 0 h) untersucht und in Zellen, die nach gleicher Prozedur der Zellisolation über 24 h unter dem Einfluss der Zellkultur standen (kultivierte Zellen, 24 h). Patch-Clamp-Messungen wurden in der „whole cell“-Konfiguration durchgeführt, das Haltepotential lag bei -80 mV. Zum Zweck der Analyse in dieser Arbeit wurden drei Messpunkte gewählt. Es wurde der Spitzenstrom („peak“-Strom) und den Punkt, an dem der Strom nach seiner Inaktivierung in ein Plateau übergeht („steady state“-Strom) bestimmt. Die Differenz des Spitzenstroms zum Plateau wurde für die vergleichende Auswertung genutzt („peak to steady state“-Strom).

### 4.2.1 Spannungsabhängige Aktivierung des $I_{K,PO}$

Als erstes sollte ermittelt werden bei welchen Spannungsänderungen über die Membran die Kanäle des  $I_{K,PO}$  aktiviert werden konnten. Das Testpotential zur Ermittlung der spannungsabhängigen Aktivierung wurde hierzu durch einen depolarisierenden Rechteckpuls in 20 mV-Schritten bis zu +60 mV generiert (-80 mV; -60 mV...+60 mV). Die

Pulsdauer betrug 1 s (siehe Abschnitt 2.5.3). Zwischen den Applikationen des Testpotentials wurde eine Pause von 30 s eingehalten.

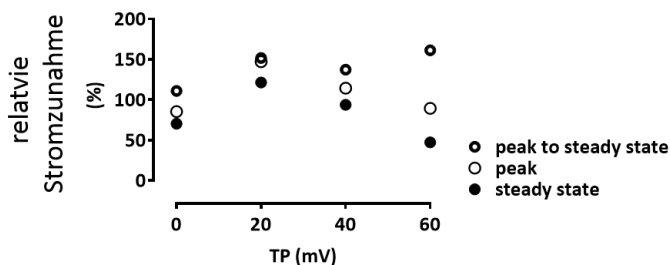
Bei positiven Testpotentialen erschien der Strom rasch aktivierend mit einer langsam inaktivierenden Komponente. Je höher das Testpotential gewählt wurde, desto größer war der Spitzenstrom. Die Messungen zeigten in den kultivierten Zellen nach 24h Primärkultur einen deutlich größeren Spitzenstrom des  $I_{K,PO}$ . Der durchschnittliche Spitzenstrom bei einem Testpotential von +60 mV der Kontrollen betrug  $1136,49 \text{ pA} \pm 83,95 \text{ pA}$ ;  $n = 25$ ). Im Vergleich dazu zeigten die kultivierten Zellen einen durchschnittlichen Spitzenstrom von  $2113,23 \text{ pA} (\pm 206,77 \text{ pA}; n = 40; p < 0,01)$ . Die Auswertung der Stromdichte zeigte ebenso eine Zunahme. Die Stromdichte ergibt sich aus dem Strom bezogen auf die Zellgröße in pF. Die Stromdichte des „peak to steady state“-Stroms bei einem Testpotential von +60 mV der Kontrollen betrug  $6,62 \text{ pA} / \text{pF} (\pm 1,09 \text{ pA} / \text{pF}; n = 25)$  im Vergleich zu  $17,31 \text{ pA} / \text{pF} (\pm 1,88 \text{ pA} / \text{pF}; n = 40)$  in den kultivierten Zellen ( $p < 0,01$ ).



**Abbildung 16: Untersuchung der Aktivierung des  $I_{K,PO}$  unter dem Einfluss der Zellkultur.**

**A** Beispielmessung einer Kontrolle zelle nach 0 h und **B** einer kultivierten Zelle nach 24 h in Kultur. **C** Ausgewertet wurde jeweils der „peak to steady state“-Strom bezogen auf die Zellgröße in pF. Aufgeführt sind auf der x-Achse die jeweiligen Testpotentiale des Rechteckpulses, auf der y-Achse Darstellung der Mittelwerte der „peak to steady state“-Ströme der einzelnen Messungen bezogen auf die Zellgröße. Kontrollen  $n = 25$ , kultivierte Zellen  $n = 40$ . TP = Testpotential.

Beim Vergleich der Zunahme der Stromdichte an den drei Messpunkten des  $I_{K,PO}$  durch die Kultur, fällt auf, dass der „peak to steady state“-Strom am stärksten zunimmt. Bei einem Testpotential von 60 mV ist im Mittel eine Zunahme auf 261 % zu ermitteln, während für den „peak“-Strom eine Zunahme auf 190 % und für den „steady state“-Strom auf 147 % ermittelt wird (Kontrollen  $n = 25$ , kultivierte Zellen  $n = 40$ ). Dies bedeutet, dass der Strom nicht nur insgesamt größer wird, sondern der Spitzenstrom auch relativ größer wird als das Plateau. Anders betrachtet, kann man auch sagen, dass der Spitzenstrom größer wird und die Inaktivierung zunimmt.



**Abbildung 17: Relative Stromzunahme des  $I_{K,PO}$ .**

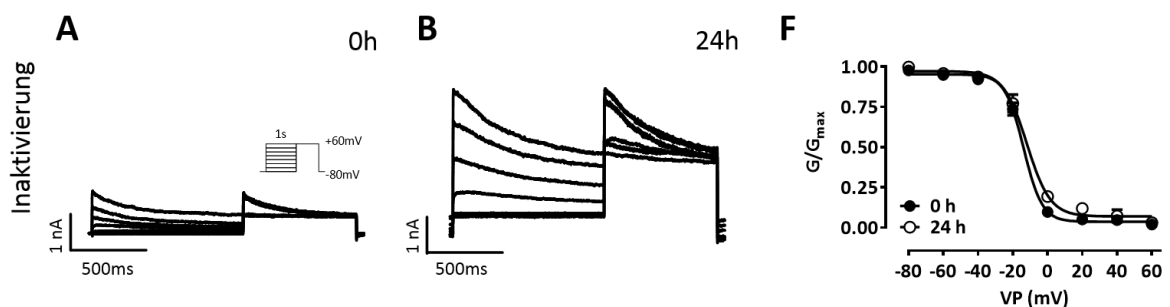
Es wird die relative Stromzunahme des  $I_{K,PO}$  unter Kulturbedingung gezeigt. Aufgeführt sind jeweils der „peak“- , „peak to steady state“- und „steady state“-Strom. An allen Messpunkten des Stromes ist eine signifikante Zunahme des Stromes zu sehen. Bei einem Testpotential (TP) von 60 mV verdoppelt sich der „peak“-Strom während der „peak to steady state“-Strom sich fast verdreifacht. Bei allen TP ist die größte Zunahme im „peak to steady state“-Strom zu sehen.

#### 4.2.2 Spannungsabhängige Inaktivierung des $I_{K,PO}$

Im Weiteren wurde die spannungsabhängige Inaktivierung des  $I_{K,PO}$  charakterisiert (siehe Abschnitt 1.5, Übergang des aktivierten (offenen) den inaktivierten Zustand des Kanals). Spannungsabhängige Kaliumkanäle befinden sich nach einem aktivierten, geöffneten Zustand zunächst in einem inaktivierten Zustand, in welchem eine erneute Aktivierung nicht möglich ist. Die Anzahl der sich im inaktivierten Zustand befindenden Kanäle ist davon abhängig, wie viele Kanäle vorher aktiviert waren. Es kann davon ausgegangen werden, dass die dem  $I_{K,PO}$  unterliegenden Kanäle diese Eigenschaften der

spannungsabhängigen Kaliumkanäle aufweisen. Je positiver die Zellmembran der atrialen Kardiomyozyten des Schweines depolarisiert wurde, desto mehr  $I_{K,PO}$ -Kanäle wurden aktiviert (siehe Abschnitt 4.2.1). Direkt nach einer Depolarisation der Zellmembran müsste sich ein Anteil der  $I_{K,PO}$ -Kanäle im inaktivierten Zustand befinden und ein erneuter depolarisierender Puls dementsprechend weniger Kanäle aktivieren können.

Für die Ermittlung der spannungsabhängigen Inaktivierung wurde dem Testpotential eine direkt vorangehende Spannung, der Vorpuls, appliziert. Der Vorpuls wurde für eine Dauer von einer Sekunde mit variierenden Spannungen von -80 mV bis +60 mV gewählt. Das anschließende Testpotential über 750 ms war mit einer Spannung von +60 mV konstant. Die Pause zwischen den Messungen betrug 30 s (siehe Abschnitt 2.5.3). Die spannungsabhängige Inaktivierung zeigte sich in einer vom Vorpuls abhängigen, reduzierten Antwort des  $I_{K,PO}$  auf das Testpotential. Mit zunehmend positiverem Vorpuls wurde der Anteil der inaktivierten Kanäle größer.



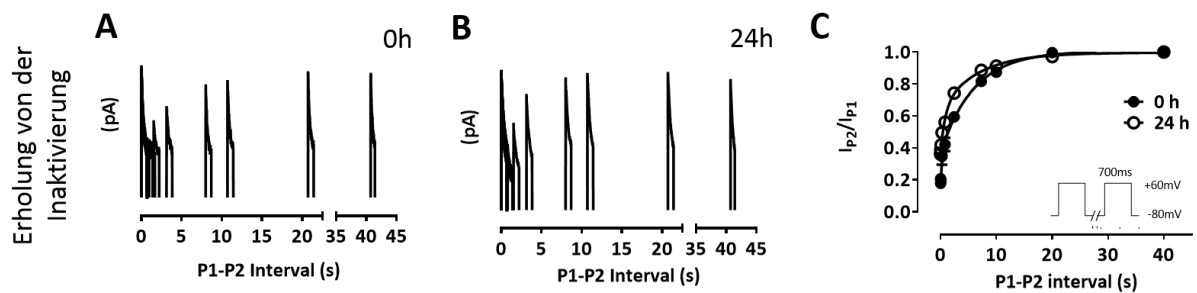
**Abbildung 18: Untersuchung der spannungsabhängigen Inaktivierung des  $I_{K,PO}$ .**

Verglichen wurden die Zellen zum Zeitpunkt 0 h (Kontrollen) und nach 24 h in Kultur. Ausgewertet wurde jeweils der „peak to steady state“-Strom. TP = Testpotential, G = „peak to steady state“-Strom des TPs,  $G_{max}$  = „peak to steady state“-Strom des Vorpulses (VP). Beispiel einzelner Messungen der spannungsabhängigen Inaktivierung des Stromes einer Kontrollzelle (0 h) **A** vs. **B** einer kultivierten Zelle (24 h). **C** zeigt die relative Stromdichte im Verhältnis zur max. Aktivierung des Stroms in Abhängigkeit zum vorangegangenen VP. Aufgeführt sind auf der x-Achse die jeweiligen TP, y-Achse: Darstellung des Quotienten des „peak to steady state“-Stroms des TPs zum „peak to steady state“-Strom des VPs ( $G / G_{max}$ ). Kontrollen (0 h):  $n = 17$ ,  $V_{50} = -13,80$  mV; kultivierte Zellen (24 h)  $n = 5$ .  $V_{50} = -11,80$  mV ( $p = 0,38$ )

Für die Auswertung wurde der „peak to steady state“-Strom des Vorpulses ( $G_{max}$ ) in Relation zum „peak to steady state“-Strom des zugehörigen Testpotentials ( $G$ ) gesetzt. Die nach den jeweiligen Vorpulsen hervorgerufenen Ströme durch das Testpotential wurden zum „peak to steady state“-Strom des  $I_{K,PO}$  bei minimaler Inaktivierung (Vorpuls von -80 mV) normalisiert. Die normalisierten Ströme wurden anschließend gegen die Spannung des Vorpulses aufgetragen und mittels Boltzmann-Funktion analysiert. Bei einem Vorpuls mit der Spannung von -20 mV waren 26 % ( $\pm 0,04$  mV;  $n = 17$ ) der für den  $I_{K,PO}$  verantwortlichen Kanäle in den Kontrollzellen und 22 % ( $\pm 0,06$  %;  $n = 5$ ) derer in den kultivierten Zellen zum Zeitpunkt der Applikation des Testpotentials inaktiviert. Je positiver der Vorpuls, desto mehr Kanäle befanden sich bei Applikation des Testpotentials im inaktivierten Zustand. Unter dem Einfluss der Zellkultur zeigte sich hierbei keine signifikante Änderung der spannungsabhängigen Inaktivierung des  $I_{K,PO}$ . Der  $V_{50}$  inact. der Kontrollen betrug im Mittel -13,80 mV vs. -11,90 mV in kultivierten Zellen ( $p = 0,38$ ).  $V_{50}$  inact. benennt die Spannung des Vorpulses bei dem 50 % der Kanäle inaktiviert sind. Bei einem Vorpuls von +60 mV war ein Maximum der Kanäle des  $I_{K,PO}$  inaktiviert.

### 4.2.3 Erholung von der Inaktivierung des $I_{K,PO}$

Als nächstes sollte untersucht werden, wie lange der Strom braucht, um sich von seinem inaktivierten Zustand zu erholen (siehe Abschnitt 1.5.2, Übergang vom inaktivierten in den geschlossen (aktivierbaren) Zustand („Recovery“)). Nach der Inaktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle vergeht eine gewisse Zeit, in welcher der Kanal aus dem inaktiviertem in einen aktivierbaren Zustand überzugehen. Je mehr Zeit nach der Inaktivierung vergeht, desto mehr Kanäle müssten sich wieder in dem aktivierbaren Zustand befinden. Es konnte gezeigt werden, dass direkt nach Depolarisation ein Teil der  $I_{K,PO}$ -Kanäle inaktiviert war (siehe Abschnitt 4.2.2). Würde man einen zweiten Testpuls nach einer Pause applizieren, in der die Kanäle wieder in einen aktivierbaren Zustand übergehen können, müssten mit Verlängerung dieser Pause wieder mehr Kanäle durch den zweiten Testpuls aktiviert werden.



**Abbildung 19: Erholung von der Inaktivierung des  $I_{K,PO}$ .**

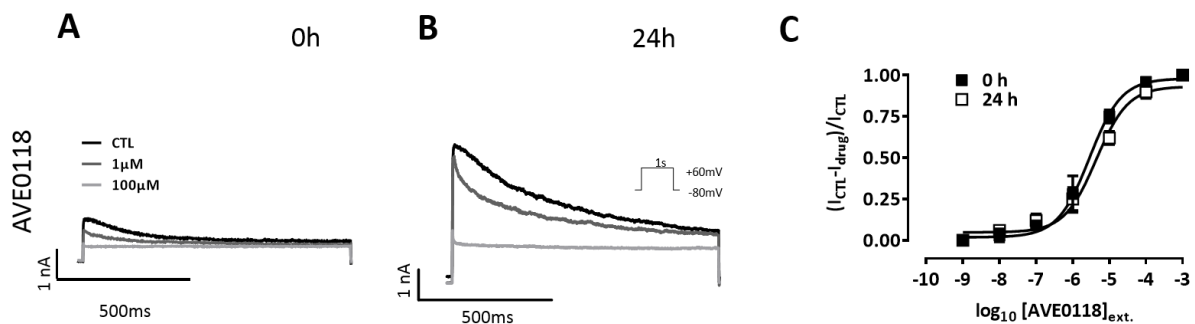
Für die Ermittlung der Erholung von der Inaktivierung wurden gekoppelte, auf +60 mV depolarisierende Pulse mit einer jeweiligen Länge von 700 ms appliziert. Die Zeitintervalle zwischen den einzelnen Pulsen wurden von 1 ms bis auf 40 s verlängert. Nach einem Zeitintervall (einer Pause) von 40 s war in beiden Gruppen bei Applikation des zweiten Pulses wieder ein max. Strom auslösbar. **A** Beispiel einer Messung einer Kontrollzelle (0 h). **B** Beispiel einer Messung einer kultivierten Zelle (24 h). **C** Analyse der Erholung der Inaktivierung der beiden Gruppen mittels biexponentieller Funktion. Aufgeführt ist jeweils die Länge des Zeitintervalls zwischen den beiden Testpulsen (x-Achse) zu dem Quotienten des „peak to steady state“-Stroms von P2 zu P1. Kontrollen (0 h):  $n = 7$ ; kultivierte Zellen (24 h)  $n = 10$ ; Verglichen wurde die langsame und schnelle Zeitkonstante ( $\tau_s$ :  $p = 0,98$ ;  $\tau_f$ :  $p = 0,96$ ).

Zur Ermittlung dieser Zeitabhängigkeit wurden in unterschiedlich langen Zeitabständen zwei Testpulse (P1 und P2) appliziert (siehe Abschnitt 2.5.4). Es zeigte sich, dass es nach einer Zeit von 40 s wieder zu einer vollständigen Aktivierung des Stroms kam, sprich alle Kanäle während der Pause wieder in den aktivierbaren Zustand übergegangen waren. Zur vergleichenden Analyse der beiden Gruppen wurde der während P2 entstehende Strom zu dem bei P1 entstehende Strom normalisiert und als Funktion des P1-P2 Intervalls aufgetragen. Die Analyse der Zeitkonstanten  $\tau$ , die mittels biexponentieller Funktion ermittelt wurde, ergab in der Kontrollgruppe im Mittel eine schnelle Zeitkonstante  $\tau_f$  von 0,26 s sowie eine langsamere Zeitkonstante  $\tau_s$  von 6,10 s ( $n = 7$ ). In den kultivierten Zellen ergab sich im Mittel ein  $\tau_f$  von 0,83 s und  $\tau_s$  von 6,63 s ( $n = 10$ ). Die Ergebnisse der vergleichenden Gruppen zeigten dabei keinen signifikanten Unterschied ( $\tau_s$ :  $p = 0,98$ ;  $\tau_f$ :  $p = 0,96$ ).

### 4.3 Unveränderte Wirkung verschiedener Pharmaka auf den $I_{K,PO}$

Nachdem sich gezeigt hatte, dass der  $I_{K,PO}$  in den kultivierten Zellen deutlich zunimmt ohne dabei wesentlich die Kinetik zu verändern, sollte die Wirkung von Pharmaka auf  $I_{K,PO}$  unter dem Einfluss der Zellkultur untersucht werden. Um eine mögliche, unterschiedlich starke Beteiligung des Kv1.5 und Kv4.3 an dem  $I_{K,PO}$  in den beiden Gruppen zu untersuchen, wurden Substanzen getestet, die als Blocker dieser Kanäle bereits beschrieben wurden.

#### 4.3.1 AVE0118



**Abbildung 20: Wirkung der Substanz AVE0118 auf den  $I_{K,PO}$ .**

Beispielmessungen mit AVE0118 in verschiedenen Konzentrationen in **A** Kontrollzellen (0 h) und in **B** kultivierte Zellen (24 h) **C** zeigt den fraktionellen Block von AVE0118, ausgewertet wurde hier der „peak to steady state“-Strom. Kontrollen (0 h):  $n = 6$ ,  $IC_{50} 2,87 \pm 0,12 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Kultivierte Zellen (24 h):  $n = 9$ ,  $4,41 \pm 0,12 \mu\text{mol l}^{-1}$

Nach Stabilisierung der Stromamplitude unter Kontrollbedingungen in pharmakafreier Extrazellulärlösung wurden aufsteigende Konzentrationen der zu testenden Substanz appliziert und jeweils abgewartet, bis der inhibitorische Effekt einen stabilen Zustand erreicht hatte. Hiernach wurde die bei jeder Konzentration erfolgte relative Inhibition („fractional bloc“, FB) berechnet ( $FB = (I_{CTL} - I_{drug}) / I_{CTL}$ ), wobei  $I_{CTL}$  den Strom unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmaka) darstellt und  $I_{drug}$  den Strom bei Applikation der jeweiligen Konzentration des applizierten Pharmakons. Zur Analyse wurde der jeweilige

FB über die angewandte Konzentration aufgetragen und mittels Hill-Funktion [ $\log(Y / 1 - Y) = h \cdot \log[S] - \log K_d$ ] analysiert. Dabei steht  $h$  für den Hill-Koeffizienten,  $K_d$  für die Dissoziationskonstante,  $Y$  für die Sättigung,  $Y / 1 - Y$  für den Sättigungsanteil. Hieraus konnten die Konzentrationen mit halbmaximaler Inhibition ( $IC_{50} = K_d$ ) berechnet werden. Die Substanzen Heteropodatoxin und PAP-1 wurde jeweils in nur einer Konzentration getestet.

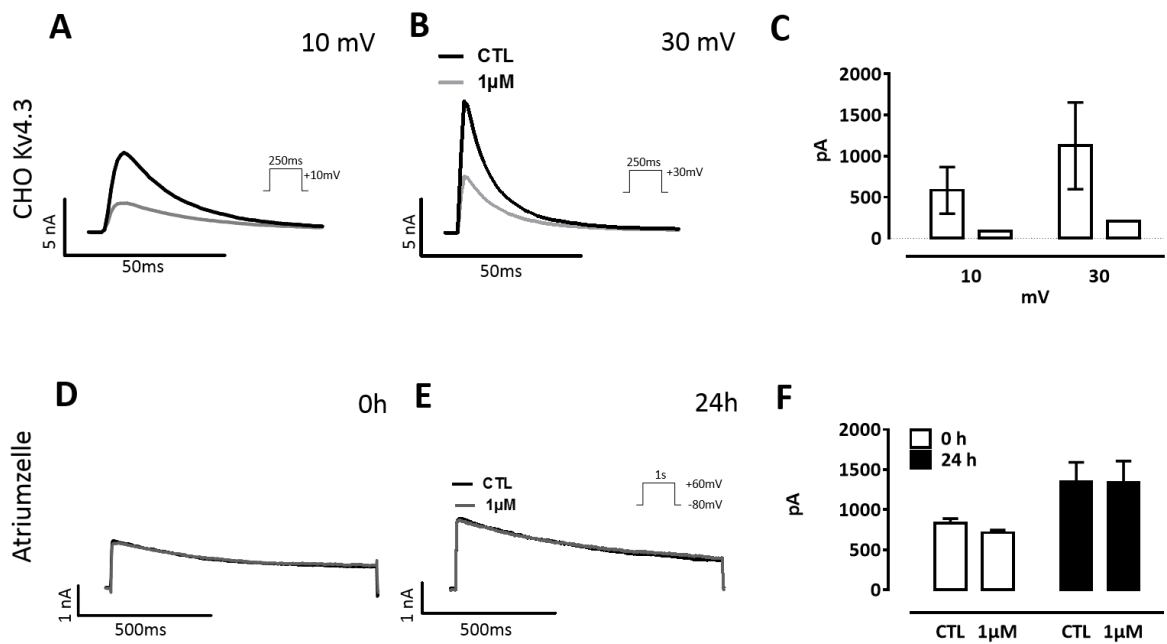
Die vorhof-selektive Substanz AVE0118 wurde als Kv1.5-Blocker verwendet (siehe auch Abschnitt 1.7 und 3.2.3). Sie blockiert heterolog exprimierte Kv1.5 Untereinheiten mit einer  $IC_{50}$  von  $1,1 \pm 0,2 \mu\text{mol l}^{-1}$  <sup>32</sup>. Die Substanz wurde in unserer Arbeit in Konzentrationen von  $0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$  bis  $100 \mu\text{mol l}^{-1}$  angewandt. Es fand sich eine Inhibition des Stromes in den Kontrollzellen mit einer  $IC_{50}$  von  $2,87 \pm 0,12 \mu\text{mol l}^{-1}$  ( $n = 6$ ) und in den kultivierten Zellen von  $4,41 \pm 0,12 \mu\text{mol l}^{-1}$  ( $n = 9$ ). Entsprechend besteht in Kontrollzellen und kultivierten Zellen eine annähernd gleiche Wirkung der Substanz AVE0118 auf den  $I_{K,PO}$ .

### 4.3.2 Heteropodatoxin

Um Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von Kv4.x Untereinheiten am dem  $I_{K,PO}$  zu erlangen, wurde die Substanz Heteropodatoxin (HpTX) verwendet, die als selektiver Blocker für Kv4.x-Kanäle beschrieben wird (siehe Abschnitt 3.2.4). HpTX wurde in Konzentrationen von  $1 \mu\text{M}$  auf die Kardiomyozyten appliziert. Das Ergebnis zeigte eine fehlende Hemmung des Stroms in Kontrollzellen sowie in den kultivierten Zellen. Dies lässt darauf schließen, dass weder der  $I_{K,PO}$  der Kontrollen noch der  $I_{K,PO}$  in kultivierten Zellen eine wesentliche Komponente eines Kv4.x tragen. Der „peak to steady state“-Strom der Kontrollen betrug bei einem Testpotential von  $+60 \text{ mV}$   $831,74 \text{ pA}$  ( $\pm 56,4 \text{ pA}$ ;  $n = 2$ ) im Vergleich zu  $711,19 \text{ pA}$  ( $\pm 34,77 \text{ pA}$ ;  $n = 2$ ) nach der Applikation von  $1 \mu\text{M}$  HpTX ( $p = 0,15$ ). In den kultivierten Zellen wurde ein „peak to steady state“-Strom von  $1344,50 \text{ pA}$  ( $\pm 246,44 \text{ pA}$ ;  $n = 7$ ) vs.  $1342,76 \text{ pA}$  ( $\pm 263,74 \text{ pA}$ ;  $n = 7$ ) gemessen ( $p = 0,67$ ). Experimente mit CHO hKv4.3 Zellen bestätigten, dass die Substanz Heteropodatoxin ein



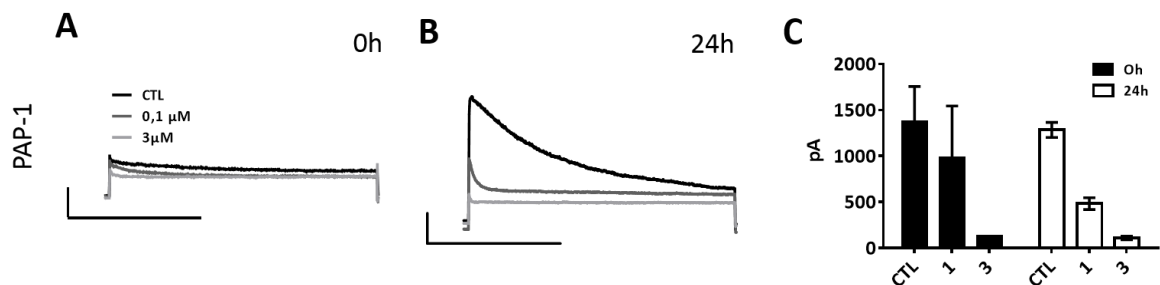
Blocker des hKv4.3 ist (siehe Abbildung 21). Die Substanz wurde auch hier in der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  angewandt. Das Ergebnis zeigte zudem, dass Heteropodatoxin bei einer Spannung von +30 mV einen größeren fraktionellen Block hervorruft als bei einer Spannung mit +10 mV.



**Abbildung 21: Testung der Substanz Heteropodatoxin (HpTX).**

Die Substanz wurde an **A-C** Kv4.3 Kanäle in CHO-Zellen und **D-F** atrialen Kardiomyozyten des Schweines unter dem Einfluss der Zellkultur getestet. Inhibition des Kv4.3 mit 1  $\mu\text{M}$  HpTX bei **A** 10 mV und **B** 30 mV nach heterologer Expression von Kv4.3 in CHO-Zellen. Die Messung wurde bei einem Puls von 250 ms bei 10 mV und 30 mV durchgeführt. **C** Darstellung des schematischen Blocks des Toxins. Auf der linken Seite ist jeweils der „peak“-Strom ohne HpTX dargestellt, auf der rechten Seite der „peak“-Strom nach Zugabe der Blockers. Beispielmessung unter der Applikation 1  $\mu\text{M}$  HpTX an **D** Kontrollzellen (0 h) und **E** kultivierten Zellen (24 h). **F** Aufzeichnung des „peak to steady“-Stroms mit und ohne die Wirkung von Heteropodatoxin. Kontrollen (0 h):  $n = 2$  ( $p = 0,15$ ); Kultivierte Zellen (24 h):  $n = 7$  ( $p = 0,67$ ).

### 4.3.3 5-(4-Phenoxybutoxy)Psoralen



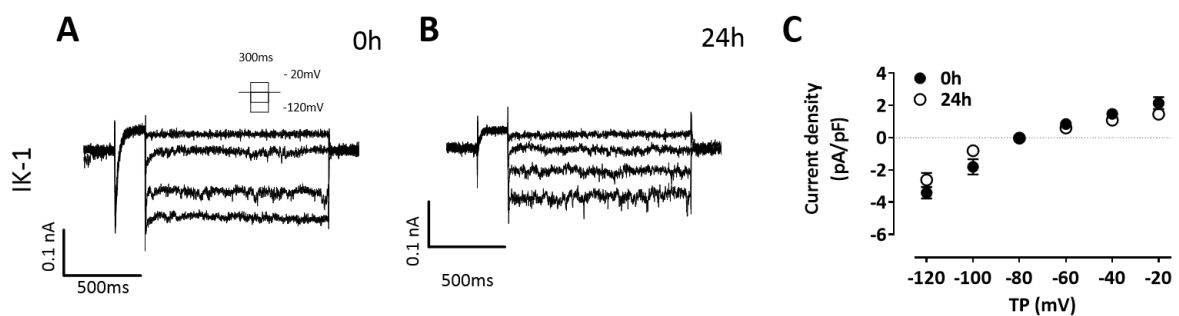
**Abbildung 22: Untersuchung der Substanz 5-(4-Phenoxybutoxy)Psoralen (PAP1)**

Die Abbildung zeigt die Hemmung von PAP1 an **A** Kontrollzellen (0 h) und **B** kultivierten Zellen (24 h). Das Testpotential betrug +60mV über 1 s. Getestet wurde PAP1 in der Konzentrationen von 1 μM. **C** zeigt den fraktionelle Block von PAP1 an Kontrollzellen (schwarz) und kultivierten Zellen (weiß). CTL steht jeweils für die Kontrollmessung ohne Substanz. Ausgewertet wurde der „peak to steady state“-Strom. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Verhalten auf die Substanz PAP1 in Kontrollzellen und kultivierten Zellen festgestellt werden ( $p = 0,13$ ). Kontrollen (0 h):  $n = 3$ ; Kultivierte Zellen (24 h):  $n = 6$ .

5-(4-phenoxybutoxy)psoralen (PAP1) wird als Blocker spannungsabhängiger Kaliumkanäle beschrieben (siehe Abschnitt 3.2.5). Es zeigt eine dosisabhängige Wirkung auf Kv1.x-Kanälen und Kv4.x-Kanäle. PAP1 wurde in der Konzentration von 1 μM als Kv1.5-Blocker an den atrialen Kardiomyozyten des Schweines getestet. Hier zeigte sich in den Kontrollzellen eine Inhibition des  $I_{K,PO}$  auf 66 % ( $\pm 15\%$ ;  $n = 3$ ) im Vergleich zu einer Inhibition in den kultivierten Zellen auf 36 % ( $\pm 7\%$ ;  $n = 6$ ). Es konnte dabei kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0,13$ ). Dies spricht für eine vergleichbare Wirkung der Substanz PAP1 auf den  $I_{K,PO}$  in den Kontrollzellen sowie in den kultivierten Zellen.

#### 4.4 Keine Veränderung des $I_{K1}$

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob sich neben dem  $I_{K,PO}$  auch noch andere Ströme unter dem Einfluss der Kultur änderten. Wir wählten exemplarisch den  $I_{K1}$  („inward rectifier“), welcher einen bekannten Kaliumkanal in atrialen Kardiomyozyten des Schweines darstellt. Der  $I_{K1}$  trägt zur Stabilisierung des Ruhemembranpotentials bei, indem es bei depolarisierenden Veränderungen repolarisierende Ströme und anders herum hervorruft.

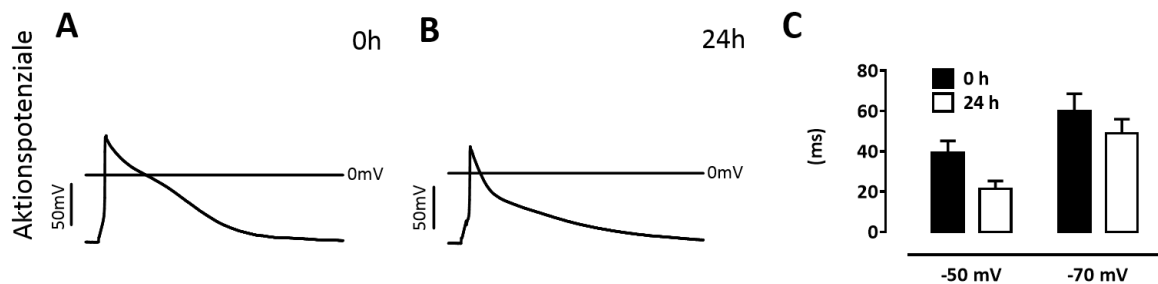


**Abbildung 23: Messung des  $I_{K1}$ .**

Beispielmessung des  $I_{K1}$  in **A** Kontrollzellen (0 h) und **B** kultivierten Zellen (24 h). **C** Aufzeichnung der Stromdichte zum jeweiligen Testpotential (TP). Gemessen wurden die „steady state“-Ströme. Die Auswertung zeigte dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden zu vergleichenden Gruppen. Kontrollen (0 h): n = 47; Kultivierte Zellen (24 h): n = 23

Zur Messung des  $I_{K1}$  wurden vom Ruhemembranpotential ausgehend depolarisierende Rechteckpulse in 20 mV-Schritten von -120 mV bis -60 mV generiert. Das Ruhemembranpotential wurde bei einer Spannung von -80 mV gehalten. Zwischen den Applikationen des Testpotentials wurde eine Pause von 5 s eingehalten. Für die Analyse wurde jeweils der durch das Testpotential hervorgerufenen „steady state“-Strom vom Ruhemembranpotential abgezogen. Die Auswertung zeigte dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden zu vergleichenden Gruppen.

## 4.5 Keine Veränderung des Aktionspotentials

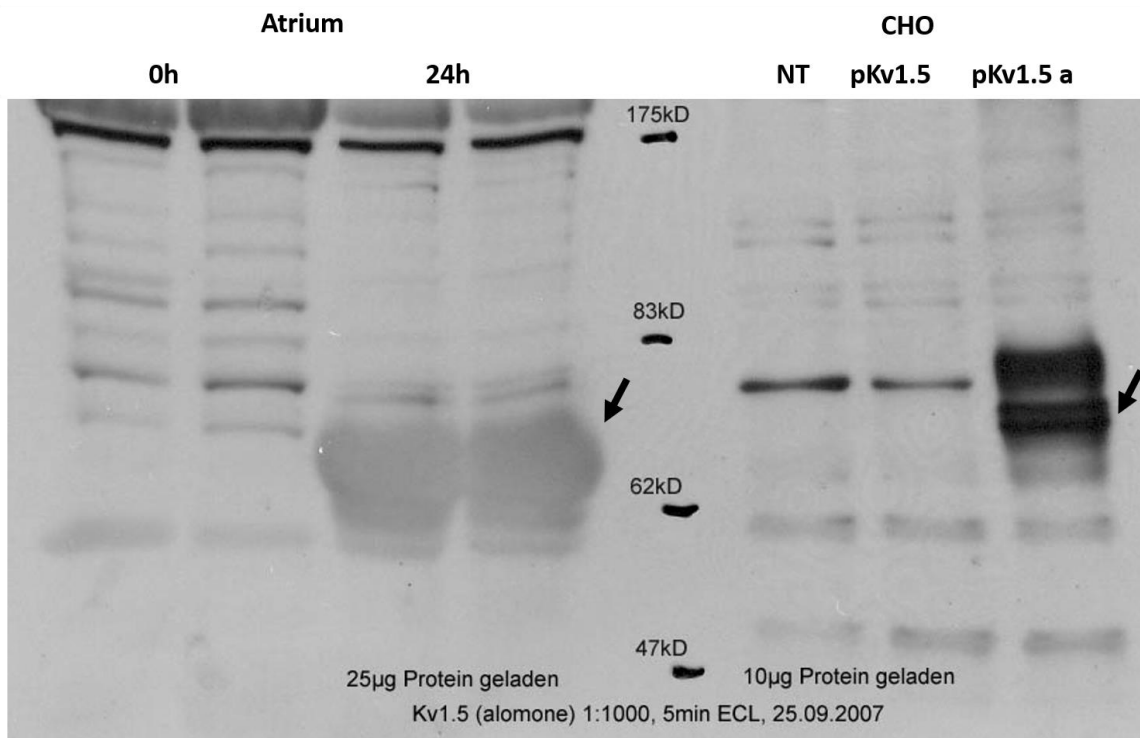


**Abbildung 24: Darstellung von Aktionspotentialen.**

Beispiele von Aktionspotentialen bei einer Stimulation mit 2 Hz an **A** Kontrollzellen (0 h) und **B** kultivierten Zellen (24 h). Die horizontale Markierung liegt bei 0mV. **C** Auswertung der Aktionspotentiale. Auf der x-Achse ist die jeweilige Spannung in mV (-50 und -70 mV) aufgeführt, auf der y-Achse die dazugehörige Aktionspotentialdauer (APD) in ms bei entsprechender Spannung.

Um die elektrophysiologische Rolle des  $I_{K,PO}$  in der Repolarisation des atrialen Aktionspotentials zu untersuchen, nahmen wir einzelne Aktionspotentiale der isolierten atrialen Kardiomyozyten des Schweines im „current-clamp“-Modus auf. Zum Auslösen des Aktionspotentials wurden die Zellen zunächst depolarisiert. Bei frisch isolierten Zellen konnten Aktionspotentiale im Mittel bei einem Strompuls von -100,83 pA ( $\pm 19,64$  pA; n=12) ausgelöst werden, kultivierte Zellen mussten zum Auslösen eines Aktionspotentials auf bis -161,25 pA ( $\pm 29,12$  pA; n = 12) ge-„clamp“ werden (n=12). Abbildung 24 zeigt die bei 2 Hz erhaltenen Aktionspotentiale. Ausgewertet wurden jeweils die Aktionspotentialdauer (APD) bei -50 mV und -70 mV. In den Kontrollen ergab sich hierbei eine APD von 59,96 ms ( $\pm 8,66$  ms; n = 12) bei -70 mV vs. 48,89 ms ( $\pm 7,04$  ms; n = 12) in kultivierten Zellen bei gleicher Spannung. Die Kultivierung der Atriumzellen hat keinen signifikant messbaren Einfluss auf die APD (p = 0,31).

## 4.6 Zunahme des Kv1.5-Proteins



**Abbildung 25: Proteinanalysen des Kv1.5 in Schweineatriumzellen**

Auf der linken Seite des Western-Blots befindet sich im Doppelansatz die Proteinanalyse der Kardiomyozyten direkt nach Zellisolation (0 h), rechts daneben das Zelllysate nach einem Tag in Kultur (24 h). In der Mitte befindet sich der Proteinmarkers. Auf der rechten Seite sind die Proteinanalysen der Wildtyp-CHO und nicht induzierte CHO-Kv1.5 Zellen, ganz rechts die induzierte CHO-Kv1.5 Zellen aufgetragen. Die Detektion des Proteins erfolgte mit einem Primärantikörper, der gegen den Mäuse-Kv1.5 entwickelt wurde. Der Sekundärantikörper war mit einer Peroxidase markiert, mit der die Enzymreaktion durchgeführt wurde. Der Schwein-Kv1.5 liegt bei etwa 66 kD. In den kultivierten Kardiomyozyten ist eine deutlich Signalzunahme bei etwa 70 kD zu sehen. Dies spricht für eine Zunahme des Schwein-Kv1.5.

Abbildung 25 zeigt die Proteinanalyse mit einem Antikörper gegen Kv1.5. Neben der Proteinanalyse der atrialen Kardiomyozyten des Schweins direkt nach Zellisolation und nach 24 Stunden in Kultur wurden Kv1.5 exprimierende CHO-Zelllysate als Positivkontrolle auf den Western-Blot aufgetragen. Auf der rechten Seite des Western-Blots sind von innen nach außen die Zelllysate folgender CHO-Zellen aufgetragen: Wildtyp-CHO-Zelle, nicht induzierte Flp-In-T-Rex-CHO-Kv1.5 Zelllinie und induzierte Flp-In-T-Rex-CHO-Kv1.5 Zelllinie. Das Schwein-Kv1.5-Protein war nur in den induzierten

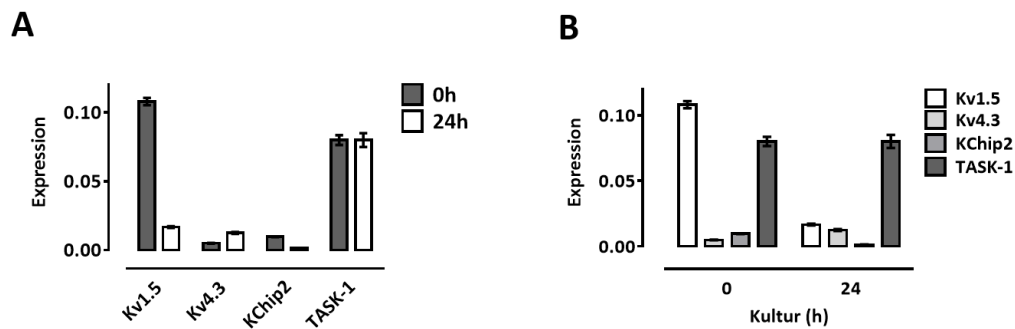
Flp-In-T-Rex-CHO-Kv1.5 Zellen zu erwarten, da nur diese Zelllinie das Schweine-Kv1.5-Protein exprimiert. Auf der linken Seite des Western-Blots sind im Doppelansatz die Zelllysate der atrialen Kardiomyozyten direkt nach Zellisolation (0 h) und nach 24 Stunden in Kultur (24 h) aufgetragen. In der Mitte befindet sich der Proteinmarker.

Der gegen den Kv1.5 gerichtete Antikörper zeigte im Zelllysate der induzierten Flp-In-T-Rex-CHO-Kv1.5 Zelllinie ein Doppelsignal bei ca. 70 Kd und 75 kd. Auch in den parentalen und nicht induzierten CHO-Zellen zeigt sich ein dezentes Signal bei ca. 75 Kd. Betrachtet man die Proteinanalyse der atrialen Kardiomyozyten des Schweines, so fällt eine massive Signalzunahme bei ca. 70 kd in den kultivierten Zellen nach 24 h im Vergleich zu den Kontrollzellen (0 h) auf. Das Signal ist sehr stark, so dass das Signal „nach unten gedrückt“ wird. Das Molekulargewicht des Schweine-Kv1.5 liegt bei etwa 66 kd (entsprechend ~550 Aminosäuren) und befindet sich damit ungefähr auf der Höhe des detektierten Proteins. Dies spricht für eine massive Zunahme des Kv1.5 unter dem Einfluss der Zellkultur in den atrialen Kardiomyozyten des Schweines.

#### **4.7 Veränderung der mRNA für die Kanaluntereinheiten Kv1.5 und Kv4.3 sowie KChIP2**

In den kultivierten Zellen war nach 24 Stunden eine deutliche Veränderung der mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollen (direkt nach Isolation) zu verzeichnen. Die Expression von Kv1.5 nahm im Mittel unter Kulturbedingungen stark auf 15 % ab. Die Expression des KChIP2 war auf 15 % verringert. Kv4.3 dahingegen zeigte im Verlauf der Kultur einen Anstieg der Expression auf 251 % (siehe Abbildung 26). Anders ausgedrückt verringerte sich die Expression für Kv1.5 auf fast ein Sechstel, die Expression für KChIP2 auf weniger als ein Zehntel und die Expression für Kv4.3 vergrößert sich auf das Zweieinhalbfache.

Neben den oben beschriebenen Kanaleinheiten zeigt TASK-1 („sustained Komponente“) in atrialen Kardiomyozyten des Schweines eine große mRNA-Expression. Ein Vergleich der mRNA-Expression in frisch isolierten Zellen und Zellen nach 24 Stunden in Kultur zeigte aber keinen Unterschied.

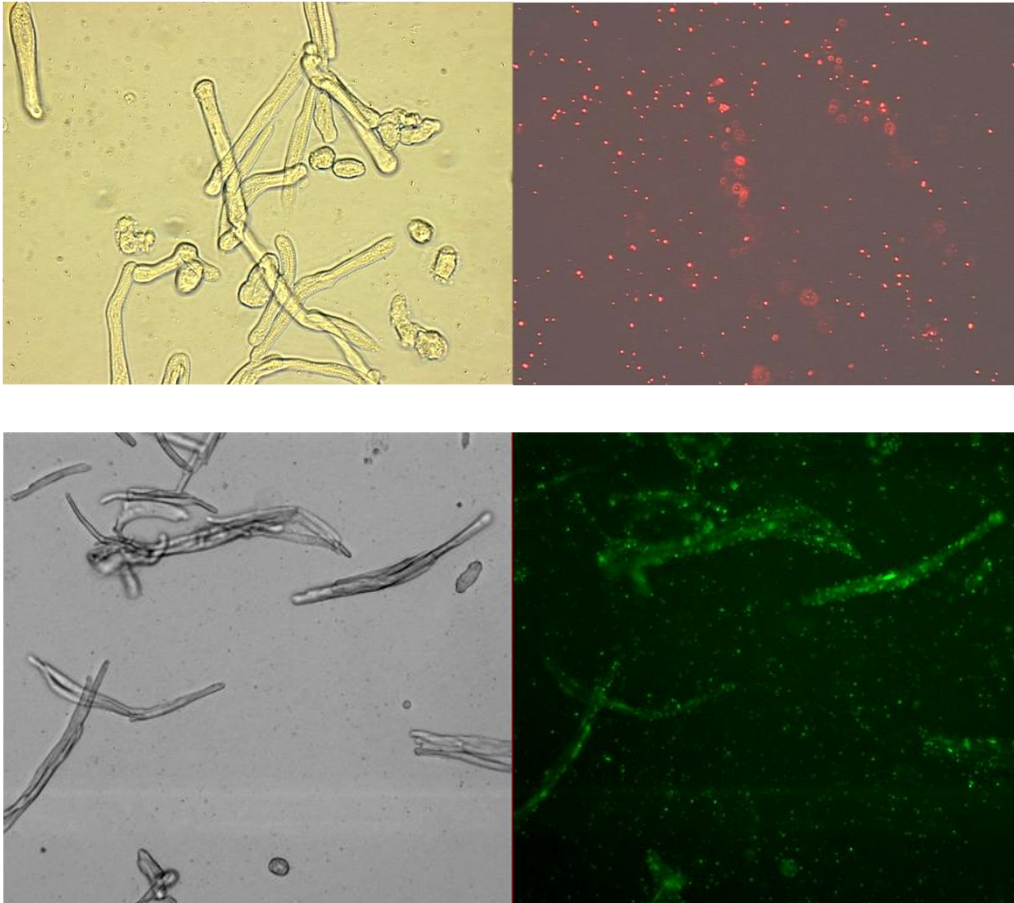


**Abbildung 26: Darstellung der mRNA-Expression in atrialen Kardiomyozyten des Schweines**

Aufgeführt sind die mRNA-Expression für verschiedene Kanaleinheiten in atrialen Kardiomyozyten des Schweines. **A** Die dunklen Säulen stehen für die mRNA-Analysen der Zellen direkt nach Zellisolation. Die weißen Säulen zeigen die mRNA-Expression nach 24 Stunden in Zellkultur. Während die mRNA-Expression für Kv1.5 massiv reduziert wird, ist die Expression für Kv4.3 erhöht, die Expression für KChip2 ist ein wenig verringert. Die mRNA-Expression des TASK-1 ist unter Kulturbedingungen konstant

#### 4.8 „Knockdown“ des Kv1.5 mit siRNA

Diese Experimente wurden zur direkten Klärung der molekularen Zusammensetzung der Kanaluntereinheiten durchgeführt. Abbildung 27 zeigt den Transfektionserfolg mit markierter siRNA (siehe Material und Methoden). Die mikroskopischen Aufnahmen entstanden 24 h nach Transfektion. Vor den Aufnahmen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt um nicht transfizierte fluoreszenzmarkierte siRNA weitgehend aus den Kulturschalen zu entfernen. Die Abbildungen zeigen im Bereich der Zellen eine erhöhte Fluoreszenz, was für einen Transfektionserfolg spricht. Es wurde ein Transfektionserfolg von über 90% erreicht.



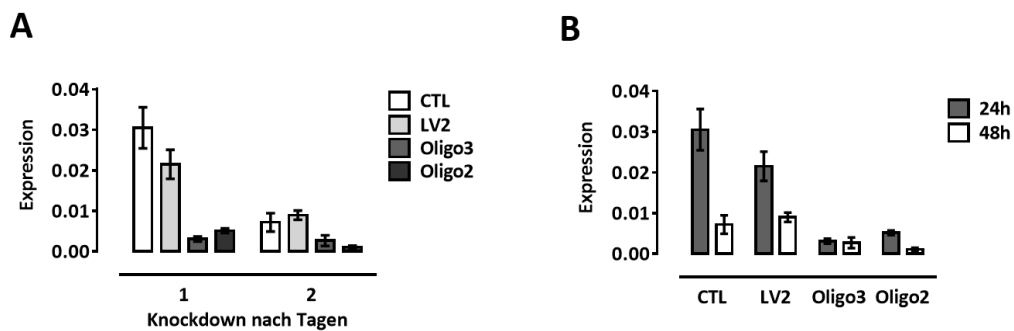
**Abbildung 27: Mikroskopische Aufnahme transfizierter Atriumzellen**

**Oben** Cy3 siRNA, **Unten** FITC-siRNA. **Links** Lichtmikroskop. **Rechts** Fluoreszenzmikroskop. Es wurde ein Transfektionserfolg von über 90% erreicht.

Die mRNA Expression der Kv1.5-Kaliumkanäle wurde in nicht transfizierten und transfizierten Zellen analysiert. Die mRNA-Analyse erfolgte 24 und 48 h nach dem Gen-„Knockdown“ mit verschiedenen siRNAs. Die siRNA Oligos 2 und 3 sind gegen den Kv1.5 gerichtet. siRNA LV2 stellt die Negativkontrolle dar (siehe Material und Methoden), CTL steht für kultivierte Zellen ohne siRNA Behandlung. Die siRNA Transfektionen mit siRNA Oligo 2 und Oligo 3 zeigten eine signifikante Suppression der mRNA Expression des Kv1.5-Kaliumkanals im Vergleich zur nicht transfizierten Zellgruppe (CTL) sowie zur Negativkontrolle (siRNA LV2). Der durch siRNA Oligo 2 und Oligo 3 hervorgerufene „Knockdown“ erreichte eine Kv1.5 mRNA-Reduktion um 76 % und 86 % 24 h nach Transfektion im Vergleich zur Negativkontrolle mit siRNA LV2 zum gleichen Zeitpunkt.



der Analyse. Der Vergleich von siRNA LV2 mit den kultivierten Zelle (CTL) ohne siRNA-Behandlung 24 h nach Transfektion/Kultur zeigte eine Kv1.5-mRNA-Reduktion um 30 %. Nach 48 h zeigte sich allgemein eine Tendenz zur geringeren Expression der Kv1.5-mRNA in allen Gruppen. In den kultivierten Zellen ohne siRNA-Behandlung zeigte sich eine Reduktion der Kv1.5-mRNA nach 24<sup>h</sup> auf 15 % und nach 48 h auf 9 % im Vergleich zu den frisch präparierten Zellen. (siehe auch Abschnitt 4.7).

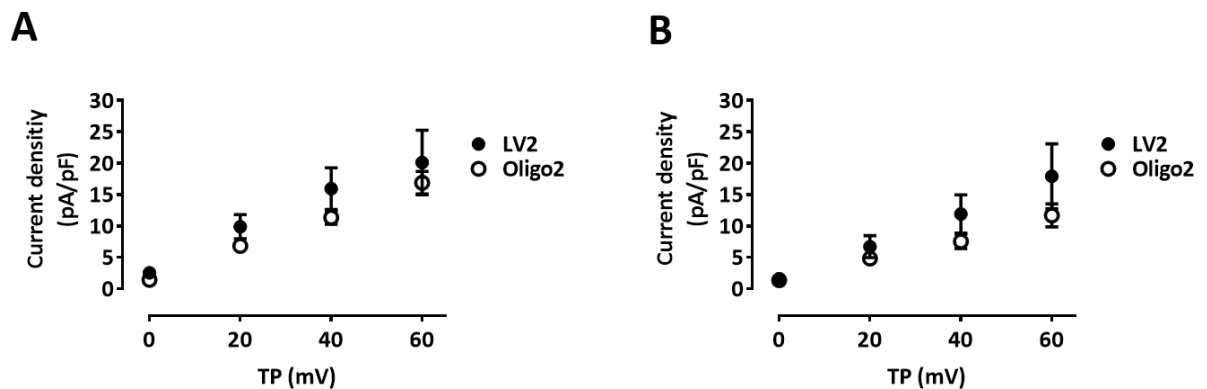


**Abbildung 28:** „Knockdown“ der mRNA für Kv1.5 mit siRNA

Dargestellt sind die mRNA-Analysen der Kontrollen sowie der Zellen nach Behandlung mit siRNA LV2 (direkte Negativkontrolle) und Zellen die mit einer gegen den Kv1.5 gerichteten siRNA behandelt wurden: siRNA Oligo 2 und Oligo 3. **A** zeigt die mRNA-Expression nach 24 und 48 h. In **B** sind die Ergebnisse zur besseren Ansicht nochmals in anderer Darstellung aufgeführt.

### 4.8.1 Keine Veränderung des $I_{K,PO}$ in mit siRNA herunter regulierter mRNA für Kv1.5 in atrialen Schweinekardiomyozyten im Vergleich zu den kultivierten Zellen

Da der „Knockdown“ mit siRNA Oligo 2 den stärksten Abfall von Kv1.5 mRNA bewirkte, wurde diese Gruppe im Vergleich zur Negativkontrolle (siRNA LV2) zur Analyse der Patch-Clamp-Messungen herangezogen. Der  $I_{K,PO}$  zeigte hier keinen signifikanten Unterschied in der Oligo 2-„Knockdown“ Gruppe im Vergleich zur Negativkontrolle. Beide Gruppen zeigten ähnlich starke Stromdichten nach 24 und 48 h Inkubationszeit nach Transfektion ( $p < 0.05$ ). Ausgewertet wurde der „peak to steady state“-Strom. Auch für den „peak“- und „steady state“-Strom war kein signifikanter Unterschied zu ermitteln.



**Abbildung 29: Messung des  $I_{K,PO}$  nach „Knockdown“ des Kv1.5 mittels siRNA nach 24 und 48 h**

Messung des  $I_{K,PO}$ . **A** 24 h und **B** 48 h nach Transfektion mit siRNA. LV2 = Negativkontrolle, Oligo2 = Zellen, die gegen den Kv1.5 gerichteter siRNA behandelt wurden. Verglichen wurden jeweils die Negativkontrollen (LV2) mit dem Oligo2. Ausgewertet wurde jeweils der „peak to steady state“-Strom

## 5 Diskussion

Die atrialen Kardiomyozyten des Schweines in Kultur zeigten bis zu 48 Stunden vitale Eigenschaften und zeigten sich für die Patch-Clamp-Technik, Real-time-PCR und Western-Blot-Analysen als geeignet. Im Vergleich zu den frisch präparierten Zellen war eine signifikante Zunahme der Stromdichte für den  $I_{K,PO}$  zu messen. Die Kinetik des  $I_{K,PO}$ -Stroms sowie das Verhalten gegenüber den Substanzen AV0118, Heteropodatoxin und PAP-1 blieben im Vergleich zu den frisch präparierten Zellen unverändert. In Western-Blot-Analysen war im Vergleich zu frisch isolierten Zellen eine Zunahme des Kv1.5-Proteins zu sehen. Die mRNA-Expression des Kv1.5 war dagegen auf ca. ein Sechstel verringert. Eine Abnahme der mRNA-Expression auf ein Zehntel konnte für die Kanaleinheit KCHIP2 gesehen werden. Kv4.3 wurde hingegen bis fast auf ein Zweieinhalbfaches vermehrt exprimiert, während die RNA-Expression für TASK-1 konstant blieb. Ein „Knockdown“ des Kv1.5 mit siRNA zeigte eine weitere Reduktion der Kv1.5 mRNA ohne eine messbare zusätzliche Veränderung des  $I_{K,PO}$ .

### 5.1 Primäre Zellkulturen atrialer Kardiomyozyten des Schweines

#### 5.1.1 Morphologische Veränderungen

Bei Betrachtung der kultivierten atrialer Kardiomyozyten des Schweines fielen morphologische Veränderungen im Vergleich zu den frisch präparierten Zellen auf. Um die Frage zu beantworten, ob dies implizieren würde, dass die makroskopisch Veränderungen Zeichen einer verminderten Vitalität darstellten, wurde nach anderen Arbeiten mit kultivierten Herzzellen gesucht. Zum Vergleich der Ergebnisse in dieser Arbeit ist man auf Grund fehlender Erkenntnisse über das Verhalten kultivierter atrialer Kardiomyozyten speziell des Schweines dabei auf Arbeiten mit anderen Spezies angewiesen.

Betrachtet man die Arbeiten mit kultivierten Herzzellen so fallen Unterschiede in der Methode bei der Zellisolation und der Kultivierung auf <sup>45 46-49</sup>. In dieser Arbeit wurde serumhaltiges Medium verwendet und die Zellen auf laminbeschichteten Schalen kultiviert, da es in Arbeiten mit dieser Rezeptur am besten gelang die Zellen in ihrer ursprünglichen Morphologie zu halten <sup>50</sup>. Eine Arbeit mit Ventrikelzellen der Ratte erreichte mit dieser Methode eine Ausbeute von über 80 % Zellen, die ihre eckige Zellform mit der charakteristischen Streifung behielten <sup>51</sup>. Das Ergebnis ist mit der Beobachtung in dieser Arbeit vergleichbar. Neben der Beschichtung der Kulturschalen gibt es unterschiedliche Rezepturen für das Zellmedium, wobei hier das Serum einen großen ausschlaggebenden Faktor zu spielen scheint <sup>45</sup>

Neben den in ihrer ursprünglichen Form bleibenden Zellen hatten sich in der Zellkultur runde Zellen gebildet. Für die hier durchgeführten Patch-Clamp-Messungen wurden ausschließlich Zellen von eckiger Form verwendet. Ob die runden Zellen sich von den eckigen Zellen die Ionenströme betreffend unterscheiden würden, kann daher nicht gesagt werden und ist in folgenden Experimenten zu prüfen. Während eine Arbeitsgruppe die runden Zellen bereits als „cardioballs“ beschrieb und sie für Patch-Clamp-Messungen verwendet (Spezies: Meerschweinchen) <sup>52</sup>, schrieb eine andere Arbeit diesen Zellen (Spezies: Ratten) keine Vitalität zu und entschied sich gegen die Verwendung der Zellen für weitere wissenschaftliche Untersuchungen <sup>53</sup>. Insgesamt zeigen diese Arbeiten <sup>45 46-49</sup>, dass es möglich ist Kardiomyozyten zu kultivieren. In einer Arbeit gelang darüber hinaus der Gentransfer mit Adenoviren in ventrikulären Kardiomyozyten adulter Mäuse <sup>54</sup>.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse muss der Einschätzung derer gefolgt werden, die angeben, dass diese Zellen für wissenschaftliche Zwecke nicht weiter zu verwenden sind.

### 5.1.2 Verstärkte Proteinexpression des Kv1.5 in den kultivierten Zellen

Die Analyse der atrialen Kardiomyozyten des Schweines zeigte eine Bande auf der Höhe von ca. 70 kd und ein überaus größeres Signal auf etwa gleicher Höhe in den kultivierten Zellen. Man kann davon ausgehen, dass das Signal in atrialen Kardiomyozyten nach 24 Stunden Kultur aufgrund seiner Stärke nach unten ausgezogen ist. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen der massive Zunahme des Gesamtproteins für Kv1.5 und auf der anderen Seite die starke Reduktion der Kv1.5-mRNA ist, dass im Herz ein Kv1.5 verwandtes Protein in der Kultur stark induziert wird, was ebenfalls von dem Antikörper erkannt wird. Da der  $I_{K,PO}$  jedoch auch zunimmt und der Kv1.5 sehr wahrscheinlich für den Strom verantwortlich ist<sup>35</sup>, kann dennoch angenommen werden, dass in den kultivierten Zellen eine echte verstärkte Proteinexpression des Kv1.5 vorliegt. Möglich ist dabei, dass das Signal nicht alleinig durch das Kv1.5-Protein zustande kommt, sondern eben auch durch ein verwandtes Protein, welches ebenfalls einer Induktion unterliegt.

### 5.1.3 Zunahme des $I_{K,PO}$ unter Kulturbedingungen

Neben den morphologischen Veränderungen waren elektrophysiologische und molekularbiologische Veränderungen unter dem Einfluss der Kultur zu beachten. So wurde vor Allem eine deutlich Stromzunahme des  $I_{K,PO}$  in den kultivierten Schweineherzzellen gemessen. Solche Veränderungen der Ionenströme in kultivierten Kardiomyozyten sind für porcine Zellen bisher nicht bekannt. Eine Arbeit mit kultivierten ventrikulären Kardiomyozyten in serumfreien Medium auf lamininbeschichteten Böden der adulten Ratte hatte funktionelle Veränderungen wie unter anderem eine Verminderung der Kontraktilität beschrieben<sup>51</sup>. In humanen atrialen Kardiomyozyten wurde unter dem Einfluss der Zellkultur (serumhaltiges Medium und lamininbeschichtete Böden) eine Vervierfachung des  $I_{SUS}$  („sustained outward K current“) beschrieben, während der  $I_{to1}$  unverändert blieb<sup>55</sup>. Die Autoren vermuten, dass der  $I_{to1}$  im Gegensatz zum  $I_{SUS}$  nicht über die Proteinkinase C beeinflusst wird und

daher die unterschiedliche Entwicklung der Ionenströme unter dem Einfluss der Kultur rührt. Ob der humane  $I_{\text{Sus}}$  von der Proteinkinase C mit reguliert wird ist nicht bekannt. Es ist es an dieser Stelle daher nicht möglich die Ergebnisse mit dieser Arbeit zu vergleichen. Eine weitere Arbeit mit kultivierten humanen atrialen Kardiomyozyten (serumhaltiges Medium und nicht beschichtete Böden) zeigte Veränderungen der Stromdichte für  $I_{\text{Kur}}$  und  $I_{\text{to}}$  <sup>56</sup>. Für  $I_{\text{Kur}}$  wurde eine Vergrößerung und für  $I_{\text{to}}$  eine Verminderung der Stromdichte gefunden. Die Kinetik der Ströme blieb dabei unverändert. Die beschriebenen Veränderung des  $I_{\text{Kur}}$  in den humanen Herzzellen (Zunahme der Stromdichte unter Kulturbedingungen) entsprechen möglicherweise den Veränderung des  $I_{\text{K,PO}}$  in den Schweineherzzellen unter Kulturbedingungen. Beide Ströme sind am ehesten auf die Ionen-Kanaleinheit Kv1.5 zurückzuführen <sup>57, 58</sup>. Ob der in humanen Zellen beschriebene  $I_{\text{Kur}}$  das Korrelat für den  $I_{\text{K,PO}}$  ist, bleibt nicht sicher belegt, diese Hinweise deuten jedoch darauf hin. Ob die beschriebenen Veränderungen der Ionenströme und die Ionenströme selbst in den humanen Herzzellen jedoch wirklich mit unseren Ergebnissen vergleichbar sind, wird aufgrund der nicht eindeutigen und überlappenden Bezeichnung von Ionenströmen erschwert (siehe Abschnitt 5.2.). Sicher scheint dabei, dass eine Veränderung der Ionenströme unter Kulturbedingung als Anpassung der Zellen an die Kultur zu werten ist und es sich dabei nicht um Artefakte oder Zufallsbefunde handelt.

Benardeau, A. et al. hatte in kultivierten humanen Herzzellen eine Reduktion des  $I_{\text{K1}}$  mit einer Anhebung des Membranpotentials zu weniger negativen Werten beobachtet und diese als eine Entwicklung zurück zu embryonalen Zellen gedeutet <sup>47</sup>. In dieser Arbeit blieb der  $I_{\text{K1}}$  konstant, weshalb bei den kultivierten atrialen Kardiomyozyten des Schweines nicht von einer Dedifferenzierung der Zellen auszugehen ist.

## 5.2 Mögliche molekulare Grundlage des $I_{K,PO}$

Bei der Erforschung von Ionenkanälen im Herzgewebe ist die Zuordnung eines Kanalproteins zu einem Strom durch die Überlappung verschiedener Ströme erschwert. Die Benennung spannungsabhängiger Kaliumkanäle, insbesondere solcher die zur Phase 3 der Repolarisation beitragen, variiert je nach Autor stark <sup>59</sup>. Zudem sind elektrophysiologische Zusammenhänge atrialer Kardiomyozyten des Schweines im Gegensatz zum Stand der Wissenschaft bei vielen anderen Spezies noch weitgehend unerschlossen <sup>60</sup>. Über den zu den spannungsabhängigen Kaliumkanäle gehörigen  $I_{K,PO}$  des Schweines liegen lediglich Kenntnisse durch eine vorangegangene Arbeit vor <sup>34</sup>. Der  $I_{K,PO}$  konnte durch die Substanz AVE0118 gehemmt werden. AVE0118 wurde dabei zuvor als Blocker der Ionenströme  $I_{to}$  und  $I_{Kur}$  beschrieben <sup>38</sup>. Im Folgenden sollen Gemeinsamkeiten des  $I_{K,PO}$  mit diesen Strömen erarbeitet werden. Die Zuordnung des  $I_{to}$  und  $I_{Kur}$  zu Kanälen wurde hierbei bereits als besonders schwierig beschrieben <sup>17</sup>.

### 5.2.1 $I_{Kur}$ wird durch Kv1.5 gebildet

$I_{Kur}$  ist nicht nur in humanen Zellen, sondern auch in den meisten anderen Spezies vornehmlich im Atrium des Herzens vorzufinden <sup>17</sup>. Dem  $I_{Kur}$  in humanen Atriumzellen soll der Kv1.5 unterliegen <sup>58</sup>. Da Kv1.5 ausschließlich im atrialen Gewebe des Herzens exprimiert wird und nicht in den Ventrikel, ist es besonders attraktiv in der Entwicklung vorhofselektiver Antiarrythmika ( $I_{Kur}$ -Blocker) geworden (siehe Abschnitt 1.7). Der Kv1.5 wird neben dem Herzen in weiteren Organen wie z.B. in den Pulmonalarterien <sup>61</sup>, im Rattengehirn <sup>62</sup> oder im Skelettmuskel <sup>63</sup> gefunden. Es wird ihm unter anderem eine Funktion im Zellzyklus zugeschrieben <sup>64</sup>. In Säugetieren trägt Kv1.5 eventuell zusammen mit Kv7.1 (KvLQT1) und Kv11.1 (HERG) neben dem ultraschnell aktivierenden  $I_{Kur}$  auch zu den langsamen ( $I_{Ks}$ ) und schnellen ( $I_{Kr}$ ) gleichrichtenden Kaliumstrom bei <sup>65</sup>.

Auch in Schweineherzzellen wurden gleichrichtende Kaliumströme ( $I_K$ ) beschrieben. Im Bereich des Sinusknotens wurde als dominanter Vertreter der  $I_K$  („delayed rectifier“) der  $I_{Ks}$  gefunden <sup>66</sup>. Spätere Studien dokumentierten daneben das Vorhandensein von  $I_{Kr}$  und

$I_{Kur}$  und nannten noch den  $I_{to2}$  <sup>67</sup>. In einer letzteren Arbeit ging man davon aus, dass der  $I_{K,PO}$  in atrialen Kardiomyozyten des Schweines den vorherrschenden Kaliumstrom darstellt und wie der  $I_{Kur}$  durch die Kanaleinheit Kv1.5 gebildet wird <sup>34</sup>.

Der Kv1.5 wird mit verschiedenen Kaliumströmen in Verbindung gebracht. In Bezug auf diese Arbeit interessiert hier besonders der  $I_{Kur}$  in menschlichen Herzen und der  $I_{K,PO}$  im Schweineherz. Beide Ströme werden als vorhofspezifisch beschrieben und galten als Ziel für vorhofselektive Antiarrhythmika <sup>35, 68</sup>. Die Real-time-PCR-Ergebnisse in dieser Arbeit bestärken, dass der  $I_{K,PO}$  wie auch der  $I_{Kur}$  in humanen atrialen Kardiomyozyten hauptsächlich durch den Kv1.5 gebildet wird. Zudem sprechen die Hemmbarkeit des  $I_{K,PO}$  durch AVE0118 und PAP-1 für eine Beteiligung von Kv1.5-Kanälen.

### 5.2.2 $I_{to}$ wird durch Kv4.3 gebildet

Der  $I_{to}$  wurde in einer Vielzahl von Spezies erwähnt. So wurde ein kalziumunabhängiger  $I_{to}$  ( $I_{to1}$ ) in ventrikulären Kardiomyozyten des Frettchens vermutet <sup>69</sup>. Kinetische Variationen betreffend die Aktivierung / Inaktivierung sowie das Bemessen der Erholungszeit von der Inaktivierung wurden auf die Beteiligung verschiedener Ionenkanaluntereinheiten des  $I_{to}$  zurückgeführt <sup>70</sup>. Der  $I_{to}$  des Kaninchens wird nachweislich von den Untereinheiten Kv4.3 und Kv4.2 getragen, während in menschlichen Zellen nur Kv4.3 nachgewiesen wurde <sup>68</sup>. Charakteristisch für den  $I_{to,f}$  des Kaninchens ist zudem eine sehr langsame Erholung von der Inaktivierung, welches auf die zusätzliche Beteiligung von Kv1.4 Untereinheiten zurück geführt wird <sup>68</sup>.

### 5.2.3 Dem $I_{K,PO}$ unterliegen der $I_{to}$ und $I_{Kur}$

Wie oben beschrieben war in den atrialen Kardiomyozyten des Schweines der Kv1.5 aber auch Kv4.3 präsent. Der  $I_{K,PO}$  wurde als  $I_{to}$ -ähnlicher Kanal beschrieben <sup>34</sup>. Es wird daher die Frage aufgeworfen ob der  $I_{K,PO}$  mit durch Kv4.3 gebildet wird. Der  $I_{K,PO}$  ließ sich in dieser Arbeit weder in nativen noch in kultivierten Zellen durch die Substanz



Heteropodatoxin hemmen, was auf eine fehlende Komponente eines  $I_{to}$  hindeuten würde. Vergleicht man den alleinig durch Kv1.5 Kanäle generierten Strom mit dem  $I_{K,PO}$  so fällt bei  $I_{K,PO}$  eine schnelleren Inaktivierungskomponente auf, die Ähnlichkeit zum  $I_{to}$  hat. Eine Beteiligung des Kv4.3 an dem  $I_{K,PO}$  wäre daher zu vermuten. Man könnte sich den  $I_{K,PO}$  als einen Strom vorstellen, der sich aus den Kanaleinheiten Kv1.5 und Kv4.3 zusammensetzt. Dabei wäre besonders die erste Komponente des  $I_{K,PO}$  mit dem schnell aufsteigenden Spitzenstrom und der anfangs der schnellen Inaktivierung vom  $I_{to}$  getragen.

Anders als bisher angenommen, ist demnach davon auszugehen, dass der  $I_{K,PO}$  neben dem Kv1.5 auch durch den Kv4.3 gebildet wird.

### **5.3 Vergrößerung des $I_{K,PO}$ trotz vermindertem Kv1.5-mRNA in Anwesenheit des KChIP2**

In den kultivierten Zellen zeigte sich eine deutliche Vergrößerung des  $I_{K,PO}$  sowie eine Zunahme des Proteins für Kv1.5. Würde man davon ausgehen, dass dem  $I_{K,PO}$  zum großen Teil der Kv1.5 unterliegt, so müsste in den kultivierten Zellen auch vermehrt Kv1.5-mRNA gemessen werden. Gegen diese Erwartung fand sich eine starke Reduktion der Kv1.5-mRNA. Neben der stark verminderten Expression der Kv1.5-mRNA war eine reduzierte mRNA-Expression für KChIP2 („K<sup>+</sup> channel-interacting protein 2“) und eine etwas erhöhte Expression für Kv4.3 unter dem Einfluss der Kultur gefunden worden. Unter der Annahme, dass der  $I_{K,PO}$  dennoch aus den beiden Kanälen Kv1.5 und Kv4.3 generiert wird, kann eine regulierende Funktion des KChIP2 vermutet werden.

Eine Interaktion des KChIP2 mit Kv1.5 und Kv4.3 wurde bereits beschrieben <sup>71</sup>. Bisher konnten vier KChIP-Gene identifiziert werden, wobei KChIP2 im Gegensatz zu anderen KChIP-Typen hauptsächlich in Herzzellen gefunden wurde <sup>72</sup>. Durch alternatives „splicing“ entstehen KChIP2-Isoformen, die im Vergleich zu ihren  $\alpha$ -Untereinheiten eine höhere Gewebespezifität aufweisen <sup>73</sup>.

### 5.3.1 KChIP2 hemmt Kv1.5

Die gleichzeitige Expression von KChIP2 mit Kv1.5 in HEK-293-Zellen zeigte eine verminderte Präsenz von Kv1.5 an der Zelloberfläche. Es wurde postuliert, dass KChIP2 den Einbau vom Endoplasmatischem Retikulum in die Zellmembran hemmt <sup>74</sup>. Ein Versuch mit „KChIP2-Knockout“-Mäusen wies dementsprechend eine erhöhte Expression von Kv1.5 im Ventrikelmyokard auf <sup>75</sup>.

Der in den kultivierten Herzzellen größere  $I_{K,PO}$  trotz reduzierter Kv1.5-mRNA bei reduzierter KChIP2-mRNA könnte durch einen verminderten hemmenden Einfluss von KChIP2 auf den Kv1.5 erklärt werden. Dennoch scheint das Kv1.5-Protein im Vergleich zur Stromzunahme unverhältnismäßig stark exprimiert zu sein. Man könnte dies dadurch erklären, dass in der Zellkultur ein Kv1.5-verwandtes Protein induziert wird, welches ebenfalls durch den Antikörper markiert wird. Es ist zu vermuten, dass das Kv1.5-Protein in den kultivierten Zellen zunimmt, aber nicht so stark wie es in der Western-Blot-Analyse scheint.

### 5.3.2 KChIP2 verstärkt Kv4.3

KChIP2 ist in Assoziation mit Kv4.2 und Kv4.3 erwähnt worden <sup>72</sup>. Die Koexpression von KChIP2 mit Kv4.3 in CHO-Zellen führte zu einer vielfachen Stromdichte des  $I_{to}$  <sup>76, 77</sup>. KChIP2e und KChIP2f finden sich im menschlichen Atrium. KChIP2e führt zu einer Verminderung der Amplitude, Beschleunigung der Inaktivierung und Verlangsamung der „Recovery“ in durch Kv4.3 Kanäle generierten Strömen. KChIP2f vergrößert die Amplitude und verlangsamt die Inaktivierungsrate <sup>73</sup>. Je nach „Splice“-Form des KChIP2 kann also ein hemmender oder verstärkender Effekt auf den Kv4.3 bestehen.

Die in dieser Arbeit kultivierten Zellen zeigten eine stärkere Expression des Kv4.3, von dem anzunehmen ist, dass er zum Strom des  $I_{K,PO}$  beiträgt. In anderen Spezies wird der Kv4.3 für den  $I_{to}$  verantwortlich gemacht und zeichnet sich durch eine schnell inaktivierende Komponente aus. Es müsste daher eine Vergrößerung des Stroms und eine schnellere Inaktivierung zu erwarten sein. In den kultivierten Zellen wird dazu

passend eine Vergrößerung des  $I_{K,PO}$  gesehen. Die Kinetik des Stromes verändert sich dabei allerdings nicht. KCHIP2 ist in den kultivierten Zellen im Vergleich zu den frisch präparierten Zellen geringer exprimiert, wonach von einer verminderten Wirkung auf den Kv4.3 ausgegangen werden kann. Da sich die Kinetik des Stromes in den kultivierten Zellen nicht signifikant verändert, kann vermutet werden, dass KCHIP2 einen verstärkenden Effekt auf den Kv4.3 hat. Der Spitzenstrom in den nicht kultivierten Zellen wäre demnach neben dem Kv1.5 durch Kv4.3 und dem verstärkenden Effekt des KCHIP2 zu erklären. In den kultivierten Zellen nimmt zwar der Kv4.3 zu, aber nun ist der verstärkende Effekt des KCHIP2 verringert so dass sich der Spitzenstrom nicht signifikant ändert.

### **5.3.3 Der $I_{K,PO}$ wird durch die Kanaleinheit Kv1.5 und Kv4.3 gebildet und wesentlich durch KCHIP2 beeinflusst**

Die Vermutung liegt nahe, dass der  $I_{K,PO}$  des Schweines durch die  $\alpha$ -Untereinheit Kv1.5 gebildet wird. Daneben sind die Beteiligung von Kv4.3 und ein regulatorischer Effekt des KCHIP2 auf die Kv1.5 und Kv4.3 wahrscheinlich. KCHIP2 scheint einen hemmenden Effekt auf den Kv1.5 zu haben, indem es den Einbau des Kv1.5-Proteins in die Plasmamembran verhindert. Der Kv4.3 bestimmt vermutlich die schnell inaktivierende Komponente des  $I_{K,PO}$  und macht einen großen Teil des Spitzenstrom aus. Kv4.3 wird vermutlich durch die Kopräsenz von KCHIP2 verstärkt.

Die Rolle des TASK-1 war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Dennoch zeigt er eine große mRNA-Expression in atrialen Kardiomyozyten des Schweines und trägt vermutlich mit zu dem Strom des  $I_{K,PO}$  bei.

### 5.3.4 KChIP2 in der Pathogenese von Arrhythmien

KChIP2 gehört zu den regulierenden Untereinheiten, welche immer mehr an Bedeutung gewinnen<sup>78</sup>. Eine Vielzahl spezifischer Untereinheiten wurde insbesondere in der Pathogenese von Herzrhythmusstörungen beschrieben. Zu erwähnen sind hier exemplarisch minK (minimal K<sup>+</sup> channel peptide), MiRP (minK-related peptide) und KChAP (K<sup>+</sup> channel-associated protein)<sup>79,80</sup>.

KChIP2 scheint in der Aufrechterhaltung der gesunden Herzphysiologie bzw. Pathogenese von Herzerkrankungen eine entscheidende Rolle zu spielen. So wurde KChIP2 vermindert in hypertrophiertem und geschädigtem Myokardgewebe gefunden<sup>81</sup>. In Patienten mit Vorhofflimmern wurde eine negative Korrelation zwischen Vorhofgröße und der Expression von Kv1.5, Kv4.3 und KChIP2 im rechten Vorhof gefunden<sup>82</sup>. Das heißt, je größer der Vorhof war, desto geringer die Expression für Kv1.5, Kv4.3 und KChIP2 oder anders herum. „KChIP2-Knockout-Mäuse“ zeigten eine erhöhte Anfälligkeit für tachykarde ventrikuläre Arrhythmien. Einzelzelluntersuchungen der Ventrikelzellen dieser Tiere wiesen dabei so gut wie keinen I<sub>to</sub> auf<sup>83</sup>. Es ist zu vermuten, dass KChIP2 notwendig ist um I<sub>to</sub> zu generieren und zur Stabilisation des Herzrhythmus beiträgt. Versuche mit „Knock-In“-Mäusen mit einer mutierten Form des Troponin T zeigten neben der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie eine Verminderung des I<sub>to</sub> und I<sub>Kur</sub> in den Ventrikelzellen. Auf mRNA-Ebene war dabei eine Reduktion der Kanäle Kv4.2, Kv1.5 und KChIP2 zu sehen<sup>84</sup>. Man könnte postulieren, dass KChIP2 in krankem Herzgewebe kompensatorisch herab reguliert wird oder andersherum eine verminderte Expression wiederum zu Pathologie führt.

Zusammenfassend kann angenommen werden, dass KChIP2 eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von Herzrhythmusstörungen spielt. In pathologisch verändertem Gewebe ist KChIP2 vermindert. Daneben wird aber auch eine verminderte Expression von Kv1.5 und Kv4.3 gefunden. Das elektrophysiologische Korrelat dieser Kanäle der I<sub>to</sub> und I<sub>Kur</sub> sind dementsprechend vermindert. Stellt man sich die Umstände in der Kultur als eine Wirkung auf die Zellen wie in einem kranken Herzen vor, müssten die Zellen ähnlich wie in einem kranken Herzen reagieren. Es wäre eine reduzierte Expression für

die Ionenkanaluntereinheiten KCHIP2, Kv1.5 und Kv4.3 zu erwarten. Diese Beobachtung stimmt teilweise mit der in dieser Arbeit ein. Während die Expression für KCHIP2 und Kv1.5 reduziert war, fand sich hingegen eine Zunahme der Kv4.3-mRNA. Anders als in dem kranken Herzgewebe findet sich auch eine Vergrößerung des Stromes, der in dieser Arbeit als  $I_{K,PO}$  benannt wird. Es ist anzunehmen, dass die genannten Kanäle auf Veränderungen der Physiologie herab bzw. heraufreguliert werden.

KCHIP2 weist dabei im Vergleich zu den  $\alpha$ -Untereinheiten eine höhere Gewebespezifität auf. Dies könnte KCHIP2 in der Entwicklung von neuen vorhofselektiven Antiarrhythmika interessant machen.

#### **5.4 „Knockdown“ des Kv1.5 mit siRNA**

Mit dem „Knockdown“ des Kv1.5 mittels siRNA konnte eine signifikante Reduktion der Kv1.5-mRNA bewirkt werden. Kv1.5 wird als grundlegenden Kanaleinheit des  $I_{K,PO}$  angenommen. Gegen die Erwartung, dass sich  $I_{K,PO}$  bei reduzierter Kv1.5-mRNA verminderte, waren in den Patch-Clamp Experimenten, die den  $I_{K,PO}$  messen, keine Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe zu sehen. Betrachtet man die durch den Einfluss der Zellkultur ohnehin schon stark reduzierte Kv1.5-mRNA, fällt die weitere Reduktion durch den „Knockdown“ mit siRNA möglicherweise kaum ins Gewicht.

Das Experiment hat hier vor allem gezeigt, dass es möglich ist an kultivierten Atriumzellen einen erfolgreichen „Knockdown“ einer mRNA durchzuführen. Dies spricht für eine besonders Vitalität der Zelle auch unter Kulturbedingungen.

## **5.5 Herausforderungen bei der Erforschung kardialer Ionenkanäle**

### **5.5.1 Heterogenität des Herzgewebes**

Bei der Untersuchung von kardialen Ionenkanälen muss berücksichtigt werden, dass Ventrikel und Vorhöfe unterschiedliche Kanäle aufweisen. Einige Arbeiten belegen sogar Unterschiede der Kanalzusammensetzung innerhalb nur eines Ventrikels oder Vorhofs und unterscheiden darüber hinaus zwischen endokardialem und extrakardialem Gewebe <sup>85</sup>. Die einzelnen Herzabschnitte müssten streng genommen für sich als eigenständige Organe betrachtet werden. Bei der Forschung mit Herzzellen ist es schwierig diese Umstände zu berücksichtigen, da anatomisch keine klaren Grenzen vorliegen. Bei der Gewebepräparation und anschließenden Zellisolation z.B. eines Vorhofs ist es dadurch leicht vorstellbar, dass man eine sehr heterogene Probe erhält. Ergebnisse können demnach bei nur kleinen Änderungen in der Gewebepräparation sehr unterschiedlich ausfallen. Dies würde unter anderem erklären warum ähnliche Arbeiten mit Herzzellen teilweise widersprüchliche Ergebnisse hervorbringen. Zudem werden in der Literatur Unterschiede in der Gewebepräparation sowie Kultivierung der Zellen angegeben, die wiederum entsprechende Reaktionen der Zelle hervorrufen (siehe 5.1.1).

## **5.6 Kultivierte Kardiomyozyten für die Erforschung neuer antiarrhythmischer Substanzen**

Unter Berücksichtigung, dass die Zellkultur immer eine artifizielle Umgebung darstellt, muss eine Reaktion/Anpassung der Zelle auf diese Umstände angenommen werden. Besonders für Herzzellen bedeutet die Zellkultur nicht nur ein Herausreißen der Zelle aus dem Zellverband, sondern auch eine abrupte Beendigung der rhythmischen Kontraktionen, wie sie *in natura* für das Aufrechterhalten des Organismus obligatorisch sind. Trotz des großen Unterschiedes der Zellkultur zum *Status in vivo* konnten gezeigt

werden, dass sich primäre Zellkulturen atrialer Kardiomyozyten des Schweines durchaus für die Forschung eignen. So hat sich vor allem die Eigenschaft auf verschiedene Substanzen zu reagieren unter Kulturbedingungen nicht verändert. Die hier dargestellten Veränderung des Ionenstroms  $I_{K,PO}$  unter Kulturbedingungen kann genutzt werden, um Zusammenhänge in der Zelle zu erforschen. Die Kombination aus verschiedenen Modellen in der Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten wird erst den Erfolg mit sich bringen <sup>60</sup>.

Unter Berücksichtigung der Vielfalt an spannungsabhängigen Kaliumkanälen in Herzzellen und der unvollständigen Entschlüsselung der Ionenströme und Kanaluntereinheiten, ist eine eindeutige Zuordnung von Strömen zu Kanaluntereinheiten als große Herausforderung zu sehen <sup>86</sup>. Es ist zunehmend ersichtlich, dass Ionenströme nicht einzelnen Kanaluntereinheiten zugeordnet werden können, sondern die Ströme aus mehreren Einheiten zusammengesetzt sind. Die Vielfältigkeit der Zusammensetzung der Ionenströme durch Kanaluntereinheiten mit verschiedenen regulierenden Untereinheiten und die Erforschung dieser Ionenströme an verschiedenen Spezies erschwert die genaue Identifizierung der Ionenströme. Die Möglichkeit Ionenströme und deren unterliegende Kanäle direkt an humanen Zellen zu erforschen würde hier einen großen Fortschritt mit sich bringen. Das in dieser Arbeit etablierter Modell kultivierter Kardiomyozyten könnte auch mit humanen Zellen durchgeführt werden. Dies würde es möglich machen mit nur wenig Material umfangreiche Experimente durchzuführen und komplexere Untersuchungen direkt an humanen Herzzellen durchzuführen. So könnten z.B. molekularebiologische Experimente wie ein Gen-“knockdown“ an humanen Herzzellen durchgeführt werden, welcher das Halten der Zellen in Kultur als voraussetzt.

## 6 Zusammenfassung

Vorhofflimmern ist die am weitesten verbreitete Herzrhythmusstörung. Die bisherige antiarrhythmische Therapie ist durch erhebliche kardiale und extrakardiale Nebenwirkungen nur wenig zufriedenstellend. Die Erforschung neuer antiarrhythmischer Substanzen ist aufgrund begrenzt zur Verfügung stehenden menschlichen Probematerials erschwert. Vorhofgewebe wird z.B. bei Herzoperationen gewonnen und kann dann für Forschungszwecke eingesetzt werden. Die Herzzellen sind allerdings sehr empfindlich, weswegen sie meist bereits nach einigen Stunden nicht mehr für weitere Untersuchungen zu gebrauchen sind. Man ist daher auf das Tiermodell angewiesen. Da das Schweineherz dem des Menschen sehr ähnlich ist, stellt es hier ein ideales Testsystem für neue Antiarrhythmika dar. In neuesten Studien wurde in Schweineherzen der  $I_{K,PO}$  als ein vielversprechenden Angriffspunkt vorhofselektiver Antiarrhythmika beschrieben. Die diesem Strom zugrundeliegenden Kanaleinheiten sind jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht genau erforscht.

Ziel der Arbeit war, ein stabiles Modell der Zellkultur mit atrialen Kardiomyozyten zu etablieren. An den kultivierten Herzzellen sollten elektrophysiologische aber auch molekular- und proteinbiologische Methoden angewandt werden. Das Modell sollte mit Zellen aus Schweineherzen erprobt werden und dazu dienen Untersuchungen an Zellen aus einer Gewebepräparation über mehrere Tage durchzuführen. Darüber hinaus sollte die Zellkultur dazu dienen einen Gen-„Knockdown“ anwenden zu können. Der  $I_{K,PO}$  und dem diesem Strom möglicherweise zugrundeliegenden Kanaluntereinheiten Kv1.5, Kv4.3, KChIP2 und TASK-1 sollten hierbei charakterisiert werden.

Atriumzellen aus Schweineherzen wurden isoliert und direkt nach Zellisolation sowie unter dem Einfluss der Zellkultur nach bis zu 48 Stunden untersucht. Es kamen die Patch-Clamp-Technik, Real-time-PCR- und Western-Blot-Analysen zum Einsatz. Die Wirkung verschiedener Substanzen auf den  $I_{K,PO}$  wurde getestet. Das Kv1.5-Protein wurde dargestellt und mRNA-Analysen für Kv1.5, Kv4.3, KChIP2 und TASK-1 durchgeführt. Ein



Teil der Zellen wurde mit einer gegen Kv1.5 gerichteten siRNA behandelt und anschließend mRNA-Analysen durchgeführt sowie der  $I_{K,PO}$ -Strom gemessen.

Die atrialen Kardiomyozyten des Schweines in Kultur zeigten bis zu 48 Stunden vitale Eigenschaften und zeigten sich für die Patch-Clamp-Technik, Real-time-PCR und Western-Blot-Analysen als geeignet. Im Vergleich zu den frisch präparierten Zellen war eine signifikante Zunahme der Stromdichte für den  $I_{K,PO}$  zu messen. Die Kinetik des  $I_{K,PO}$ -Stroms sowie das Verhalten gegenüber den Substanzen AV0118, Heteropodatoxin und PAP-1 blieben im Vergleich zu den frisch präparierten Zellen unverändert. In Western-Blot-Analysen war im Vergleich zu frisch isolierten Zellen eine Zunahme des Kv1.5-Proteins zu sehen. Die mRNA-Expression des Kv1.5 war dagegen auf ca. ein Sechstel verringert. Eine Abnahme der mRNA-Expression auf ein Zehntel konnte für die Kanaleinheit KCHIP2 gesehen werden. Kv4.3 wurde hingegen bis fast auf ein Zweieinhalbfaches vermehrt exprimiert, während die RNA-Expression für TASK-1 konstant blieb. Ein „Knockdown“ des Kv1.5 mit siRNA zeigte eine weitere Reduktion der Kv1.5 mRNA ohne eine messbare zusätzliche Veränderung des  $I_{K,PO}$ .

Die Arbeit hat gezeigt, dass primäre Kulturen atrialer Kardiomyozyten des Schweines für elektrophysiologische sowie molekularbiologische Versuche geeignet sind. Der im Interesse stehende Strom  $I_{K,PO}$  hat sich unter Kulturbedingungen zwar vergrößert, jedoch blieben Kinetik und vor allem die Eigenschaft auf verschiedene Substanzen zu reagieren unverändert. Es ist somit möglich neue Substanzen in der Entwicklung von Antiarrhythmika an kultivierten Herzzellen zu testen und somit die Anzahl der für die Experimente benötigten Tiere zu verringern. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben dem Kv1.5 die Kanaleinheiten der Kv4.3 und KCHIP2 wesentlich zum  $I_{K,PO}$  beitragen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf, dass Kv1.5 den Grundstrom des  $I_{K,PO}$  bildet und Kv4.3 vornehmlich den Spitzenstrom des  $I_{K,PO}$  ausmacht. Kv1.5 wird dabei vermutlich wesentlich durch KCHIP2 gehemmt. KCHIP2 spielt eine nachweisliche Rolle in der Pathogenese von Herzrhythmusstörungen und zeigt im Vergleich zu Kv1.5 und Kv4.3 eine höhere Gewebespezifität. KCHIP2-Blocker könnten in der Entwicklung vorhofselektiver Antiarrhythmika vielversprechende Ergebnisse liefern.

## Summary

Background: Atrial fibrillation is the most common cardiac arrhythmia. Because of its cardiac and extracardiac side effects of the antiarrhythmic therapy further investigation is necessary. Due to the rare availability of human sample material the exploration of new antiarrhythmic agents is limited. Atrial tissue obtained during cardiac surgery can be used for research purposes. Heart cells from the atrial tissue are very difficult to handle for what these cells are not commonly used for cell culture experiments. Investigation on antiarrhythmic agents still depends on animal models. Since the human heart is very similar to the pig heart it here represents an ideal model. In recent studies  $I_{K,PO}$  found in pig hearts seemed to be a promising target for atrial selective antiarrhythmic drugs. The current underlying channel units are not thoroughly explored at this time.

The aim of this study was to establish a stable model of cell culture of atrial cardiomyocytes. Based on this model electrophysiological, molecular and protein biological methods should be tested. The methods should be tested on the cells from porcine heart after tissue isolation and cell culture of several days. Based on the cell culture model techniques like gene knockdown should be performed. The  $I_{K,PO}$  and its possible underlying channel subunits Kv1.5, Kv4.3, KCHIP2 and TASK 1 should be characterized.

Methods: Atrium cells from pig hearts were isolated and analyzed directly after cell isolation and under the influence of cell culture after up to 48 hours. The used methods were patch-clamp, real-time PCR and Western blot analyzes. The effect of various substances on the  $I_{K,PO}$  was tested. The Kv1.5 protein has been detected and mRNA analysis for Kv1.5, Kv4.3, KCHIP2 and TASK 1 were made. Part of the cells was treated with siRNA targeted against Kv1.5 mRNA. After knock-down of Kv1.5 mRNA the current  $I_{K,PO}$  in these cells was measured.

Results: The atrial cardiomyocytes in culture of the pig showed vital properties up to 48 hours and were compatible for patch-clamp technic, real-time PCR and Western blot analyzes. In comparison to the freshly prepared cells a significant increase in the current density for the  $I_{K,PO}$  was measured. The kinetics of the  $I_{K,PO}$  current as well as the behavior towards the substances AVE0118, Heteropodatoxin and PAP 1 remained unchanged compared to the freshly prepared cells. In Western blot analysis was seen an increase of Kv1.5 protein as compared to freshly isolated cells. The mRNA expression of Kv1.5 was however reduced to about one-sixth. A decrease in the mRNA expression could be seen on one-tenth for the channel unit KCHIP2. The mRNA expression of Kv4.3 however increased up on two and a half times, while the mRNA expression of TASK 1 remained constant. A knock-down of the Kv1.5 mRNA showed further reduction in the Kv1.5 mRNA quantity without a measurable change in the  $I_{K,PO}$  current.

Conclusion: The results have shown that primary cultures of atrial cardiomyocytes of the pig heart are suitable for electrophysiological and molecular biological experiments. The mainly analyzed  $I_{K,PO}$  current has increased under culture conditions without changing kinetics. Furthermore it remained its properties in the reaction to various substances. In future cultured model of pig heart cells could be used in the development of antiarrhythmic drugs. In this way also less number of animals would be required for the experiments. The results suggest that besides Kv1.5 the channel units Kv4.3 and KCHIP2 are important underlying subunits of the  $I_{K,PO}$  current. The present results suggest that Kv1.5 forms the base current of  $I_{K,PO}$  and Kv4.3 constitutes mainly the peak current of  $I_{K,PO}$ . Kv1.5 is thereby presumably inhibited significantly by KCHIP2. KCHIP2 plays a demonstrable role in the pathogenesis of cardiac arrhythmias and shows in comparison to Kv1.5 and Kv4.3 a higher tissue specificity. Therefore substances targeting KCHIP2 could provide promising results in the development of atrial- selective antiarrhythmic drugs.

## 7 Literaturverzeichnis

- (1) Shukla A, Curtis AB. Avoiding permanent atrial fibrillation: treatment approaches to prevent disease progression. *Vasc Health Risk Manag* 2014;10:1-12.
- (2) Kompetenznetz Vorhofflimmern
- (3) Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Europace* 2010 October;12(10):1360-420.
- (4) Camm AJ, Lip GY, De CR et al. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J* 2012 November;33(21):2719-47.
- (5) Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002 January 10;415(6868):219-26.
- (6) ESC. The Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). 2010.
- (7) Angaran P, Dorian P. Antiarrhythmic drugs in atrial fibrillation: do they have a future? *Can J Cardiol* 2013 October;29(10):1158-64.
- (8) Silbernagel S. *Taschenatlas der Physiologie*. 6 ed. 2006.
- (9) Edward K.Chung. *Principles of Cardiac Arrhythmias* . second ed. The William and Wilkins Company; 2012.
- (10) Dale D. *Ion Adventure of the Heartland*. 2003.
- (11) Roeper J, Pongs O. Presynaptic potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 1996 June;6(3):338-41.
- (12) Veh RW, Lichtinghagen R, Sewing S, Wunder F, Grumbach IM, Pongs O. Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channel subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain. *Eur J Neurosci* 1995 November 1;7(11):2189-205.
- (13) Rettig J, Heinemann SH, Wunder F et al. Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of beta-subunit. *Nature* 1994 May 26;369(6478):289-94.

- (14) Shi G, Nakahira K, Hammond S, Rhodes KJ, Schechter LE, Trimmer JS. Beta subunits promote K<sup>+</sup> channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron* 1996 April;16(4):843-52.
- (15) Vetter DE, Mann JR, Wangemann P et al. Inner ear defects induced by null mutation of the *isk* gene. *Neuron* 1996 December;17(6):1251-64.
- (16) Aimond F, Kwak SP, Rhodes KJ, Nerbonne JM. Accessory Kvbeta1 subunits differentially modulate the functional expression of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 2005 March 4;96(4):451-8.
- (17) Ravens U, Wettwer E. Ultra-rapid delayed rectifier channels: molecular basis and therapeutic implications. *Cardiovasc Res* 2011 March 1;89(4):776-85.
- (18) Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000 June 1;525 Pt 2:285-98.
- (19) Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 1990 October 26;250(4980):533-8.
- (20) Rasmusson RL, Morales MJ, Wang S et al. Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels. *Circ Res* 1998 April 20;82(7):739-50.
- (21) Gonzalez T, David M, Moreno C, Macias A, Valenzuela C. Kv1.5-Kv beta interactions: molecular determinants and pharmacological consequences. *Mini Rev Med Chem* 2010 June;10(7):635-42.
- (22) Hohnloser SH, Singh BN. Proarrhythmia with class III antiarrhythmic drugs: definition, electrophysiologic mechanisms, incidence, predisposing factors, and clinical implications. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1995;6:920-36.
- (23) Behr ER, Roden D. Drug-induced arrhythmia: pharmacogenomic prescribing? *Eur Heart J* 2013 January;34(2):89-95.
- (24) Vaughan Williams EM. Classification of antidysrhythmic drugs. *Pharmacol Ther B* 1975;1(1):115-38.
- (25) Sohns C, Zabel M. [Current role of amiodarone in antiarrhythmic therapy]. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol* 2010 December;21(4):239-43.
- (26) Papiris SA, Triantafillidou C, Kolilekas L, Markoulaki D, Manali ED. Amiodarone: review of pulmonary effects and toxicity. *Drug Saf* 2010 July 1;33(7):539-58.

- (27) Blaauw Y, Gogelein H, Tieleman RG, van Hunnik A, Schotten U, Allessie MA. "Early" class III drugs for the treatment of atrial fibrillation: efficacy and atrial selectivity of AVE0118 in remodeled atria of the goat. *Circulation* 2004 September 28;110(13):1717-24.
- (28) Roy D, Rowe BH, Stiell IG et al. A randomized, controlled trial of RSD1235, a novel anti-arrhythmic agent, in the treatment of recent onset atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2004 December 21;44(12):2355-61.
- (29) Goldstein RN, Khrestian C, Carlsson L, Waldo AL. Azd7009: a new antiarrhythmic drug with predominant effects on the atria effectively terminates and prevents reinduction of atrial fibrillation and flutter in the sterile pericarditis model. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004 December;15(12):1444-50.
- (30) Levy S. Do we need pharmacological therapy for atrial fibrillation in the ablation era? *J Interv Card Electrophysiol* 2006 December;17(3):189-94.
- (31) Ehrlich JR, Nattel S, Hohnloser SH. Novel anti-arrhythmic drugs for atrial fibrillation management. *Curr Vasc Pharmacol* 2007 July;5(3):185-95.
- (32) Gogelein H, Brendel J, Steinmeyer K et al. Effects of the atrial antiarrhythmic drug AVE0118 on cardiac ion channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004 September;370(3):183-92.
- (33) Wirth KJ, Paehler T, Rosenstein B et al. Atrial effects of the novel K(+)-channel-blocker AVE0118 in anesthetized pigs. *Cardiovasc Res* 2003 November 1;60(2):298-306.
- (34) Ehrlich JR, Hoche C, Coutu P et al. Properties of a time-dependent potassium current in pig atrium: evidence for a role of kv1.5 in repolarization. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 November;319(2):898-906.
- (35) Ehrlich JR, Hoche C, Coutu P et al. Properties of a time-dependent potassium current in pig atrium: evidence for a role of kv1.5 in repolarization. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 November;319(2):898-906.
- (36) Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kuhlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999 October;44(1):121-31.
- (37) Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward K<sup>+</sup> current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 1997 June;80(6):772-81.
- (38) Ehrlich JR, Nattel S, Hohnloser SH. Novel anti-arrhythmic drugs for atrial fibrillation management. *Curr Vasc Pharmacol* 2007 July;5(3):185-95.

- (39) Burashnikov A, Antzelevitch C. New pharmacological strategies for the treatment of atrial fibrillation. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2009 July;14(3):290-300.
- (40) Christ T, Wettwer E, Voigt N et al. Pathology-specific effects of the IKur/Ito/IK,ACh blocker AVE0118 on ion channels in human chronic atrial fibrillation. *Br J Pharmacol* 2008 August;154(8):1619-30.
- (41) Gamper N, Stockand JD, Shapiro MS. The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005 May;51(3):177-85.
- (42) Jacobson SL, Piper HM. Cell cultures of adult cardiomyocytes as models of the myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1986 July;18(7):661-78.
- (43) Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976 April 29;260(5554):799-802.
- (44) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981 August;391(2):85-100.
- (45) O'Connell TD, Rodrigo MC, Simpson PC. Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol Biol* 2007;357:271-96.
- (46) Feng J, Li GR, Fermini B, Nattel S. Properties of sodium and potassium currents of cultured adult human atrial myocytes. *Am J Physiol* 1996 May;270(5 Pt 2):H1676-H1686.
- (47) Benardeau A, Hatem SN, Rucker-Martin C et al. Primary culture of human atrial myocytes is associated with the appearance of structural and functional characteristics of immature myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1997 May;29(5):1307-20.
- (48) Hatem SN, Benardeau A, Rucker-Martin C, Samuel JL, Coraboeuf E, Mercadier JJ. Differential regulation of voltage-activated potassium currents in cultured human atrial myocytes. *Am J Physiol* 1996 October;271(4 Pt 2):H1609-H1619.
- (49) Ellingsen O, Davidoff AJ, Prasad SK et al. Adult rat ventricular myocytes cultured in defined medium: phenotype and electromechanical function. *Am J Physiol* 1993 August;265(2 Pt 2):H747-H754.
- (50) Jacobson SL, Piper HM. Cell cultures of adult cardiomyocytes as models of the myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1986 July;18(7):661-78.

- (51) Ellingsen O, Davidoff AJ, Prasad SK et al. Adult rat ventricular myocytes cultured in defined medium: phenotype and electromechanical function. *Am J Physiol* 1993 August;265(2 Pt 2):H747-H754.
- (52) Bechem M, Pott L, Rennebaum H. Atrial muscle cells from hearts of adult guinea-pigs in culture: a new preparation for cardiac cellular electrophysiology. *Eur J Cell Biol* 1983 September;31(2):366-9.
- (53) Banyasz T, Lozinskiy I, Payne CE et al. Transformation of adult rat cardiac myocytes in primary culture. *Exp Physiol* 2008 March;93(3):370-82.
- (54) O'Connell TD, Rodrigo MC, Simpson PC. Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol Biol* 2007;357:271-96.
- (55) Hatem SN, Benardeau A, Rucker-Martin C, Samuel JL, Coraboeuf E, Mercadier JJ. Differential regulation of voltage-activated potassium currents in cultured human atrial myocytes. *Am J Physiol* 1996 October;271(4 Pt 2):H1609-H1619.
- (56) Feng J, Li GR, Fermini B, Nattel S. Properties of sodium and potassium currents of cultured adult human atrial myocytes. *Am J Physiol* 1996 May;270(5 Pt 2):H1676-H1686.
- (57) Ehrlich JR, Hoche C, Coutu P et al. Properties of a time-dependent potassium current in pig atrium: evidence for a role of kv1.5 in repolarization. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 November;319(2):898-906.
- (58) Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K<sup>+</sup> current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* 1993 December;73(6):1061-76.
- (59) Ravens U, Wettwer E. Ultra-rapid delayed rectifier channels: molecular basis and therapeutic implications. *Cardiovasc Res* 2011 March 1;89(4):776-85.
- (60) Janse MJ, Opthof T, Kleber AG. Animal models of cardiac arrhythmias. *Cardiovasc Res* 1998 July;39(1):165-77.
- (61) Wang J, Juhaszova M, Rubin LJ, Yuan XJ. Hypoxia inhibits gene expression of voltage-gated K<sup>+</sup> channel alpha subunits in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1997 November 1;100(9):2347-53.
- (62) Swanson R, Marshall J, Smith JS et al. Cloning and expression of cDNA and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain. *Neuron* 1990 June;4(6):929-39.



- (63) Matsubara H, Liman ER, Hess P, Koren G. Pretranslational mechanisms determine the type of potassium channels expressed in the rat skeletal and cardiac muscles. *J Biol Chem* 1991 July 15;266(20):13324-8.
- (64) Chittajallu R, Chen Y, Wang H et al. Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G1/S phase progression of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 February 19;99(4):2350-5.
- (65) Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000 June 1;525 Pt 2:285-98.
- (66) Ono K, Shibata S, Iijima T. Properties of the delayed rectifier potassium current in porcine sino-atrial node cells. *J Physiol (Lond)* 2000 April 1;524(Pt 1):51-62.
- (67) Li GR, Sun H, To J, Tse HF, Lau CP. Demonstration of calcium-activated transient outward chloride current and delayed rectifier potassium currents in Swine atrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2004 April;36(4):495-504.
- (68) Wang Z, Feng J, Shi H, Pond A, Nerbonne JM, Nattel S. Potential molecular basis of different physiological properties of the transient outward K<sup>+</sup> current in rabbit and human atrial myocytes. *Circ Res* 1999 March 19;84(5):551-61.
- (69) Campbell DL, Qu Y, Rasmusson RL, Strauss HC. The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. II. Closed state reverse use-dependent block by 4-aminopyridine. *J Gen Physiol* 1993 April;101(4):603-26.
- (70) Patel SP, Campbell DL. Transient outward potassium current, 'I<sub>to</sub>', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol* 2005 November 15;569(Pt 1):7-39.
- (71) An WF, Bowlby MR, Betty M et al. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 2000 February 3;403(6769):553-6.
- (72) Rosati B, Pan Z, Lypen S et al. Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* 2001 May 15;533(Pt 1):119-25.
- (73) Decher N, Barth AS, Gonzalez T, Steinmeyer K, Sanguinetti MC. Novel KChIP2 isoforms increase functional diversity of transient outward potassium currents. *J Physiol* 2004 June 15;557(Pt 3):761-72.
- (74) Li H, Guo W, Mellor RL, Nerbonne JM. KChIP2 modulates the cell surface expression of Kv 1.5-encoded K(+) channels. *J Mol Cell Cardiol* 2005 July;39(1):121-32.

- (75) Thomsen MB, Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, Ozgen N, Boyden PA, Rosen MR. Deleting the accessory subunit KChIP2 results in loss of I(to,f) and increased I(K,slow) that maintains normal action potential configuration. *Heart Rhythm* 2009 March;6(3):370-7.
- (76) Bähring R, Dannenberg J, Peters HC, Leicher T, Pongs O, Isbrandt D. Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *J Biol Chem* 2001 June 29;276(26):23888-94.
- (77) Pongs O, Schwarz JR. Ancillary subunits associated with voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *Physiol Rev* 2010 April;90(2):755-96.
- (78) Pourrier M, Schram G, Nattel S. Properties, expression and potential roles of cardiac K<sup>+</sup> channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J Membr Biol* 2003 August 1;194(3):141-52.
- (79) Kodirov SA, Zhuravlev VL, Safonova TA, Kurilova LS, Krutetskaia ZI. [Superfamily of voltage dependent K<sup>+</sup> channels: structure, functions and pathology]. *Tsitologiya* 2010;52(9):697-714.
- (80) Wible BA, Yang Q, Kuryshev YA, Accili EA, Brown AM. Cloning and expression of a novel K<sup>+</sup> channel regulatory protein, KChAP. *J Biol Chem* 1998 May 8;273(19):11745-51.
- (81) Jin H, Hadri L, Palomeque J et al. KChIP2 attenuates cardiac hypertrophy through regulation of I<sub>to</sub> and intracellular calcium signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2010 June;48(6):1169-79.
- (82) Oh S, Kim KB, Ahn H, Cho HJ, Choi YS. Remodeling of ion channel expression in patients with chronic atrial fibrillation and mitral valvular heart disease. *Korean J Intern Med* 2010 December;25(4):377-85.
- (83) Kuo HC, Cheng CF, Clark RB et al. A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I<sub>to</sub> and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 2001 December 14;107(6):801-13.
- (84) Suzuki T, Shioya T, Murayama T et al. Multistep ion channel remodeling and lethal arrhythmia precede heart failure in a mouse model of inherited dilated cardiomyopathy. *PLoS One* 2012;7(4):e35353.
- (85) Zwermann Ludwig Andreas. Bedeutung in humanem Myokard, Speziesunterschiede, transmurale Verteilung und Regulation bei Herzinsuffizienz. 2005.
- (86) Ravens U, Wettwer E. Ultra-rapid delayed rectifier channels: molecular basis and therapeutic implications. *Cardiovasc Res* 2011 March 1;89(4):776-85.

- (87) Gogelein H, Bruggemann A, Gerlach U, Brendel J, Busch AE. Inhibition of IKs channels by HMR 1556. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000 December;362(6):480-8.
- (88) Sanguinetti MC, Johnson JH, Hammerland LG et al. Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. *Mol Pharmacol* 1997 March;51(3):491-8.
- (89) Schmitz A, Sankaranarayanan A, Azam P et al. Design of PAP-1, a selective small molecule Kv1.3 blocker, for the suppression of effector memory T cells in autoimmune diseases. *Mol Pharmacol* 2005 November;68(5):1254-70.

## 8 Anhang

### 8.1 Materialien

Material	Hersteller
<i>Gewebepräparation</i>	
Collagenase	Worthington Biochemical Corp.
Rompun® (Xylacine HCL)	Provet AG
Hostaket® (Ketamine HCL)	INTERVET DEUTSCHL GmbH
Narcoren® (Pentobarbital)	Merial GmbH
Liquemin® (Na-Heparin)	Roche
<i>Zellkultur</i>	
Petrischalen klein (9,6cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio GmbH
Petrischalen groß (58cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio GmbH
6-Well Platte	Greiner Bio GmbH
DICkgläschen	Greiner Bio GmbH
M199	Gibco®
HAM's F12	PAA Laboratories GmbH
FCS Gold	PAA Laboratories GmbH
PBS	Gibco®
Trypsin	Biochrom AG
EDTA	Biochrom AG
Blasticidin	Invivogen®
Hygromycin B	Invitrogen®
Accutase	PAA Laboratories GmbH
Penicilin/Streptomycin Solution	Sigma-Aldrich
G418-Solution	PAA Laboratories GmbH
Laminin	Pan-Biotech GmbH
Iscove basal medium	Biochrom AG
FBS	Biochrom AG

L-Glutamin	Biochrom AG
G418 (Geneticin)	Biochrom AG
Zeocin	Invitrogen®
L-Glutamin	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH
Gewebekulturflaschen 250ml	Greiner Bio-One GmbH
Pipetten	Greiner Bio-One GmbH
Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH
Ham's F12	Invitrogen®
Kv4.3/KCHIP#105 CHO	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
<i>PatchClamp</i>	
Verstärker: EPC-7	Heka Elektronik, LambriCht
<i>Chemikalien</i>	
rHeteropodatoxin-2	Alomone Labs Ltd.
Phrixotoxin-2	Alomone Labs Ltd.
AVEO118	Sanofi-Aventis
<i>RNA-Isolierung</i>	
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Qiagen Schredder-Säulen	Qiagen
<i>Knockdown</i>	
siRNA: Oligo Nr.3 Kv1.5 / LV2 / FITC / Cys3	Sanofi-Aventis
DharmafiCt	Sanofi-Aventis
OPTI-MEM	Invivogen®
<i>Western-Blot</i>	
Anti-Kv 1.5 (Kcna5)	Alomone Labs Ltd.
Anti-Kv 1.5 potassium channel, NeuroMab clone K7/45	UC Davis/NIH NeuroMab Facility
RIPA-Buffer	Cell Signaling Technology
BCA Protein Assay Reagent (bicinchoninic acid)	Thermo Fisher Scientific Inc.

## 8.2 Lösungen

Tabelle 2: Extrazellulär-Lösung (Storage)

Substanz	Menge in mmol / l
KCl	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10	10
Dextrose	10
Mannitol	40
L-Glutamat	70
β-OH-Buttersäure	10
Taurine	20
EGTA	10
0,1 % BSA	

pH mit KOH auf pH7.3 eingestellt

Tabelle 3: Extrazellulär-Lösung (Tyrode)

Substanz	Menge in mmol/l
NaCl	136
KCl	5.4
MgCl <sub>2</sub>	1
CaCl <sub>2</sub>	1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.33
HEPES	5
Dextrose	10

pH mit NaOH auf pH 7.35 eingestellt

Tabelle 4: Intrazelluläre Lösung (Pipettenlösung)

Substanz	Menge in mmol/l
K-Aspartat	110
KCl	20
MgCl <sub>2</sub>	1
MgATP	5
Li-GTP	0.1
HEPES	10
Na-Phosphokreatin	5
EGTA	5

pH mit KOH auf pH 7.3 eingestellt

## 8.3 Verwendete Kanalinhhibitoren

### 8.3.1 Cadmiumchlorid

Cadmiumchlorid (CdCl<sub>2</sub>) wurde zu der extrazellulären Tyrodelösung hinzugegeben, um I<sub>Ca,L</sub> zu inhibieren und somit eine Überlagerung der durch Depolarisation hervorgerufenen Ströme durch diesen Strom zu vermeiden.

### 8.3.2 HMR1556

HMR1556 ist ein Derivat des I<sub>Ks</sub> Blockers Chromanol 293B. I<sub>Ks</sub> Blocker wurden ursprünglich als Klasse III Antiarrhythmikum entwickelt. HMR1556 übertrifft Chromanol 293B in Potenz und Selektivität für I<sub>Ks</sub>-Blockade und stellt somit ein wichtiges experimentelles Werkzeug dar<sup>87</sup>.

### 8.3.3 AVE0118

Die Substanz AVE0118 ist als vorhofselektives Antiarrhythmikum entwickelt worden. Sie blockiert heterolog exprimierte Kv1.5 Untereinheiten mit einer IC<sub>50</sub> von 1,1±0,2 μmol l<sup>-1</sup>.<sup>32</sup> (siehe auch Abschnitt 1.7).

### 8.3.4 Heteropodatoxin

Heteropodatoxin (HpTX) ist ein giftiges Peptid der südafrikanischen Riesenkrahbennspinne (*Heteropoda venatoria*) und verursacht einen Block von Kv4.2 Untereinheiten an spannungsabhängigen Kaliumkanälen sowie eine Inhibition von Kalziumkanälen. Es ist darüber hinaus ein potenter Inhibitor sowohl von nativen  $I_{to,1}$  als auch von heterolog exprimierten Kv4-Untereinheiten<sup>88</sup>. In frühen Untersuchungen zeigte HpTX keinen Block des  $I_{K,PO}$  in atrialen Kardiomyozyten des Schweines, was auf eine fehlende Beteiligung eines Kv4.x an dem  $I_{K,PO}$  schließen lässt<sup>34</sup>.

### 8.3.5 5-(4-Phenoxybutoxy)Psoralen

5-(4-Phenoxybutoxy)Psoralen (PAP-1) wurde als Kv1.3 Blocker in der Entwicklung gegen Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose oder Typ1-Diabetes hergestellt. Das Target sind T-Gedächtniszellen („T<sub>EM</sub> cells“). Es ist ein Derivat von Psora-4 und hemmt Kv1.3 mit einer  $IC_{50}$  von 2 nM. Es bindet vorwiegend an den C-Typ inaktivierten Zustand des Kanals. PAP-1 ist 23-fach weniger selektiv für Kv1.5 und zeigt auf andere Kanäle eine noch deutlich geringere Wirkung<sup>89</sup>. Die hemmende Wirkung auf die verschiedenen Kanäle ist dabei dosisabhängig. In dieser Arbeit wurde die Sustanz als Kv1.5-Blocker angewendet.



## 8.4 Real-time-PCR Sonden

Tabelle 5: Sequenz der PCR-Sonden

Ionenkanal	Klon	GenBank Accession No.	Primer
Kv1.5	KCNA5	NM001006593	Forw. 5'-CCTTGTCATCCTCATCTCCATCA-3'
			Rev. 5'-GCAGCAGCTCGCGTTCAT-3'
Kv4.3	KCND3	DQ285632	Probe 5'-CCTTCTGCTTGGAGACCCTGCCTGA-3'
			Forw. 5'-GCATGGAGAGTTCAATGCAGAA-3'
KChiP2	KCNI2	DQ285634	Rev. 5'-AGCAGCAGGTGGTGGTGAG-3'
			Probe 5'-CACACGGAGTCCCTCGCTGTCCA-3'
			Forw. 5'-CGACAGCGTGGAGGATGAGT-3'
			Rev. 5'-TTGCAATTCCTTGCCTGTGA-3'
			Probe 5'-TTGGTTTGCTCCTGCAGCTGCTCC-3'

## 8.5 siRNAs

Tabelle 6: Sequenzen der siRNAs

LV-2	5'-AUC GUA CGU ACC GUC GUA UTT-3'	LV-2	
	5'-AUA CGA CGG UAC GUA CGA UTT-3'		
Oligo1	5' GCG GUG CCA UGA UCG UCA A dTdT 3'	Kv1.5-1	182342
	5' UUG ACG AUC AUG GCA CCG C dCdA 3'		182343
Oligo2	5' CGC CGA GGC CGA CAA CCA A dTdT 3'	Kv1.5-2	182344
	5' UUG GUU GUC GGC CUC GGC G dAdA 3'		182345
Oligo3	5' AGG UGU GGC UGA UCU UCG A dTdT 3'	Kv1.5-3	182346
	5' UCG AAG AUC AGC CAC ACC U dGdG 3'		182347
Oligo4	5' GCC GGG AAA CAG AUU UGU A dTdT 3'	Kv1.5-4	182348
	5' UAC AAA UCU GUU UCC CGG C dTdG 3'		182349

Die siRNAs stammten von Qiagen und waren gegen den porcinen Kv1.5 gerichtet

## 9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AF	atrial fibrillation
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BSA	bovine serum albumin
CHO	chinese hamster ovaries
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTL	Kontrolle
Ct-Wert	Schwellen-Zyklus
Cy3	Carbocyanin 3
IC <sub>50</sub>	mittlere effektive Dosis
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
FB	fractional block
FBS	fetal bovine serum
FCS	fetal calf serum
FRET	Fluoreszenz-Energietransfer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HERG	human Ether-a-go-go Related Gene
HMR	Höchst Marion Russel
H <sub>p</sub> TX	Heteropodatoxin
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
I <sub>Ca</sub>	Kalziumstrom
I <sub>Ca,L</sub>	Strom durch langsamen spannungsgesteuerten Kalziumkanal
I <sub>K</sub>	Strom durch „delayed rectifier K <sup>+</sup> channel“
I <sub>K1</sub>	Strom durch „inward-rectifier“
I <sub>Kr</sub>	Strom durch “rapid delayed rectifier K <sup>+</sup> channel”
I <sub>Ks</sub>	Strom durch “slow delayed rectifier K <sup>+</sup> channel”
I <sub>Kur</sub>	Strom durch “ultrarapid delayed rectifier K <sup>+</sup> channel”
I <sub>Na</sub>	Natriumstrom
I <sub>Na,late</sub>	Später Natriumstrom

I <sub>Na/Ca</sub>	Strom durch Natrium-Calcium-Austauscher
I <sub>to</sub>	„transient outward current“
I <sub>to,f</sub>	„transient outward current, fast“
I <sub>to1</sub>	„transient outward current 1“
I <sub>to2</sub> (ECL <sub>(Ca)</sub> )	„transient outward current 2“
K-Aspartat	Kaliumaspartat
KChAP	„K <sup>+</sup> channel-associated protein“
KChIP	„K <sup>+</sup> channel-interacting protein“
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
Kv	Spannungsabhängiger Kaliumkanal
Kv1.1-1.6	Spannungsabhängiger Kaliumkanal 1.1-1.6
Li-GTP	Lithium Guanosin triphosphat
LQTS	Long QT Syndrom
M199	Medium 199
MgATP	Magnesiumadenosin triphosphat
minK	minimal K <sup>+</sup> channel peptide
MiRP	minK-related peptide
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na-Phosphokreatin	Natriumphosphokreatin
NCS	neuronal calcium sensor
N-Terminus	Amino-Terminus
PAP-1	5-(4-Phenoxybutoxy)Psoralen
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
p-loop	Peptidschleife
p-Wert	Probability value
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time-PCR
S1-6	Transmembransegmente 1-6
SEM	standard error of the mean
siRNA	small interfering RNA
TASK-1	„the acid-sensitiv potassium channel“
TP	Testpotential
U	Unit
WT	Wildtyp
Y/1-Y	Sättigungsanteil

## **10 Danksagung**

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Joachim Ehrlich, dass ich diese Arbeit unter seiner Leitung durchführen durfte und dafür, dass er auch nach langer Zeit immernoch unterstützend mit großem Einsatz zur Seite steht. Danach danke ich Herrn Professor Dr. Heinz Gögelein, der mir im Rahmen eines Praktikums bei der Fa. Sanofi-Aventis (wo ein Grossteil der Experimente durchgeführt wurde) mit Enthusiasmus Interesse an biophysikalischen Fragestellungen vermittelt hat und jederzeit mit Freude und Optimismus bei der Arbeit war. Ich danke ihm für sein ermutigendes Wesen und die Begleitung auf dem Weg zum Ziel. Besonderer Dank im Bezug auf die praktische Laborarbeit gilt Frau Karin Kopp, die mich in die Arbeitstechniken eingeführt hatte, mir bei Fragen immer zur Seite stand und darüber hinaus viele Anregungen gegeben hatte. An diesem Punkt danke ich auch Herrn Klein für die Assistenz einiger wichtiger praktischer Handgriffe. Ich danke den Kollegen bei Sanofi-Aventis Frau Kathrin Herrmeier für die Diskussionsbereitschaft wobei ein besonderer Dank dabei an Herrn Klaus Steinmeyer, der mir vor allem für die schriftliche Ausarbeitung der Arbeit mit viel Zeit und Ruhe zur Verfügung stand.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, die immer für mich da sind und mich auch bei dieser Arbeit Halt gegeben haben. Nicht zuletzt ein herzlicher Dank an meine Freunde, die mich ohne Ausnahme ermutigt hatten diese Arbeit fertig zu stellen.

## 11 Curriculum vitae

### Persönliche Angaben

Geburtsdatum, -ort	23. Oktober 1982, Frankfurt am Main
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Praktische Erfahrungen

#### Assistenzärztin

Seit 02/2014 Kinderintensivstation, Kinderkardiologie, Universitätsmedizin Göttingen

11/2012 – 12/2013 Kardiozentrum, La Paz - Bolivien (kinderkardiologische Klinik unter der Leitung von Dr. Alexandra Heath-Freudenthal) und Hospital de Niño, La Paz - Bolivien (universitäre Kinderklinik der Universidad Mayor de San Andrés (UMSA))

10/2010 – 09/2012 Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum Offenbach

04/2010 – 10/2010 Station Czerny, Kinderherzzentrum, Gießen

#### Ärztliche Mitarbeiterin

11/2012 – 12/2013 Herzverein ([www.herzverein.de](http://www.herzverein.de)) - “fundación cardioinfantil”, La Paz – Bolivien und PFM ([www.pfmbolivia.com](http://www.pfmbolivia.com)), La Paz – Bolivien

#### Studentischer Nebenjob

2005 – 2010 Herzkatheterlabor, Cardio-angiologisches Centrum Bethanien (CCB), Frankfurt am Main

#### Praktisches Jahr

08/2008 – 07/2009 3. Tertial – Pädiatrie; Hospital Universitário Antônio Pedro, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Rio de Janeiro - Brasilien

2. Tertial - Innere Medizin; Hospital Piñero, Universidad de Buenos Aires (UBA) - Argentinien

1. Tertial – Chirurgie; Yonsei-University, Seoul – Südkorea

Famulaturen

- 02 – 03/2008 Pädiatrie; Hospital Régional Puebla ISSSTE, Puebla - Mexico
- 02 – 03/2007 Praxis; Cardioangiologisches Centrum Bethanien (CCB), Frankfurt am Main
- 04 – 05/2006 Medizinische Notaufnahme; Universitätsklinikum der Johann-Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main
- 02 – 03/2006 Innere Medizin; Elisabethenkrankenhaus (ELIM), Hamburg
- Krankenpflegepraktika
- 02 – 03/2004 Krankenhaus Nordwest, Frankfurt am Main
- 07 – 09/2003 Fugger-Klinik, Berlin

**Fortbildungen**

- 12/2013 „Pediatric Advanced Live Support“ (PALS), der “American Heart Association” (AHA), La Paz - Bolivien
- 09/2012 Kurs-Weiterbildung in „Allgemeiner und spezieller Notfallbehandlung“, Sylt

**Forschungsarbeit/Vorträge**

- 05/2013 Vortrag über „Angeborene Herzfehler mit verminderter Lungendurchblutung, FALLOT“ auf dem internationalen kinderkardiologischen Kurs, „Curso Internacional de Cardiología Pediátrica“, La Paz - Bolivien
- Seit 04/2013 unter der Leitung von Dr. Alexandra Heath-Freudenthal, Kardiozentrum, La Paz - Bolivien
- Epidemiologische Studie über „Angeborene Herzfehler in Down—Syndrom in der Höhe“
- Klinische Studie über „Pulmonare Hypertension in Patienten mit Links-Rechts Shunt in hoher Höhe“

**Universitäre Ausbildung**

10/2005 – 10/2009	Studium der Medizin, W. Goethe-Universität Frankfurt am Main; Staatsexamen (Note 2)
10/2003 – 09/2005	Studium der Medizin, Hamburg; Physikum (Note 2)
10/2002 – 09/2003	Architektur, Bauhausuniversität Weimar
06/2002 – 09/2002	Sprachkurs: Yonsei-University, Seoul - Südkorea

**Schulische Bildung**

1993 - 2002	Gymnasium Oberursel, Oberursel; Abitur (Note 1,8)
1989 - 1993	Grundschule-Stierstadt, Oberursel

**Kenntnisse**

Computerkenntnisse	Windows Vista/XP/00, MS Word/Excel/PowerPoint Referenzmanager, Prism, Igor, Hekafit Internetrecherche
Sprachkenntnisse	Englisch (fließend in Wort und Schrift) Spanisch (fließend in Wort und Schrift) Portugiesisch (gut in Wort und Schrift) Französisch (gut in Wort und Schrift) Koreanisch (gut in Wort und Schrift)

**Sonstige Aktivitäten und Interessen**

Seit 2009	Capoeira im Verein
Seit 1994	klassisches Musikinstrument: Klavier
Seit 1989	klassisches Musikinstrument: Geige
Seit 1988	Karate im Verein

Frankfurt am Main, 29. September 2014

Claudia Scherer

## 12 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Untersuchung des  $I_{K,PO}$  und seiner zugrundeliegenden Untereinheiten in primären Zellkulturen atrialer Kardiomyozyten des Schweines mittels Patch-Clamp-Technik und molekularbiologischer Untersuchungen

im Zentrum der Inneren Medizin der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main, Medizinische Klinik III - Kardiologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. med. Joachim Ehrlich ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt, den 29.09.2014

---

Claudia Scherer