

**Elektrophysiologische und pharmakologische Untersuchungen zur Relevanz
kardialer Ionenkanäle bei Arrhythmien**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Niels Decher
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2002
(DF1)

Abkürzungen

AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
APD ₅₀	Aktionspotentialdauer bei 50% der Repolarisation
APD ₉₀	Aktionspotentialdauer bei 90% der Repolarisation
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
A-Typ-Strom	Schnell aktivierender und inaktivierender Kaliumstrom
α -UE	α -Untereinheit
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CPAE-Zellen	Engl.: Calf pulmonary arterial endothelial cells; Kälber-Pulmonararterien-Endothelzellen
cRNA	RNA, die aus cDNA durch <i>in-vitro</i> -Synthese erhalten wird
DCPIB	4-(2-Butyl-6,7-dichlor-2-cyclopentyl-indan-1-on-5-yl)oxybuttersäure
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's</i> -Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EST	Engl.: Expressed sequence tag
E _{Cl}	Chlorid-Gleichgewichtspotential
Fit	Elektronisches Anpassen von Ergebnissen an eine mathematische Funktion, um bestimmte charakteristische Parameter zu bestimmen
IC ₅₀	Halb-maximale Wirkkonzentration (Inhibition) eines Stoffes
$I_{Cl,swell}$	Schwellungs-aktivierter Chloridstrom
$I_{K,AA}$	$I_{K_{Kalium\ arachidonic\ acid}}$: Arachidonsäure-sensitiver Kaliumstrom des Herzens
I_{Kp}	$I_{K_{Kalium\ plateau}}$: Kaliumstrom, der während der Plateauphase des AP aktiv ist
$I_{K,PL}$	$I_{K_{Kalium\ phospholipid}}$: Phospholipid-aktivierter Kaliumstrom des Herzens
I_{Kur}	$I_{K_{Kalium\ ultra\ rapid}}$: Sehr schnell aktivierende, nicht inaktivierende kardiale Kaliumleitfähigkeit, die durch das Kv1.5-Protein kodiert wird
I_{Kr}	$I_{K_{Kalium\ rapid}}$: Schnell aktivierende kardiale Kaliumleitfähigkeit, die durch HERG-Kanäle induziert wird
I_{Ks}	$I_{K_{Kalium\ slow}}$: Langsam aktivierende kardiale Kaliumleitfähigkeit, die durch den Kaliumkanal KvLQT1 vermittelt wird

Abkürzungen

I_{to1}	$I_{\text{transient outward 1}}$: 4-Aminopyridin-sensitive, sehr schnell aktivierende und schnell inaktivierende kardiale Kaliumleitfähigkeit
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-(2-ethansulfonsäure)
HERG	Engl.: <u>H</u> uman <u>e</u> ther- <u>a</u> - <u>g</u> o- <u>g</u> o <u>r</u> elated <u>g</u> ene. Gen, das für den HERG-Kanal kodiert
$[K^+]_o$	Extrazelluläre Kaliumkonzentration
kb	Kilobase
hKChIP	Engl.: <u>H</u> uman <u>K</u> ⁺ - <u>c</u> hannel- <u>i</u> nteracting- <u>p</u> rotein
<i>hKCNI</i> P	Humanes Gen, das für das hKChIP-Protein kodiert
P	Pore
PCR	Engl.: Polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
pH _o	Extrazellulärer pH-Wert
pKi	pH-Wert, bei dem eine Inhibition von 50% erreicht wird
RACE	Engl.: Rapid amplification of cDNA ends
RT	Reverse Transkriptase
SEM	Engl.: <u>S</u> tandard <u>e</u> rror of the <u>m</u> ean
TASK	Engl.: <u>T</u> WIK-related <u>a</u> cid- <u>s</u> ensitive <u>K</u> ⁺ channel
TEA	Tetraethylammonium
TEVC	Engl.: <i>Two Electrode Voltage Clamp</i> ; Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemme
TM	Transmembran
TRAAK	Engl.: <u>T</u> WIK-related <u>a</u> rachidonic <u>a</u> cid sensitive <u>K</u> ⁺ channel
TREK	Engl.: <u>T</u> WIK-related <u>K</u> ⁺ channel
TWIK	Engl.: <u>T</u> andem of two P domains in a <u>w</u> eak <u>i</u> nward rectifying <u>K</u> ⁺ channel
$V_{1/2 \text{ act.}}$	Halb-maximale Spannung der Aktivierung
$V_{1/2 \text{ inact.}}$	Halb-maximale Spannung der Inaktivierung
V_{rest}	Ruhemembranpotential

Abkürzungen der Aminosäuren: A, Alanin; C, Cystein; D, Aspartat; E, Glutamat; F, Phenylalanin; G, Glycin; H, Histidin; I, Isoleucin; K, Lysin; L, Leucin; M, Methionin; N, Asparagin; P, Prolin; Q, Glutamin; R, Arginin; S, Serin; T, Threonin; V, Valin; W, Tryptophan; Y, Tyrosin

I	EINLEITUNG	1
I.A	Chloridkanäle	1
I.A.1	Die CLC-Superfamilie	1
I.A.2	Der CFTR-Chloridkanal.....	3
I.A.3	Der Schwellungs-aktivierte Chloridstrom ($I_{Cl,swell}$)	4
I.B	Kaliumkanäle	5
I.B.1	Kaliumkanäle mit einem Zwei-Transmembran-Domänen-Motiv (2TM-1P)	5
I.B.2	Kaliumkanäle mit einem Tandem-von-zwei-Poren-Motiv (4TM-2P)	6
I.B.3	Kaliumkanäle mit einem Sechs-Transmembran-Domänen-Motiv (6TM-1P) ...	8
I.C	Ionenkanäle, die am humanen Aktionspotential beteiligt sind	9
I.D	Arrhythmien und deren medikamentöse Therapie	12
I.E	Zielsetzung dieser Arbeit und wissenschaftliche Begründung für die Auswahl der untersuchten Ionenkanäle	14
I.E.1	Pharmakologische und elektrophysiologische Untersuchungen des kardialen $I_{Cl,swell}$	15
I.E.2	Klonierung und Analyse eines neuen kardialen Kaliumkanals mit einem Tandem-von-zwei-Poren(4TM-2P)-Motiv	16
I.E.3	Suche nach einer kardialen β -Untereinheit des hKv4.3 im humanen Herz.....	17
II	MATERIAL UND METHODEN	19
II.A	<i>Xenopus</i>-Oozyten als heterologes Expressions-System	19
II.A.1	Isolierung von Oozyten aus <i>Xenopus laevis</i>	20
II.A.2	Mikroinjektion in <i>Xenopus</i> -Oozyten	21
II.B	Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmen-Methode	23
II.B.1	Aufbau des TEVC-Messplatzes	24
II.C	<i>Patch-Clamp</i>-Methode	26
II.C.1	Die Methode	26
II.C.2	Der <i>Patch-Clamp</i> -Messplatz	28
II.C.3	Strom- und Potential-Messungen mit Hilfe der <i>Patch-Clamp</i> -Methode	30
II.C.4	Zellgrößenbestimmung atrialer Kardiomyozyten	31
II.C.5	Zellkultur der CPAE-Zellen	31
II.C.6	Kardiomyozytenpräparation.....	32
II.C.7	<i>Aortic banding</i> der Ratte zur Erreichung einer links-ventrikulären Hypertrophie.....	33
II.D	Lösungen	33
II.D.1	$I_{Cl,swell}$ in CPAE-Zellen	34
II.D.2	$I_{Cl,Ca}$ in CPAE-Zellen.....	35
II.D.3	$I_{Cl,swell}$ in <i>Xenopus</i> -Oozyten	35
II.D.4	$I_{Cl,swell}$ in Meerschweinchen-Kardiomyozyten	36
II.D.5	Aktionspotential-Messungen in Kardiomyozyten.....	36
II.D.6	I_{Ks} , I_{Kr} , I_{K1} in Meerschweinchen-Kardiomyozyten	37
II.D.7	I_{Ks} in Meerschweinchen-Kardiomyozyten während der Zellschwellung.....	38

II.D.8	I_{Na} in Meerschweinchen-Kardiomyozyten	38
II.D.9	I_{Ca} in Meerschweinchen-Kardiomyozyten	39
II.D.10	$I_{Cl,PKA}$ in Meerschweinchen-Kardiomyozyten.....	39
II.D.11	Expression von hCFTR- und CLC-Chloridkanälen in <i>Xenopus</i> -Oozyten	40
II.E	Molekularbiologische Methoden.....	40
II.E.1	Polymerasekettenreaktion	40
II.E.2	Northern-Blot-Analyse.....	41
II.E.3	Klonierung des TASK-4.....	41
II.E.4	Klonierung des hKChIP2	42
II.E.5	Konstruktion der $\Delta N2-67$ -hKv4.3long-Mutante	42
II.F	Datenauswertung und Statistik.....	42
II.F.1	Datenauswertung	42
II.F.2	Statistik.....	43
III	ERGEBNISSE	44
III.A	Pharmakologische und elektrophysiologische Untersuchungen des $I_{Cl,swell}$; Beteiligung des $I_{Cl,swell}$ am atrialen Aktionspotential und an Chloridleitfähigkeiten von Kardiomyozyten der Ratte	44
III.A.1	Identifizierung eines neuen spezifischen $I_{Cl,swell}$ -Blockers (DCPIB); Inhibition des endogenen $I_{Cl,swell}$ von <i>Xenopus</i> -Oozyten durch Acylaryloxysäure-Derivate.....	44
III.A.2	DCPIB ist ein potenter Blocker des nativen $I_{Cl,swell}$ von CPAE-Zellen und Kardiomyozyten	47
III.A.3	Spezifität von DCPIB	50
III.A.4	Effekte von DCPIB auf Kaliumströme, die am humanen Aktionspotential beteiligt sind, analysiert nach heterologer Expression in <i>Xenopus</i> -Oozyten....	55
III.A.5	Effekte der osmotischen Zellschwellung auf die kardiale Aktionspotentialdauer (APD) und auf das Ruhemembranpotential (V_{rest})	56
III.A.6	Zellgrößen-Messung der atrialen Kardiomyozyten.....	60
III.A.7	Einfluss von DCPIB auf native I_{Ks} -Ströme atrialer Kardiomyozyten während einer osmotischen Zellschwellung.....	61
III.A.8	$I_{Cl,swell}$ -Untersuchungen in normalen und hypertrophierten Rattenherzen	63
III.B	Klonierung, Expression, Pharmakologie und Gewebeverteilung eines im menschlichen Atrium exprimierten Tandem-von-zwei-Poren-Kaliumkanals (TASK-4)	66
III.B.1	Klonierung und Primärstruktur des TASK-4	66
III.B.2	Gewebeverteilung des TASK-4.....	68
III.B.3	Funktionelle Charakterisierung von TASK-4 in <i>Xenopus</i> -Oozyten.....	69
III.B.4	Pharmakologische Eigenschaften des TASK-4.....	72
III.C	Identifizierung des hKChIP2 als eine funktionelle kardiale β-Untereinheit des humanen Kv4.3.....	74
III.C.1	Klonierung des hKChIP2 sowie einer neuen kurzen hKChIP2-Spleiß-Variante	74
III.C.2	Gewebeverteilung des hKChIP2 im Menschen.....	74
III.C.3	Genomische Organisation und chromosomale Lokalisation des <i>hKCNIIP2</i> -Gens	75

Inhaltsverzeichnis

III.C.4	Charakterisierung der hKv4.3long-Ströme	77
III.C.5	Koexpression beider hKChIP2-Isoformen mit dem hKv4.3long in <i>Xenopus</i> -Oozyten.....	79
III.C.6	Koexpression von hKChIP2 mit einer N-terminalen Deletionsmutante (Δ N2-67) des hKv4.3long.....	83
IV	DISKUSSION	84
IV.A	Pharmakologie des spezifischen $I_{Cl,swell}$-Blockers DCPIB sowie der Einfluss des $I_{Cl,swell}$ auf das atriale Aktionspotential.....	84
IV.A.1	Untersuchungen des $I_{Cl,swell}$ in normalen und hypertrophierten ventrikulären Kardiomyozyten des Rattenherzens	89
IV.B	Charakterisierung des Kaliumkanals TASK-4: kardiales Expressions-Muster sowie seine mögliche physiologische und pathophysiologische Relevanz.....	90
IV.C	KChIP2 ist eine funktionelle β-Untereinheit des hKv4.3: Beteiligung an Herzinsuffizienz und Arrhythmien	93
V	ZUSAMMENFASSUNG	99
VI	LITERATURVERZEICHNIS	101
VII	CURRICULUM VITAE.....	120
VIII	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	121
IX	DANKSAGUNG	122

I Einleitung

Ionenkanäle sind Membranproteine, die hydrophile Poren durch Lipid-Doppelschichten bilden. Sie besitzen eine unterschiedliche Selektivität für Natrium-, Kalium-, Kalzium- oder Chloridionen. Ionenkanäle sind an einer Vielzahl biologischer Funktionen beteiligt, wie der Regulation des Zellvolumens, dem transepithelialen Salztransport und der Regulation des intrazellulären pH-Wertes. Sie bilden die Grundlage der elektrischen Erregbarkeit von Membranen und somit von Nerven- und Muskelzellen. Außerdem vermitteln sie die Kommunikation mit der Umwelt und leiten über Nervenbahnen Informationen innerhalb des Körpers weiter. Durch die ausgedehnte Untersuchung und Klonierung neuer Ionenkanäle hat sich in den letzten Jahren die Anzahl von potentiellen Angriffspunkten für Arzneistoffe stark erhöht. Ionenkanäle sind die Hauptangriffspunkte der bisher eingesetzten antiarrhythmischen Medikamente. Durch die weiterführende Analyse der am Aktionspotential beteiligten und der unter pathophysiologischen Bedingungen veränderten spannungsabhängigen Ionenkanäle sind neue Ansätze für die Entwicklung von Antiarrhythmika zu erwarten.

I.A Chloridkanäle

Bis vor 20 Jahren galten Chloridkanäle noch als unselektive und wenig charakterisierte „Löcher“ in Membranen (Hille, 1982). In der Zwischenzeit hat sich durch die elektrophysiologische Charakterisierung nativer Chloridströme und der Klonierung von spannungsabhängigen Chloridkanälen der CLC-Superfamilie (Jentsch *et al.*, 1999) die Vielfalt und funktionelle Bedeutung der Chloridkanäle verdeutlicht. Außerdem hat sich gezeigt, dass den Chloridströmen eine wesentlich größere physiologische Rolle zukommt als die einfache Bereitstellung einer Hintergrundleitfähigkeit zur Wahrung der Elektroneutralität.

I.A.1 Die CLC-Superfamilie

Als erstes Mitglied dieser Familie von spannungsabhängigen Chloridkanälen (engl.: chloride channel = CLC) wurde, durch Expressions-Klonierung aus dem elektrischen Organ von *Torpedo marmorata*, der CLC-0 identifiziert (Jentsch *et al.*, 1990). Die Struktur dieses Chloridkanals ähnelte keinem der bis dahin bekannten Chloridkanäle (Abbildung I.1). In den folgenden Jahren hat sich herausgestellt, dass der CLC-0 das Gründungsmitglied einer großen

Familie von Chloridkanälen ist. Seitdem wurden bei den Säugetieren neun verschiedene CLC-Gene entdeckt (Jentsch & Günther, 1997).

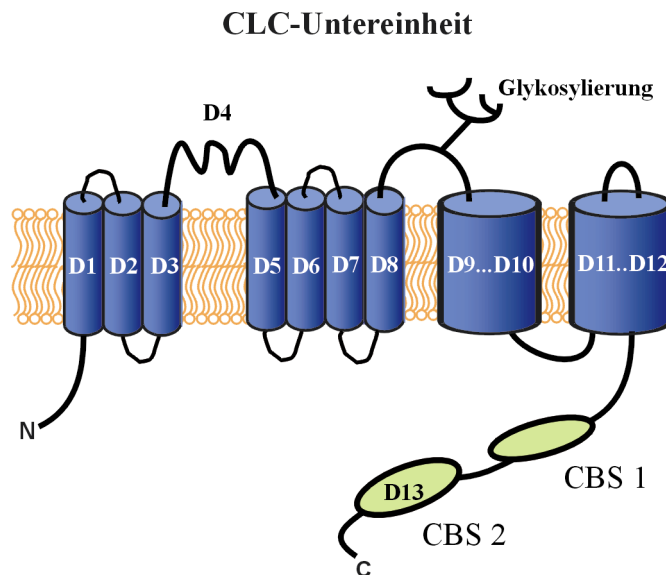


Abbildung I.1: Transmembran-Topologie der CLC-Untereinheiten. Der N- und C-Terminus der CLC-Chloridkanäle befinden sich intrazellulär. Die Kanäle besitzen 13 hydrophobe Domänen und zwei CBS-Domänen im C-Terminus. Die Domäne D4 besitzt nur eine geringe Hydrophobizität und es ist nicht klar, ob sie die Membran durchspannt. Da die große hydrophobe Region zwischen D9 bis D12 strukturell schwer zu untersuchen ist, ist es im Moment noch unklar, ob die Region drei oder fünf Transmembran-Domänen besitzt.

Die CLC-Proteine besitzen 13 hydrophobe Domänen (Jentsch *et al.*, 1990). Für die hydrophoben Domänen D4 und D13 konnte gezeigt werden, dass sie wahrscheinlich nicht die Membran durchspannen (Gründer *et al.*, 1992; Schmidt-Rose & Jentsch, 1997). Zur Zeit ist jedoch noch unklar, ob die Domänen 9 bis 12 die Lipid-Doppelschicht drei- oder fünfmal durchspannen (Jentsch *et al.*, 1999). In Säugetieren zeigen die CLCs verschiedene Gewebeverteilungen und Funktionen. Sie kontrollieren die elektrische Erregbarkeit, den transepithelialen Transport und den Ladungsausgleich, der für die Ansäuerung intrazellulärer Organellen notwendig ist (Jentsch *et al.*, 1999). Außerdem wurde eine Beteiligung an der Regulation des Zellvolumens diskutiert (Gründer *et al.*, 1992). Die physiologische Bedeutung dieser Kanäle zeigt sich an den vererbaren Krankheiten, die durch Mutationen in den Kanal-Genen hervorgerufen werden. Mutationen im CLC-1 führen zu einer spezifischen Form der Myotonie (Steinmeyer *et al.*, 1991; Koch *et al.*, 1992), während Mutationen im nierenspezifischen CLC-Kb das Bartter-Syndrom erzeugen (Simon *et al.*, 1997), welches sich durch schweren Wasser- und Salzverlust auszeichnet. Mutationen im CLC-5 führen zur Dent'schen-Krankheit (Lloyd *et al.*, 1996), bei der es zur Proteinurie und Hyperkalzurie kommt,

die als klinische Symptome Nephrokalzinose, Nierensteine und Nierenversagen auslöst. Auch die genetische Generierung von Knock-out-Mäusen hat wertvolle Informationen zur physiologischen Relevanz der CLC-Chloridkanäle geliefert. Die CLC-K1-Knock-out-Maus hat gezeigt, dass dieser Ionenkanal zur Konzentrierung des Harns in der Niere notwendig ist (Matsumura *et al.*, 1999). Der genetische Knock-out des CLC-7-Gens führte zur Osteopetrose (Kornak *et al.*, 2001), während das „Ausschalten“ des CLC-3-Gens den kompletten Verlust des Hippokampus bewirkte (Stobrawa *et al.*, 2001). Die Gewebeverteilungen, die assoziierten Erkrankungen und die vermuteten Funktionen der CLC-Mitglieder sind in der Abbildung I.2 dargestellt.

	Expression	Funktion	Krankheit/Knock-Out Maus*
CLC-1	Skelettmuskel	Stabilisierung des Membranpotentials	Myotonia congenita
CLC-2	Ubiquitär	Zellvolumenregulation ? Limitierung der intrazellulären Cl ⁻ -Konzentration ?	
CLC-Ka	Niere	Transepithelialer Cl ⁻ -Transport	Diabetes insipidus*
CLC-Kb	Niere	Transepithelialer Cl ⁻ -Transport	Bartter-Syndrom
CLC-3	breite Verteilung, insbes. Gehirn und Skelettmuskel	Ansäuerung intrazellulärer Vesikel	Verlust des Hippokampus*
CLC-4	breite Verteilung, insbes. Gehirn und Herz	Ansäuerung intrazellulärer Vesikel	
CLC-5	Niere, auch Gehirn, Leber	Ansäuerung intrazellulärer Vesikel	Dent'sche-Krankheit
CLC-6	Ubiquitär	?	
CLC-7	Ubiquitär	?	Osteopetrose*

Abbildung I.2: Familienstammbaum, Gewebeverteilung im Menschen, vermutete Funktion und die mit den CLC-Familienmitgliedern assoziierten Erkrankungen bzw. der Phänotyp der Knock-out-Maus (modifiziert nach Jentsch *et al.*, 1999).

I.A.2 Der CFTR-Chloridkanal

Der humane CFTR (engl.: Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator) ist ein Mitglied der Gen-Familie der ATP-Bindungs-Kassetten(ABC)-Transporter (Abbildung I.3). Mitglieder dieser Superfamilie sind unter anderem der MDR-Transporter (engl.: Multidrug Resistance) und der Sulfonylharnstoff-Rezeptor (engl.: Sulfonylurea Receptor = SUR), der die Inhibition der K_{ATP}-Kanäle, welche aus heteromeren Komplexen von SUR und K_{ir}-Untereinheiten bestehen, durch die Sulfonylharnstoffe vermittelt (Ammala *et al.*, 1996). Der CFTR ist ein cAMP-aktivierter Chloridkanal und Regulator von physiologischen Prozessen, wie der Aktivierung von auswärts-rektifizierenden Chloridkanälen (engl.: outwardly rectifying chloride channels = ORCC) (Egan *et al.*, 1992; Gabriel *et al.*, 1993) und der Hemmung von epithelialen Natriumkanälen (Boucher *et al.*, 1986; Stutts *et al.*, 1995; Ismailov *et al.*, 1996).

Mutationen im CFTR-Gen verursachen die als Zystische Fibrose (CF) bekannte Krankheit. Die Regulation der oben erwähnten Kanäle geht jedoch verloren, wenn der CFTR nicht anwesend oder aufgrund einer Mutation in seiner Funktion stark beeinträchtigt ist. An der Aktivierung der Chloridleitfähigkeit des CFTR sind Phosphorylierungen an den beiden Nukleotid-Bindungs-Domänen (NBD) und der regulatorischen Domäne (R-Domäne) beteiligt.

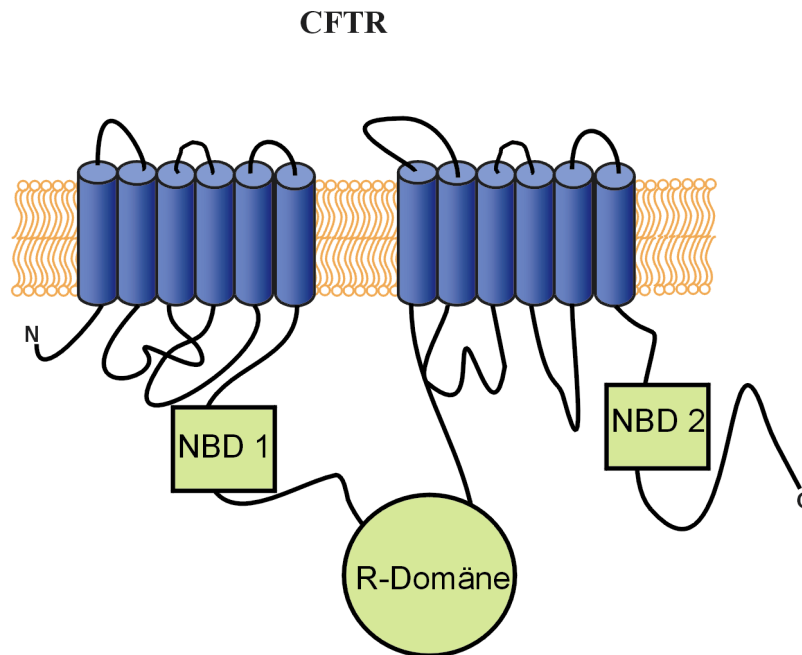


Abbildung I.3: Transmembran-Topologie des humanen CFTR-Proteins. Das Protein besitzt je zweimal sechs Transmembran(TM)-Domänen. Nach den ersten sechs TM-Domänen folgt eine Nukleotid-Bindungs-Domäne (NBD) und eine regulatorische Domäne (R-Domäne). Im C-Terminus des CFTR befindet sich eine zweite NBD-Domäne.

I.A.3 Der Schwellungs-aktivierte Chloridstrom ($I_{Cl,swell}$)

Der Schwellungs-induzierte Chloridstrom $I_{Cl,swell}$ ist in den meisten Zellen zu finden (Nilius *et al.*, 1994; Okada, 1997), unter anderem auch im Herzen von Säugetieren (Sorota, 1992; Sakai *et al.*, 1995). Dort spielt er wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellvolumens. Der $I_{Cl,swell}$ ist permeabel für eine Vielzahl von Anionen, Aminosäuren und organischen Osmolyten. Das Öffnen und Schließen des $I_{Cl,swell}$ -Kanals wird voraussichtlich über einen komplexen Mechanismus reguliert, an dem Tyrosinphosphorylierungen, der Zytoskelett-Organisator RhoA, Änderungen der Ionenstärke und auch das Protein Caveolin essentiell beteiligt sind. Als funktionelle Rolle wird neben der Regulation des Zellvolumens auch eine Funktion als Mechano-Sensor im Endothelium, die Regulierung der endothelialen Zellprolifera-

tion und vielleicht auch die Beteiligung an der Angiogenese diskutiert. Das Gen, welches für diesen Kanal kodiert, ist jedoch noch nicht bekannt. Als mögliche Kandidaten wurden unter anderem die Proteine pI_{Cl} , CLC-2 und MDR (P-Glykoprotein) diskutiert (Clapham, 1998). Insbesondere der CLC-3-Chloridkanal wurde lange für den $I_{Cl,swell}$ gehalten (Duan *et al.*, 1997). Die Einzelkanalleitfähigkeit, Spannungsabhängigkeit, Anionenselektivität, pH-Abhängigkeit und Pharmakologie des nativen $I_{Cl,swell}$ unterscheiden sich jedoch von den Eigenschaften des CLC-2 (Okada, 1997). *Patch-Clamp*-Untersuchungen mit kombinierten molekularbiologischen Analysen haben gezeigt, dass das P-Glykoprotein nicht der $I_{Cl,swell}$ selbst ist, sondern nur ein Regulator-Protein der Volumensensitivität darstellt (Okada, 1997). Für pI_{Cl} wurde inzwischen gezeigt, dass es kein Chloridkanal, sondern ein Regulator eines Chloridkanals ist, der jedoch nicht mit dem $I_{Cl,swell}$ identisch ist (Clapham, 1998). Auch der CLC-3 scheidet als Kandidatengen für den $I_{Cl,swell}$ aus, da Zellen der CLC-3-Knock-out-Maus nach wie vor den typischen Schwellungs-aktivierten Chloridstrom besitzen (Stobrawa *et al.*, 2001).

I.B Kaliumkanäle

I.B.1 Kaliumkanäle mit einem Zwei-Transmembran-Domänen-Motiv (2TM-1P)

Die Mitglieder der K_{ir} -Familie besitzen zwei Transmembran(TM)-Domänen (M1 und M2) und eine Poren-formende Interdomäne (P). Der funktionelle Kaliumkanal besteht aus einem Tetramer dieser Proteine, so dass, wie bei den anderen Kaliumkanälen auch, vier Poren-formende Interdomänen an der Bildung der Pore beteiligt sind. Die Poren-formende Interdomäne enthält jeweils ein „GYG“-Motiv (Aminosäuren: Glycin-Tyrosin-Glycin), welches den Selektivitätsfilter für Kalium bildet. Die Einwärts-Rektifizierung der K_{ir} (engl.: *inwardly rectifying*) α -Untereinheit wird durch die Blockade der Kanalpore mit zytoplasmatischen Mg^{2+} -Ionen und Polyaminen, wie dem Spermin und Spermidin, vermittelt. Dadurch wird bei positivem Membranpotential der Zelle der Auswärtsstrom von Kaliumionen verhindert. Die $K_{ir2.x}$ -Unterfamilie erzeugt den I_{K1} -Strom des humanen Herzens, der im wesentlichen am Aufbau des Ruhemembranpotentials und der späten Phase der Repolarisation während des kardialen Aktionspotentials beteiligt ist. Die Mitglieder der $K_{ir3.x}$ -Unterfamilie kodieren für den über G-Proteine regulierten $I_{K,ACH}$ -Strom, während der $K_{ir6.2}$ zusammen mit dem SUR2A-Protein den kardialen $I_{K,ATP}$ bildet.

K_{ir} -Untereinheiten

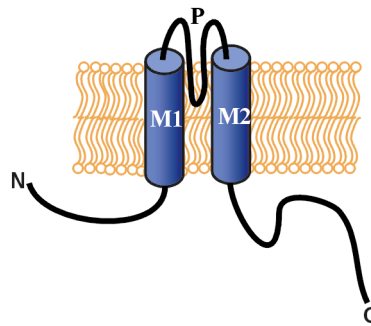


Abbildung I.4: Transmembran-Topologie der K_{ir} -Untereinheiten. Das K_{ir} -Protein besteht aus zwei Transmembran-Domänen (M1 und M2) und einer Poren-formenden Interdomäne (P), die auch den Selektivitätsfilter der Pore beinhaltet. Der N- und C-Terminus des Kaliumkanals sind intrazellulär lokalisiert. Der funktionelle Ionenkanal wird durch ein Tetramer dieser Proteine geformt.

I.B.2 Kaliumkanäle mit einem Tandem-von-zwei-Poren-Motiv (4TM-2P)

Die Kaliumkanäle der Tandem-von-zwei-Poren-Proteine gehören zu einer stark expandierenden Superfamilie, deren Mitglieder durch die Bereitstellung einer Hintergrund- oder Leckleitfähigkeit stark zum Aufbau des Ruhemembranpotentials vieler Gewebe beitragen. Es gibt zwei unterschiedliche Typen von Zwei-Poren-Domänen-Strukturen (2P), die entweder acht oder vier Transmembran-Segmente (TM) besitzen (8TM-2P oder 4TM-2P) (Ketchum *et al.*, 1995; Goldstein *et al.*, 1996). Insbesondere der 4TM-2P-Typ (Abbildung I.5) scheint sehr weit verbreitet zu sein, da allein das Genom des Nematoden *Caenorhabditis elegans* über 50 Gene enthält, die für Ionenkanäle dieses Musters kodieren (Salkoff *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1996; Goldstein *et al.*, 1998; Lesage & Lazdunski, 2000). TWIK-1 war bei den Säugetieren der erste Vertreter dieser Klasse von 4TM-2P-Kaliumkanälen (Lesage *et al.*, 1996a), die neben den TWIK-Kanälen noch drei weitere Familien mit den Namen TASK, TREK und TRAAK enthält. Die Mitglieder dieser Gen-Familie (*KCNK*-Gene) zeichnen sich durch eine meist geringe Sequenzhomologie untereinander aus. Die kodierten Kaliumkanäle werden durch eine Vielzahl von physiologischen Stimuli reguliert und besitzen eine typische Pharmakologie. Die heterologe Expression des TWIK-1 und TWIK-2 führt zu schwach einwärts-rektifizierenden Strömen, die durch Proteinkinase C reguliert und durch absinkenden intrazellulären pH-Wert gehemmt werden (Lesage *et al.*, 1996a; Chavez *et al.*, 1999). TREK-1 und TREK-2 werden ähnlich wie der TRAAK-Kanal durch mechanischen Stress und freie Fettsäuren aktiviert (Maingret *et al.*, 1999; Bang *et al.*, 2000).

Tandem-von-zwei-Poren-Untereinheiten

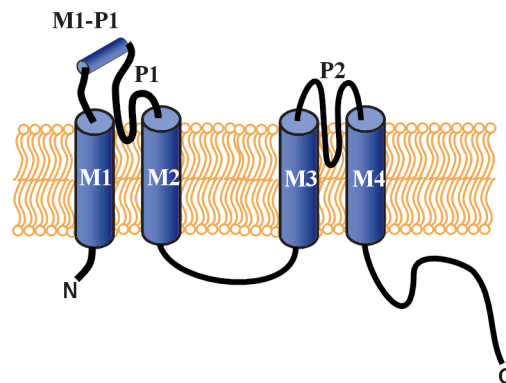


Abbildung I.5: Transmembran-Topologie der Tandem-von-zwei-Poren-Untereinheiten. Die Proteine dieser Familie bestehen aus vier Transmembran-Domänen (4TM) und zwei Poren-formenden Interdomänen (2P). Der N- und C-Terminus des Ionenkanals sind intrazellulär lokalisiert. Demnach bestehen diese Proteine scheinbar aus einem kovalenten Dimer von K_{ir} -artigen Proteinen. Zusätzlich besitzen diese 4TM-2P-Kanäle eine extrazelluläre M1-P1-Interdomäne nach der ersten transmembranären Domäne, in der unter anderem die N-verknüpften-Glykosylierungsstellen liegen. Das funktionelle Kanalprotein wird durch Dimerisierung der beschriebenen Proteine geformt, so dass wie bei den anderen Kaliumkanälen vier Poren-formende Untereinheiten im nativen Kanal vorhanden sind.

TASK-1, TASK-2 und TASK-3 erzeugen Kalium-Auswärtsströme, die durch einen Abfall des extrazellulären pH-Wertes gehemmt werden. Die Auswärts-Rektifizierung der TASK-Ströme geht bei hohen extrazellulären Konzentrationen von Kaliumionen verloren, wodurch sich diese Kanäle als *Offene-Rektifizierer* identifizieren, da die durch sie erzeugten Ströme der Goldman-Hodgkin-Katz-Formel für einen offenen Ionenkanal gehorchen. Demnach wird die Rektifizierung dieser Kaliumkanäle nur durch den physiologischen Konzentrationsgradienten der Kaliumionen hervorgerufen. Kaliumkanäle mit einem Zwei-Poren-Motiv sind generell relativ insensitive für klassische Kaliumkanalblocker, wohingegen einige von ihnen durch Inhalationsanästhetika und den neuroprotektiven Wirkstoff Riluzol aktiviert werden können (Fink *et al.*, 1998).

Im Ventrikel von Meerschweinchen wurde ein kleiner, nicht zeitabhängiger Kaliumstrom (I_{Kp}) beschrieben (Yue & Marban, 1988; Backx & Marban, 1993), dessen Eigenschaften keinem der klonierten 6TM-1P-Kaliumkanäle oder der 2TM-1P-Kaliumkanäle ähneln. Einige Mitglieder der 4TM-2P-Kaliumkanal-Familie erzeugen aber Ströme mit dieser für „Hintergrund-leitfähigkeiten“ charakteristischen Kinetik. Obwohl die Beteiligung von TWIK- und TASK-Strömen diskutiert wird, ist die exakte Komposition des I_{Kp} -Stroms (p = Plateau) jedoch noch nicht bekannt (Snyders, 1999).

Der I_{Kp} -Strom hat seinen Namen durch die Bereitstellung einer Kaliumleitfähigkeit während der Plateauphase des Aktionspotentials erhalten. Weitere I_{Kp} -artige Ströme wurden im Atrium und Ventrikel von Tieren nachgewiesen, wie der Arachidonsäure-sensitive $I_{K,AA}$ (engl.: arachidonic acid = AA) und der Phospholipid-sensitive $I_{K,PL}$ (engl.: phospholipid) von denen man ebenfalls annimmt, dass sie von 4TM-2P-Proteinen kodiert werden (Carmeliet, 1999).

I.B.3 Kaliumkanäle mit einem Sechs-Transmembran-Domänen-Motiv (6TM-1P)

Diese Superfamilie von Kaliumkanälen besitzt sechs Transmembran-Domänen. Die vierte Transmembran-Domäne fungiert aufgrund ihrer positiven Ladung, die durch mehrere Lysin-Aminosäuren bedingt ist, als Spannungssensor. Ähnlich wie bei den 2TM-1P- und 4TM-2P-Proteinen besitzt das 6TM-1P-Protein eine Poren-formende Interdomäne (P oder H5), die sich zwischen dem Transmembran-Segment S5 und S6 befindet. Mitglieder dieser Familie sind die Kv-Kanäle mit den Kv1-, Kv2-, Kv3- und Kv4-Gen-Familien, die den *Shaker*-, *Shab*-, *Shaw*- und *Shal-Drosophila*-Gen-Familien entsprechen. Auch der humane Verwandte des *Eag-Drosophila*-Proteins, das HERG-Protein, und die Mitglieder der KvLQT-Familie besitzen diese Membran-Topologie.

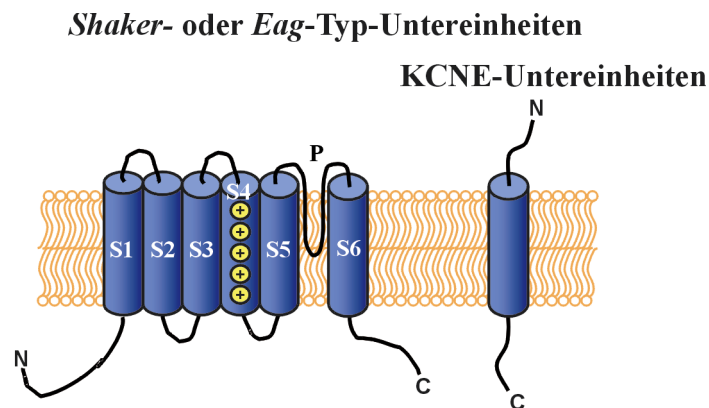


Abbildung I.6: Transmembran-Topologie der Kaliumkanal-Untereinheiten vom *Shaker*- oder *Eag*-Typ mit sechs Transmembran-Domänen. Der N- und der C-Terminus sind intrazellulär lokalisiert. Im S4-Segment wird durch positiv geladene Lysin-Aminosäuren der sogenannte Spannungssensor gebildet. Zwischen dem S5- und S6-Segment liegt die Porenschleife (P oder H5), die auch den Selektivitätsfilter innerhalb der Pore bildet. Der funktionelle Kanal wird aus jeweils vier dieser Transmembran-Proteine gebildet. Einige Mitglieder dieser Strukturklasse bilden heteromere Proteinkomplexe mit regulatorischen Untereinheiten der KCNE-Familie.

Die Kanäle dieser Superfamilie sind beim Ruhemembranpotential geschlossen, wobei sie auf Depolarisation hin mit unterschiedlicher Geschwindigkeit öffnen und abhängig von der Kinetik der anschließenden Inaktivierung entweder anhaltende oder transiente Auswärtsströme verursachen. Einige Mitglieder dieser Familie (z. B. HERG, KvLQT1) werden in ihrer Aktivität und Kinetik durch KCNE-Proteine wie dem MinK (KCNE1) und MiRP1 (KCNE2) reguliert. Während des Aktionspotentials des Herzens aktivieren mindestens ein transienter und mehrere verzögert aktivierende, rektifizierende Kaliumströme, welche die Dauer des Aktionspotentials kontrollieren.

Eine spezielle Klasse der 6TM-1P-Kaliumkanal-Familie stellen die Mitglieder der HCN-Familie dar, welche die sogenannten Schrittmacherströme bewirken. Die Ionenkanäle dieser Familie aktivieren bei einer Hyperpolarisation der Membran und sind durch cAMP-Bindung reguliert (engl.: hyperpolarisation activated cyclic nucleotide binding protein = HCN). Aufgrund der untypischen Aktivierung durch Hyperpolarisation und der gemischten Natrium-Kalium-Leitfähigkeit wurde dieser Schrittmacherstrom im Herzen als I_f (engl.: funny = f) bezeichnet. Die Mitglieder der HCN-Familie bestimmen über den depolarisierenden Einwärtsstrom während der Diastole die Geschwindigkeit der diastolischen Depolarisation und somit die Herzfrequenz. Da die Aktivierung der HCNs durch die Bindung von cAMP zu mehr positiven Spannungen verschoben wird, bewirkt der mit der Aktivierung des Sympathikus verbundene Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels eine gesteigerte Aktivität der HCN-Kanäle und somit eine stärker diastolische Depolarisation, die in der Zunahme der Herzfrequenz resultiert.

I.C Ionenkanäle, die am humanen Aktionspotential beteiligt sind

Das Aktionspotential des menschlichen Herzens (Abbildung I.7) wird vor allem durch spannungsabhängige Ionenkanäle bestimmt. Hierbei sind Natrium-, Kalium-, Kalzium- aber auch Chloridkanäle beteiligt. Kaliumkanäle sind sowohl für den Aufbau des kardialen Ruhemembranpotentials als auch für die Repolarisation der kardialen Membranen während des Aktionspotentials verantwortlich. Daher sind Kaliumkanäle maßgeblich an der Formung des Aktionspotentials beteiligt. Durch die Expression verschiedenartiger Kaliumkanäle, das variable Expressions-Niveau in unterschiedlichen funktionellen Abschnitten des Herzens sowie auch innerhalb der Muskelschichten des Myokards erklärt sich die unterschiedliche Länge und Verlaufsform der Aktionspotentiale (Barry & Nerbonne, 1996).

Dem I_{K1} -Strom kommt eine große Bedeutung bei der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials in der späten Repolarisationsphase des Aktionspotentials zu. Die stark einwärts-rektifizierenden I_{K1} -Ströme wurden sowohl in den menschlichen Vorhöfen (Heidbüchel *et al.*, 1990), als auch in den Ventrikeln (Varro *et al.*, 1993) nachgewiesen. Mit Ausnahme des Sinoatrial- und Atrioventrikular-Knotens bestimmt der I_{K1} maßgeblich das Ruhemembranpotential der Kardiomyozyten (Irisawa *et al.*, 1993). Dem I_{K1} unterliegen die Einwärts-Rektifizierer der Kir2.x-Unterfamilie, wobei bisher Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3 und Kir2.4 im Herzen nachgewiesen wurden (Barry & Nerbonne, 1996).

In den Schrittmacherzellen des Sinoatrial- und Atrioventrikular-Knotens wird die fortschreitende Depolarisation (Phase 4 des Aktionspotentials), welche zum Erreichen des Schwellenpotentials der Kalziumkanäle führt, vor allem durch Schrittmacherkanäle der HCN-Familie bewirkt (Snyders, 1999). Im Arbeitsmyokard, in dem der schnelle Aufstrich des Aktionspotentials (Phase 0) durch einen Natrium-Einwärtsstrom getragen wird, werden diese den I_f -Strom vermittelnden HCN-Kanäle nur gering exprimiert. Zusätzlich findet sich in den Zellen des Sinoatrial-Knotens der durch die Kir3.x-Unterfamilie gebildete $I_{K,ACH}$ -Strom, der durch den Parasympathikus über M_2 -muskarinische Azetylcholinrezeptoren reguliert wird und somit ebenfalls an der Bestimmung der Herzfrequenz beteiligt ist (Kurachi *et al.*, 1992).

In der Phase 1 des Aktionspotentials, in der die Repolarisation der kardialen Membranen beginnt, werden die als I_{to} (engl.: transient outward) und I_{Kur} (engl.: ultra rapid) (Boyle & Nerbonne, 1991) bezeichneten Kaliumströme aktiviert. Der I_{to} -Strom wird weiter in eine 4-Aminopyridin-sensitive Komponente (I_{to1}) und einen kleineren, durch Chloridströme getragenen Strom (I_{to2}) unterteilt. Als molekulare Bestandteile des I_{to1} werden die schnell inaktivierenden Kaliumkanäle Kv1.4, Kv4.2 und Kv4.3 diskutiert. Der native I_{Kur} -Strom wird durch Kv1.5-Kanäle hervorgerufen, möglicherweise aber auch teilweise durch Kv3.1- und Kv1.2-Ströme (Deal *et al.*, 1996; Snyders, 1999).

In den Phasen 2 (Plateauphase) und 3 (Repolarisationsphase) des Aktionspotentials ist der I_K -Strom, welcher der stärkste repolarisierende Strom in Herzmuskelzellen ist, von Bedeutung. Es werden zwei Hauptkomponenten des I_K unterschieden (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990 und 1991). Die erste, schneller aktivierende Komponente ist der I_{Kr} -Strom und die zweite, langsamere Komponente wird als I_{Ks} -Strom bezeichnet. Der I_{Kr} -Kanal wird durch das HERG-

Protein und die β -Untereinheit MiRP1 gebildet (Abbott *et al.*, 1999), während der I_{Ks} -Kanal vom KvLQT1-Protein und der β -Untereinheit MinK gebildet wird (Sanguinetti *et al.*, 1996).

In der Phase 4 des Aktionspotentials werden die kardialen Membranen vor allem durch den I_{K1} -Strom, also durch Kanäle der Kir2.x-Unterfamilie repolarisiert, und anschließend wird das Ruhemembranpotential stabilisiert, bevor durch die diastolische Depolarisation ein neues Aktionspotential ausgelöst wird.

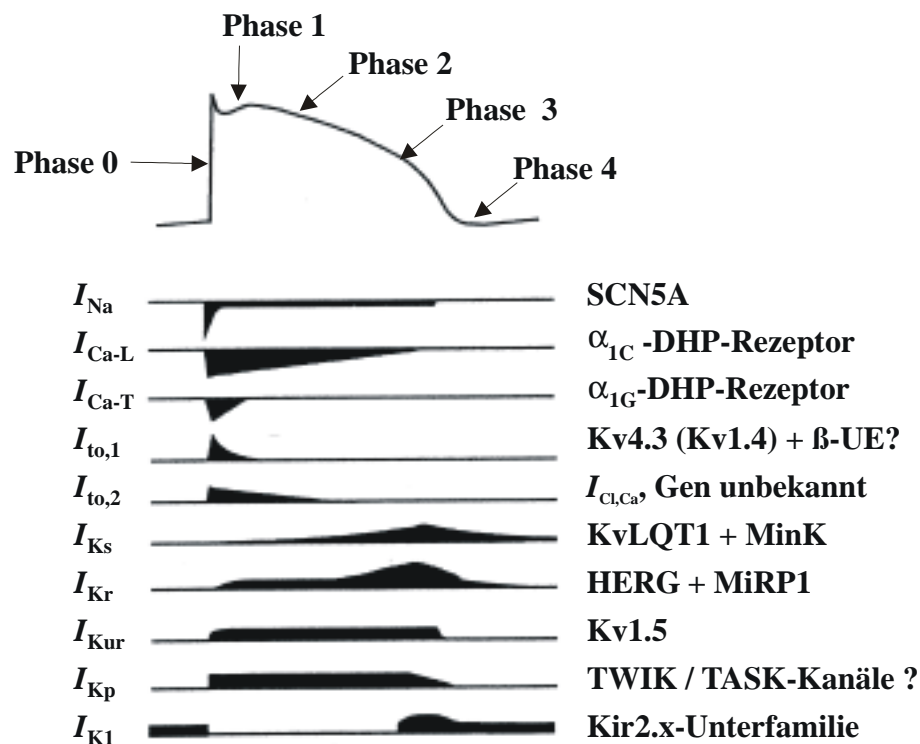


Abbildung I.7: Das humane kardiale Aktionspotential (AP) mit den dazu beitragenden Ionenströmen und Aktionspotentialphasen (modifiziert nach Snyders *et al.*, 1999). Flächen unterhalb der Basislinie bedeuten Einwärtsströme, Flächen oberhalb Auswärtsströme. Auf der linken Seite ist der Name des nativen Stroms angegeben und auf der rechten Seite der Name des wahrscheinlichen Gens. Der Natrium-Einwärtsstrom (I_{Na}) bestimmt im Arbeitsmyokard den schnellen Aufschlag des Aktionspotentials, der durch die Inaktivierung der Natriumkanäle und die schnell öffnenden Kaliumkanäle (I_{to1}) beendet wird. In der Plateauphase halten sich Kalium-Auswärtsströme (I_{Kur} und I_{Kp}) und Kalzium-Einwärtsströme (über L- und T-Typ-Kalziumkanäle, I_{Ca-L} und I_{Ca-T}) das Gleichgewicht. I_{Ks} und I_{Kr} sind für die Repolarisation der Zellen verantwortlich, wie auch der I_{K1} -Strom, der durch die einwärts-rectifizierenden Kir2-Kanäle gebildet wird. Weitere Erklärungen im Text.

Außerdem sind im Herzen Ionenkanäle exprimiert, die unter physiologischen Bedingungen während des Aktionspotentials nur eine geringe Aktivität zeigen. Hierzu gehören Kanäle, die für die Entstehung des $I_{K,ATP}$ -, des $I_{Cl,swell}$ - und des $I_{Cl,PKA}$ -Stroms verantwortlich sind. Unter physiologischen intrazellulären ATP-Konzentrationen sind die K_{ATP} -Kanäle des Herzens, die

aus Kir6.2 und SUR2a gebildet werden, vorwiegend geschlossen. Unter pathophysiologischen Bedingungen, die mit einem absinkenden ATP-Spiegel einhergehen, zeigt sich hingegen eine verstärkte $I_{K,ATP}$ -Leitfähigkeit, die zur Verkürzung der Aktionspotentialdauer führt (Faivre & Findlay, 1990). Der $I_{Cl,PKA}$ -Chloridstrom wird durch das CFTR-Protein gebildet und durch Proteinkinase A oder erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel aktiviert. Der Schwellungs-aktivierte Chloridstrom $I_{Cl,swell}$ besitzt in Kardiomyozyten nur eine geringe basale Leitfähigkeit, die aber experimentell durch osmotisches Schwellen der Zellen stark gesteigert werden kann.

I.D Arrhythmien und deren medikamentöse Therapie

Herzrhythmusstörungen können auf einer Störung der Erregungsbildung, der Erregungsleitung oder auf einer Kombination beider Ursachen basieren. Die kardialen Rhythmusstörungen lassen sich in tachykarde und bradykarde Arrhythmien einteilen. Je nach Lokalisation der Arrhythmie wird zwischen supraventrikulären (atrialen) und ventrikulären Formen unterschieden. Atriale Arrhythmien treten häufiger auf als ventrikuläre, wobei die Häufigkeit mit dem Alter stark ansteigt. Die etwas selteneren, ventrikulären Arrhythmien können zum plötzlichen Herztod führen (Jalife, 2000; Nattel *et al.*, 2000). Kammerflattern (bis zu 300 Erregungen/min) und Kammerflimmern (bis zu 500 Erregungen/min) führen durch die hohen Frequenzen der Ventrikelerregungen dazu, dass kein koordinierter Blutauswurf mehr gewährleistet werden kann. Die dadurch auftretende Ischämie führt zur schnellen Schädigung von Hypoxie-sensiblen Organen wie dem Gehirn und dem Herzen selbst. Bei Fibrillationen besteht aufgrund der gestörten Hämodynamik ein stark erhöhtes Risiko für Embolien, wodurch es bei der atrialen Fibrillation häufig zum zerebralen Insult („Hirnschlag“) kommt.

Bereits vorhandene Arrhythmien begünstigen die Entstehung weiterer Arrhythmien. Die Grundlage hierfür könnte das als „elektrisches *Remodelling*“ bezeichnete Phänomen sein (Nattel *et al.*, 2000). Langanhaltende Arrhythmien führen zu dauerhaften Veränderungen in der Expression bestimmter Ionenkanäle und Ionentransporter wie des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals, des Kv4.3-Kanals oder der Kalzium-ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum. Das elektrische *Remodelling* lässt sich experimentell durch eine hochfrequente Stimulation des Herzens mit einem Schrittmacher (engl.: *rapid pacing*) im Tierversuch nachahmen. Aufgrund der im Tiermodell verwendeten kurzen Stimulationsdauer sind die auftretenden Veränderungen im Gegensatz zur chronischen Arrhythmie des Patienten meist reversibel.

Einleitung

Die Substanzen zur Therapie tachykarder Herzrhythmusstörungen und Extrasystolen werden nach Vaughan Williams aufgrund ihres Wirkungsmechanismus eingeteilt. In Tabelle I.1 sind die Wirkungen der verschiedenen Substanzklassen und ihre Angriffspunkte am Aktionspotential aufgeführt.

Tabelle I.1: Die Tabelle zeigt die Einteilung der Antiarrhythmika nach Vaughan Williams mit Beispielen therapeutisch eingesetzter Wirkstoffe. Außerdem sind die verschiedenen molekularen Angriffspunkte und Wirkungen der Antiarrhythmika sowie die Aktionspotentialphasen, in denen sie ihre Wirkung ausüben, aufgeführt.

Klasse	AP-Phase	Substanzklasse	Wirkungen	Wirkstoffe
IA, B, C	0	Natriumkanalblocker	-Abnahme der Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials und somit Verringerung der Leitungsgeschwindigkeit -Verlangsamter Anstieg des Generatorpotentials -Erhöhung der Depolarisationsschwelle -Zunahme der Gesamtrefraktärzeit -Herabsetzen der Kontraktionskraft des Herzens IA: -Verlängerung der Aktionspotentialdauer (QRS- und QT-Intervall) IB: -Geringe Verlängerung der Aktionspotentialdauer -Wirkung vorwiegend auf die Kammern IC: -Geringe Verlängerung der Aktionspotentialdauer -QRS-Erweiterung bei Ruhfrequenzen	IA: -Chinidin -Dajmium -Disopyramid IB: -Lidocain -Tocainid -Phenytoin IC: -Encainid -Flecainid -Propafenon
II	4	β -Adrenozeptorenblocker	-Antiadrenerge Wirkung -Herabsetzung der atrioventrikulären Überleitung	-Propranolol -Metoprolol
III	3	Kaliumkanalblocker	-Verlängerung des Aktionspotentials durch Blockade von repolarisierenden Kaliumströmen	-Sotalol -Amiodaron
IV	2	Kalziumkanalblocker	-Verminderung der Depolarisationsgeschwindigkeit im Sinuatrial- und Atrioventrikular-Knoten, daher Verlängerung der atrioventrikulären Überleitung -Erhöhung der effektiven Refraktärzeit -Unterdrückung von Nachpotentialen	-Verapamil -Diltiazem

Viele der zur Zeit verwendeten Antiarrhythmika sind jedoch mit Zurückhaltung einzusetzen, da insbesondere für einige Antiarrhythmika der Klassen I und III proarrhythmogene Wirkungen und im Vergleich zu Placebo erhöhte Mortalitäten nachgewiesen wurden (Pratt & Moye, 1990; Waldo *et al.*, 1996). Nur mit β -Adrenozeptorenblockern und Amiodaron konnte in klinischen Studien die Mortalitätsrate im Vergleich zu Placebo gesenkt werden (Lichstein *et al.*, 1983; Cairns *et al.*, 1997; Julian *et al.*, 1997). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit für die Suche nach neuen Angriffspunkten bei der pharmakologischen Therapie von Herzrhythmusstörungen.

I.E Zielsetzung dieser Arbeit und wissenschaftliche Begründung für die Auswahl der untersuchten Ionenkanäle

Ziel dieser Arbeit war die pharmakologische und elektrophysiologische Charakterisierung kardialer Ionenkanäle, die am normalen oder pathophysiologisch veränderten humanen Aktionspotential beteiligt sind. Der Schwerpunkt dieser Doktorarbeit lag auf der Identifizierung neuer potentieller Targets für die Entwicklung von Antiarrhythmika. Hierfür wurden drei verschiedene Ansatzpunkte gewählt.

In den vergangenen Jahren hat man sich in der Forschung und Entwicklung neuer antiarrhythmischer Medikamente auf Inhibitoren von Kaliumkanälen konzentriert. Für die Entwicklung neuer Klasse-III-Antiarrhythmika ist, neben dem Auffinden von spezifischen Modulatoren für bekannte Ionenkanäle, eine weiterführende Analyse aller am humanen Aktionspotential beteiligten Kaliumkanäle notwendig. Dies beinhaltet die Identifizierung, Klonierung und elektrophysiologische Charakterisierung neuer Kaliumkanäle sowie ihrer regulatorischen Untereinheiten.

Die Bedeutung der Chloridkanäle für das Aktionspotential ist noch sehr wenig untersucht. Chloridkanäle sind jedoch sehr wahrscheinlich an der Modulierung des Aktionspotentials beteiligt. Die Blockade von Anionenkanälen wäre ein völlig neuer Ansatz für die Entwicklung von Medikamenten, die in die Erregbarkeit kardialer Zellen und somit in die rhythmischen Prozesse des Herzens eingreifen. Bisher fehlen jedoch spezifische Chloridkanalblocker, um die Bedeutung nativer Chloridströme für das kardiale Aktionspotential in Kardiomyozyten zweifelsfrei nachzuweisen.

Viele herkömmliche Antiarrhythmika können zur Induktion lebensbedrohlicher ventrikulärer Arrhythmien führen. Dies zeigt, dass es wichtig ist, zwischen vorwiegend atrial und ventrikulär wirksamen Substanzen zu unterscheiden. Insbesondere bei der Suche nach Antiarrhythmika für die Therapie von atrialen Rhythmusstörungen sollten die pharmakologischen Angriffspunkte vorwiegend auf die Vorhöfe beschränkt sein, um Störungen der Ventrikel auszuschließen.

**I.E.1 Pharmakologische und elektrophysiologische
Untersuchungen des kardialen $I_{Cl,swell}$**

In *Patch-Clamp*-Experimenten an isolierten Herzzellen kann durch Anlegen eines Überdrucks über die *Patch*-Pipette (Hagiwara *et al.*, 1992) oder durch das osmotische Schwellen der Zellen eine geringe Depolarisation des Ruhemembranpotentials (V_{rest}) (Akiyama & Fozzard, 1975; Ehara & Hasegawa, 1983; Zhang *et al.*, 1993; Du & Sorota, 1997) und eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer erzielt werden (Kawata *et al.*, 1974; Ehara & Hasegawa, 1983; Vandenberg *et al.*, 1997). Studien am isolierten ventrikulären Gewebe zeigten, dass während einer Ischämie und nachfolgender Reperfusion eine Zellschwellung auftritt (Tranum-Jensen *et al.*, 1981; Jennings *et al.*, 1986, Garcia-Dorado & Oliveras, 1993), die in der gleichen Größe bei isolierten Zellen (Hagiwara *et al.*, 1992; Sorota, 1992) zur Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ -Stroms führt (Sorota, 1994; Hiraoka *et al.*, 1998). Ischämie und Reperfusion sind oft mit kardialen Arrhythmien assoziiert (Janse & Wit, 1989), wobei man annehmen kann, dass die Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ und die damit verbundene Aktionspotential-Verkürzung an der Entstehung von Arrhythmien beteiligt sein könnte (Hiraoka *et al.*, 1998; Mulvaney *et al.*, 2000). Der kardiale $I_{Cl,swell}$ wurde in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten von vielen Säugetieren und auch dem Menschen beschrieben und ist sehr wahrscheinlich vorwiegend im atrialen Gewebe und im Atrioventrikular-Knoten zu finden (Hagiwara *et al.*, 1992; Sorota, 1992; Vandenberg *et al.*, 1994; Sakai *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996). Daher könnte die Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ einen größeren Einfluss auf die atriale als auf die ventrikuläre elektrische Aktivität besitzen. Der $I_{Cl,swell}$ könnte daher eine Rolle in der Kontrolle der elektrischen Aktivität von atrialem Gewebe und vielleicht auch dem Sinoatrial-Knoten spielen (Hiraoka *et al.*, 1998; Mulvaney *et al.*, 2000). Während es mehrere Studien gibt, die den Beitrag des $I_{Cl,swell}$ an Schwellungs-induzierten elektrischen Veränderungen von ventrikulären Zellen untersuchten, gab es bisher keine Studie, welche die Funktion des $I_{Cl,swell}$ im atrialen Aktionspotential analysierte. Ein selektiver Blocker des $I_{Cl,swell}$ würde es erlauben, spezifisch den Beitrag des $I_{Cl,swell}$ an Schwellungs-induzierten Veränderungen des atrialen Aktionspotentials zu bestimmen, ohne andere kardiale Ströme, die essentiell an der Generierung und Formung des Aktionspotentials beteiligt sind, zu beeinflussen.

Pathophysiologische Zustände des Herzens können mit einer erhöhten mechanischen Belastung einhergehen. Insbesondere bei der atrialen Fibrillation und der Herzinsuffizienz kommt es zum erhöhten mechanischen Stress, der über eine „mechano-elektrische Rückkopplung“ an der

Entstehung von Arrhythmien beteiligt sein könnte (Nazir & Lab, 1996; Bode *et al.*, 2001). Ob der $I_{Cl,swell}$, der ebenfalls über mechanischen Stress aktivierbar ist, an diesen Effekten beteiligt ist, ist jedoch noch unklar. Elektrophysiologische Untersuchungen von Tiermodellen der Herzinsuffizienz und der ventrikulären Hypertrophie durch Clemo *et al.* (1999) und Benitah *et al.* (1997) haben gezeigt, dass in den isolierten ventrikulären Kardiomyozyten vom Hund und der Ratte eine erhöhte Chloridleitfähigkeit auftritt. In der Studie von Clemo *et al.* (1999) wurde für die durch *rapid pacing* des Ventrikels in Hunden erzeugte Herzinsuffizienz gezeigt, dass diese zu einer erhöhten basalen Chloridleitfähigkeit der ventrikulären Kardiomyozyten führt und diese Leitfähigkeit durch eine erhöhte basale Aktivität des $I_{Cl,swell}$ bedingt ist. In der Studie von Benitah *et al.* (1997) an durch *aortic banding* hypertrophierten Rattenherzen wurde die Identität des Chloridstroms, der zur erhöhten Chloridleitfähigkeit führte, jedoch nicht bestimmt. Da die ventrikuläre Hypertrophie eine Vorstufe der Herzinsuffizienz darstellt, war es unser Ziel zu überprüfen, ob es in diesem Modell auch zu einer Erhöhung der basalen $I_{Cl,swell}$ -Leitfähigkeit kommt. Da die Ratte häufig für die Etablierung von Tiermodellen verwendet wird, aber bisher noch keine experimentellen Untersuchungen des $I_{Cl,swell}$ am adulten Rattenherzen bekannt waren, war es für zukünftige Untersuchungen des $I_{Cl,swell}$ in Tierversuchen wichtig zu überprüfen, ob dieser Strom im Rattenherzen vorkommt.

I.E.2	Klonierung und Analyse eines neuen kardialen Kaliumkanals mit einem Tandem-von-zwei-Poren(4TM-2P)-Motiv
--------------	--

Ziel der Klonierung neuer Kaliumkanäle war unter anderem das Auffinden eines Tandem-von-zwei-Poren-Kanals. Sowohl im Ventrikel des Meerschweinchens (I_{Kp}) als auch im Atrium und Ventrikel der Ratte ($I_{K,AA}$ und $I_{K,PL}$) wurden Ströme gefunden, die in ihrer elektrophysiologischen und pharmakologischen Charakteristik den Kaliumkanälen der 4TM-2P-Struktur (Yue & Marban, 1988; Backx & Marban, 1993; Carmeliet, 1999) entsprechen. Für das menschliche Herz wurde ebenfalls die Anwesenheit eines I_{Kp} -Stroms diskutiert (Snyders, 1999). Bei der Klonierung neuer kardialer Ionenkanäle waren atrial exprimierte Kaliumkanäle von besonderem Interesse, da bei einer therapeutischen Blockade ausschließlich im Atrium exprimierter Kaliumkanäle nicht die Gefahr einer QT-Zeit-Verlängerung und ein dadurch verursachtes Auftreten von tödlich verlaufenden ventrikulären Arrhythmien gegeben wäre. Damit wäre die Entwicklung eines Atrium-spezifischen Antiarrhythmikums möglich. Außerdem besteht die theoretische Möglichkeit, dass durch die Blockade eines Hintergrund-Kaliumkanals eine feiner abgestufte Verlängerung der Aktionspotentialdauer als durch die

vollständige Blockade von Strömen wie I_{Ks} oder I_{Kr} , die eine Schlüsselrolle in der Repolarisation des Membranpotentials haben, möglich ist. Da in einigen Spezies Kaliumkanäle nachgewiesen wurden, deren elektrophysiologische Eigenschaften denen von Tandem-von-zwei-Poren-Kanälen ähneln, wurde in Datenbanken nach Verwandten der bereits klonierten 4TM-2P-Kaliumkanäle gesucht. Die Suche in der Incyte-LifeSeq-Datenbank führte zur Identifizierung eines Kaliumkanals mit signifikanter Homologie zum Arachidonsäure-sensitiven TRAAK-Kaliumkanal. Ziel der Arbeit war die Klonierung dieses neuen kardialen Kaliumkanals, die Bestimmung seiner Gewebeverteilung und seiner elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften.

I.E.3 Suche nach einer kardialen β -Untereinheit des hKv4.3 im humanen Herz

Der Ca^{2+} -unabhängige transiente Auswärtsstrom I_{to1} ist ein wichtiger repolarisierender Kaliumstrom im menschlichen Herzen (Escande *et al.*, 1987). Er ist insbesondere für die frühe Phase der Repolarisation verantwortlich (Wettwer *et al.*, 1993; Wettwer *et al.*, 1994). Hierbei bestimmt er die Höhe des frühen Plateaus des humanen Aktionspotentials, und dadurch beeinflusst er auch andere Ionenkanäle, die an den darauffolgenden Phasen der Repolarisation beteiligt sind. Der I_{to1} -Strom ist sowohl im Herzen von Säugetieren (Litovsky & Antzelevitch, 1988; Litovsky & Antzelevitch, 1989; Clark *et al.*, 1993; Shimoni *et al.*, 1995; Gomez *et al.*, 1997) als auch im menschlichen Herzen nicht gleichmäßig verteilt (Näbauer *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1998). Sowohl zwischen einzelnen Herzregionen als auch innerhalb der ventrikulären Wand existieren Unterschiede in der Stromdichte, den biophysikalischen Eigenschaften und der Regulation des I_{to1} (Clark *et al.*, 1993; Näbauer *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1998).

Bei einigen Krankheiten des Herzens, wie bei der Herzinsuffizienz (Näbauer *et al.*, 1993; Kääh *et al.*, 1996), dem Myokardinfarkt (Jeck *et al.*, 1995) und der atrialen Fibrillation (Van Wagoner *et al.*, 1997; Yue *et al.*, 1997), ist die Größe des I_{to1} -Stroms reduziert. Die Reduktion des I_{to1} wird von einer signifikanten Verlängerung des Aktionspotentials begleitet (Beuckelmann *et al.*, 1993). Obwohl diese Untersuchungsergebnisse eine direkte Verknüpfung zwischen der Stromgröße des I_{to1} und der Aktionspotentialdauer andeuten, ist dies experimentell nur schwer zu beweisen, da wie zum Beispiel bei der Herzinsuffizienz auch andere repolarisierende Ströme verändert sind (Beuckelmann *et al.*, 1993; Greenstein *et al.*, 2000).

Man nimmt an, dass der native kardiale I_{to1} -Strom von Mitgliedern der *Shal*- oder *Kv4*-Familie von Kaliumkanal-Proteinen vermittelt wird. Hierbei ist insbesondere das *Kv4.3*-Protein für den Großteil des humanen I_{to1} -Stroms verantwortlich (Kääh *et al.*, 1998a; Greenstein *et al.*, 2000). Trotzdem lassen sich die Eigenschaften des nativen I_{to1} -Stroms nicht vollständig durch die heterologe Expression des h*Kv4.3* reproduzieren. Insbesondere die im Vergleich zum nativen Strom viel langsamere Erholung von der Inaktivierung (Wettwer *et al.*, 1993; Wettwer *et al.*, 1994; Näbauer *et al.*, 1996) deutet das Vorkommen modulatorischer Untereinheiten innerhalb des nativen I_{to1} -Kanalkomplexes an.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass KChIP-Proteine mit *Kv4*-Proteinen der Ratte assoziieren (An *et al.*, 2000) und dadurch Eigenschaften des nativen A-Typ-Kaliumkanals des Gehirns rekonstruieren können (An *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse haben uns veranlasst zu untersuchen, ob hKChIP2 die Ströme des h*Kv4.3* beeinflussen kann und ob sich dadurch die Eigenschaften der nativen kardialen I_{to1} -Kanäle reproduzieren lassen.

II Material und Methoden

II.A *Xenopus*-Oozyten als heterologes Expressions-System

Die aus *Xenopus laevis* (Südafrikanischer Krallenfrosch) isolierten Oozyten sind nicht ausdifferenzierte, omnipotente Einzelzellen, die sich für die Untersuchung von heterolog exprimierten, Oozyten-fremden Proteinen wie Ionenkanälen, Membranrezeptoren oder zytoplasmatischen Enzymen bewährt haben.

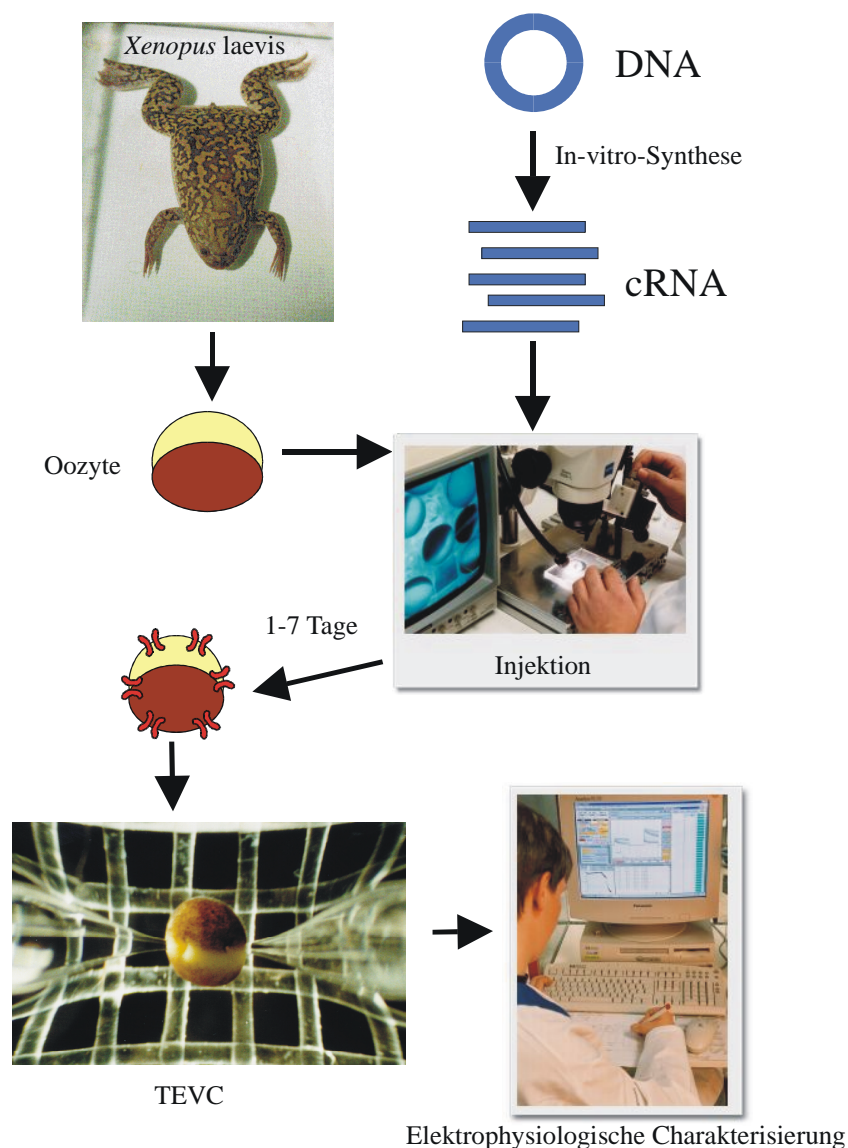


Abbildung II.1: Schematische Darstellung der heterologen Genexpression in *Xenopus*-Oozyten. Aus der DNA durch *in-vitro*-Synthese hergestellte cRNA wird in Oozyten injiziert. Je nach Größe des zu exprimierenden Proteins können nach einem bis sieben Tagen elektrogene Transportsysteme in der Plasmamembran der Oozyte elektrophysiologisch durch die Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemme (TEVC) charakterisiert werden.

Der Umgang mit Oozyten erfordert im Gegensatz zur Zellkultur keine sterilen Bedingungen. Zur Durchführung der Experimente wird die jeweilige cRNA in die Oozyte injiziert. Nach einem bis sieben Tagen können die heterolog exprimierte Proteine in der lebenden Zelle oder im Zellextrakt nachgewiesen werden. Die große Translationskapazität einer einzelnen Oozyte ermöglicht hohe Proteinausbeuten bei sparsamem cRNA-Einsatz. Die Oozyte führt posttranslationale Modifikationen durch und befördert das Protein in die richtigen Kompartimente. Ionenkanäle, elektrogene Rezeptoren oder Transport-Proteine können heterolog exprimiert und ihre Funktion entweder durch die Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemme (TEVC) oder mit der *Patch-Clamp*-Technik analysiert werden.

II.A.1 Isolierung von Oozyten aus *Xenopus laevis*

Vor der Entnahme von Oozyten aus dem Frosch *Xenopus laevis* wurde ein erwachsener, weiblicher Frosch für circa 15 min in ein Glasgefäß, das mit einem Liter einer 0,1%igen 3-Aminobenzoesäureethylester-Lösung (=Tricain, Sigma) gefüllt war, gesetzt. Die Vollständigkeit der Anästhesie konnte dabei durch das Aussetzen des Umkehrreflexes und dem fehlenden respiratorischen Schluckreflex nach Berührung der Kehlgasse bestätigt werden. Anschließend wurde der Frosch mit dem Rücken auf Eis gelegt, um die Anästhesie aufrecht zu erhalten und um eventuell auftretende Blutungen zu minimieren. Danach wurde die Froschhaut an der späteren Schnittstelle mit 70%igem Ethanol gereinigt. Anschließend wurde mit einem sterilen Skalpell ein jeweils circa 1 cm langer Schnitt durch die Bauchhaut, die Muskelfaszie und die Muskelschicht vorgenommen. Durch den so geschaffenen Zugang zum Bauchraum des Frosches konnten mit Pinzette und Skalpell die Ovarialsäcke entnommen werden. Die einzelnen Gewebeschichten der Wunde wurden danach mit resorbierbarem chirurgischem Nahtmaterial (Firma Ethicon, Norderstedt) wieder vernäht. Bis zur vollständigen Rückerlangung des Reaktionsvermögens wurde der Frosch in einen Behälter mit Leitungswasser gesetzt, wobei der Kopf des Frosches durch die Schräglagerung des Gefäßes oberhalb der Wasseroberfläche war.

Die entnommenen Ovarialsäcke, die Oozyten aller Reifestadien enthalten, wurden dann in OR-2-Lösung mit einer Schere in kleinere Säckchen zerschnitten. Dadurch wurde der spätere Kollagenaseverdau zur Vereinzelung und Defollikulierung der Oozyten erleichtert. Nach mehrmaligem Waschen mit OR-2-Lösung wurden die Oozyten mit 20 ml einer Kollagenasehaltigen Lösung versetzt (40 mg Kollagenase der Firma Worthington Biochemical Corporation, Lakewood USA, auf 20 ml OR-2). Die Kollagenasebehandlung erfolgte bei 18°C auf einem

Schüttler, der auf 20 Umdrehungen pro Minute eingestellt war. Es wurde eine Ca^{2+} -freie OR-2-Lösung verwendet, damit die Kollagenase nicht durch vorhandenes Ca^{2+} inhibiert werden konnte. Die Dauer dieses Kollagenaseverdaus lag zwischen 120 und 150 min. Nachdem der Großteil der Oozyten vereinzelt und defollikuliert war (Kontrolle unter dem Stereomikroskop), wurde die Kollagenasebehandlung abgebrochen. Danach wurden die Oozyten zur Entfernung der Kollagenase mehrmals mit ND-96-Lösung gewaschen.

Aus dem Gemisch der sich in unterschiedlichen Wachstums- und Reifestadien befindenden Oozyten wurden unter einem Stereomikroskop die ausgewachsenen und unbeschädigten Oozyten des Reifestadiums VI aussortiert (Dascal, 1987). Diese Oozyten wurden in antibiotikahaltiger ND-96-Lösung (ND-96 + AB) aufbewahrt, wobei die Aufbewahrung bei 18°C auf einem Schüttler (20 Umdrehungen/Minute) erfolgte, um eine Deformierung durch Aneinanderhaften der Oozyten zu verhindern.

Die verwendeten Kulturmedien für die *Xenopus*-Oozyten waren wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	ND-96-Lösung	ND-96 + AB-Lösung	Ca^{2+} -freie OR-2-Lösung
NaCl	96 mM	96 mM	82,5 mM
KCl	2 mM	2 mM	2 mM
CaCl_2	1,8 mM	1,8 mM	0 mM
MgCl_2	1 mM	1 mM	1 mM
HEPES	5 mM	5 mM	5 mM
Natriumpyruvat	0 mM	2,5 mM	0 mM
Theophyllin	0 mM	0,5 mM	0 mM
Gentamycin	0 mM	50 $\mu\text{g/ml}$	0 mM
pH, eingestellt mit NaOH	7,5	7,5	7,5

Für die Messungen des endogenen $I_{\text{Cl,swell}}$ von *Xenopus*-Oozyten wurden die Oozyten mit Hilfe von Pinzetten und unter Beobachtung durch ein Stereomikroskop (Zeiss) manuell defollikuliert (Hilken *et al.*, 1997) und bei 18°C in der ND-96-Lösung aufbewahrt. Dies war nötig, da nach einer Kollagenasebehandlung der Oozyten kein endogener $I_{\text{Cl,swell}}$ mehr gemessen werden kann.

II.A.2 Mikroinjektion in *Xenopus*-Oozyten

Noch am Tag der Entnahme aus dem Frosch erfolgte, unter Kontrolle durch ein Stereomikroskop (Zeiss), die Injektion der cRNA in die Oozyten. Aufgrund der Empfindlichkeit der cRNA wurde dabei mit Latex-Handschuhen (Unigloves, Troisdorf)

gearbeitet und RNase-freie Injektionskapillaren, Kulturschälchen und Pipettenspitzen verwendet. Die Injektionskapillaren wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren (World Precisions Instruments, Inc. Sarasota, USA) mit einem Außendurchmesser von 1,2 mm unter Verwendung eines Mikroelektrodenpullers (DMZ-Universal Puller der Firma Zeitz-Instrumente, Augsburg) zu Mikroelektroden mit einer langer Spitze gezogen. Ein Teil der Spitze wurde unter dem Stereomikroskop an einem kalten Heizdraht abgebrochen und an dem anschließend erwärmten Heizdraht zu einer kanülenförmigen Spitze ausgezogen. Die so erhaltenen Pipetten gewährleisteten, dass der Durchmesser der Kapillarenspitze groß genug war, um die cRNA blasenfrei aufzusaugen und diese beim Injizieren wieder abzugeben. Andererseits musste die Pipette möglichst klein und rund geformt sein, damit Verletzungen der Oozytenmembran beim Injizieren weitgehend verhindert werden konnten (Durchmesser circa 10 - 15 μM). Die Injektion erfolgte unter Verwendung eines vollautomatischen Nanoliterinjektors der Firma World Precisions Instruments (Sarasota, USA). Der Kolben des Nanoliterinjektors wurde in die mit Paraffinöl (Sigma 400-5 heavy white oil, $\delta = 0,88 \text{ g/ml}$) gefüllte Injektionskapillare eingeführt. Das Paraffinöl diente zur Abdichtung und zur Vermeidung von Luftblasen beim Aufnehmen der cRNA. Hierdurch wurde die Genauigkeit des Nanoliterinjektors gewährleistet. Es wurden circa 3 μl der aufgetauten cRNA-Lösung in die Injektionskapillare aufgezogen. Die zu injizierenden Oozyten wurden in der ND-96-Lösung auf ein Gitternetz gelegt, und die Injektionskapillare wurde in einem Winkel von circa 45° eingestochen (siehe Abbildung II.2). In jede Oozyte wurden 50 nl cRNA-Lösung injiziert. Bei einer Konzentration der cRNA-Lösung von 200 bis 1000 ng/ μl entsprach dieses Volumen circa 10 bis 50 ng cRNA.

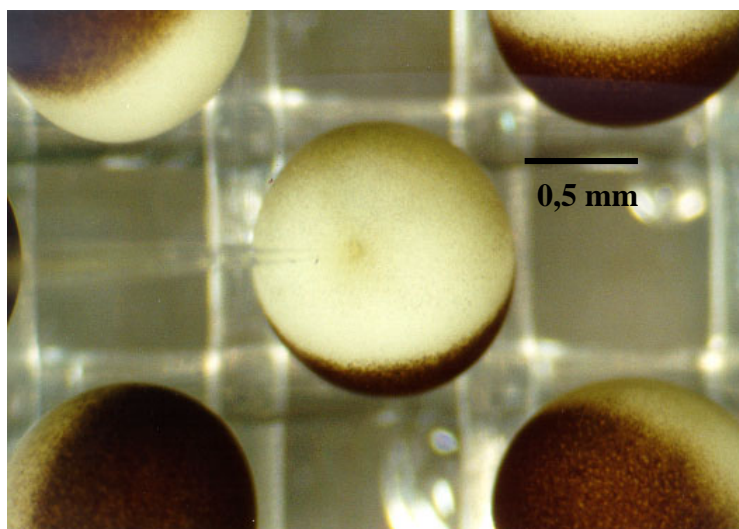


Abbildung II.2: *Xenopus*-Oozyte während der Injektion von cRNA. Die Injektionskapillare sticht von links in einem Winkel von etwa 45° in die Oozyte.

Nach der Injektion wurden die einzelnen Oozyten in mit antibiotikahaltiger ND-96-Lösung befüllte 24-Loch-Gewebekulturplatten (Greiner, Frickenhausen) gegeben und bei 18°C aufbewahrt. Je nach Größe des Proteins dauerte es einen bis sechs Tage, bis die entsprechenden Ströme gemessen werden konnten.

II.B Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmen-Methode

Um den Gesamtzellstrom einer Oozyte unter gleichbleibenden intrazellulären Bedingungen zu messen, bietet sich die Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmen-Methode an (engl.: *Two Electrode Voltage Clamp Method* = TEVC-Methode). Bei dieser Methode kann das Membranpotential einer Zelle auf einen Spannungswert geklemmt und somit der Strom bestimmt werden, der appliziert werden muss, um die Zelle auf dem gewählten Potential zu halten (Hodgkin *et al.*, 1952; Bezanilla *et al.*, 1982; Finkel & Gage, 1985). Abbildung II.3 zeigt schematisch die Messanordnung für Spannungsklemmen-Messungen an *Xenopus*-Oozyten.

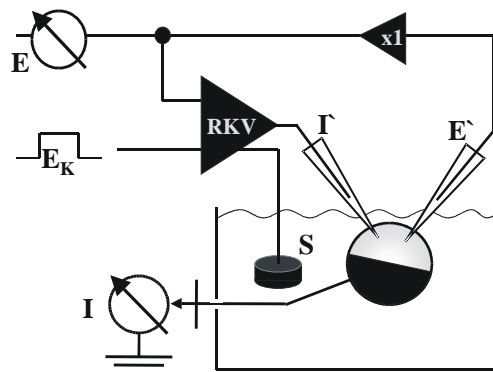


Abbildung II.3: Schematische Darstellung und Ersatzschaltbild der TEVC-Methode. Bei dieser Methode werden zwei intrazelluläre Mikroelektroden verwendet. Mit der Elektrode E' kann das Membranpotential E gegen eine geerdete Referenzelektrode im Bad (S) (Agarbrücke oder Salzpellet = S) gemessen werden. Der Rückkopplungsverstärker (RKV) vergleicht das Membranpotential mit dem vom Experimentator gewählten Potential E_K (Kommandopotential). Anschließend kann über die Elektrode I' der Strom I appliziert werden, um E_K zu erreichen und anschließend die erreichte Spannung zu halten. Die Aufgabe des Rückkopplungsverstärkers besteht also darin, die durch einen fließenden Strom bedingte Spannungsänderung (z. B. einen Ionenstrom durch Ionenkanäle) durch das Anlegen der gleichen Stromamplitude mit umgekehrten Vorzeichen zu verhindern. Durch Messen des applizierten Stroms I ist eine indirekte Bestimmung des Nettostroms von Einwärts- oder Auswärtsströmen möglich. Bei elektrophysiologischen Messungen wird die Stromrichtung konventionsgemäß durch die Richtung der bewegten positiven Ladung definiert. Ein positiver Strom kann demnach durch einen Ausstrom von Kationen aus der Zelle oder einen Einstrom von Anionen in die Zelle hervorgerufen werden. Wird die Spannung bei TEVC-Experimenten auf einen positiven Wert geklemmt, so bedeutet dies, dass das Zellinnere gegenüber der Zellaußenseite ein positives Potential besitzt.

II.B.1 Aufbau des TEVC-Messplatzes

Der TEVC-Messplatz (siehe Abbildung II.4) war auf einem speziell konstruierten Experimentiertisch (Vipraplane, Kinetic Systems) aufgebaut. Die Tischplatte lag dabei auf luftgefüllten Dämpfungspuffern, um möglichst schwingungs- und erschütterungsfreie Messungen zu gewährleisten.

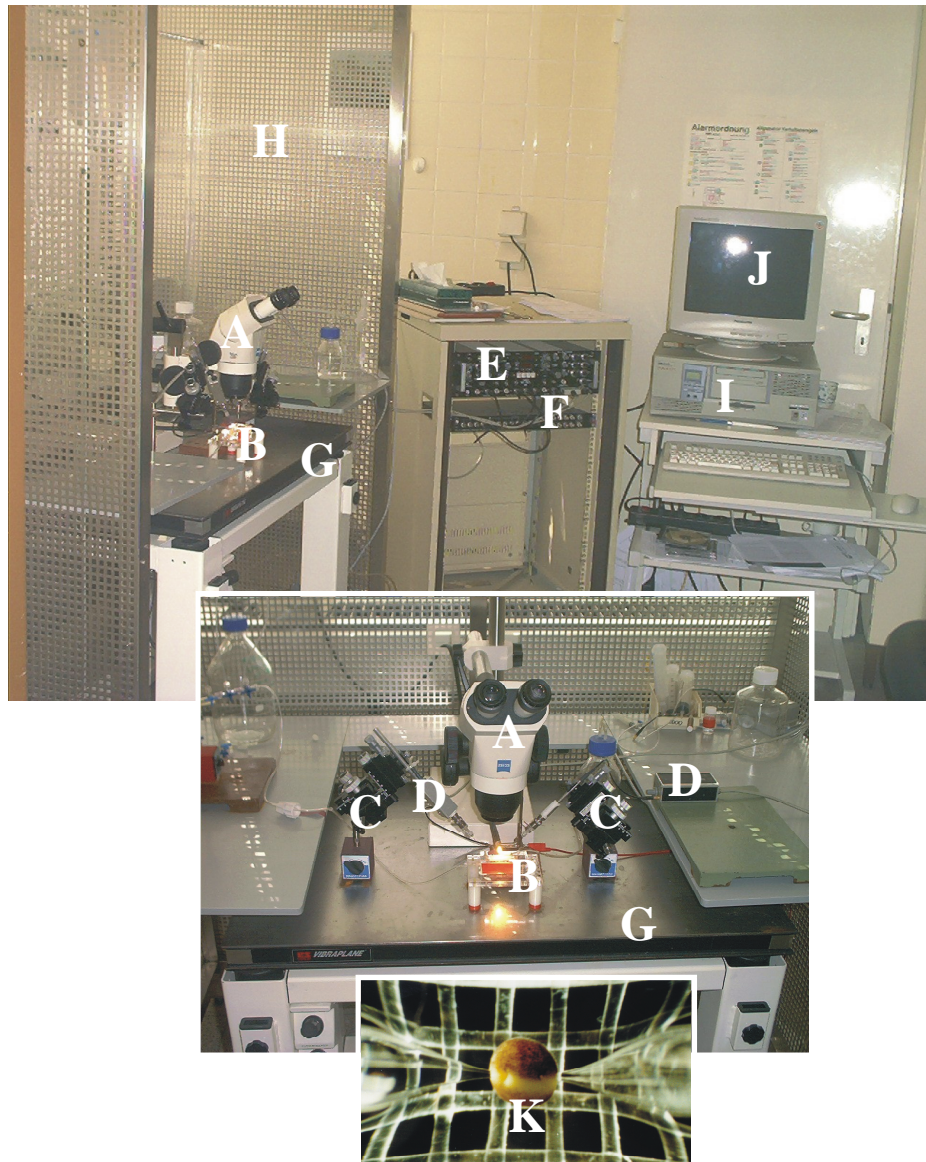


Abbildung II.4: Aufbau des TEVC-Messplatzes. Die Ausstattung bestand aus einem Mikroskop (A), der Badkammer (B), zwei manuellen Mikromanipulatoren (C) und Vorverstärkern (D), dem Verstärker (E), einem Computer-Interface (F), einem schwingungsgedämpften Tisch (G), dem Faraday-Käfig (H) sowie zur Auswertung einem Computer (I) und einem Monitor (J). *Xenopus-laevis*-Oozyte mit zwei eingestochenen Pipetten zur Durchführung einer TEVC-Messung (K).

Um elektrische Störungen bei der Messung zu minimieren, war der Messplatz durch einen Faraday-Käfig geschützt. Alle Metallgeräte innerhalb des Messplatzes waren mit Erdungskabeln geerdet. Die im Hause angefertigte Messkammer aus Plexiglas hatte ein Fassungsvermögen für 3,5 ml Badlösung und befand sich in der Mitte des Experimentiertisches. Die Oozyten wurden während den elektrophysiologischen Untersuchungen mit der jeweiligen Badlösung konstant umspült. Der Zulauf der Lösungen erfolgte über verschiedene Vorratsbehälter aufgrund des hydrostatischen Druckes. Die Lösungen wurden über Silikonschläuche in die Messkammer geleitet. Die Flussgeschwindigkeit der Badlösungen betrug etwa 20 ml/min, so dass die Lösung in der Messkammer nach 10 bis 15 Sekunden komplett ausgetauscht war. Zur Absaugung der Lösungen aus dem Kammer-Überlauf diente ein Silikonschlauch, der über eine Waschflasche mit einer elektrischen Pumpe (Firma Neuberger) verbunden war.

Auf beiden Seiten der Messkammer befanden sich manuelle Mikromanipulatoren (World Precision Instruments, Berlin), an denen jeweils ein HS-2A-Headstage-Vorverstärker (Firma Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) befestigt war. Diese waren mit dem Rückkopplungsverstärker (Turbotec-10CX, NPI Electronic, Tamm) verbunden. An den Vorverstärkern (engl.: headstages) befanden sich Elektrodenhalter und ein Ag/AgCl-Elektrodendraht. Die zum Einstechen in die Oozyten verwendeten Mikroelektroden aus Borosilikatglas (GC 150TF-15, 1,5 mm Außendurchmesser, 1,17 mm Innendurchmesser, dünnwandig mit Innenfilament, Firma Clark Elektromedical Instruments, Pangbourne, England) wurden mit einem DMZ-Universal Puller (Firma Zeitz, Augsburg) gezogen. Die Pipetten wurden mit 3 M KCl-Lösung gefüllt, in die die Ag/AgCl-Elektrodendrähte der Pipettenhalter eintauchten. Die verwendeten Mikroelektroden hatten einen elektrischen Widerstand von 0,1 bis 1,3 M Ω . Das Potential der Badlösung wurde unter Verwendung zweier Salzpellets über eine VG-2A-BathClamp-Headstage (Axon Instruments Inc.) aktiv auf 0 mV geklemmt. Alle Versuche wurden bei 22°C durchgeführt. Oberhalb der Messkammer befand sich ein Stereomikroskop (Firma Zeiss), um ein kontrolliertes Einstechen in die Oozyte zu ermöglichen. Zur Beleuchtung der Messkammer diente eine durch Gleichstrom betriebene Halogenlampe (Firma Schott). Alle Daten wurden über den Rückkopplungsverstärker und über ein Interface (ITC-16, Instrutec Corporation, Long Island, NY, USA) in einem IBM Pentium-II-Computer aufgenommen und ausgewertet (Pulse und Pulsefit Software der Firma HEKA elektronik, Lambrecht).

II.C *Patch-Clamp-Methode*

II.C.1 Die Methode

Die *Patch-Clamp*-Methode erlaubt es, sowohl makroskopische Ströme von einigen Nanoampere (nA) als auch Ströme einzelner Ionenkanäle von wenigen Picoampere (pA) zu messen. Da die Plasmamembran als Lipid-Doppelschicht weitestgehend impermeabel für Ionen ist, müssen die gemessenen Ionenflüsse durch Ionenkanäle, Pumpen oder Transporter hervorgerufen werden. Die Stromamplituden hängen von der Dichte des entsprechenden Proteins in der Membran sowie von der Ladung des bewegten Substrates ab. Die Voraussetzung der Messung mikroskopischer Ionenströme liegt in einem sehr geringen Signal-Rausch-Verhältnis. Durch eine elektrisch sehr dichte (hochohmige) Verbindung (engl.: *seal*) zwischen der mit Salzlösung gefüllten *Patch*-Pipette und der Plasmamembran, kann ein sehr geringes Rauschen erreicht werden. Diese hängt im wesentlichen vom elektrischen Widerstand zwischen der *Patch*-Pipette und der Plasmamembran ab (R_{seal}), der immer über 1 G Ω liegen sollte (engl.: *gigaseal*). Der hohe elektrische Widerstand gewährleistet, dass der zu messende Strom fast ausschließlich durch die Transportsysteme oder Ionenkanäle des isolierten Membranflecks fließt und der Anteil an Leckströmen sehr gering ist. Der kleine Membranfleck unterhalb der Pipette wird auch *Patch* (englisch für Fleck) genannt. Die entsprechende Messkonfiguration wird als *cell-attached* bezeichnet. Mit einem ruckartigen Zurückfahren der Pipette durch den Mikromanipulator reißt man das isolierte Membranstück aus der Membran, wobei die Innenseite des Membranflecks nach außen zeigt. Durch diese mechanische Manipulation gelangt man zu der *inside-out*-Konfiguration. Legt man von der *cell-attached*-Konfiguration ausgehend einen kurzen Unterdruck über die Pipette auf die Zellmembran an, reißt man den Membranfleck auf und erreicht Zugang zum Zellinneren. Die dadurch erreichte *whole-cell*-Konfiguration (Ganzzelleableitung) ist die am meisten verwendete Messkonfiguration. Sie ermöglicht die Messung des Stroms einer ganzen Zelle unter definierten intra- und extrazellulären Bedingungen. Ausgehend von der *whole-cell*-Konfiguration kann man durch ein vorsichtiges Zurückziehen der Pipette in die *outside-out*-Konfiguration gelangen. Hierbei kommt es zu einer Verschmelzung von kleinen Membranstücken, so dass die ursprünglich äußere Membranseite dem Bad zugewendet ist.

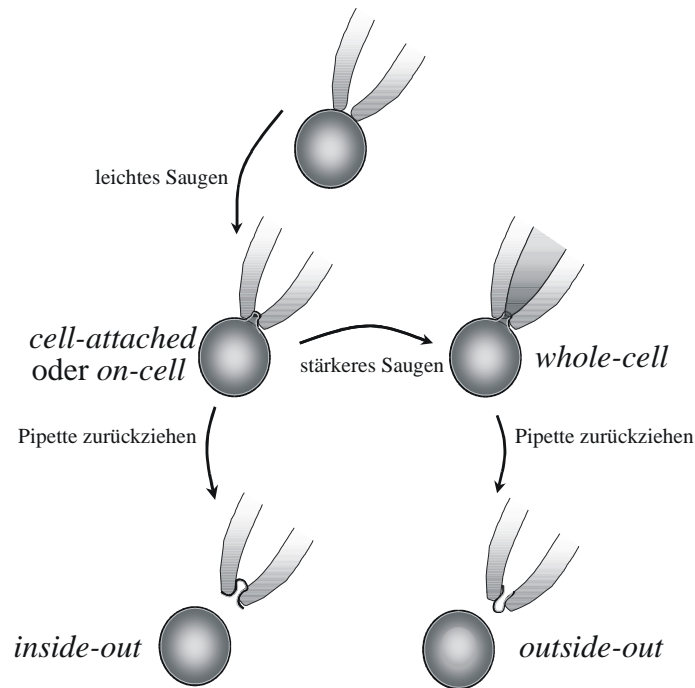


Abbildung II.5: Die verschiedenen Messkonfigurationen der *Patch-Clamp*-Technik und ihre Herstellung. Die Abbildung zeigt die vier wichtigsten Messkonfigurationen und das Prinzip ihrer Herstellung. Ausgangspunkt jedes Experiments ist die Verwendung einer neuen sauberen Pipette, die mit Hilfe eines elektrischen Mikromanipulators leicht auf die Membran aufgesetzt wird. Dies kann über das Mikroskop oder einen Bildschirm und den elektrischen Widerstand der Pipette kontrolliert werden. Durch das Anlegen eines leichten Unterdrucks über die *Patch*-Pipette kann sich anschließend eine Verbindung zwischen Pipette und Membran ausbilden, die mehrere Gigaohm elektrischen Widerstand gegenüber ihrem Umfeld haben kann (engl.: *seal*). In dieser *cell-attached*-Konfiguration können je nach Größe des Membranflecks unter der Pipette makroskopische Ionenströme (engl.: *macropatch*) oder einzelne Ionenkanäle gemessen werden. Durch das kurze Anlegen eines Unterdrucks kann die Membran unterhalb der Pipette aufgerissen werden, und man erreicht die *whole-cell*-Konfiguration. Jetzt bekommt die Pipettenlösung Zugang zum Zytoplasma, so dass es zur Dialyse der Zelle mit dieser Lösung kommt. Durch das Zurückfahren der Pipette kann aus der *whole-cell*- die *outside-out*-Konfiguration und aus der *cell-attached*- die *inside-out*-Konfiguration erreicht werden. Bei diesen Konfigurationen ist entweder die Innenseite (*inside-out*) oder die Außenseite (*outside-out*) des kleinen Membranflecks der Badlösung zugewendet.

In dieser Arbeit werden ausschließlich Ergebnisse vorgestellt, die auf Messungen in der *whole-cell*-Konfiguration beruhen. Zusätzlich zu den klassischen Spannungsklemmen-Messungen in der *whole-cell*-Konfiguration wurden auch Membranpotential-Messungen im Stromklemmen-Modus durchgeführt. Hierbei klemmt der Verstärker über die Injektion eines Stroms die Zelle auf das Membranpotential, bei dem keine weiteren Ströme fließen. In erregbaren Zellen ist es möglich, dass man zusätzlich zu den Membranpotential-Messungen durch einen kurzen Stromimpuls über die *Patch-Clamp*-Pipette ein Aktionspotential auslöst und den entsprechenden Verlauf des Membranpotentials registriert. Der EPC-9-Verstärker in

Kombination mit der Software Pulse (HEKA) bietet die Möglichkeit, kapazitive Ströme der Pipette und der Zellmembran, die durch die applizierten Spannungssprünge verursacht werden, teilweise auszugleichen. Dabei können die schnelle Kapazität der Pipette und die langsamere Kapazität der Zellmembran über eine sogenannte „schnelle“ bzw. „langsame“ Kompensation des Verstärkers ausgeglichen werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer elektrischen Serienwiderstands- und Offsetkompensation. Außerdem ist es möglich, die gemessenen Ströme nachträglich mit verschiedenen Frequenzen zu filtern. Da die *Patch-Clamp*-Experimente einen mechanisch störungsfreien Messaufbau benötigen, wurden ein schwingungsgedämpfter Messtisch sowie ein Faraday-Käfig zur elektrischen Abschirmung benutzt.

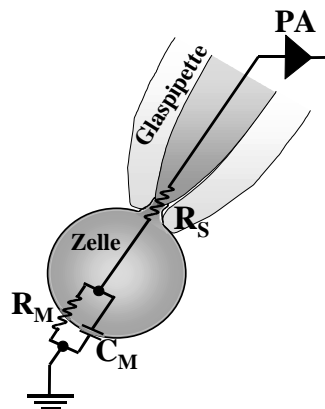


Abbildung II.6 Ersatzschaltbild der *whole-cell*-Ganzzellableitung. Nach dem Durchbrechen der Membran erhält man die *whole-cell*-Konfiguration. Dabei werden Membranfragmente und anderes Zellmaterial in die Nähe der Pipettenmündung gesaugt, was den Serienwiderstand R_S erhöht. Der Serienwiderstand ermöglicht eine Aussage über den elektrischen Zugang zum Zellinneren während einer Messung im *whole-cell*-Modus. C_M ist die Membrankapazität, die indirekt die Größe der Zelloberfläche wiedergibt. Durch den Membranwiderstand R_M erkennt man die Leitfähigkeit der Membran. Als PA ist der Vorverstärker (engl.: preamplifier) gekennzeichnet.

II.C.2 Der *Patch-Clamp*-Messplatz

Der Vorverstärker (engl.: preamplifier oder headstage) war an einem Halter befestigt, der über einen Mikromanipulator mit Präzisionsmotoren (Luigs & Neumann, Deutschland) bewegt werden konnte. Der Halter des Vorverstärkers und die Präzisionsmotoren waren an einer mit dem schwingungsgedämpften Tisch des Messplatzes verschraubten Säule angebracht. Die beheizbare Messkammer (im Hause gefertigt) war über einen Gleittisch fest mit dem inversen Mikroskop (Zeiss, Axiovert 35/135, Deutschland) verbunden.

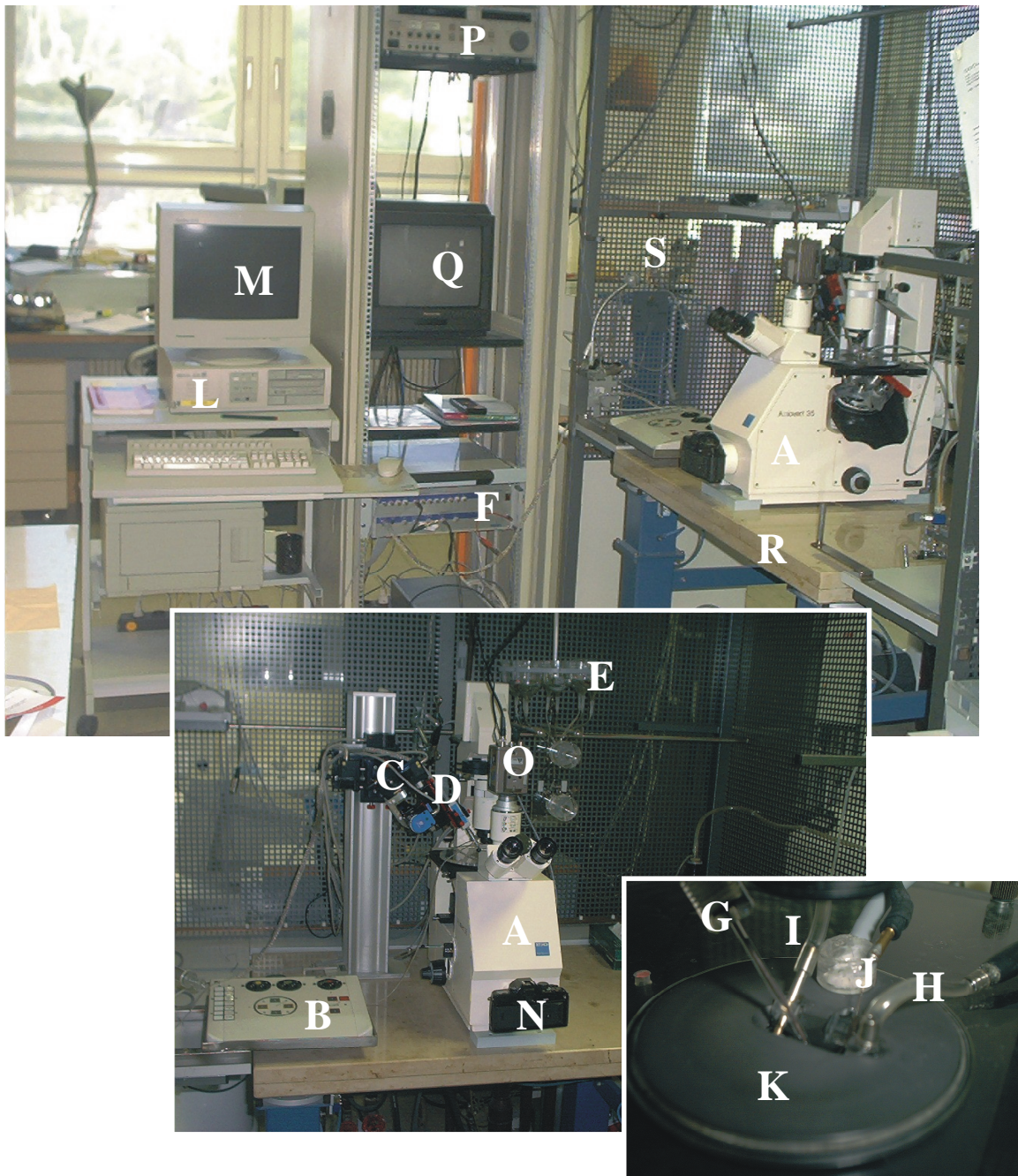


Abbildung II.7: Aufbau des *Patch-Clamp*-Messplatzes. Die Aufnahme und Auswertung der Messwerte erfolgte Computergestützt. Der Messplatz bestand aus folgenden Komponenten: inverses Mikroskop (A), Steuereinheit des Mikromanipulators (B), Motor des Mirkomanipulators (C), Vorverstärker mit dem Pipettenhalter und der Pipette (D), Vorratsgefäße für die Perfusion (E), *Patch-Clamp*-Verstärker (F), *Patch*-Pipette (G), Zulauf der Perfusion (H), Absaugung der Badlösung (I), Bad-Referenzelektrode (J), beheizbare Badkammer (K), Computer (L) und Computermonitor (M). Auf dem Foto sind ferner eine Spiegelreflexkamera (N), die Videokamera (O) mit Videorekorder (P) und Monitor (Q) sowie der schwingungsgedämpfte Tisch (R) und der Faraday-Käfig (S) zu erkennen.

Die Perfusionsgeschwindigkeit der Badlösung war auf etwa 3 ml pro Minute eingestellt. Der Zulauf der Lösungen war aus acht alternativ wählbaren Vorratsgefäßen möglich. Die letzte

Teilstrecke des Zulaufsystems (25 cm) war beheizbar, wobei über einen Thermofühler in der Badkammer und durch eine Rückkopplungsschaltung die Temperatur reguliert werden konnte. Die Absaugung der Badlösung erfolgte über das zentrale Unterdrucksystem des Messplatzes. Die Experimente konnten über eine Kamera (Panasonic, WV-CD 22) und einen kombinierten VHS-C-Videorekorder (Panasonic, AG-7355) kontrolliert werden. Nur die Perfusionsanlage, der luftgelagerte Messtisch mit seinen Aufbauten und die Manipulatorsteuerung waren innerhalb des Faraday-Käfigs angeordnet. Die Erdung der Geräte wurde nur vorgenommen, wenn hierdurch eine deutliche Verringerung des elektromagnetischen Rauschens bewirkt wurde.

II.C.3 Strom- und Potential-Messungen mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Methode

Alle *Patch-Clamp*-Messungen wurden im *whole-cell*-Modus bei $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die *Patch-Clamp*-Untersuchungen von CPAE-Zellen und die Messungen von Natriumströmen wurden jedoch bei Raumtemperatur ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) durchgeführt. Bei den Messungen der Natriumströme wurden unter Verwendung der „P-P/n“-Methode (Bezanilla & Armstrong, 1977) lineare kapazitive Ströme elektronisch abgezogen. Außerdem wurden die Natriumströme mit einer elektronischen Kompensation des Serienwiderstands von 40 bis 60% gemessen, um eine ausreichende Auflösung der schnellen Natriumströme zu gewährleisten. Die I_{Ks} -Messungen während der Zellschwellung wurden mit einer 70%igen Serienwiderstandskompensation durchgeführt. In allen Experimenten wurde der Strom der *Patch*-Pipette vor der Herstellung eines „Seals“ genullt. Die *Patch*-Pipetten wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,87 mm, ohne Filament) der Firma Hilgenberg (Deutschland) mit einem automatischen Ziehgerät (engl.: puller) (Firma List-Medical, Deutschland) in drei Stufen gezogen und anschließend deren Spitzen feuerpoliert. Für Experimente mit Kardiomyozyten wurden *Patch*-Pipetten mit einem elektrischen Widerstand von 2,0 bis 3,5 M Ω und für Messungen des $I_{Cl,swell}$ solche mit 1,5 bis 2,5 M Ω verwendet. Nach der Membranruptur zum Erreichen der *whole-cell*-Konfiguration wurde der Dreiwege-Hahn an der Spritze, die zum Anlegen des Unterdrucks auf die *Patch*-Pipette verwendet wurde, zur Atmosphäre geöffnet. Dies sollte verhindern, dass über die Pipette ein dauerhafter Unterdruck auf die Zelle angelegt wurde. Aktionspotential-Messungen wurden mit Pipettenwiderständen von 3,0 bis 4,5 M Ω durchgeführt. Aktionspotentiale wurden im Stromklemmen-Modus durch die Applikation eines Stromimpulses über die Pipette ausgelöst. Der Stromimpuls hatte eine

Amplitude von 0,8 bis 1 nA und eine Dauer von 1 bis 3 ms. Amplitude und Dauer des Impulses richteten sich nach der Erregbarkeit der einzelnen Kardiomyozyte. Die Aktionspotentiale wurden mit einer regelmäßigen Frequenz von 0,2 Hz ausgelöst.

II.C.4 Zellgrößenbestimmung atrialer Kardiomyozyten

Die Zellen wurden durch ein invertiertes Mikroskop mit einer 400-fachen Vergrößerung sichtbar gemacht (Zeiss, Axiovert 35). Die Veränderungen in der Zellgröße während der Zellschwellung wurden über eine Kamera (Panasonic, WV-CD 22) und einen daran angeschlossenen VHS-C-Videorekorder (Panasonic, AG-7355) kontrolliert. Außerdem wurden mit einer Spiegelreflexkamera (Contax, 167), die an das Mikroskop angeschlossen war, Bilder der *Patch-Clamp*-Experimente erhalten. Da Volumenveränderungen von Kardiomyozyten proportional zu Veränderungen der Zellbreite sind (Roos, 1986; Drewnowska & Baumgarten, 1991), wurde in einigen Experimenten die Zellbreite als Ersatzparameter für das Zellvolumen bestimmt und ausgewertet, wie es schon zuvor für atriale Kardiomyozyten beschrieben wurde (Sorota, 1992). Die Änderungen der Zellbreite wurden anhand der aufgenommenen Bilder ausgewertet. Hierbei wurde die Zellbreite der Kardiomyozyten an drei unterschiedlichen Stellen gemessen und anschließend die durchschnittliche Zellbreite errechnet.

II.C.5 Zellkultur der CPAE-Zellen

CPAE-Zellen (engl.: calf pulmonary arterial endothelial cells) wurden in DMEM-Medium mit 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin und 20% fötalem Kälberserum kultiviert. Die Zellkultivierung wurde bei 37°C und 5% CO₂ durchgeführt. Die Zellen wurden bei erreichter Konfluenz mit einer 0,05% Trypsin-haltigen Ca²⁺- und Mg²⁺-freien Lösung vom Boden abgelöst, neu ausgesät und 2 bis 4 Tage vor dem Gebrauch für die *Patch-Clamp*-Experimente in Kultur belassen. Für Untersuchungen des $I_{Cl,swell}$ wurden nur wachsende Zellen verwendet, da nach Erreichen der Konfluenz und dem Eintreten der Wachstumshemmung die Expression des $I_{Cl,swell}$ vermindert ist (Shen *et al.*, 2000).

II.C.6 Kardiomyozytenpräparation

Einzelne Kardiomyozyten wurden durch enzymatischen Verdau von Meerschweinchen- und Rattenherzen gewonnen. Die Meerschweinchen und Ratten (350 bis 450 g) wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Herzen danach schnell entnommen. Die Aorta wurde kannüliert und das Herz 5 min retrograd mit einer nominell Ca^{2+} -freien Tyrode-Lösung bei $37,5^\circ\text{C}$ perfundiert. Die hierbei verwendete Ca^{2+} -freie Tyrode-Lösung wurde vorher für 20 bis 30 min mit Sauerstoff (O_2) begast. Danach wurde das Herz mit der gleichen Lösung, die zusätzlich 0,33 mg/ml Kollagenase (Type CLS II, 270 U/mg, Biochrom KG) und $15 \mu\text{M}$ CaCl_2 enthielt, perfundiert. Die Dauer des Verdauungsprozesses lag bei Meerschweinchenherzen zwischen 5 min 45 s und 7 min 30 s und bei Rattenherzen zwischen 7 und 9 min. Die Dauer des Verdauungsprozesses richtete sich nach der mechanischen Festigkeit des Herzens, da durch den Verdau mit der genannten Kollagenaselösung das Herz „steifer“ wird. Der Verdau wurde beendet, wenn die Festigkeit des Herzens wieder abnahm. Je nach Fragestellung wurde nach beendetem Kollagenaseverdau das Atrium und/oder der Ventrikel entfernt, in die Aufbewahrungslösung gegeben und dort weiter in kleine Stücke geschnitten. Danach erreichte man durch leichtes mechanisches Agitieren mit Hilfe einer Pipette eine stärkere Zelldissoziation. Die erhaltene Zellsuspension wurde durch ein Nygonsieb filtriert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die verwendeten Lösungen für die Präparation der Kardiomyozyten waren wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	Ca^{2+} -freie Tyrode-Lösung
NaCl	143 mM
KCl	5,4 mM
MgCl_2	0,5 mM
NaH_2PO_4	0,25 mM
Glucose	10 mM
HEPES	5 mM
pH, eingestellt mit NaOH	pH 7,2
P_{Osm}	$290 \pm 5 \text{ mOsmol}$

Substanz	Aufbewahrungslösung
L-Glutaminsäure	50 mM
KCl	40 mM
Taurin	20 mM
KH_2PO_4	20 mM
MgCl_2	1 mM
Glucose	10 mM
HEPES	10 mM
EGTA	2 mM
pH, eingestellt mit KOH	pH 7,2
P_{Osm}	$260 \pm 5 \text{ mOsmol}$

II.C.7 *Aortic banding* der Ratte zur Erreichung einer links-ventrikulären Hypertrophie

Das Abbinden der Aorta zwischen den beiden renalen Arterien der Ratte (englisch = *aortic banding*) führt durch Drucküberlastung zu einer links-ventrikulären Hypertrophie und einem Renin-abhängigen Bluthochdruck. In unserem Falle diene das Tiermodell zur Analyse der links-ventrikulären Hypertrophie, die eine Vorstufe der Kardiomyopathie darstellt. Die Operation und Haltung der Tiere erfolgte im Labor von PD Dr. W. Linz, Aventis Pharma. Zur Durchführung wurden männliche *Sprague-Dawley*-Ratten, die zwischen 280 und 300 g wogen, verwendet. Vor der Operation wurde die Nahrungszufuhr der Ratten für 12 Stunden eingestellt. Die Narkose wurde durch intraperitoneale Injektion von 60 mg/kg Hexobarbital erreicht. Anschließend wurde das Abdomen durch einen Schnitt parallel zur *Linea alba* eröffnet. Die abdominale Aorta wurde oberhalb der linken renalen Arterie freigelegt und ein Seidenfaden unter ihr durchgezogen. Danach wurde eine Kanüle No. 1 (0,9 x 40 mm) longitudinal auf die Aorta aufgelegt und diese mit der Kanüle verbunden. Im nächsten Schritt wurde die Kanüle entfernt, wodurch ein Lumen der Aorta resultierte, das dem Durchmesser der Kanüle entsprach. Vor dem Verschließen des Abdomen mit Katgut wurde den Tieren noch 5,5 mg Rolitetracyclin zur antibiotischen Prophylaxe verabreicht. Danach wurde die Haut mit Klammern verschlossen und mit einem Teer-Spray bedeckt. Scheinoperierte Tiere (*sham*) dienten zur Kontrolle der Experimente. Diese wurden wie oben beschrieben operiert, jedoch wurde das Abbinden der Aorta nicht durchgeführt.

II.D *Lösungen*

Für Lösungen zur Untersuchung des $I_{Cl,swell}$ und $I_{Cl,Ca}$ wurden die Osmolaritäten mit einem Gefrierpunktsosmometer (Vogel, OM 801) bestimmt. Die Osmolaritäten in mOsmol/kg (mOsmol) sind in den nachfolgenden Tabellen angegeben. In den Tabellen ist auch aufgeführt, ob die Lösungen mit NaOH, CsOH oder HCl auf den nötigen pH eingestellt wurden.

II.D.1 $I_{Cl,swell}$ in CPAE-Zellen

Zu Beginn jeder Messung wurde die Badlösung für die CPAE-Zellen durch eine isotonische Cäsiumlösung (isotonische Badlösung) ersetzt. Die Zugabe von Cäsium-Salzen zur Bad- und Pipettenlösung diente der Hemmung endogener Kaliumkanäle in den CPAE-Zellen. Danach wurde der endogene $I_{Cl,swell}$ der CPAE-Zellen durch die Perfusion mit einer 25% hypotonischen Cäsiumlösung (hypotonische Badlösung) aktiviert. Die Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ erfolgte nach 3 bis 5 min. Um die einzelnen Salzkonzentrationen nicht zu verändern, wurde die Hypotonie der Lösung durch Weglassen von 90 mM Mannitol aus der isotonischen Lösung erreicht.

Die verwendeten Lösungen für die Messungen des $I_{Cl,swell}$ in CPAE-Zellen waren wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	Badlösung
NaCl	150 mM
KCl	6 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1,5 mM
Glucose	10 mM
HEPES	10 mM
pH, eingestellt mit NaOH	pH 7,4
P _{Osm}	320 ± 5 mOsmol

Substanz	Pipettenlösung
CsCl	40 mM
Cs-Aspartat	100 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1,93 mM
EGTA	5 mM
Na ₂ ATP	4 mM
HEPES	10 mM
pH, eingestellt mit CsOH	pH 7,2
P _{Osm}	290 ± 5 mOsmol

Substanz	isotonische Badlösung	hypotonische Badlösung
NaCl	105 mM	105 mM
CsCl	6 mM	6 mM
MgCl ₂	1 mM	1 mM
CaCl ₂	1,5 mM	1,5 mM
Mannitol	90 mM	0 mM
Glucose	10 mM	10 mM
HEPES	10 mM	10 mM
pH, eingestellt mit NaOH	pH 7,4	pH 7,4
P _{Osm}	320 ± 5 mOsmol	240 ± 5 mOsmol

II.D.2 $I_{Cl,Ca}$ in CPAE-Zellen

Für die Untersuchung des Ca^{2+} -aktivierten Chloridkanals wurde eine leicht hypertonische Cäsiumlösung (345 ± 5 mOsmol) als Badlösung verwendet (hypertonische Badlösung). Die erhöhte Osmolarität verhinderte die Koaktivierung des $I_{Cl,swell}$. $I_{Cl,Ca}$ wurde durch das Beladen der Zellen mit $1 \mu M$ freien Ca^{2+} -Ionen über die *Patch*-Pipette erreicht (Nilius *et al.*, 1997 a,b).

Die verwendeten Lösungen für die Messungen des $I_{Cl,Ca}$ waren wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	hypertonische Badlösung
NaCl	150 mM
CsCl	6 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1,5 mM
Mannitol	25 mM
Glucose	10 mM
HEPES	10 mM
pH, eingestellt mit NaOH	pH 7,4
P _{Osm}	345 ± 5 mOsmol

Substanz	Pipettenlösung
CsCl	40 mM
Cs-Aspartat	100 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	4,33 mM
EGTA	5 mM
Na ₂ ATP	4 mM
HEPES	10 mM
pH, eingestellt mit CsOH	pH 7,2
P _{Osm}	290 ± 5 mOsmol

II.D.3 $I_{Cl,swell}$ in *Xenopus*-Oozyten

Als isotonisches Medium wurde eine Mannitol-haltige Lösung (isotonische Badlösung) verwendet. In der hypotonischen Lösung (hypotonische Badlösung) war kein Mannitol zugegeben, um über die Erniedrigung der Osmolarität den $I_{Cl,swell}$ zu aktivieren. Die Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ erfolgte nach 3 bis 10 min im hypotonischen Medium.

Die verwendeten Lösungen für die Messungen des $I_{Cl,swell}$ in *Xenopus*-Oozyten waren wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	isotonische Badlösung	hypotonische Badlösung
NaCl	48 mM	48 mM
KCl	2 mM	2 mM
CaCl ₂	1,8 mM	1,8 mM
MgCl ₂	1 mM	1 mM
HEPES	5 mM	5 mM
Mannitol	110 mM	0 mM
pH, eingestellt mit NaOH	pH 7,5	pH 7,5
P _{Osm}	220 ± 5 mOsmol	110 ± 5 mOsmol

II.D.4 $I_{Cl,swell}$ in Meerschweinchen-Kardiomyozyten

Die isotonische Badlösung enthielt 140 mM Saccharose. Es wurden 2 μ M Nicardipin zugegeben, um die Schwellungs-sensitiven L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle zu inhibieren und 20 μ M Quabain, um Schwellungs-induzierte Ströme durch die Na^+/K^+ -ATPase zu hemmen. Die hypotonische Lösung war wie die isotonische Lösung zusammengesetzt, jedoch ohne Saccharose.

Die verwendeten Lösungen für die Messungen des $I_{Cl,swell}$ in Kardiomyozyten waren wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	isotonische Badlösung	hypotonische Badlösung
NaCl	70 mM	70 mM
MgCl ₂	2 mM	2 mM
BaCl ₂	2 mM	2 mM
Saccharose	140 mM	0 mM
HEPES	5 mM	5 mM
pH, eingestellt mit CsOH	pH 7,5	pH 7,5
P_{Osm}	290 \pm 5 mOsmol	160 \pm 5 mOsmol

Substanz	Pipettenlösung
CsCl	58 mM
Cs-Aspartat	52 mM
TEA-Chlorid	20 mM
EGTA	10 mM
HEPES	5 mM
pH, eingestellt mit CsOH	pH 7,3
P_{Osm}	285 \pm 5 mOsmol

II.D.5 Aktionspotential-Messungen in Kardiomyozyten

Als korrespondierendes Lösungspaar wurden auch hier eine zuckerhaltige Lösung und eine zuckerfreie Lösung verwendet. Jedoch war ihre Zusammensetzung bei den Aktionspotential-Messungen während der Zellschwellung so gewählt, dass Ströme, die für die Entstehung und Formung des Aktionspotentials essentiell sind, nicht gehemmt wurden (kein: Cs^+ , Ba^{2+} , TEA etc.). Außerdem waren der Pipettenlösung Phosphokreatin und GTP zugesetzt, um die Zellen mit ausreichend Energie zu versorgen und eine metabolische Aktivierung des $I_{K,ATP}$ -Stroms zu verhindern.

Die verwendeten Lösungen für Aktionspotential-Messungen waren wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	isotonische Badlösung	hypotonische Badlösung
NaCl	100 mM	100 mM
Saccharose	80 mM	0 mM
KCl	5,4 mM	5,4 mM
MgCl ₂	0,5 mM	0,5 mM
CaCl ₂	1,8 mM	1,8 mM
NaH ₂ PO ₄	0,33 mM	0,33 mM
Glucose	11 mM	11 mM
HEPES	5 mM	5 mM
pH, eingestellt mit NaOH	pH 7,4	pH 7,4
P _{Osm}	290 ± 5 mOsmol	205 ± 5 mOsmol

Substanz	Pipettenlösung
KCl	20 mM
K-Aspartat	100 mM
MgCl ₂	1 mM
EGTA	0,2 mM
HEPES	5 mM
Na ₃ GTP	5 mM
Na ₂ -Phosphokreatin	5 mM
pH, eingestellt mit NaOH	pH 7,3

II.D.6 I_{Ks} , I_{Kr} , I_{K1} in Meerschweinchen-Kardiomyozyten

Für die Messungen des I_{Ks} , I_{Kr} und I_{K1} wurde die sogenannte „Herzmuskelzellen-Lösung“ verwendet (HMZ-Lösung). Zur Ermittlung des I_{Kr} wurde der HMZ-Lösung 5 μ M Nifedipin zugegeben, um die gleichzeitige Aktivierung von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen zu verhindern.

Die verwendeten Lösungen für die Messungen des I_{Ks} , I_{Kr} und I_{K1} der Kardiomyozyten waren wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	HMZ-Lösung
KCl	4,7 mM
NaCl	140 mM
CaCl ₂	1,3 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
pH, eingestellt mit NaOH	pH 7,4

Substanz	Pipettenlösung
KCl	140 mM
NaCl	10 mM
MgCl ₂	1,1 mM
EGTA	1 mM
HEPES	10 mM
K ₂ ATP	1 mM
pH, eingestellt mit KOH	pH 7,2

II.D.7 I_{Ks} in Meerschweinchen-Kardiomyozyten während der Zellschwellung

Die Messungen des I_{Ks} wurden wie zuvor von Rees *et al.* (1995) beschrieben durchgeführt. Die Myozyten wurden mit einer hypotonischen Badlösung perfundiert, die im Vergleich zu der isotonischen Badlösung kein Mannitol enthielt. Beiden Lösungen wurde 0,2 μ M Dofetilid zugegeben, um noch eventuell vorhandene I_{Kr} -Ströme zu hemmen.

Die verwendeten Lösungen für die Messungen des I_{Ks} während einer Zellschwellung waren wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	isotonische Badlösung	hypotonische Badlösung
NaCl	100 mM	100 mM
Saccharose	80 mM	0 mM
KCl	5,4 mM	5,4 mM
MgCl ₂	0,5 mM	0,5 mM
NaH ₂ PO ₄	0,33 mM	0,33 mM
Glucose	5,5 mM	5,5 mM
HEPES	5 mM	5 mM
pH, eingestellt mit NaOH	pH 7,4	pH 7,4
P _{Osm}	290 \pm 5 mOsmol	200 \pm 5 mOsmol

Substanz	Pipettenlösung
K-Aspartat	140 mM
MgCl ₂	5 mM
EGTA	10 mM
HEPES	5 mM
K ₂ ATP	5 mM
pH, eingestellt mit KOH	pH 7,4
P _{Osm}	310 \pm 5 mOsmol

II.D.8 I_{Na} in Meerschweinchen-Kardiomyozyten

Die Badlösung enthielt 30 mM CsCl, 20 mM Tetramethylammonium-Chlorid (TMA-Chlorid), 2 mM CoCl₂ und 5 mM 4-Aminopyridin, um die bei den Messungen störenden Kalium- und Kalziumströme zu inhibieren.

Die verwendeten Lösungen für die Messungen des I_{Na} waren wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	Pipettenlösung
NaCl	16 mM
CsCl	115 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	0,3 mM
EGTA	10 mM
HEPES	5 mM
pH, eingestellt mit CsOH	pH 7,2

Substanz	Badlösung
NaCl	20 mM
CsCl	30 mM
TMA-Chlorid	20 mM
CoCl ₂	2 mM
MgCl ₂	1 mM
4-Aminopyridin	5 mM
Saccharose	80 mM
Glucose	5 mM
HEPES	5 mM
pH, eingestellt mit HCl	pH 7,4

II.D.9 I_{Ca} in Meerschweinchen-Kardiomyozyten

Hier wurden Cäsium-haltige Lösungen verwendet, um endogene Kaliumströme zu inhibieren.

Die verwendeten Lösungen für die Messungen des I_{Ca} waren wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	Badlösung
NaCl	132 mM
CsCl	4,8 mM
MgCl ₂	1,2 mM
CaCl ₂	1 mM
Glucose	5 mM
HEPES	5 mM
pH, eingestellt mit CsOH	pH 7,3

Substanz	Pipettenlösung
CsCl	140 mM
MgCl ₂	2 mM
CaCl ₂	1 mM
EGTA	11 mM
HEPES	10 mM
pH, eingestellt mit CsOH	pH 7,3

II.D.10 $I_{Cl,PKA}$ in Meerschweinchen-Kardiomyozyten

Die Badlösung war analog zu der isotonischen Lösung für die Messungen des $I_{Cl,swell}$ in Kardiomyozyten zusammengesetzt, jedoch wurde die Saccharose aus diesen Lösungen durch weitere 70 mM NaCl ersetzt. Es wurde eine 1 mM Isoprenalin-Stammlösung in Wasser hergestellt, die 100 mM L-Ascorbinsäure als Schutz vor Oxidation enthielt. Um den $I_{Cl,PKA}$ zu aktivieren, wurde entweder Isoprenalin in einer Endkonzentration von 1 μ M oder 500 μ M 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) in die Badlösung gegeben. Die Pipettenlösung war wie für die Messung des $I_{Cl,swell}$ zusammengesetzt.

Die verwendete Badlösung für die Ermittlung des $I_{Cl,PKA}$ in Kardiomyozyten war wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	Badlösung
NaCl	140 mM
MgCl ₂	2 mM
BaCl ₂	2 mM
Saccharose	0 mM
HEPES	5 mM
pH, eingestellt mit CsOH	pH 7,5
P _{Osm}	290 ± 5 mOsmol

II.D.11 Expression von hCFTR- und CLC-Chloridkanälen in *Xenopus*-Oozyten

Die Standardlösung für die Messung der in *Xenopus*-Oozyten heterolog exprimierten Chloridkanäle war die bereits erwähnte ND-96-Lösung. Die Aktivierung des hCFTR erfolgte über die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Hierzu enthielt diese Lösung zusätzlich 1 mM IBMX und 10 µM Forskolin. Die vollständige Aktivierung des hCFTR benötigte dabei 3 bis 7 min.

II.E Molekularbiologische Methoden

II.E.1 Polymerasekettenreaktion

Die Analyse der Gewebeverteilung des als TASK-4 bezeichneten Tandem-von-zwei-Poren-Kanals wurde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Hierfür wurden cDNAs von verschiedenen Geweben (Clontech) als Matrize für eine PCR verwendet. Zur DNA-Amplifikation wurde *Taq*-DNA-Polymerase (Gibco BRL) verwendet. Die TASK-4-spezifischen Primer hatten die folgenden Sequenzen: 5'-CCTTCATCACCTCAGCACC-3' für den vorwärts-gerichteten Primer und 5'-ACACCCGAAAGTCACATCCC-3' für den rückwärts-gerichteten Primer. Als Kontrolle für die einzelnen Gewebe wurden Primer für GAPDH (Clontech) verwendet. Um die Spezifität und Sensitivität der Reaktion für die TASK-4-Matrize zu erhöhen, wurde ein sogenanntes *touch-down*-PCR-Protokoll verwendet. Bei dieser Art der PCR-Reaktion werden erst mehrere Zyklen mit einer Hybridisierungs-Temperatur durchgeführt, die leicht oberhalb der errechneten Schmelztemperatur der Primer liegt.

Hierdurch wird der Anteil unspezifischer Hybridisierungen während der ersten Zyklen vermindert.

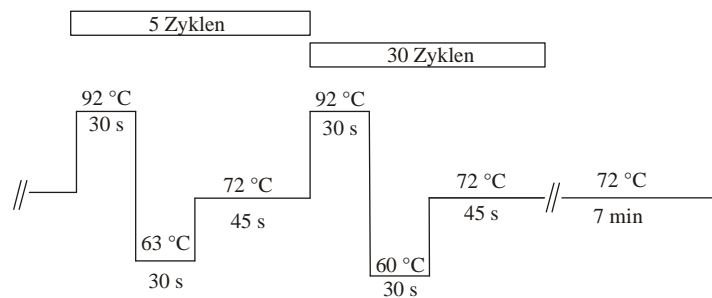


Abbildung II.8: *Touch-down*-PCR-Protokoll zur Bestimmung der Gewebeverteilung des TASK-4-Kaliumkanals. Zuerst wurden 5 Zyklen von 30 s Denaturierung bei 92°C, 30 s Hybridisierung bei 63°C und 45 s Synthese bei 72°C durchgeführt, gefolgt von 30 Zyklen mit Hybridisierung bei 60°C.

Die PCR-Produkte wurden über ein 2%iges Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer Ethidiumbromidfärbung im UV-Bereich detektiert. Anschließend wurden die erhaltenen PCR-Produkte aus dem Gel eluiert, gereinigt und ihre Identität mit einem automatischen Sequenziergerät (ABI 310, Perkin Elmer) ermittelt.

II.E.2 Northern-Blot-Analyse

Eine Digoxigenin(DIG)-markierte-RNA-Sonde von 0,75 kb Länge wurde ausgehend von der kompletten Sequenz des hKChIP2long mit Hilfe des DIG-RNA-Labeling-Kits (Roche Molecular Biochemicals) entsprechend den Herstellerangaben synthetisiert. Die Sonde wurde mit verschiedenen RNA-Blots (Clontech), den Herstellerangaben folgend, über Nacht hybridisiert, und die Membranen wurden für circa 4 min auf einem Lumi-Imager (Roche - Molecular Biochemicals) detektiert.

II.E.3 Klonierung des TASK-4

Ausgehend von den bekannten Sequenzen bereits klonierter Zwei-Poren-Domänen-Kaliumkanäle wurde eine Computer-gestützte BLAST-Suche in der Incyte-LifeSeq-Datenbank durchgeführt, um neue Mitglieder dieser Superfamilie zu identifizieren. Hierbei wurde eine EST-Sequenz identifiziert, die eine signifikante Ähnlichkeit zum humanen TRAAK-Kaliumkanal (Fink *et al.*, 1998) besaß. Die DNA-Sequenz des anfänglich nur partiellen cDNA-

Klons wurde durch 5'-RACE-PCR vervollständigt. Hierzu wurde cDNA aus adulter humaner Niere (Edge BioSystems) verwendet. Anschließend wurden vom 5'- und 3'-Ende PCR-Primer abgeleitet, um den Volle-Länge-Klon aus humaner Nebenieren-cDNA zu amplifizieren, der dann in den *Xenopus*-Oozyten-Expressions-Vektor pSGEM (Villmann *et al.*, 1997) subkloniert wurde. Beide Stränge der cDNA wurden unter Verwendung eines automatischen DNA-Sequenziergerätes (ABI 310, Perkin Elmer) vollständig sequenziert.

II.E.4 Klonierung des hKChIP2

Beide hKChIP2-Isoformen wurden durch PCR aus humaner Herz-cDNA (Marathon-Ready, Clontech) kloniert. Hierfür wurden Primer verwendet (vorwärts: 5'-GCCATGCGGGGCCAGGGC-3' und rückwärts: 5'-GGGCTAGATGACATTGTCAAAG-3'), die von der zuvor publizierten hKChIP2-cDNA-Sequenz (accession number AF199598) abgeleitet wurden. Die beiden cDNA-Klone wurden automatisch sequenziert (ABI 310, Perkin Elmer) und in den pSGEM-Vektor kloniert (Villmann *et al.*, 1997).

II.E.5 Konstruktion der Δ N2-67-hKv4.3long-Mutante

Für die Koexpressions-Studien des hKv4.3 wurde ein N-terminal trunkierter Kv4.3-Kanal konstruiert. Die N-terminale Deletion wurde über PCR-Reaktionen eingeführt. Der N-terminale PCR-Primer enthielt eine Kozak-Erkennungs-Sequenz mit einem Translations-Initiations-Kodon. Der C-terminale Primer enthielt ein Translations-Stop-Kodon.

II.F Datenauswertung und Statistik

II.F.1 Datenauswertung

Die kinetische Charakterisierung der Spannungen der halb-maximalen Aktivierung und halb-maximalen Inaktivierung des hKv4.3 wurden mit dem Programm Origin (Version 5.0, Microcal Software) unter Verwendung einer Boltzmann-Funktion durchgeführt. Die Zeitkonstanten der Inaktivierung für die hKv4.3-Ströme erhielt man durch das Anpassen an eine monoexponentiell abnehmende Funktion (Fit) der ersten 200 ms in Pulse Fit (HEKA) bei einer Spannung von +50

mV. Die Zeitkonstante für die Erholung von der Inaktivierung wurde durch eine monoexponentiell zunehmende Funktion in Origin (Version 5.0) gefittet.

II.F.2 Statistik

Die Versuchsergebnisse wurden als Mittelwerte und dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben (engl.: standard error of the mean = S.E.M.). Die Anzahl der Experimente wurde mit "n" angegeben. Die statistisch signifikanten Unterschiede der Ruhemembranpotentiale, der Aktionspotentialdauer und der Chloridleitfähigkeiten der Kardiomyozyten wurden mit einem zwei Populationen, gepaarten Studenten-T-Test mit dem Programm Origin geprüft. Statistisch signifikant unterschiedliche Daten wurden mit einem Stern * markiert, wenn $p < 0,05$ war, und mit zwei Sternen ** oder zwei Plus-Zeichen ⁺ markiert, wenn $p < 0,01$ war.

III Ergebnisse

III.A *Pharmakologische und elektrophysiologische Untersuchungen des $I_{Cl,swell}$; Beteiligung des $I_{Cl,swell}$ am atrialen Aktionspotential und an Chloridleitfähigkeiten von Kardiomyozyten der Ratte*

Die bisher bekannten klassischen Chloridkanalblocker wie die Stilbenderivate (z. B. DIDS, SITS), die Fenamate (z. B. Nifluminsäure, Flufenaminsäure), die Diphenylderivate (z. B. DPC, DCDPC) und das 9-AC sind in ihrer Pharmakologie bisher nicht ausreichend beschrieben. Allen diesen Blockern ist jedoch die fehlende Selektivität zwischen dem $I_{Cl,swell}$ und sowohl den Mitgliedern der CLC-Familie als auch dem hCFTR gemeinsam. Es gibt bisher noch keine spezifischen Blocker für die verschiedenen Chloridkanäle. Wir haben einen spezifischen und potenten Blocker des $I_{Cl,swell}$ gesucht, um dessen Einfluss auf das atriale Aktionspotential unter Zellschwellung zu untersuchen. In Experimenten an isolierten Herzzellen sollte untersucht werden, ob eine $I_{Cl,swell}$ -Blockade Schwellungs-induzierte APD-Verkürzung verhindern oder aufheben kann. Mit Hilfe dieser Experimente sollte überprüft werden, ob die $I_{Cl,swell}$ -Blockade als neuer antiarrhythmischer Ansatz bei Schwellungs-induzierten Veränderungen des Aktionspotentials dienen kann. Außerdem haben wir Experimente an Kardiomyozyten der Ratte durchgeführt, um die Aussagekraft von *in-vivo*-Experimenten mit Rattenherzen zu überprüfen.

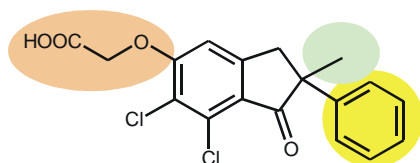
III.A.1 **Identifizierung eines neuen spezifischen $I_{Cl,swell}$ -Blockers (DCPIB); Inhibition des endogenen $I_{Cl,swell}$ von *Xenopus*-Oozyten durch Acylaryloxysäure-Derivate**

Für das nicht-diuretische Acylaryloxysäure-Derivat DCPIB wurde gezeigt, dass es das Schwellen von astroglialen Zellen verhindern kann (Bourke *et al.*, 1981). Das strukturell eng verwandte Derivat IAA-94 ist als Blocker von epithelialen Chloridkanälen (Landry *et al.*, 1989) und des $I_{Cl,swell}$ (Sorota, 1994) beschrieben worden. Dies hat uns dazu veranlasst zu untersuchen, ob DCPIB ebenfalls in der Lage ist, den $I_{Cl,swell}$ zu hemmen. Hierfür wurde mit Hilfe der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemme untersucht, ob der endogene $I_{Cl,swell}$ von *Xenopus*-Oozyten durch DCPIB und einige seiner Strukturabkömmlinge gehemmt werden kann. In *Xenopus*-Oozyten kann man einen endogenen $I_{Cl,swell}$ nur messen, wenn die Oozyten noch von den Follikeln umschlossen sind (Arellano & Miledi, 1995; Arellano *et al.*, 1996) oder wenn sie zuvor manuell defollikuliert wurden (Ackerman *et al.*, 1994). Für die Untersuchungen des

$I_{Cl,swell}$ wurden Oozyten manuell defollikuliert und anschließend in Theophyllin-freiem Medium aufbewahrt, um eine starke Reduktion der Stromamplituden des Schwellungs-aktivierten Chloridkanals aufgrund seiner cAMP-Abhängigkeit (Nagasaki *et al.*, 2000) zu vermeiden. Die maximale Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ war nach 3- bis 5-minütiger Perfusion mit hypotonischer Lösung erreicht.

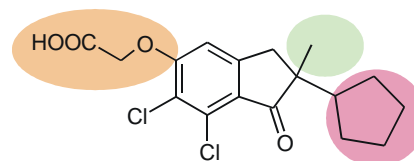
Es wurde die Inhibition des $I_{Cl,swell}$ durch 20- μ M-Lösungen von IAA-94, Indacrinon (IAA-92), R-(+)-DIOA, S846365 und DCPIB bei +40 mV bestimmt. Wie schon zuvor beschrieben, ist IAA-94 ein Blocker des $I_{Cl,swell}$ -Stroms. Die Inhibition des $I_{Cl,swell}$ von *Xenopus*-Oozyten durch die 20- μ M-IAA-94-Lösung betrug jedoch nur $13,1 \pm 2,0\%$ ($n = 6$). Indacrinon (IAA-92) zeigte bei einer Konzentration von 20 μ M keine signifikante Hemmung des $I_{Cl,swell}$ ($1,0 \pm 1,0\%$; $n = 4$). Deshalb erscheint die Cyclopentylgruppe in Position 2 des IAA-94 für die Inhibition des $I_{Cl,swell}$ von Bedeutung zu sein. Interessanterweise führt der Austausch der Methylgruppe in der Position 2 des Indanon-Gerüsts gegen eine Butylgruppe zu einer deutlichen Wirkungsverstärkung, da die Substanzen S846365 und R-(+)-DIOA eine Inhibition von $32,4 \pm 3,6\%$ ($n = 4$) bzw. von $33,2 \pm 6,9\%$ ($n = 4$) zeigten. Die durch diese Substitution erhaltene Wirkungsverstärkung verdeutlicht die Bedeutung der Substituenten in Position 2 auf die Effektivität der $I_{Cl,swell}$ -Blockade. Da das Razemat (S846365) und das (+)-Enantiomer (R-(+)-DIOA) keine signifikant unterschiedliche Effektivität hatten, scheint ihre Blockade keine Enantioselektivität zu besitzen. DCPIB unterscheidet sich nicht in den Substituenten des Indanon-Gerüsts von den beiden zuvor genannten Derivaten, sondern ist die homologe Buttersäure des S846365. DCPIB zeigte die stärkste Inhibition von den getesteten Acylaryloxysäure-Derivaten mit einem Wert von $70,6 \pm 1,4\%$ ($n = 4$) bei einer Konzentration von 20 μ M. Dies zeigt, dass neben den Substituenten in der Position 2 des Indanon-Gerüsts die homologen Alkanoxysäure-Substituenten in Position 5 einen entscheidenden Einfluss auf die Hemmung des $I_{Cl,swell}$ besitzen. Diese Untersuchung identifizierte DCPIB als einen neuen potenten Blocker des $I_{Cl,swell}$.

IAA-92 / Indacrinon

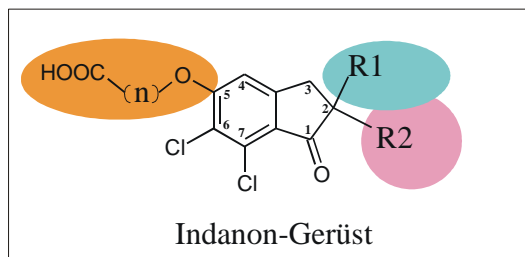


1,0 ± 1,0 % Inhibition

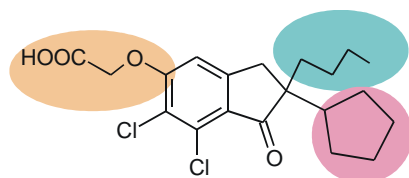
IAA-94



13,1 ± 2,0 % Inhibition



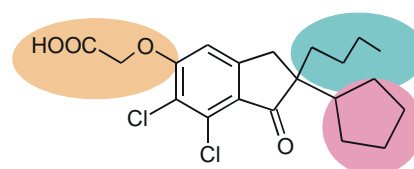
S846365



Razemat

32,4 ± 3,6 % Inhibition

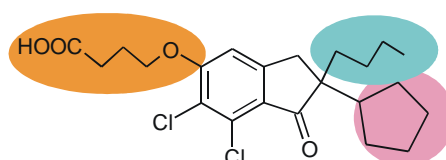
R-(+)-DIOA



R-(+)-Enantiomer

33,2 ± 6,9 % Inhibition

DCPIB



Razemat

70,6 ± 1,4 % Inhibition

Abbildung III.1 Struktur-Wirkungs-Beziehung einiger Acylaryloxysäure-Derivate. Für eine potente Inhibition des $I_{Cl,swell}$ sind zwei Epitope im Indanon-Gerüst von Bedeutung. Hierbei sind die Substituenten in Position 2 des Grundgerüsts wichtig, wobei der Cyclopentyl-Rest dem Phenyl-Substituenten und die n-Butyl-Gruppe dem Methyl-Rest hinsichtlich der Inhibitionsstärke überlegen sind. Ebenfalls von Bedeutung ist der Substituent in Position 5 des Indanon-Grundgerüsts, da eine Kettenverlängerung des Alkanoxysäure-Substituenten zur homologen Butoxysäure zu einer deutlichen Wirkungsverstärkung führt. DCPIB vereint die effektivsten Substituenten der getesteten Substanzen und zeigt die stärkste Inhibition des $I_{Cl,swell}$ -Stroms.

Die durch das DCPIB vermittelte Hemmung des $I_{Cl,swell}$ war nicht abhängig von der Spannung und nach dem Auswaschen von DCPIB durch die hypotonische Badlösung vollständig reversibel.

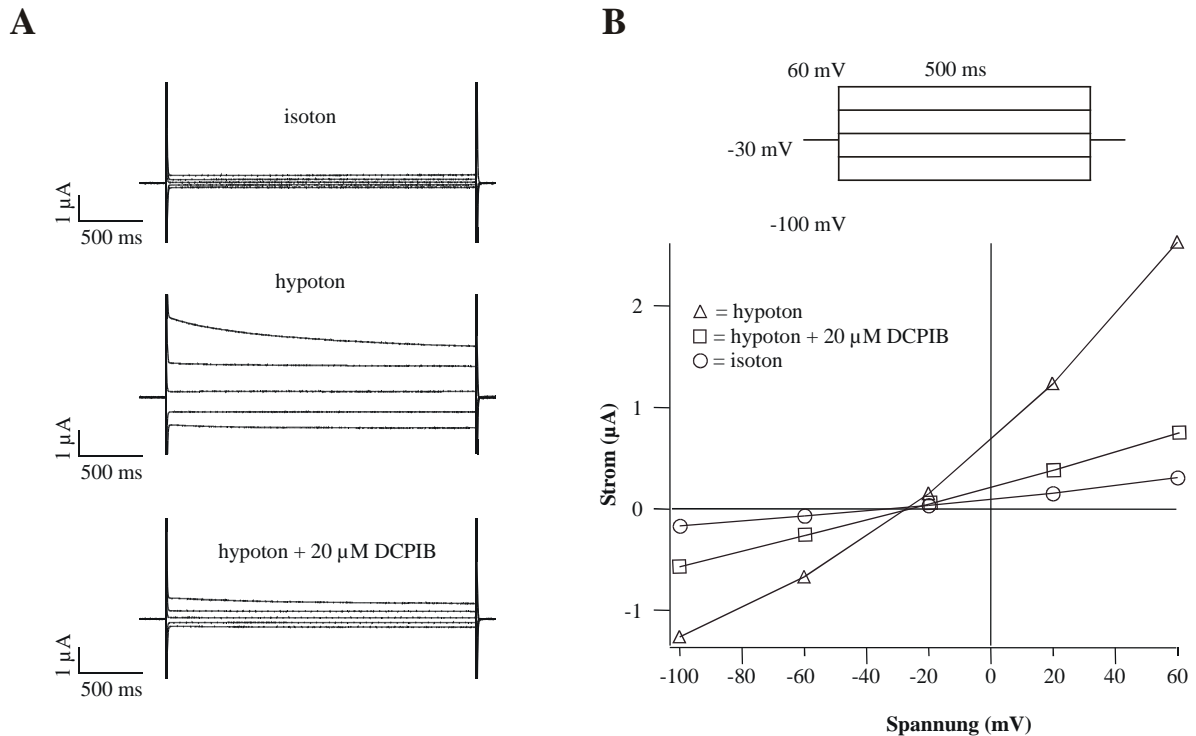


Abbildung III.2: Inhibition des endogenen $I_{Cl,swell}$ von *Xenopus*-Oozyten durch 20 μM DCPIB. (A) Stromspuren der basalen Leitfähigkeit (isoton), des $I_{Cl,swell}$ (hypoton) und der verbleibenden Ströme nach Zugabe von DCPIB (hypoton + 20 DCPIB). (B) Strom-Spannungs-Verhältnisse der in (A) gezeigten endogenen Ströme sowie das verwendete Spannungsprotokoll.

III.A.2 DCPIB ist ein potenter Blocker des nativen $I_{Cl,swell}$ von CPAE-Zellen und Kardiomyozyten

Anschließend wurde der Einfluss von DCPIB auf den $I_{Cl,swell}$ von zwei weiteren Zellarten untersucht. Hierfür wurden *Patch-Clamp*-Messungen in der *whole-cell*-Konfiguration durchgeführt. Es wurden endotheliale Zellen (CPAE-Zellen) und atriale Kardiomyozyten von Meerschweinchen verwendet, die beide einen nativen Schwellungs-sensitiven Chloridstrom besitzen. In CPAE-Zellen kann durch osmotisches Schwellen der Zellen in hypotonischem Medium ein großer Strom, der den $I_{Cl,swell}$ repräsentiert, aktiviert werden (Nilius *et al.*, 1994). Die maximale Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ war nach 3- bis 5-minütiger Perfusion mit hypotonischer Lösung erreicht. Die Zugabe von 10 μM DCPIB zu den osmotisch geschwollenen Zellen hemmte den Gesamtstrom um $83,7 \pm 4,0\%$ ($n = 4$), was einer fast vollständigen Hemmung der

Schwellungs-induzierten Komponente der Chloridleitfähigkeit entspricht (Abbildung III.4A-C). Nach Abzug des basalen, nicht DCPIB-sensitiven Stroms ergab sich eine Hemmung des $I_{Cl,swell}$ durch 10 μM DCPIB um $98,7 \pm 5,1\%$ ($n = 4$). Der maximale Block war 3 bis 5 min nach Zugabe des DCPIB erreicht. Der IC_{50} für den Block des $I_{Cl,swell}$ durch DCPIB betrug 4,1 μM bei -80 mV (Abbildung III.3). Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes wurde ohne den Abzug der basalen Leitfähigkeit durchgeführt. Nach Abzug des basalen, nicht DCPIB-sensitiven Stroms ergab sich ein IC_{50} von 2,5 μM bei -80 mV.

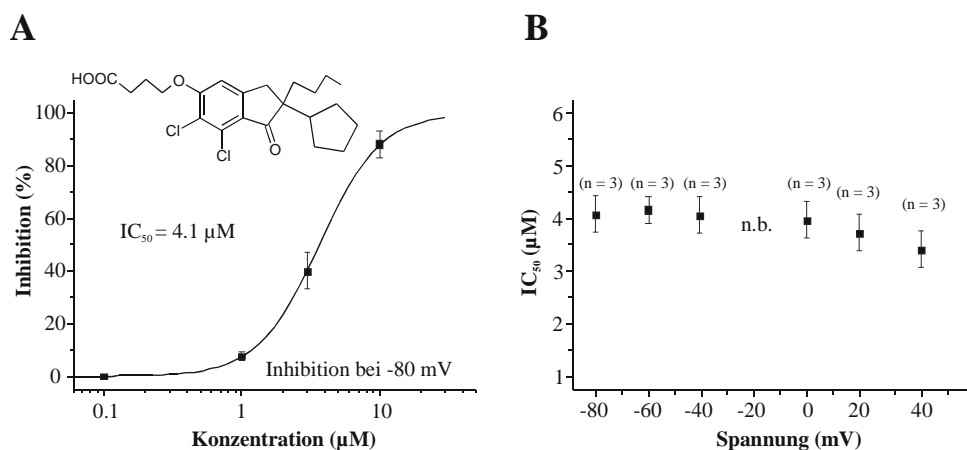


Abbildung III.3: Chemische Struktur und Dosis-Wirkungs-Kurve von DCPIB für die Inhibition des $I_{Cl,swell}$ in CPAE-Zellen. (A) DCPIB blockierte den $I_{Cl,swell}$ in CPAE-Zellen bei einer Spannung von -80 mV mit einer halb-maximalen Konzentration (IC_{50}) von 4,1 μM . Die Bestimmung des IC_{50} wurde ohne den Abzug der basalen Leitfähigkeit durchgeführt. Wurde der basale, nicht DCPIB-sensitive Strom bei der Kalkulation des IC_{50} abgezogen, dann ergab sich ein IC_{50} von 2,5 μM bei -80 mV (B) IC_{50} -Werte für die Hemmung des $I_{Cl,swell}$ -Stroms in CPAE-Zellen durch DCPIB bei unterschiedlichen Spannungen (n.b. = nicht bestimmt). Die IC_{50} -Werte sind mit den entsprechenden Standardabweichungen angegeben. Die Werte in Klammern geben die Zahl der Messungen an.

Anschließend wurde die Effektivität des DCPIB auf den atrialen $I_{Cl,swell}$ -Strom untersucht. Hierbei wurden die zuvor für ventrikuläre Kardiomyozyten beschriebenen Methoden verwendet (Vandenberg *et al.*, 1994). DCPIB bewirkte in den Myozyten eine starke Blockade des atrialen $I_{Cl,swell}$. Die Inhibition durch 10 μM DCPIB betrug $72,9 \pm 7,4\%$ ($n = 4$) (Abbildung III.4D-F), wobei bei der Kalkulation des Wertes die basale, nicht DCPIB-sensitive Leitfähigkeit nicht abgezogen wurde. Nach deren Abzug betrug die Inhibition $85,3 \pm 6,9\%$ ($n = 4$).

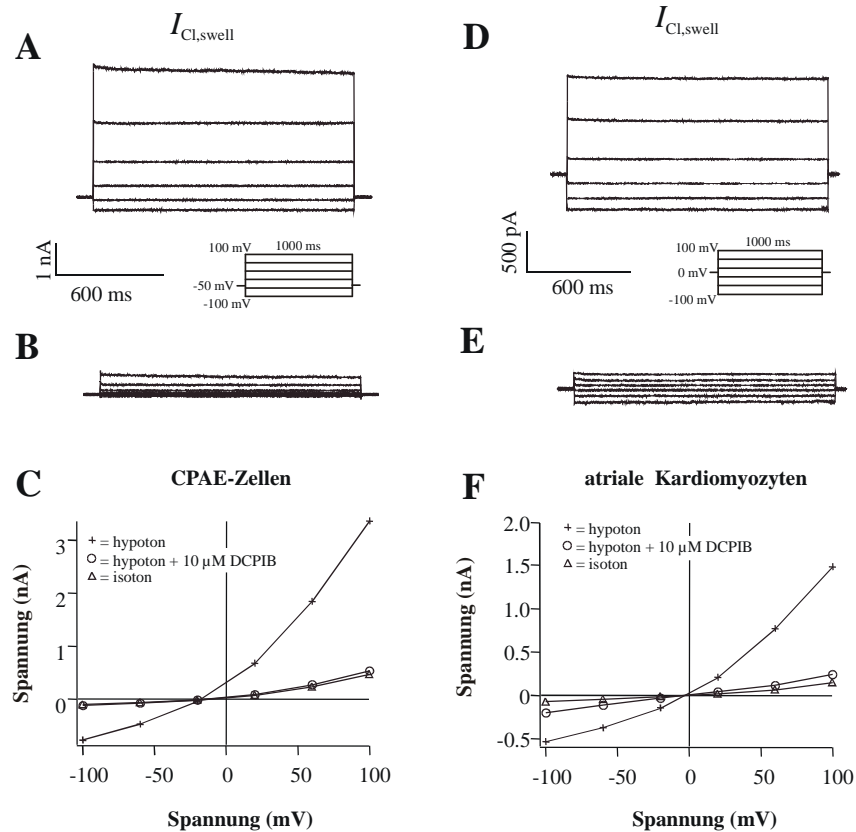


Abbildung III.4 Effekte von DCPIB auf native $I_{Cl,swell}$ -Ströme von CPAE-Zellen und atrialen Kardiomyozyten des Meerschweinchens. (A) $I_{Cl,swell}$ -Ströme von CPAE-Zellen nach 3- bis 5-minütiger Perfusion mit hypotonischem Medium. (B) Hemmung des $I_{Cl,swell}$ in CPAE-Zellen durch 10 μ M DCPIB. (C) Strom-Spannungs-Kurven, die durch die illustrierten Spannungsprotokolle von einem Haltepotential von -50 mV aus erhalten wurden, zeigen die Leitfähigkeiten in isotonischem Medium (isoton), nach dem osmotischen Schwellen in hypotonischer Lösung (hypoton) und nach der Zugabe von 10 μ M DCPIB zu der hypotonischen Lösung (hypoton + 10 μ M DCPIB). (D) $I_{Cl,swell}$ -Strom atrialer Kardiomyozyten des Meerschweinchens. Die Perfusion mit hypotonischem Medium dauerte 5 bis 10 min. Die atrialen Ströme wurden, ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV, durch das abgebildete Spannungsprotokoll ermittelt. Der Lösung waren 2 μ M Nicardipin zugesetzt worden, um Schwellungs-induzierte L-Typ- Ca^{2+} -Ströme zu hemmen. Außerdem enthielten die Lösungen 20 μ M Quabain, um Schwellungs-induzierte Na^+/K^+ -ATPase-Ströme (Whalley *et al.*, 1993) zu verhindern. (E) Stromspuren des $I_{Cl,swell}$ von atrialen Kardiomyozyten nach der Zugabe von 10 μ M DCPIB zu der hypotonischen Badlösung. (F) Die aus (D) und (E) resultierenden Strom-Spannungs-Kurven atrialer Kardiomyozyten.

DCPIB (10 μ M) war somit in der Lage, in allen untersuchten Zellen den nativen $I_{Cl,swell}$ potent zu hemmen. Alle Zellarten besaßen unter isoosmotischen Bedingungen eine basale Leitfähigkeit. Bei CPAE-Zellen führte die Behandlung mit 50 μ M DCPIB zu einer Reduktion dieser basalen Leitfähigkeit um $15,8 \pm 4,2\%$ ($n = 4$), während der basale Strom von atrialen Kardiomyozyten nur um $8,5 \pm 3,0\%$ ($n = 4$) reduziert wurde. Dieses Ergebnis ist konsistent mit einer niedrigen basalen Aktivität des $I_{Cl,swell}$ in isoosmotischer Umgebung. Dies bedeutet, dass

DCPIB (10 μM) sowohl in CPAE-Zellen als auch in atrialen Kardiomyozyten die Schwellungs-induzierte Chloridleitfähigkeit fast vollständig hemmte (Abbildung III.4F).

III.A.3 Spezifität von DCPIB

III.A.3.a DCPIB zeigt Selektivität gegenüber anderen Chloridkanälen

Um die Spezifität von DCPIB innerhalb der Chloridkanäle zu untersuchen, wurde der Effekt von DCPIB auf den Ca^{2+} -aktivierten Chloridstrom $I_{\text{Cl,Ca}}$ in CPAE-Zellen mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik sowie auf einige Mitglieder der CLC-Chloridkanal-Familie und den humanen CFTR-Chloridkanal nach heterologer Expression in *Xenopus*-Oozyten getestet.

Wie zuvor in der Literatur beschrieben, konnte der hCLC-3, welcher als Kandidaten-Gen für den $I_{\text{Cl,swell}}$ galt, nicht funktionell in *Xenopus*-Oozyten exprimiert werden (Borsani *et al.*, 1995). Die Injektion der einzelnen cRNAs, die für die anderen Chloridkanäle kodieren, führte zur Generierung der bekannten Ionenströme (Bear *et al.*, 1991; Drumm *et al.*, 1991; Thiemann *et al.*, 1992; Steinmeyer *et al.*, 1994; Uchida *et al.*, 1993; Steinmeyer *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 1999).

Die Abbildung III.5 zeigt, dass DCPIB (10 μM) keine signifikante Inhibition des $I_{\text{Cl,Ca}}$ in CPAE-Zellen zeigte.

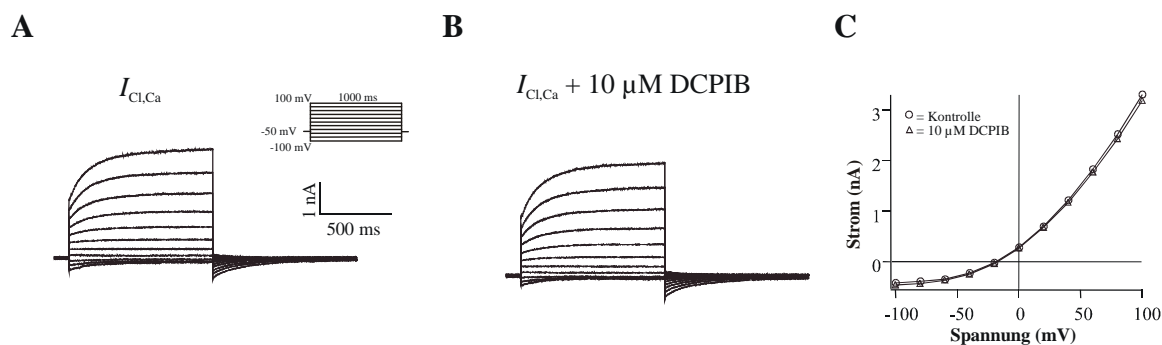


Abbildung III.5: Effekte von DCPIB auf den nativen $I_{\text{Cl,Ca}}$ -Strom von CPAE-Zellen. (A) Die $I_{\text{Cl,Ca}}$ -Ströme wurden durch 3 s lange Spannungssprünge zu unterschiedlichen Spannungen, ausgehend von einem Haltepotential von -50 mV, hervorgerufen. (B) $I_{\text{Cl,Ca}}$ -Ströme in der Gegenwart von 10 μM DCPIB. (C) Strom-Spannungs-Verhältnis der Ströme aus (A) und (B). Die Ströme wurden am Ende des Spannungssprungs gemessen und ausgewertet.

Ergebnisse

Bei der verwendeten Konzentration von 10 μM zeigte DCPIB auch keine Effekte auf die Ströme des CLC-1, -2, -4, -5, -K1 und des hCFTR, nachdem diese in *Xenopus*-Oozyten exprimiert wurden (Tabelle III.1). Die Abbildung III.6 verdeutlicht die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

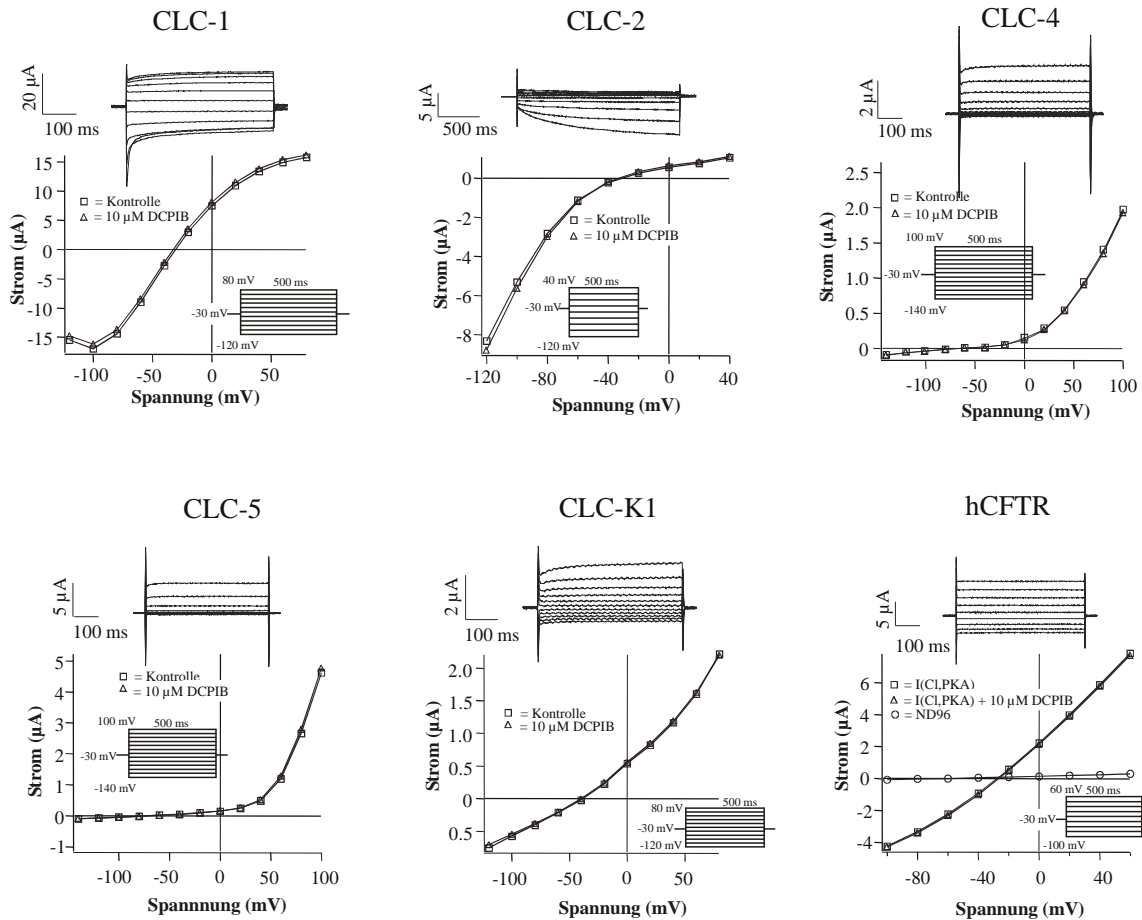


Abbildung III.6: Chloridströme kodiert von CLC-Chloridkanal-Familienmitgliedern und dem hCFTR in ND-96-Lösung und nach Zugabe von 10 μM DCPIB. Das Haltepotential für diese Experimente war -30 mV . Die Spannungsprotokolle, die für die einzelnen Ströme verwendet wurden, sind abgebildet. Der hCFTR-Strom wurde durch die Zugabe von 1 mM IBMX und 10 μM Forskolin aktiviert.

In Tabelle III.1 sind die Inhibitionswerte von DCPIB (10 μM) auf den nativen $I_{\text{Cl,swell}}$ und $I_{\text{Cl,Ca}}$ der CPAE-Zellen sowie auf die in *Xenopus*-Oozyten heterolog exprimierten Chloridkanäle angegeben. Aus den Resultaten ergab sich, dass DCPIB bei der verwendeten Konzentration für den Chloridstrom $I_{\text{Cl,swell}}$ selektiv ist und andere Chloridströme durch DCPIB nicht signifikant beeinflusst werden.

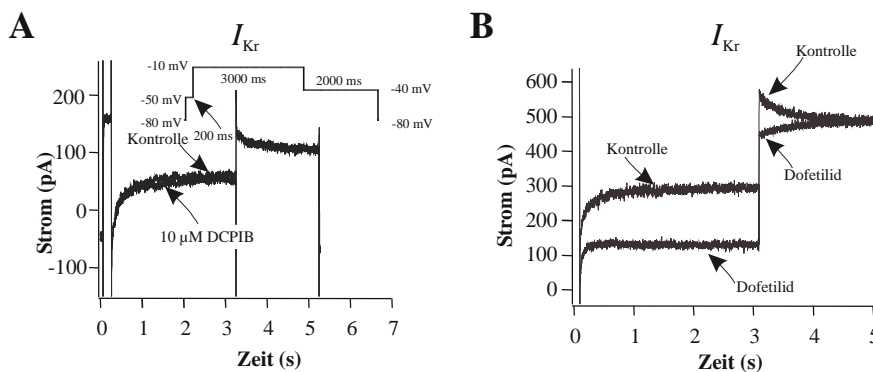
Ergebnisse

Tabelle III.1: Einfluss von DCPIB auf native Chloridströme von CPAE-Zellen sowie auf in *Xenopus*-Oozyten heterolog exprimierte Chloridkanäle. Die nativen $I_{Cl,swell}$ - und $I_{Cl,Ca}$ -Ströme wurden in CPAE-Zellen gemessen. Der hCFTR sowie die CLC-Chloridkanäle wurden in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. Die Werte sind bei einer Blocker-Konzentration von 10 μM mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben (n = Anzahl der Zellen). * Die Inhibition wurde ohne das Abziehen der basalen Leitfähigkeit errechnet. • Die Inhibition wurde nach Abzug der basalen Leitfähigkeit errechnet.

Strom/Klon	% Inhibition (10 μM DCPIB)	n
* $I_{Cl,swell}$	83,7 \pm 4,0	$n = 4$
• $I_{Cl,swell}$	98,7 \pm 5,1	$n = 4$
$I_{Cl,Ca}$	4,1 \pm 0,3	$n = 3$
hCFTR	0 \pm 0	$n = 4$
hCLC-1	0 \pm 0	$n = 4$
rCLC-2	1,6 \pm 1,6	$n = 3$
hCLC-4	0 \pm 0	$n = 3$
hCLC-5	0 \pm 0	$n = 3$
rCLC-K1	5,9 \pm 3,4	$n = 4$

III.A.3.b Untersuchung nativer Ströme in Meerschweinchen-Kardiomyozyten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass DCPIB innerhalb der Chloridkanäle für den $I_{Cl,swell}$ spezifisch ist, sollte der Einfluss von DCPIB auf kardiale Ionenkanäle untersucht werden, die an der Generierung und Formung des Aktionspotentials beteiligt sind. Hierfür wurden atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten des Meerschweinchens isoliert und native Ionenströme in Anwesenheit von 10 μM DCPIB ermittelt (Abbildung III.7).



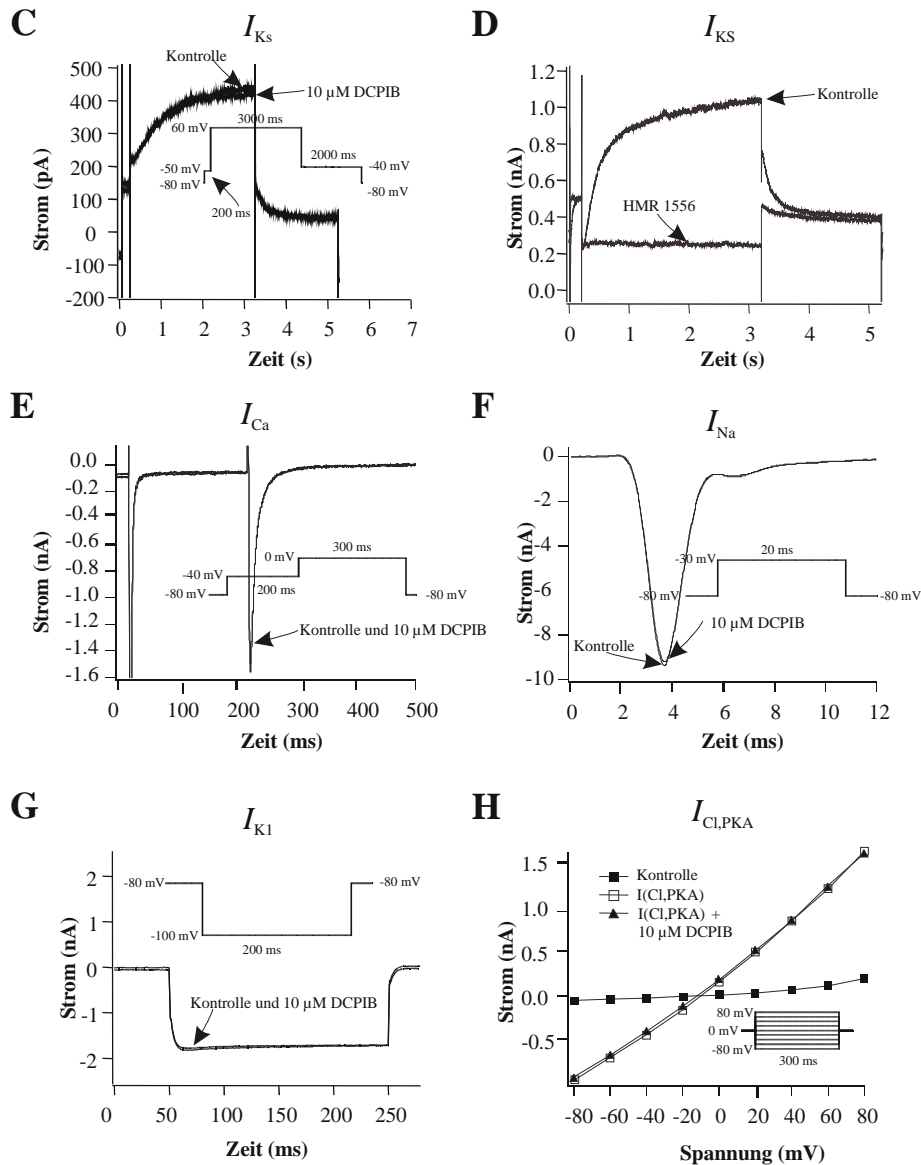


Abbildung III.7: Einfluss von 10 μ M DCPIB auf Ströme von nativen Kardiomyozyten des Meerschweinchens. *Whole-cell-Patch-Clamp*-Untersuchungen wurden routinemäßig mit einem Haltepotential von -80 mV durchgeführt, wobei der $I_{Cl,PKA}$ bei einem Haltepotential von 0 mV untersucht wurde. (A) Die Hemmung des I_{Kr} wurde anhand der Schwanz-Ströme bei -40 mV und (C) die Hemmung des I_{Ks} bei +60 mV ausgewertet. (B) Außerdem wurde die Hemmung des I_{Kr} durch 0,2 μ M Dofetilid und (D) des I_{Ks} durch 1,0 μ M HMR 1556 untersucht. Die Verwendung dieser selektiven Blocker zeigte, dass die verwendeten Spannungsprotokolle geeignet waren, den I_{Ks} vollständig getrennt vom I_{Kr} zu messen (Bosch *et al.*, 1998). (E) Der I_{Ca} wurde anhand seiner Spitzen-Einwärtsströme ausgewertet. Die Spannungssprünge wurden alle 15 s ausgeführt, um die kontinuierliche Abnahme (engl.: rundown) des Stroms zu minimieren. (F) Der I_{Na} -Einwärtsstrom wurde durch einen 20 ms langen Spannungssprung nach -30 mV, mit einer Frequenz von 1 Hz, ausgelöst und anhand seiner Spitzen-Einwärtsströme ausgewertet. (G) Die I_{K1} -Hemmung wurde bei einer Spannung von -100 mV ausgewertet. (H) Der $I_{Cl,PKA}$ wurde durch 1 μ M Isoprenalin oder durch 500 μ M IBMX aktiviert. Die Hemmung des $I_{Cl,PKA}$ wurde bei einer Spannung von +40 mV bestimmt. Die verwendeten Spannungsprotokolle sind bei den jeweiligen Strom-Messungen angegeben.

DCPIB zeigte hierbei keine Beeinflussung der nativen Kationenströme I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1} , I_{Na} und I_{Ca} (Tabelle III.2). Zusätzlich konnte keine Verschiebung in den Strom-Spannungs-Kurven dieser Ströme festgestellt werden, was ebenfalls zu einer Veränderung der APD führen würde (keine Abbildung). Der native $I_{Cl,PKA}$ -Chloridstrom wird durch eine kardiale Isoform des CFTR-Gens kodiert. Ähnlich wie nach der Expression des hCFTR in *Xenopus*-Oozyten (Abbildung III.6) zeigte 10 μ M DCPIB auch keine Inhibition des $I_{Cl,PKA}$ (Tabelle III.2 und Abbildung III.7H). Tabelle III.2 verdeutlicht die Inhibitionswerte des DCPIB auf native atriale Ströme des Meerschweinchens.

Tabelle III.2: Einfluss von DCPIB auf native Ionenströme von atrialen Meerschweinchen-Kardiomyozyten. Die Werte sind mit der entsprechenden Standardabweichung bei einer Blocker-Konzentration von 10 μ M (n = Anzahl der Zellen) angegeben. * Die Inhibition wurde ohne die Subtraktion der basalen Leitfähigkeit errechnet. • Errechnete Hemmung des Stroms bei abgezogener basaler Leitfähigkeit. Da der $I_{Cl,PKA}$ -Strom vor allem in ventrikulären Kardiomyozyten vorkommt (Vandenberg *et al.*, 1994), wurden für seine Messung ventrikuläre Zellen verwendet. Die Daten für die anderen Ströme wurden an atrialen Kardiomyozyten erhoben. Ähnliche Ergebnisse wurden aber auch an ventrikulären Zellen beobachtet.

Kardialer Strom	% Inhibition (10 μ M DCPIB)	n
* $I_{Cl,swell}$	$72,9 \pm 7,4$	$n = 4$
• $I_{Cl,swell}$	$85,3 \pm 6,9$	$n = 4$
I_{Ks}	$2,1 \pm 1,5$	$n = 4$
I_{Kr}	$2,2 \pm 1,2$	$n = 5$
I_{K1}	$1,3 \pm 1,0$	$n = 4$
I_{Na}	$1,3 \pm 0,7$	$n = 4$
I_{Ca}	$2,9 \pm 1,8$	$n = 4$
$I_{Cl,PKA}$	$2,2 \pm 1,4$	$n = 4$

III.A.4 Effekte von DCPIB auf Kaliumströme, die am humanen Aktionspotential beteiligt sind, analysiert nach heterologer Expression in *Xenopus*-Oozyten

Um die Ergebnisse mit den nativen Strömen der Kardiomyozyten in einem heterologen Expressions-System zu bestätigen und zu erweitern, wurde untersucht, ob DCPIB (10 μM) Effekte auf die Ströme zeigt, die von hKv1.5, hKv4.3, hMinK und HERG kodiert werden. Nach Expression der entsprechenden Gene in *Xenopus*-Oozyten wurden Untersuchungen mit der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemme durchgeführt. Diese Ionenkanäle bzw. Untereinheiten wurden untersucht, weil sie für die wichtigsten repolarisierenden Ströme im humanen Herzen verantwortlich sind, nämlich den I_{Kur} , den I_{to1} , den I_{Ks} und den I_{Kr} . Wie aus Abbildung III.8 ersichtlich ist, hatten 10 μM DCPIB keinen Einfluss auf die erzeugten Kaliumströme.

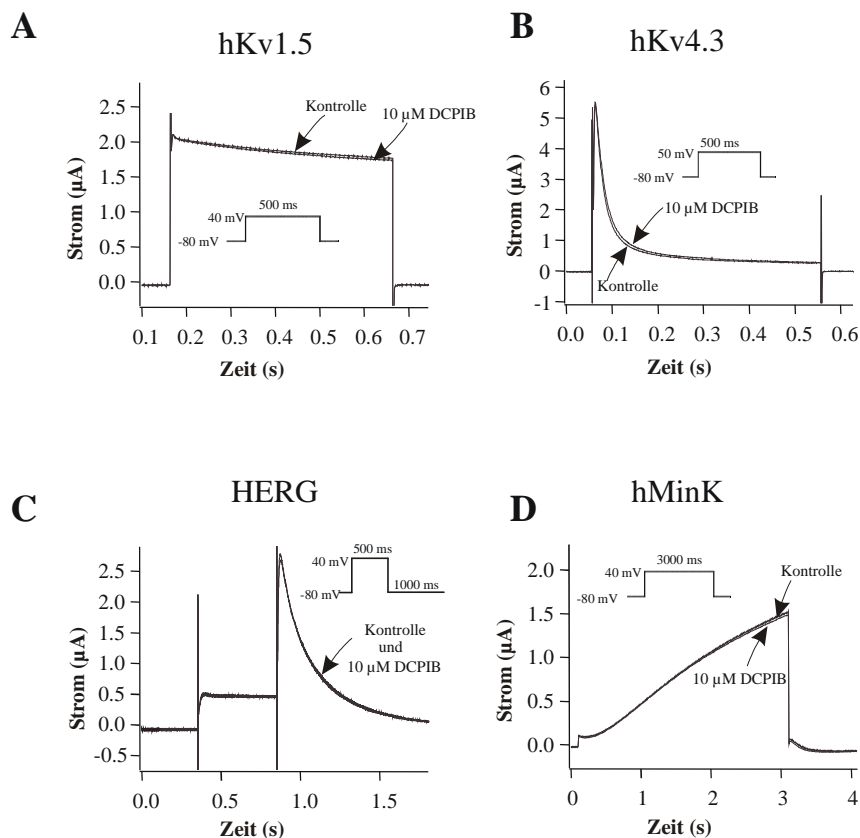


Abbildung III.8: Die Strom-Messungen zeigen die Effekte von 10 μM DCPIB auf humane Kv-Kanäle und die verzögert aktivierenden, rektifizierenden Ströme, die für die wichtigsten repolarisierenden Kaliumströme im humanen Herzen verantwortlich sind. Die Ionenkanäle wurden in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. Das Haltepotential war -80 mV. (A) Ströme des hKv1.5 (I_{Kur}) und (B) hKv4.3 (I_{to1}) vor (Kontrolle) und nach der Zugabe von 10 μM DCPIB. (C) Strom-Messungen von HERG (I_{Kr})- und (D) hMinK (I_{Ks})-injizierten *Xenopus*-Oozyten in ND-96 (Kontrolle) und in der Anwesenheit von 10 μM DCPIB.

Die Tabelle III.3 gibt die entsprechenden Inhibitionswerte von DCPIB auf die heterolog exprimierte kardialen Kaliumströme an.

Tabelle III.3: Effekte von 10 μM DCPIB auf hKv4.3, hKv1.5, HERG, hMinK nach heterologer Expression der Ionenkanäle in *Xenopus*-Oozyten. Die Werte sind mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben (n = Anzahl der Zellen).

Strom/Klon	% Inhibition (10 μM DCPIB)	n
hKv4.3	1,3 \pm 1,5	$n = 5$
hKv1.5	2,2 \pm 1,2	$n = 5$
HERG	1,3 \pm 1,0	$n = 5$
hMinK (I_{Ks})	1,9 \pm 0,7	$n = 5$

III.A.4.a Zusammenfassung der pharmakologischen Untersuchungen

Die Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen mit DCPIB zeigten, dass DCPIB in einer Konzentration von 10 μM den Schwellungs-induzierten Chloridstrom fast vollständig hemmen konnte und die wichtigsten Ströme, die am humanen kardialen Aktionspotential beteiligt sind, bei dieser Konzentration nicht beeinflusst werden. Deswegen ist DCPIB bei der verwendeten Konzentration selektiv für den $I_{\text{Cl,swell}}$ und somit ein wertvolles pharmakologisches Werkzeug, um die Rolle von Chloridströmen bei Schwellungs-induzierten Veränderungen des Aktionspotentials zu untersuchen.

III.A.5 Effekte der osmotischen Zellschwellung auf die kardiale Aktionspotentialdauer (APD) und auf das Ruhemembranpotential (V_{rest})

Atriale Kardiomyozyten sind für osmotische Zellschwellung sensitiver als ventrikuläre Zellen (Vandenberg *et al.*, 1994). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte der $I_{\text{Cl,swell}}$ in allen untersuchten atrialen Zellen ($n = 7$) nach 5- bis maximal 10-minütiger Perfusion mit einer zu 29% hypotonischen Lösung aktiviert werden. Im Gegensatz hierzu konnte nur in 25% ($n = 8$) der ventrikulären Zellen ein $I_{\text{Cl,swell}}$ durch osmotische Zellschwellung aktiviert werden. Innerhalb dieses Zeitrahmens war die Aktivierung des $I_{\text{Cl,swell}}$ nach Rückkehr zur Perfusion mit der isotonischen Lösung voll reversibel. Außerdem war der $I_{\text{Cl,swell}}$ -Strom sensitiv für DCPIB (Tabelle III.2). Unter isotonischen Bedingungen war das Ruhemembranpotential von atrialen

Ergebnisse

Kardiomyozyten $-62,9 \pm 0,8$ mV ($n = 13$). Die APD_{90} betrug $138,3 \pm 13,3$ ms ($n = 13$) und die APD_{50} hatte einen Wert von $97,8 \pm 14,7$ ms ($n = 13$). In Übereinstimmung mit der fehlenden Wirkung von DCPIB auf alle getesteten kardialen Ionenkanäle zeigte DCPIB keine signifikante Beeinflussung der atrialen APD unter isotonischen Bedingungen (APD_{90} $105,5 \pm 3,3\%$ ($n = 6$), APD_{50} $96,5 \pm 1,9\%$ ($n = 6$)), (Tabelle III.4B and Abbildung III.9B). Auch das Ruhemembranpotential wurde durch die Zugabe von $10 \mu\text{M}$ DCPIB zum isotonischen Medium nicht signifikant verändert (Tabelle III.4B).

Tabelle III.4: Aktionspotentialdauer und Ruhemembranpotential mit der entsprechenden Standardabweichung ($n =$ Anzahl der Zellen) unter dem Einfluss von DCPIB. APD Aktionspotentialdauer; V_{rest} Ruhemembranpotential. Statistisch signifikante Veränderungen im Vergleich zu den Ausgangswerten in isotonischen Lösungen werden durch einen Stern angezeigt. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ im Vergleich zu den isotonischen Werten. (A) APD und V_{rest} in isotonischer Lösung, nach 10-minütiger Perfusion der atrialen Kardiomyozyten mit einer hypotonischen Lösung sowie nach dem Einwirken von $10 \mu\text{M}$ DCPIB auf die geschwellenen Zellen. DCPIB konnte die Schwellungs-induzierte APD-Verkürzung vollständig aufheben. (B) Die Zellen wurden zuerst 5 min mit einer isotonischen $10 \mu\text{M}$ DCPIB-haltigen Lösung preinkubiert und anschließend für 10 min einer hypotonischen Lösung, die $10 \mu\text{M}$ DCPIB enthielt, ausgesetzt. DCPIB hatte keine Effekte auf das APD unter isotonischen Bedingungen und konnte die Schwellungs-induzierte APD-Verkürzung vollständig verhindern.

A		isotonisch			hypotonisch			hypotonisch + 10 μM DCPIB		
APD_{90} (ms)	APD_{50} (ms)	V_{rest} (mV)	APD_{90} (%)	APD_{50} (%)	V_{rest} (mV)	APD_{90} (%)	APD_{50} (%)	V_{rest} (mV)		
			**	**	*					
$138,3 \pm 13,3$	$97,8 \pm 14,7$	$-62,9 \pm 1,2$	$70,2 \pm 3,4$	$61,3 \pm 3,5$	$-60,9 \pm 1,2$	$112 \pm 6,8$	$101,2 \pm 5,2$	$-61,8 \pm 1,1$		
$n = 13$	$n = 13$	$n = 7$	$n = 7$	$n = 7$	$n = 7$	$n = 7$	$n = 7$	$n = 7$		

B		isotonisch			isotonisch + 10 μM DCPIB			hypotonisch + 10 μM DCPIB		
APD_{90} (ms)	APD_{50} (ms)	V_{rest} (mV)	APD_{90} (%)	APD_{50} (%)	V_{rest} (mV)	APD_{90} (%)	APD_{50} (%)	V_{rest} (mV)		
						*	*			
$138,3 \pm 13,3$	$97,8 \pm 14,7$	$-62,9 \pm 1,0$	$105,5 \pm 3,3$	$96,5 \pm 1,9$	$-61,9 \pm 1,3$	$128,3 \pm 7,5$	$122,8 \pm 6,5$	$-61,1 \pm 1,7$		
$n = 13$	$n = 13$	$n = 6$	$n = 6$	$n = 6$	$n = 6$	$n = 4$	$n = 4$	$n = 4$		

Die Perfusion mit hypotonischem Medium über einen Zeitraum, der zuvor zur maximalen Aktivierung des $I_{\text{Cl,swell}}$ führte, hatte eine signifikante Verkürzung der atrialen APD zur Folge (Abbildung III.9A). Die APD_{90} betrug $70,2 \pm 3,4\%$ ($n = 7$; $p < 0,01$) und die APD_{50} $61,3 \pm 3,5\%$ ($n = 7$; $p < 0,01$) der isotonischen APD (als 100% gesetzt). Die Zugabe von $10 \mu\text{M}$ DCPIB zu der hypotonischen Lösung hob die APD-Verkürzung wieder auf (Abbildung III.9A). Sowohl die APD_{90} als auch die APD_{50} waren dann nicht mehr signifikant verschieden zu den

Ausgangswerten in isotonischem Medium (Tabelle III.4A). In einigen Experimenten blieb die APD_{50} nach der $I_{Cl,swell}$ -Blockade durch DCPIB leicht verlängert und die APD_{90} leicht verkürzt. Die resultierenden Durchschnittswerte der APD_{90} und APD_{50} waren jedoch nicht statistisch signifikant unterschiedlich zu den Ausgangswerten (Tabelle III.4A). Somit zeigten alle atrialen Kardiomyozyten ($n = 7$) eine starke APD-Verkürzung während der Zellschwellung, die durch DCPIB aufgehoben werden konnte. Vandenberg *et al.* (1997) hatten in *Patch-Clamp*-Messungen von ventrikulären Kardiomyozyten durch das osmotische Schwellen der Zellen routinemäßig eine initiale Verlängerung der APD beobachtet. Dieser Effekt konnte in atrialen Kardiomyozyten jedoch nicht beobachtet werden. Das Ruhemembranpotential zeigte während der Zellschwellung nur eine leichte Depolarisation von $-62,9 \pm 1,2$ mV ($n = 7$) zu $-60,9 \pm 1,2$ mV ($n = 7$) ($p < 0,05$). Die Zugabe von DCPIB zu den zuvor geschwollenen Zellen konnte das Ruhemembranpotential nicht signifikant verändern und das V_{rest} betrug dann $-61,8 \pm 1,1$ mV. Zusätzlich war in einigen Zellen (2 von 7) die Spitzen-Spannung des Aktionspotentials während der Zellschwellung reduziert. Diese Abnahme in der Amplitude konnte fast vollständig durch $10 \mu\text{M}$ DCPIB (Abbildung III.9A) aufgehoben werden. Um eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer durch das Öffnen von K_{ATP} -Kanälen auszuschließen, haben wir nach erfolgter Zellschwellung Spannungsrampen appliziert, um mögliche aktivierte K_{ATP} -Ströme nachzuweisen. Die erhaltenen Strom-Spannungs-Kurven lieferten jedoch keine Hinweise dafür, dass sich während der osmotischen Zellschwellung K_{ATP} -Kanäle geöffnet hatten (keine Abbildung).

Die 5-minütige Perfusion der atrialen Myozyten mit einer $10 \mu\text{M}$ DCPIB-haltigen isotonischen Lösung verhinderte sowohl die Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ (keine Abbildung) als auch die APD-Verkürzung, nachdem zu der hypotonischen DCPIB-haltigen Lösung gewechselt wurde (Abbildung III.9B). Sogar 10 min nach Beginn der hypotonischen Perfusion, einer Zeit die ausreicht, um den $I_{Cl,swell}$ vollständig zu aktivieren, war das APD nicht verkürzt. Im Gegensatz dazu wurde sogar eine leichte APD-Verlängerung beobachtet. Die APD_{90} betrug dann $128,3 \pm 7,5\%$ ($n = 4$) und die APD_{50} $122,8 \pm 6,5\%$ ($n = 4$) im Vergleich zu den isotonischen Ausgangswerten ($p = 0,03$ für die APD_{90} ; $p = 0,04$ für die APD_{50}) (Tabelle III.4B). Das Ruhemembranpotential war jedoch bei verlängerter Gegenwart von DCPIB und trotz osmotischem Schwellen der Zellen nicht verändert.

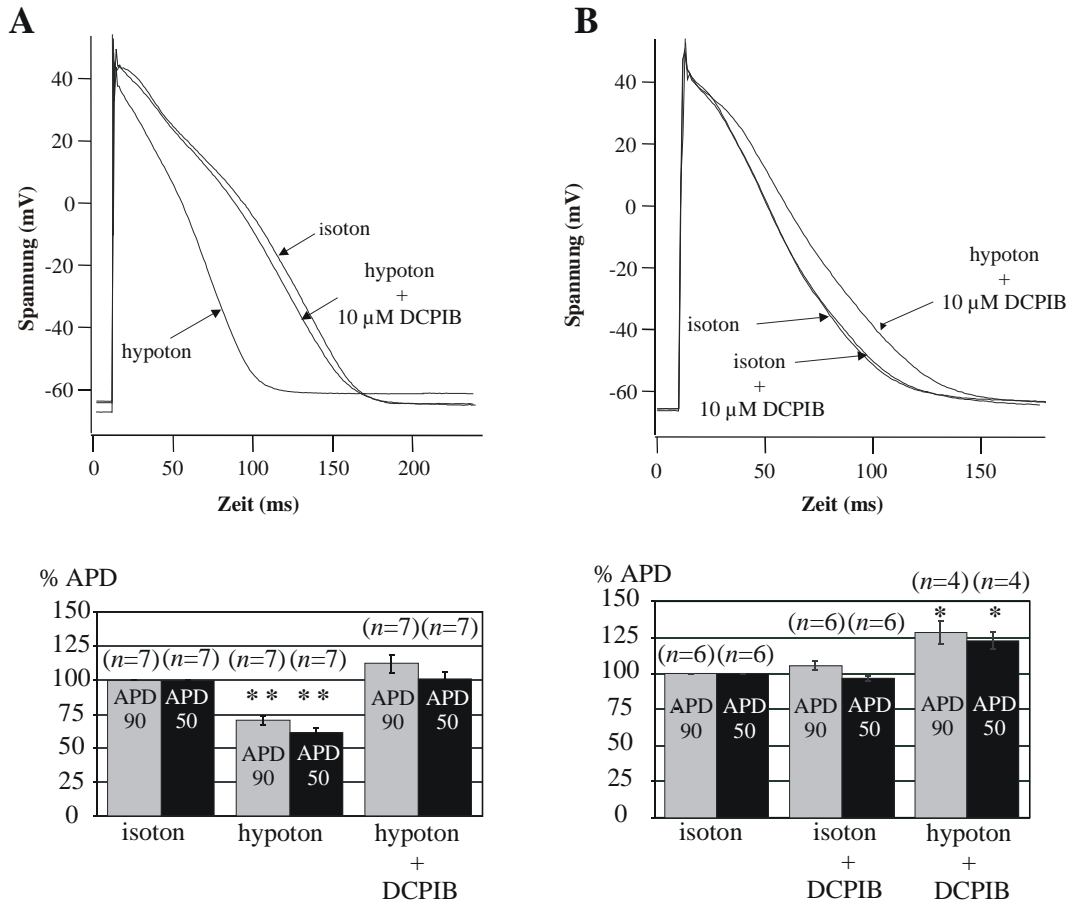


Abbildung III.9: Der Einfluss von Zellschwellung und 10 μ M DCPIB auf das atriale Aktionspotential von Meerschweinchen-Kardiomyozyten. (A) Individuelle Aktionspotentiale von Zellen in isotonischer Lösung (isoton) werden verglichen mit Aktionspotentialen von Zellen, die für 5 bis 10 min in hypotonischem Medium geschwollen waren (hypoton). Die hypotonische Lösung verursachte eine ausgeprägte Verkürzung der APD. Durch die nachfolgende Zugabe von 10 μ M DCPIB wurde die APD-Verkürzung wieder aufgehoben (hypoton + 10 μ M DCPIB). Die Reduktion der Amplitude des Aktionspotentials in hypotonischem Medium wurde nur in 2 von 7 Zellen beobachtet. Das Histogramm zeigt die Ergebnisse dieser Versuche unter der Verwendung der Werte aus der Tabelle III.4A. Die Aktionspotentialdauer wurde auf die APD in isotonischem Medium normalisiert und prozentual dargestellt. ** $p < 0,01$ im Vergleich zu den isotonischen Werten. (B) Zeigt die Prävention der Schwellungs-induzierten APD-Verkürzung durch 10 μ M DCPIB. Die einzelnen Aktionspotentiale wurden zuerst nach 5-minütiger Perfusion mit einer isotonischen 10 μ M DCPIB-haltigen Lösung (isoton + 10 μ M DCPIB) gemessen. Hierbei beeinflusste DCPIB die Aktionspotentialdauer nicht (vergleiche „isoton“ mit „isoton + 10 μ M DCPIB“). Die nachfolgende Behandlung der Zellen für 5 bis 10 min mit einer hypotonischen Lösung, der 10 μ M DCPIB zugesetzt war, führte nicht zu einer APD-Verkürzung (hypoton + 10 μ M DCPIB). Das Histogramm zeigt die Ergebnisse dieser Versuche unter Verwendung der Werte aus der Tabelle III.4B. Die Aktionspotentialdauer wurde auf die APD in isotonischem Medium normalisiert und prozentual dargestellt. * $p < 0,05$ im Vergleich zu den isotonischen Werten.

III.A.6 Zellgrößen-Messung der atrialen Kardiomyozyten

DCPIB war, wie oben erwähnt, in den vorangegangenen Experimenten in der Lage, den $I_{Cl,swell}$ -Strom sowie die Zellschwellungs-vermittelte Verkürzung der Aktionspotentialdauer zu verhindern. Um auszuschließen, dass die Hemmung des $I_{Cl,swell}$ indirekt durch Hemmung der Zellschwellung zustande kam, wurde das Zellvolumen während den Aktionspotential-Messungen bestimmt. Als erstes wurde untersucht, ob DCPIB das Volumen geschwollener Zellen vermindern konnte. In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob DCPIB in der Lage war, die osmotische Schwellung der Zellen zu verhindern.

Die Veränderungen im Zellvolumen von Kardiomyozyten sind proportional zu Änderungen in der Zellbreite (Roos, 1986; Drewnowska & Baumgarten, 1991). Deswegen wurde in unseren Experimenten die Zellbreite als Indikator für das Zellvolumen bestimmt. In allen atrialen Kardiomyozyten ($n = 6$) wurde während der Perfusion mit hypotonischem Medium eine Zunahme der Zellbreite beobachtet. Repräsentative Experimente sind in der Abbildung III.10 gezeigt. Die durchschnittliche Zellbreite der atrialen Kardiomyozyten nahm nach 10-minütiger Perfusion mit hypotonischem Medium um den Faktor $1,31 \pm 0,04$ ($n = 6$) zu (Abbildung III.10B). Simultan dazu wurden die Chloridströme gemessen, und es wurde eine Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ beobachtet. Nach anschließender 5-minütiger Perfusion mit einer $10 \mu\text{M}$ DCPIB-haltigen hypotonischen Lösung (Abbildung III.10C) war die durchschnittliche Zellbreite im Vergleich zum Ausgangswert immer noch um den Faktor $1,41 \pm 0,07$ ($n = 7$) vergrößert.

Wurden die atrialen Zellen in isotonischer Lösung für 5 min mit DCPIB vorinkubiert, blieb die durchschnittliche Zellbreite unverändert (Faktor $1,01 \pm 0,02\%$; $n = 4$) (Abbildung III.10E). Die nachfolgende 10-minütige Perfusion in hypotonischem DCPIB-haltigem Medium bewirkte eine Zellschwellung im gleichen Ausmaß, wie bei Perfusion in Abwesenheit von DCPIB. In DCPIB-haltiger Lösung war die Zellbreite um den Faktor $1,35 \pm 0,07$ vergrößert (Abbildung III.10F). Die Vorinkubation der Kardiomyozyten mit DCPIB verhinderte also nicht die nachfolgende osmotische Zellschwellung. Eine indirekte Hemmung des $I_{Cl,swell}$ über die Beeinflussung der Zellschwellung durch DCPIB konnte deshalb ausgeschlossen werden.

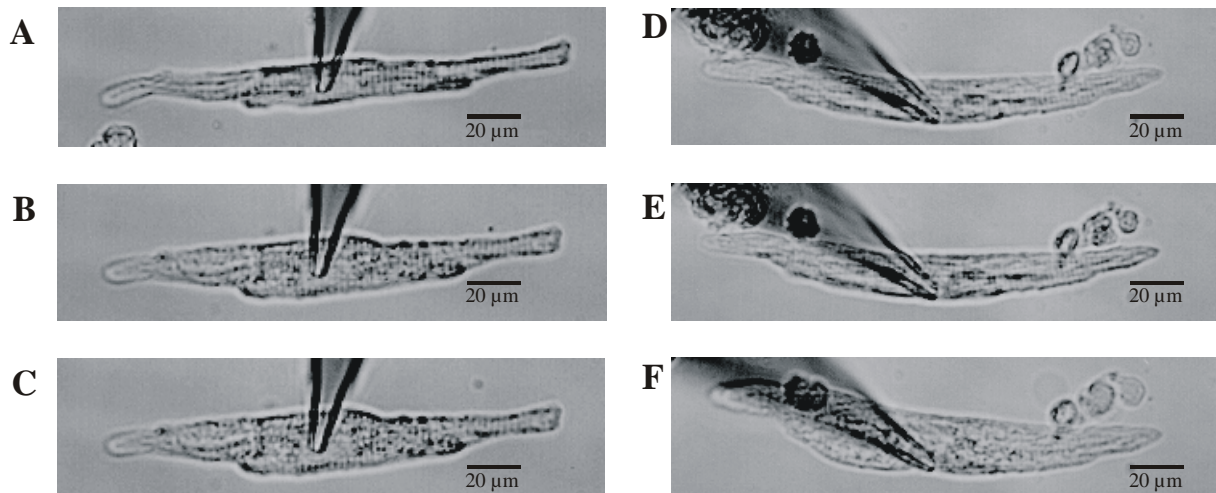


Abbildung III.10: Atriale Meerschweinchen-Kardiomyozyten während *whole-cell-Patch-Clamp*-Messungen. Die Zellbreite wurde an drei verschiedenen Stellen der Kardiomyozyten gemessen und der durchschnittliche Zelldurchmesser bestimmt. (A) Atriale Kardiomyozyte in isotonischer Lösung. (B) Aufnahme, die nach 10-minütiger Perfusion in hypotonischem Medium gemacht wurde. (C) Das Foto zeigt dieselbe atriale Kardiomyozyte nach 5 min Perfusion mit einer 10 µM DCPIB-haltigen hypotonischen Lösung. Die Abbildung zeigt deutlich, dass DCPIB die Zellschwellung während der Hypotonie nicht rückgängig macht. (D) Atriale Kardiomyozyte in isotonischer Lösung. (E) Myozyte nach 5-minütiger Inkubation mit 10 µM DCPIB in isotonischer Lösung. (F) Das nachfolgende Schwellen der Kardiomyozyte in hypotonischem Medium, welches 10 µM DCPIB enthielt, war im Vergleich zum Schwellen in Abwesenheit von DCPIB (C) nicht abgeschwächt.

III.A.7 Einfluss von DCPIB auf native I_{Ks} -Ströme atrialer Kardiomyozyten während einer osmotischen Zellschwellung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass DCPIB die osmotische Zellschwellung nicht hemmt, sollte jetzt untersucht werden, ob durch DCPIB grundsätzlich Schwellungs-induzierte Ionenströme gehemmt werden. Der verzögert aktivierende, gleichrichtende Kaliumstrom I_{Ks} ist unter isotonischen Bedingungen an der Repolarisation des Aktionspotentials beteiligt und wird durch Zellschwellung stimuliert (Rees *et al.*, 1995).

In den nachfolgenden Experimenten wurde deshalb untersucht, ob DCPIB die Stimulation der I_{Ks} -Ströme durch Zellschwellung hemmt. Außerdem wurde die Sensitivität des I_{Ks} für 10 µM DCPIB während der Zellschwellung analysiert, da eine verstärkte oder plötzlich vorhandene Hemmung des I_{Ks} während der osmotischen Zellschwellung auch zu der beobachteten APD-Verlängerung durch die Blockade des $I_{Cl,swell}$ hätte beitragen können. Die I_{Ks} -Messungen während der Zellschwellung wurden, wie von Rees *et al.* (1995) beschrieben, durchgeführt.

Um eine Messung des isolierten I_{Ks} -Stroms zu erlauben und eine Beeinflussung der Ergebnisse durch den I_{Kr} -Strom auszuschließen, wurde die Zellschwellung in Ca^{2+} -freien Lösungen durchgeführt. In Abwesenheit von Ca^{2+} wird die Aktivierung des I_{Kr} zu mehr negativen Potentialen und die des I_{Ks} zu mehr positiven Potentialen verschoben (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1992; Jurkiewicz & Sanguinetti, 1993). Zusätzlich wurden noch $0,2 \mu M$ des I_{Kr} -Blockers Dofetilid der Badlösung zugegeben, um mögliche verbleibende I_{Kr} -Ströme zu hemmen. Dadurch war es möglich, den I_{Ks} -Strom während der Zellschwellung bei völliger Abwesenheit des I_{Kr} -Stroms zu analysieren. Wie von Rees *et al.* (1995) beschrieben, führte die Schwellung von Kardiomyozyten zu einer Zunahme des I_{Ks} -Stroms. Die Stromamplituden wurden am Ende des Spannungssprunges zu $+60$ mV ausgewertet.

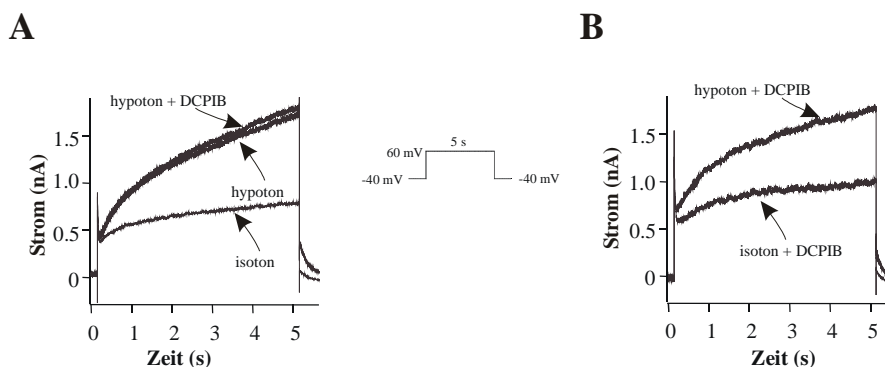


Abbildung III.11: Effekte von DCPIB auf den I_{Ks} -Strom atrialer Kardiomyozyten während der Zellschwellung. I_{Ks} -Ströme wurden von einem Haltepotential von -40 mV aus durch Spannungssprünge von 5 s Dauer zu $+60$ mV ausgelöst. Hierfür wurden Ca^{2+} -freie Lösungen verwendet. (A) Repräsentative I_{Ks} -Ströme in isotonischem Medium (isoton), nach erfolgter Zellschwellung (hypoton) und nach der Zugabe von $10 \mu M$ DCPIB zu der hypotonischen Badlösung (hypoton + DCPIB). (B) Repräsentative I_{Ks} -Stöme in der Anwesenheit von $10 \mu M$ DCPIB in der isotonischen Lösung (isoton + DCPIB) und nach der darauffolgenden Zellschwellung in der Anwesenheit von DCPIB (hypoton + DCPIB).

Unter Kontrollbedingungen war der I_{Ks} -Strom $0,71 \pm 0,08$ nA ($n = 6$) groß. Die Zellschwellung verursachte eine Zunahme des I_{Ks} -Stroms um $137,1 \pm 35,6\%$ ($n = 3$) auf $1,68 \pm 0,31$ nA (Abbildung III.11A). Nach Zellschwellung in der Anwesenheit von DCPIB hatte die I_{Ks} -Stromamplitude um $140,3 \pm 31,2\%$ ($n = 3$) zugenommen (Kontroll-Strom $0,68 \pm 0,12$ nA zu $1,63 \pm 0,35$ nA). DCPIB ($10 \mu M$) zeigte somit während der Zellschwellung weder eine Hemmung des I_{Ks} (Abbildung III.11A), noch schwächte es die Schwellungs-induzierte Amplitudenvergrößerung des I_{Ks} ab (Abbildung III.11B). Obwohl keine detaillierten Untersuchungen über den Mechanismus der $I_{Cl,swell}$ -Blockade durchgeführt wurden, zeigten

diese Ergebnisse zusammen mit den Ergebnissen der Zellgrößenmessung, dass eine direkte und spezifische Blockade des $I_{Cl,swell}$ -Kanals durch DCPIB wahrscheinlicher ist als eine generelle Hemmung Schwellungs-induzierter Ionenkanäle.

III.A.8 $I_{Cl,swell}$ -Untersuchungen in normalen und hypertrophierten Rattenherzen

Die Ratte ist eine häufig verwendete Spezies für *in-vivo*- und *in-vitro*-Versuche. Es gibt jedoch bisher keine Untersuchungen, ob Kardiomyozyten der Ratte einen $I_{Cl,swell}$ besitzen und das Rattenherz somit zur Validierung des $I_{Cl,swell}$ als pharmakologischen Angriffspunkt geeignet ist. Benitah *et al.* (1997) berichteten, dass in hypertrophierten links-ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte eine auswärts-rektifizierende Chloridleitfähigkeit aktiviert ist, bei der es sich um den $I_{Cl,swell}$ handeln könnte. Die genaue Identität des Chloridstroms wurde jedoch nicht aufgeklärt.

III.A.8.a Untersuchung eines potentiellen $I_{Cl,swell}$ in normalen atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte

Zu Beginn sollte deshalb untersucht werden, ob der $I_{Cl,swell}$ im Rattenherzen exprimiert ist. Anhand von *Patch-Clamp*-Untersuchungen mit den zuvor für die Meerschweinchenherzen verwendeten Protokollen und Lösungen konnten wir aber weder in atrialen ($n = 6$) noch in ventrikulären ($n = 5$) Kardiomyozyten der Ratten nach osmotischer Zellschwellung einen Schwellungs-induzierten Chloridstrom nachweisen. Es stellte sich daher die Frage, ob die von Benitah *et al.* (1997) gefundene erhöhte Chloridleitfähigkeit in hypertrophierten Myozyten tatsächlich durch den $I_{Cl,swell}$ vermittelt wurde. Eine Erklärung wäre, dass es unter erhöhtem mechanischen Stress während der Hypertrophie zur Induktion eines $I_{Cl,swell}$ -Stroms kommt.

III.A.8.b Basale Chloridleitfähigkeiten von normalen und hypertrophierten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte

Anschließend wurden die basalen Leitfähigkeiten (pA/pF) im Ventrikel der *aortic-banding*-Ratten mit denen der *sham*-Tiere aus der Kontrollgruppe verglichen. Hierfür wurden *Patch-Clamp*-Untersuchungen mit den zuvor isolierten Kardiomyozyten durchgeführt. Bei unseren Untersuchungen der basalen Chloridleitfähigkeiten haben wir in hypertrophierten Kardiomyozyten nur eine geringe Erhöhung der basalen Leitfähigkeit feststellen können

(Tabelle III.5 und Abbildung III.12). Eine Kapazitätserhöhung der hypertrophierten Kardiomyozyten war jedoch vorhanden. Ebenso war die Hypertrophie der linken Herzwand während der Präparation der Kardiomyozyten sichtbar.

Tabelle III.5: Basale Chloridleitfähigkeiten und Membrankapazitäten links-ventrikulärer Kardiomyozyten von hypertrophierten Rattenherzen (*aortic banding*) und von Herzen scheinoperierter Tiere (*sham*) in isotonischem Medium. * $p < 0,05$ im Vergleich zu den Werten der scheinoperierten Tiere.

Chloridleitfähigkeit <i>sham</i> (pA/pF bei +40 mV)	Kapazität <i>sham</i> (pF)	Chloridleitfähigkeit <i>aortic banding</i> (pA/pF bei +40 mV)	Kapazität <i>aortic banding</i> (pF)
$1,0 \pm 0,13$	$181,75 \pm 7,04$	$1,24 \pm 0,12$	$196,37 \pm 6,43$ *
$n = 10$	$n = 10$	$n = 11$	$n = 11$

Demnach konnte unter unseren Versuchsbedingungen der *Patch-Clamp*-Experimente ebenfalls eine leicht erhöhte Chloridleitfähigkeit in hypertrophierten Kardiomyozyten der Ratte nachgewiesen werden.

III.A.8.c Einfluss von DCPIB und Osmolarität auf die basale Chloridleitfähigkeit von hypertrophierten Kardiomyozyten der Ratte

Die folgenden Experimente sollten klären, ob der unter basalen Bedingungen in hypertrophierten Myozyten messbare Chloridstrom durch osmotische Zellschwellung weiter erhöht werden kann. Die Perfusion der ventrikulären Kardiomyozyten mit hypotonischem Medium resultierte jedoch nicht in einer signifikanten Erhöhung der Chloridleitfähigkeit (Abbildung III.12A). Um zu untersuchen, ob die leicht erhöhte Chloridleitfähigkeit in den links-ventrikulären Kardiomyozyten der *aortic-banding*-Ratten durch einen ausschließlich basal aktiven $I_{Cl,swell}$ zustande kam, wurden $50 \mu\text{M}$ DCPIB zu dem isotonischen Medium zugegeben (keine Abbildung) bzw. die Kardiomyozyten mit hypertonischer Lösung perfundiert (Abbildung III.12A und B). Keine der beiden Bedingungen bewirkte aber eine Abschwächung der basalen Chloridleitfähigkeit.

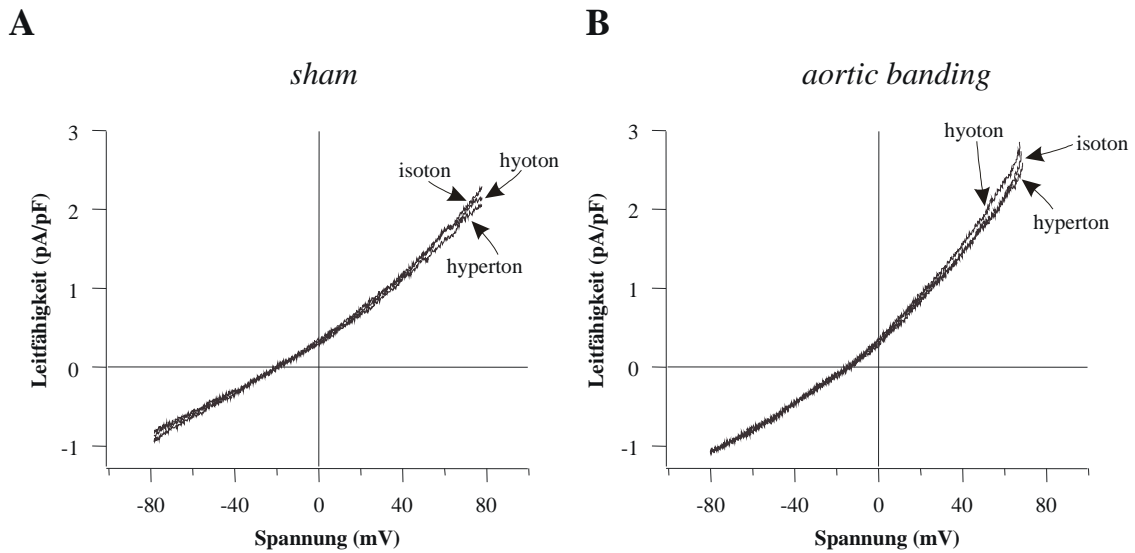


Abbildung III.12: (A) Chloridleitfähigkeiten von hypertrophierten (*aortic banding*) und (B) nicht-hypertrophierten (*sham*) links-ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte. Es sind die Chloridleitfähigkeiten (pA/pF) der Kardiomyozyten in isotonischer, hypotonischer und hypertotonischer Lösung abgebildet.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die durch das *aortic banding* induzierte links-ventrikuläre Hypertrophie nur zu einer geringen Chloridleitfähigkeitserhöhung führt, die jedoch nicht durch den $I_{Cl,swell}$ verursacht wird. Damit konnte der $I_{Cl,swell}$ weder im Atrium und dem Ventrikel des normalen Rattenherzens noch im hypertrophierten Rattenherzen nachgewiesen werden.

III.B *Klonierung, Expression, Pharmakologie und Gewebeverteilung eines im menschlichen Atrium exprimierten Tandem-von-zwei-Poren-Kaliumkanals (TASK-4)*

Ziel der Klonierung und elektrophysiologischen Charakterisierung eines Tandem-von-zwei-Poren-Kanals war das Auffinden neuer Kaliumkanäle und somit neuer potentieller Zielmoleküle für Klasse-III-Antiarrhythmika. Hierbei waren insbesondere atrial exprimierte Kaliumkanäle interessant, die bei Vorhofflimmern eine Rolle spielen könnten. Als Grundlage für die Suche nach einem Kaliumkanal, der im Herzen einen I_{Kp} - oder $I_{K,AA}$ -artigen Strom auslösen könnte, dienten die Primärstrukturen der bereits klonierten Tandem-von-zwei-Poren-Kanäle.

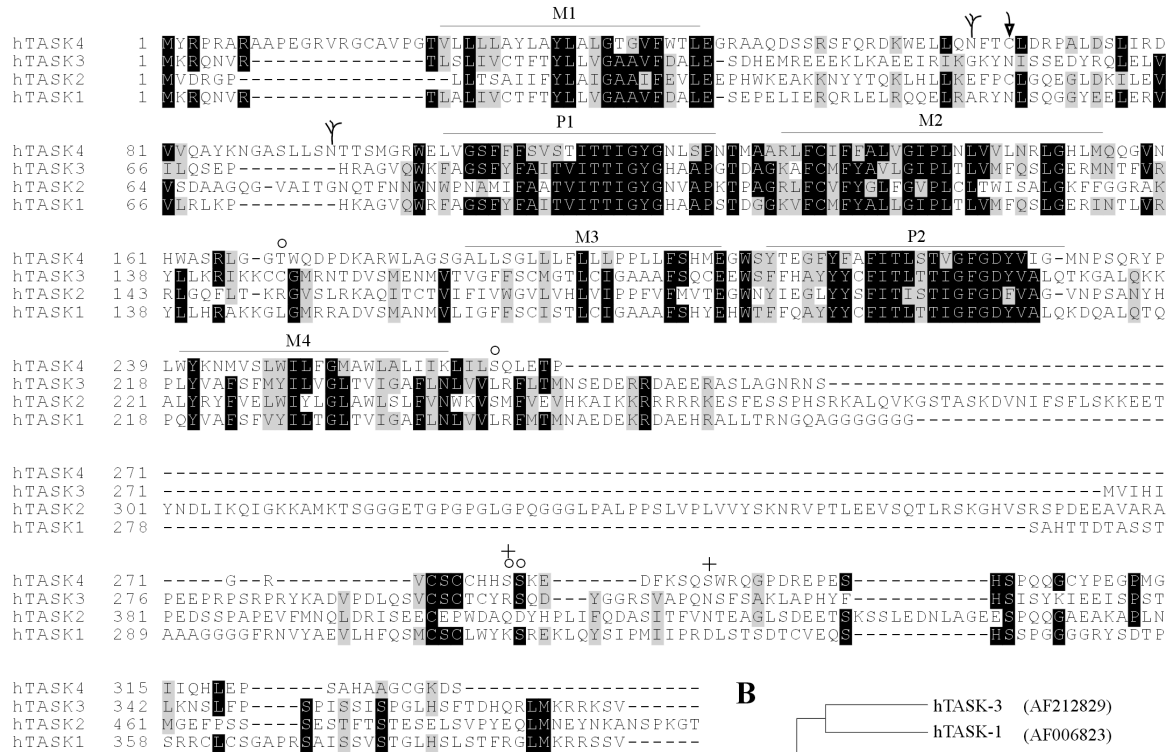
III.B.1 Klonierung und Primärstruktur des TASK-4

Bei der Homologie-Suche in der Incyte-LifeSeq-Datenbank wurde ein humaner EST-Klon mit einer signifikanten Homologie zum TRAAK-Kaliumkanal gefunden. Die Sequenzinformation wurde verwendet, um die fehlende 5'-kodierende Sequenz aus einer humanen cDNA-Bibliothek der Niere zu gewinnen (Edge BioSystems). Ein Volle-Länge-cDNA-Klon wurde anschließend aus einer cDNA-Bibliothek der Nebenniere kloniert. Das Initiations-Methionin der cDNA wurde dem ersten ATG im Leserahmen zugeordnet, dem aber im selben Leserahmen kein Stop-Kodon vorangegangen war. Die Umgebung des ATG besaß nicht die optimale Konsensus-Sequenz für eine Translationsinitiation (Kozak, 1984). Trotzdem haben Sequenzvergleiche mit dem später publizierten humanen genomischen DNA-Klon (accession number AL136087) bestätigt, dass ein Stop-Kodon im gleichen Leserahmen 250 bp vor dem ATG liegt. Die Volle-Länge-TASK-4-cDNA kodiert für ein 332 Aminosäuren langes Protein (Abbildung III.13), das eine vorausgesagte molekulare Masse von $\approx 36,5$ kDa besitzt und welches wir TASK-4 nannten. Anschließende Hydrophathie-Analysen unterstützten das Topologie-Modell mit vier Transmembran-Domänen und zwei eingeschobenen Poren-Domänen.

Innerhalb der Zwei-Poren-Domänen-Kaliumkanäle zeigte TASK-4 die höchste Homologie zum TASK-2 (38% Identität innerhalb der M1- bis M4-Transmembran-Domänen). Außerdem enthielt TASK-4 eine ausgedehnte extrazelluläre M1-P1-Interdomäne, die für Kaliumkanäle dieser Superfamilie charakteristisch ist.

Ergebnisse

A



B

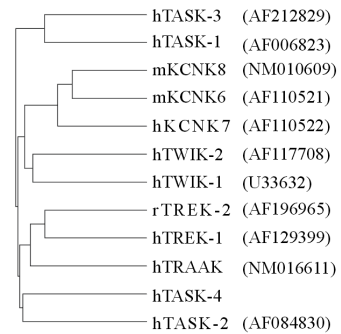


Abbildung III.13: Proteinsequenz des TASK-4 im Vergleich zu anderen TASK-Proteinen und Dendrogramm der Tandem-von-zwei-Poren-Kanäle. (A) Sequenzvergleich der Aminosäuren des TASK-4 (accession number: AF339912) mit den anderen TASK-Kanälen. Die vier Transmembran-Segmente M1 bis M4 und die zwei Poren-formenden Regionen P1 und P2 sind markiert. Identische und konservierte Aminosäuren sind schwarz bzw. grau unterlegt. Potentielle zytoplasmatische Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (+) und die Kaseinkinase II (o) werden durch Symbole gekennzeichnet. Außerdem werden die Konsensus-Stellen für N-verknüpfte-Glykosylierungen (λ) in der extrazellulären M1-P1-Schleife angezeigt. Die konservierte Aminosäure Cystein in der Position 68 der M1-P1-Schleife ist durch einen Pfeil markiert. (B) Phylogenetischer Stammbaum der bisher klonierten Mitglieder aus der KCNK-Gen-Familie.

Die Primärsequenz des humanen TASK-4-Proteins besitzt innerhalb dieser M1P1-Interdomäne zwei Konsensus-Sequenzen für N-verknüpfte-Glykosylierungen (Aminosäuren 65 und 94) und ein Cystein in Position 68, das bei den Ionenkanälen TWIK-1, TREK-1, TRAAK und TASK-2 konserviert ist. Für TWIK-1 wurde gezeigt, dass dieses Cystein an der Bildung von Homodimeren beteiligt ist (Lesage *et al.*, 1996b). Ferner besitzt das TASK-4-Protein Konsensus-Sequenzen für die Phosphorylierung durch die Kaseinkinase II (Position 169, 265, 280 und 281) und Proteinkinase C (Position 280 und 289). Ähnlich wie TASK-2 und im

Gegensatz zu TASK-1 und TASK-3 besitzt TASK-4 kein Histidin direkt C-terminal vom GYG-Poren-Motiv, welches den Block von TASK-3 durch extrazelluläre Protonen vermittelt (Kim *et al.*, 2000).

III.B.2 Gewebeverteilung des TASK-4

Die Gewebeexpression des TASK-4 wurde durch semi-quantitative PCR-Experimente mit Hilfe von cDNA aus humanen Geweben bestimmt (Clontech). Die PCR-Analyse mit den TASK-4-spezifischen Primern ergab eine breite Gewebeverteilung des TASK-4.

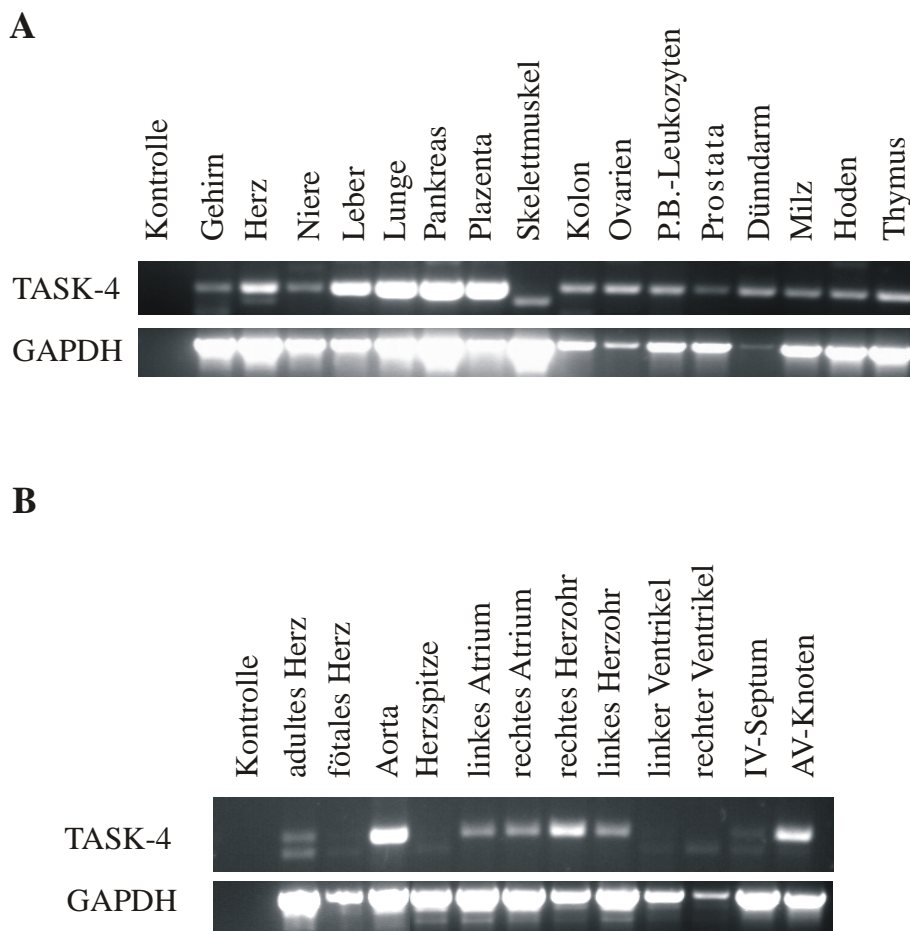


Abbildung III.14: Gewebeverteilung des TASK-4. Das Vorkommen der TASK-4-Transkripte wurde durch PCR und mit Hilfe von cDNA, die (A) aus einer Vielzahl menschlicher Gewebe sowie (B) aus verschiedenen Regionen des humanen Herzens hergestellt wurde, untersucht. P.B.-Leukozyten periphere Blut-Leukozyten; IV-Septum Interventrikular-Septum; AV-Knoten Atrioventrikular-Knoten.

Im Gegensatz zum TASK-2 (Reyes *et al.*, 1998) ist der TASK-4 auch im Gehirn nachweisbar. Ähnlich wie die meisten Mitglieder der 4TM-2P-Kaliumkanal-Familie (Lesage & Lazdunski, 2000) kommt TASK-4 aber nicht im humanen Skelettmuskel vor. Im Skelettmuskel wurde jedoch ein PCR-Produkt von etwas kleinerer Größe amplifiziert, das nach Sequenzierung als Myosin-leichte-Kette-3 (engl.: myosin light chain 3 = MYL3) identifiziert werden konnte und welches auch als die langsame Skelettmuskel-Isoform (engl.: slow skeletal muscle isoform) oder als die ventrikuläre Isoform bezeichnet wird (Schaub *et al.*, 1998). In Übereinstimmung damit wurde dieses Produkt auch aus der ventrikulären cDNA amplifiziert. Die stärksten TASK-4-Signale wurden für Leber, Lunge, Plazenta, Pankreas, Dünndarm, Aorta und Herz gefunden. TASK-4 konnte ebenfalls im humanen Kolon, den Ovarien, den peripheren Blut-Leukozyten, der Prostata, der Milz, den Hoden und dem Thymus detektiert werden. Im Herzen ist TASK-4 präferentiell in atrialen Regionen exprimiert. Die Signale zeigen die mRNA-Expression im linken und rechten Atrium, den Herzohren und im Atrioventrikular-Knoten. Im Interventrikular-Septum konnte hingegen nur ein schwaches Signal nachgewiesen werden, während TASK-4-Transkripte weder in den Ventrikeln oder der Herzspitze noch im fötalen Herzen nachweisbar waren.

III.B.3 Funktionelle Charakterisierung von TASK-4 in *Xenopus*-Oozyten

Für die funktionelle Analyse des neu klonierten TASK-4-Kaliumkanals wurde von der cDNA *in vitro* cRNA hergestellt und diese in *Xenopus*-Oozyten injiziert. Im Gegensatz zu TASK-1 konnten aber auch 48 Stunden nach Injektion keine Kaliumströme gemessen werden. Erst nach Erhöhung des pH-Wertes der extrazellulären Lösung konnten quasi-instantane und nicht-inaktivierende Ströme (Abbildung III.15) aktiviert werden, die in nicht-injizierten Oozyten nicht vorhanden waren. Die TASK-4-Ströme waren hoch sensitiv für Veränderungen des extrazellulären pH-Wertes (Abbildung III.15), was ein typisches Merkmal der Kaliumkanäle aus der TASK-Familie ist. Die Strom-Spannungs-Kurven waren auswärts-rektifizierend, und es waren fast keine Einwärtsströme vorhanden, wenn man die Strom-Messungen in der ND-96-Lösung (pH 7,5) durchführte.

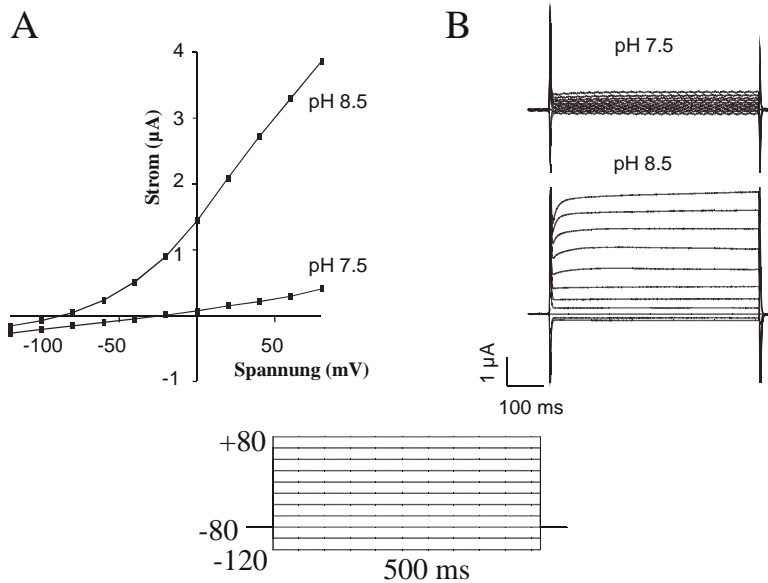


Abbildung III.15: Funktionelle Expression des TASK-4 in *Xenopus*-Oozyten. (A) Strom-Spannungs-Verhältnis von TASK-4-exprimierenden Oozyten sowie (B) repräsentative Ströme. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde das Membranpotential in Schritten von 20 mV von -120 auf $+80$ mV verändert. Die Messungen wurden bei pH_o -Werten von $7,5$ und $8,5$ durchgeführt.

Durch Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes von pH $7,5$ auf pH $8,5$ wurde der Block durch extrazelluläre Protonen aufgehoben und der TASK-4-Kanal war nun, ähnlich wie für die anderen Mitglieder der TASK-Familie und den anderen Hintergrund-Kaliumkanälen bereits beschrieben, bei allen Membranpotentialen geöffnet. Im geöffneten Zustand war die Aktivität des Kanals eine Funktion der Differenz zwischen dem Membranpotential und dem Umkehrpotential. Wie in Abbildung III.16A und B gezeigt, führte die Anhebung des pH_o von $7,5$ auf $8,5$ oder auf $9,0$ zu einer Verstärkung des Auswärtsstroms um den Faktor $6,3 \pm 0,2$ ($n = 22$) bzw. $17,4 \pm 2,9$ ($n = 9$). Die Abnahme des pH_o -Wertes auf pH $6,0$ führte jedoch nur zu einer 30%igen Reduktion der Ströme (Faktor $0,7 \pm 0,1$, $n = 7$). Die Zunahme der Stromamplitude zeigte keine Sättigung innerhalb des pH-Bereichs von $6,0$ bis $10,5$ (Abbildung III.16A). Deswegen war es nicht möglich, einen pKi -Wert (pH-Wert, bei dem 50% der Kanäle inaktiviert sind) zu bestimmen. Die Zunahme des pH_o bewirkte gleichzeitig eine Verschiebung des Ruhemembranpotentials (V_{rest}) in Richtung des Kalium-Gleichgewichtspotentials (E_K) (Abbildung III.16C). Diese Daten zeigten deutlich, dass der TASK-4 bei pH-Werten von $6,0$ bis $7,5$ hauptsächlich in blockierter Form vorliegt.

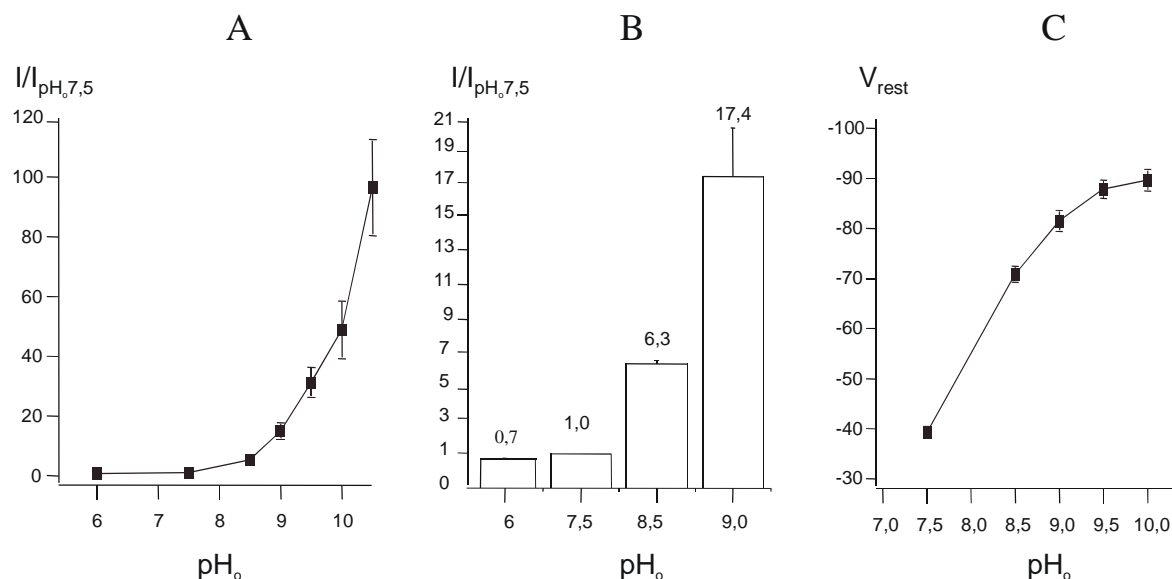


Abbildung III.16: pH-Sensitivität der TASK-4-Ströme und des V_{rest} . (A) Stromamplituden von TASK-4-injizierten Oozyten, die Spannungssprüngen von -80 bis $+40$ mV ausgesetzt wurden. Die Messungen wurden in einem pH-Bereich von 6,0 bis 10,5 durchgeführt. Die Werte der Stromamplituden wurden auf den Wert bei pH 7,5 normalisiert und die Daten mit Standardabweichung (Mittelwert \pm S.E.M., $n = 9 - 22$) angegeben. (B) Abbildung des pH-Bereichs von pH 6,5 bis 9,0. (C), Abhängigkeit des Ruhemembranpotentials der TASK-4-injizierten Oozyten vom extrazellulären pH-Wert. Die Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M. ($n = 10 - 58$) angegeben.

Aufgrund der zu den anderen Zwei-Poren-Domänen-Kaliumkanälen unterschiedlichen pH-Abhängigkeit (Fink *et al.*, 1996; Lesage *et al.*, 1996a; Duprat *et al.*, 1997; Fink *et al.*, 1998) ist bei pH 7,5 das Membranpotential der Oozyten, die den TASK-4 exprimieren ($-39,3 \pm 1,1$ mV, $n = 58$), im Vergleich zu den Kontroll-Oozyten ($-35,7 \pm 1,4$ mV, $n = 13$) nur leicht hyperpolarisiert. Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass die pH-Abhängigkeit von TASK-4 im Vergleich zu TASK-1, TASK-2 und TASK-3 zu mehr alkalischen Werten verschoben ist.

Die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[K^+]_o$) bei pH 8,5 erzeugte Einwärtsströme, die zu einer Depolarisation der Oozyten-Membran führte (Abbildung III.17A). Nach Perfusion der Oozyten mit einer Kalium-reichen extrazellulären Lösung (96 mM) war die ermittelte Strom-Spannungs-Kurve des TASK-4-Stroms fast linear (keine Abbildung). Aufgrund der direkten Abhängigkeit der Rektifizierung der TASK-4-Ströme von der extrazellulären Kaliumkonzentration kann der TASK-4-Kanal als *Offener-Rektifizierer* bezeichnet werden.

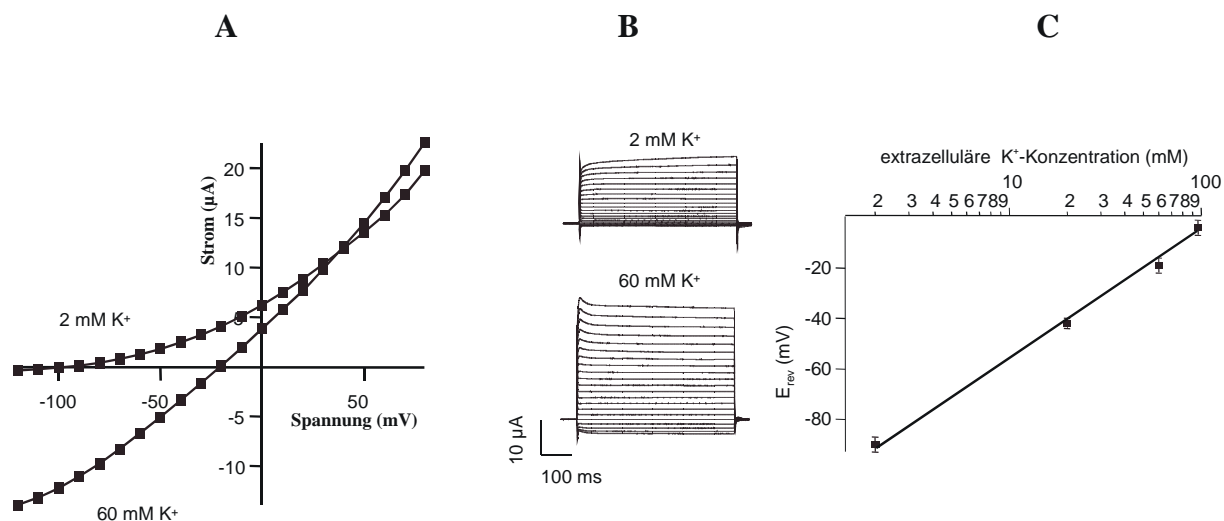


Abbildung III.17: $[\text{K}^+]_o$ -Abhängigkeit des Umkehrpotentials und der TASK-4-Ströme bei pH_o 8,5. (A) Repräsentative Strom-Spannungs-Verhältnisse der TASK-4-Ströme, die bei verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen gemessen wurden, zeigen, dass TASK-4 ein *Offener-Rektifizierer* ist. (B) Einzelne Messungen des TASK-4 bei extrazellulären Kaliumkonzentrationen von 2 und 60 mM. (C) Die Abhängigkeit des Umkehrpotentials (E_{rev}) (Mittelwert \pm S.E.M., $n = 4 - 7$) von der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[\text{K}^+]_o$) wird durch die Gerade angezeigt, die durch eine linearen Regression erhalten wurde (Steigung, $51,1 \pm 1,0$ mV).

Die Abhängigkeit zwischen dem Umkehrpotential und der extrazellulären Kaliumkonzentration entsprach nahezu der durch die Nernst-Gleichung vorausgesagten Beziehung, mit einem Wert der Steigung von 58,4 mV bei 21°C. Die Steigung der Funktion wurde durch lineare Regression der experimentellen Daten bestimmt, wobei sich mit $51,1 \pm 1,0$ mV ein Wert errechnet, der dem eines selektiven Kaliumkanals entspricht (Abbildung III.17).

III.B.4 Pharmakologische Eigenschaften des TASK-4

Als nächstes wurde die Sensitivität des TASK-4 für einige Substanzen getestet, die Kaliumkanäle und insbesondere Zwei-Poren-Domänen-Kanäle beeinflussen. Die pharmakologische Charakterisierung des TASK-4 wurde bei pH 8,5 durchgeführt, um TASK-4-Ströme mit ausreichender Amplitude zu erhalten. Die Inhibitionswerte wurden bei einer Spannung von +40 mV bestimmt.

Die klassischen Kaliumkanalblocker Tetraethylammonium (TEA, 3 mM), 4-Aminopyridin (4-AP, 2 mM) und Cäsium (2 mM) zeigten keine Wirkung auf die gemessenen Ströme. TASK-4 war nur leicht sensitiv gegenüber Chinin (1 mM), welches eine Hemmung der Ströme um $17,8 \pm 4,3\%$ ($n = 4$) bewirkte. Die Lokalanästhetika Bupivacain (1 mM) und Lidocain (1 mM)

zeigten ebenfalls nur eine geringe Hemmung der TASK-4-Ströme. Die Inhibition durch diese beiden Substanzen war auch nur transient, mit einer maximalen Hemmung von $25,7 \pm 5,6\%$ ($n = 8$) bzw. $13,1 \pm 1,1\%$ ($n = 8$), die zwei Minuten nach der Applikation der Substanzen erreicht wurde. Eine starke Hemmung von $82,8 \pm 1,6\%$ ($n = 4$) konnte dagegen mit Bariumionen (2 mM) beobachtet werden. Wie die anderen TASK-Kanäle war auch TASK-4 nicht sensitiv für die extrazelluläre Applikation von Arachidonsäure (100 μ M).

Das TASK-4-Protein besitzt potentielle Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C. Deren Aktivierung durch extrazelluläre Perfusion der Oozyten mit Phorbolmyristin-Azetat (PMA, 100 nM) bewirkte aber keine Veränderungen der TASK-4-Ströme ($n = 5$). Daher scheint TASK-4 wahrscheinlich nicht durch die Proteinkinase C reguliert zu werden.

III.C Identifizierung des hKChIP2 als eine funktionelle kardiale β -Untereinheit des humanen Kv4.3

Neben der Klonierung neuer kardialer Kaliumkanäle kann auch die Identifizierung von neuen regulatorischen Ionenkanal-Untereinheiten (β -Untereinheiten) wichtige neue Angriffspunkte für zukünftige antiarrhythmisch wirksame Substanzen liefern. KChIP-Proteine wurden als Interaktionspartner von Kv4-Kanälen beschrieben (An *et al.*, 2000). Deshalb wurde im folgenden Teil dieser Arbeit untersucht, ob hKChIP2 eine funktionelle β -Untereinheit des hKv4.3-Kanals ist, der eine Schlüsselrolle bei der Repolarisation der kardialen Membranen während des Aktionspotentials einnimmt.

III.C.1 Klonierung des hKChIP2 sowie einer neuen kurzen hKChIP2-Spleiß-Variante

In Kollaboration mit Dr. Bernd Wollnik, Universität Istanbul, wurde eine neue hKChIP2-Isoform kloniert. Hierfür wurde mittels PCR aus cDNA des humanen Herzens die bereits veröffentlichte hKChIP2-cDNA (An *et al.*, 2000) amplifiziert. Dabei entstanden jedoch zwei PCR-Produkte, nämlich ein Hauptfragment von 663 bp Länge und ein weniger häufiges Produkt von 759 bp (Abbildung III.18C). Die anschließende Sequenzierung der PCR-Fragmente zeigte, dass das längere Produkt identisch mit der publizierten hKChIP2-Sequenz (AF199598) war und das kürzere Fragment eine Spleiß-Variante des hKChIP2 darstellte. Diese Spleiß-Variante haben wir hKChIP2short benannt (accession number AY026328). Sie kodiert für ein 220 Aminosäuren großes Protein, dem die Aminosäuren 25 bis 56 der längeren Isoform fehlen. Die Deletion veränderte den Leserahmen des Proteins nicht (ΔN 25-56) (Abbildung III.19), wobei aber das Asparagin in der Position 57 durch ein Aspartat ersetzt war.

III.C.2 Gewebeverteilung des hKChIP2 im Menschen

Um die Gewebeverteilung von hKChIP2 zu untersuchen, wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Diese ergab, dass hKChIP2 ausschließlich im humanen Herzen exprimiert ist (Abbildung III.18A). Innerhalb des Herzens konnten hKChIP2-Transkripte sowohl im Atrium als auch im Ventrikel nachgewiesen werden, jedoch nicht im fötalen Herzen (Abbildung III.18B). Die Tatsache, dass sowohl hKChIP2 als auch hKv4.3 (Kääb *et al.*, 1998a; Grammer *et al.*, 2000) im Atrium und im Ventrikel exprimiert sind, macht eine Interaktion beider Proteine

möglich. Die Ergebnisse der PCR-Analyse zeigten außerdem, dass die kurze hKChIP2-Isoform die prädominierende Isoform von hKChIP2 im menschlichen Herzen ist.

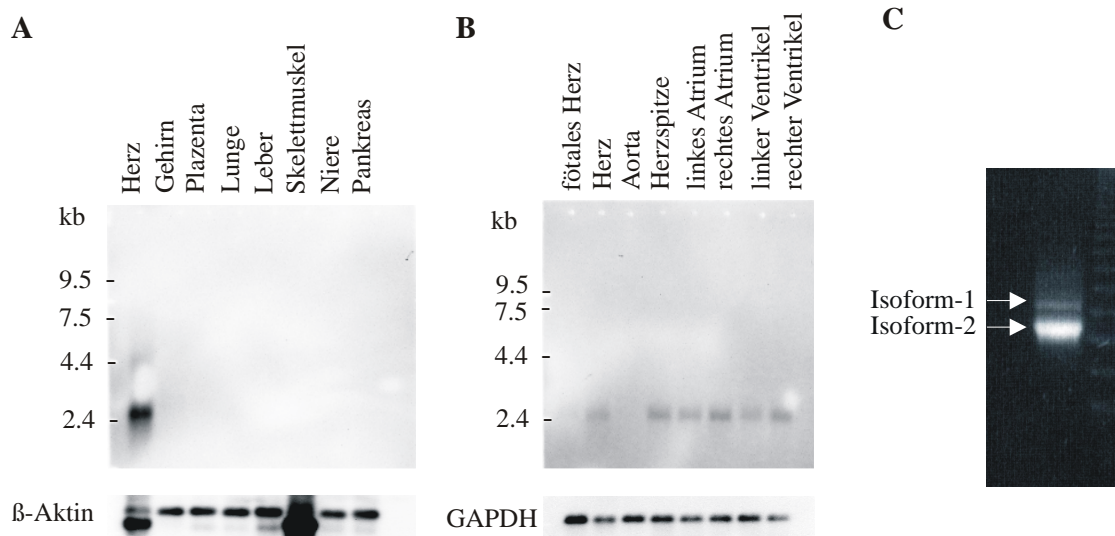


Abbildung III.18: Gewebeverteilung des humanen KChIP2. (A) Northern-Blots wurden mit verschiedenen humanen Geweben und (B) Geweben aus Subregionen des menschlichen Herzens durchgeführt. Hierfür wurde ein poly(A)⁺-RNA enthaltener Blot (Clontech) mit einer hKChIP2-spezifischen und DIG-markierten-RNA-Sonde hybridisiert und anschließend über einen Lumi-Imager detektiert. Die Kontroll-Hybridisierungen wurden mit GAPDH- oder β -Aktin-Sonden durchgeführt. (C) Die semi-quantitative PCR-Untersuchung von cDNA des Herzens zeigte die Expression der beiden Isoformen im humanen Herzen, wobei die kürzere Isoform stärker exprimiert wird.

III.C.3 Genomische Organisation und chromosomale Lokalisation des *hKCNIP2*-Gens

In Kollaboration mit Dr. Bernd Wollnik, Universität Istanbul, wurde die Exon-Intron-Struktur des *hKCNIP2*-Gens vollständig bestimmt. Hierfür wurde die bekannte hKChIP2-cDNA-Sequenz mit der genomischen Sequenz des BAC-Klons RP11-190J1 (accession number AC010789), der den größten Teil des *hKCNIP2*-Gens enthält, verglichen. Zusätzlich wurden mittels *long-range*-PCR an humanen genomischen DNA-Fragmenten die Exon-Intron-Grenzen des Exon 2 bestimmt. Das *hKCNIP2*-Gen besteht demnach aus neun Exons und die gefundenen Spleiß-Grenzen enthalten die für Donor- und Akzeptorseiten charakteristischen Dinukleotide GT und AG. Eine Ausnahme ist die Donor-Spleiß-Grenze des Exon 2, welches ein GC-Dinukleotid enthält (Abbildung III.19B). Es wurde berichtet, dass nur weniger als 0,6% aller humanen Spleiß-Grenzen dieses GC-Dinukleotid besitzen (Burset *et al.*, 2000). Es ist jedoch

noch nicht bekannt, ob diese Art der Spleiß-Grenze einen Einfluss auf die Effizienz des Spleiß-Vorgangs besitzt. Interessanterweise ist das Exon 2 nicht in der kurzen Isoform der hKChIP2-cDNA enthalten. Die Größen der Exons und Introns des *hKCNIP2*-Gens sind in der Abbildung III.19B aufgeführt.

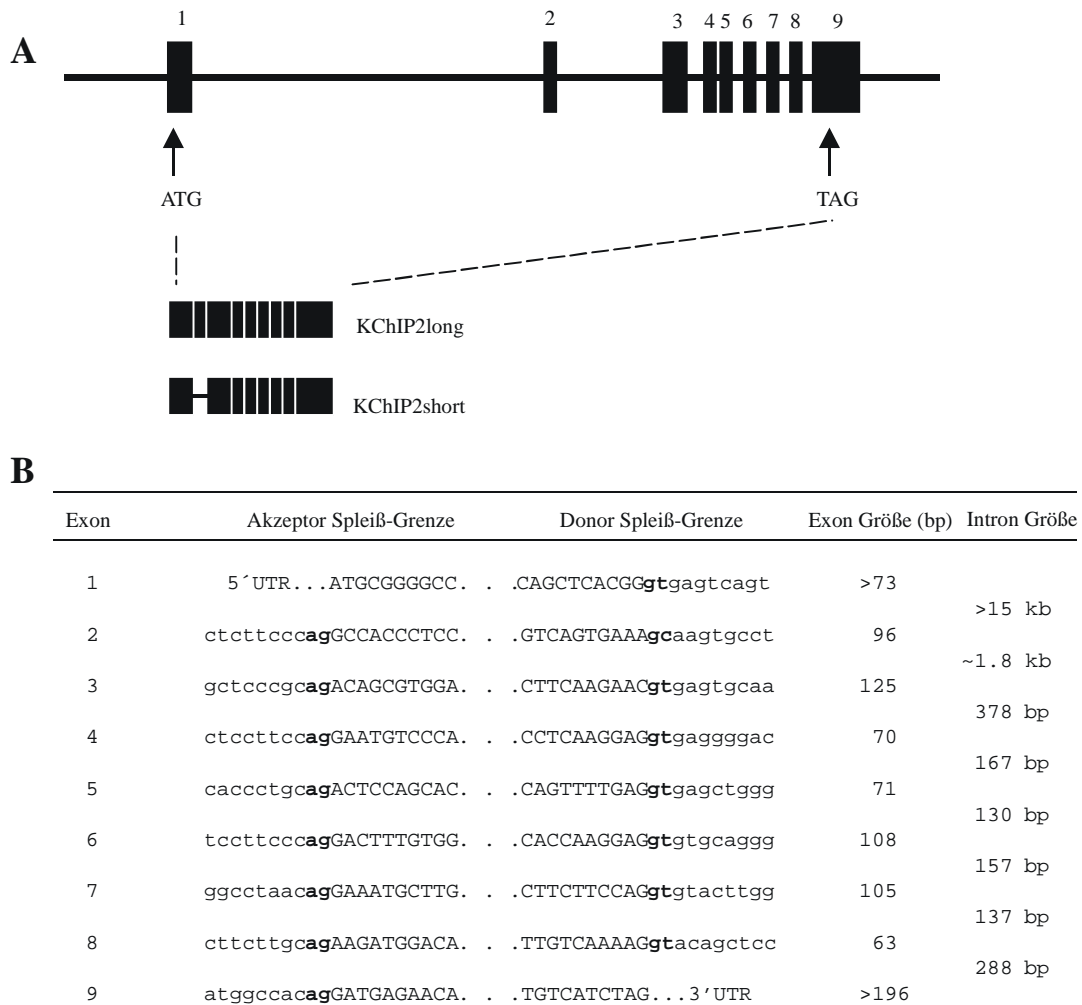


Abbildung III.19: Exon-Intron-Struktur des *hKCNIP2*-Gens. (A) Die Exons werden durch nummerierte schwarze Boxen angezeigt. Das Start-ATG und das Stop-Signal für die Translation werden durch Pfeile markiert. Es wird die Zusammensetzung der langen und kurzen Isoform des *hKCNIP2*-Gens dargestellt. Die kurze Isoform enthält das Exon 2 des Gens nicht. (B) DNA-Sequenz der Spleiß-Grenzen des *hKCNIP2*-Gens sowie die entsprechenden Größen der Exons und Introns. Die exonischen Sequenzen werden in großen Buchstaben dargestellt, die intronischen Sequenzen sind in kleinen Buchstaben aufgeführt und die Spleiß-Motive werden durch fett gedruckte Buchstaben markiert. Die Donor-Spleiß-Grenze des Exon 2 enthält ein ungewöhnliches GC-Motiv.

Mit Hilfe von STS-Markern, die in der Sequenz des genomischen Klon RP11-190J1 enthalten waren, konnte die Lage des *hKCNI*P2-Gens auf dem Chromosom 10q24 bestimmt und in den Bereich zwischen den Markern D10S603 und D10S597 eingegrenzt werden (Abbildung III.20A). Diese Lokalisation wurde durch eine parallel durchgeführte FISH-Analyse (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung) bestätigt (Abbildung III.20B).

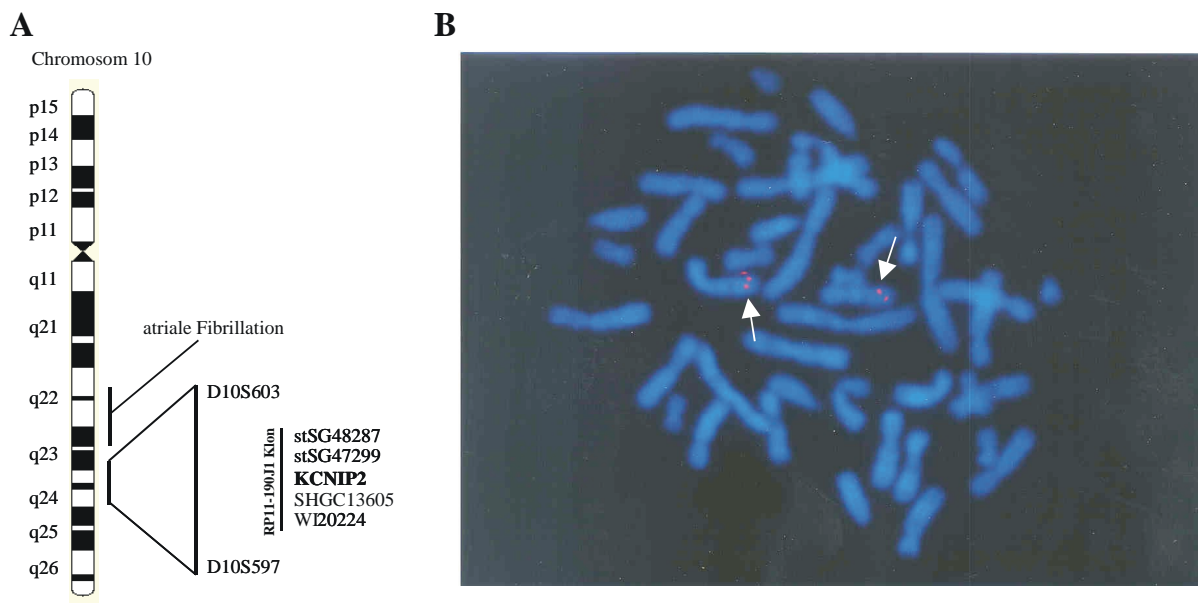


Abbildung III.20: Das *hKCNI*P2-Gen ist auf dem Chromosom 10q24 lokalisiert. (A) Das Piktogramm zeigt die Lokalisation des *hKCNI*P2-Gens auf dem Chromosom 10 sowie die Lokalisation auf dem genomischen RP11-190J1-Klon, der das *hKCNI*P2-Gen und die flankierenden STS-Marker enthält. Die Region, die mit „atriale Fibrillation“ markiert ist, definiert den Locus einer familiären Form der atrialen Fibrillation, die von Brugada *et al.* (1997) beschrieben wurde. (B) Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungs-Analyse (FISH) des *hKCNI*P2-Gens mit menschlichen Metaphasechromosomen. Die Pfeile markieren die Lokalisation des *hKCNI*P2-Gens auf den beiden Chromosomen 10.

III.C.4 Charakterisierung der hKv4.3long-Ströme

Die beschriebene funktionelle Interaktion von KChIP-Proteinen mit Kv4-Kaliumkanälen und das überlappende Vorkommen von hKChIP2 und hKv4.3 haben uns veranlasst zu untersuchen, ob hKChIP2 in der Lage ist, die biophysikalischen Eigenschaften von hKv4.3 zu beeinflussen. Diese Untersuchungen erfolgten durch Koexpression beider cDNAs in *Xenopus*-Oozyten. Zunächst wurden die Eigenschaften von hKv4.3 in Oozyten untersucht. Bei diesen Experimenten wurde die lange kardiale Isoform von hKv4.3 (hKv4.3long) verwendet.

Die Injektion der hKv4.3long-cRNA in *Xenopus*-Oozyten resultierte in der Expression von schnell aktivierenden und inaktivierenden A-Typ-Kaliumkanälen (Abbildung III.21). Um die Zeitkonstante der Inaktivierung zu bestimmen, wurden während den depolarisierenden Spannungssprüngen die ersten 200 ms der Ströme ausgewertet und durch eine monoexponentiell abnehmende Funktion gefittet. Die Zeitkonstante für die Inaktivierung bei +50 mV war $\tau = 62,3 \pm 2,1$ ms ($n = 43$) (Tabelle III.6). Die Spannung für die halb-maximale Aktivierung wurde nach Umrechnung der Ströme in die normierte Leitfähigkeit durch eine Boltzmann-Funktion der ersten Ordnung gefittet (Dilks *et al.*, 1999). Die Spannung der halb-maximalen Aktivierung ($V_{1/2 \text{ act.}}$) hatte für den hKv4.3long den Wert von $-9,6 \pm 1,2$ mV ($n = 18$) und der Steigungsparameter der normierten Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung betrug $20,3 \pm 0,6$ mV (Abbildung III.21D). Die Parameter für das Gleichgewicht der Inaktivierung ($V_{1/2 \text{ inact.}}$) wurden, wie schon zuvor beschrieben (Dilks *et al.*, 1999), durch ein Doppel-Puls-Protokoll erhalten, wobei ein 1 s langer Vorpuls zu Spannungen von -100 bis $+5$ mV in 5 mV Schritten, ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV, verwendet wurde. Die normierten Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen der maximalen transienten Auswärtsströme wurden für jede einzelne Oozyte mit einer Boltzmann-Formel der ersten Ordnung gefittet. Die Spannung für die halb-maximale Inaktivierung betrug $-51,0 \pm 1,3$ mV ($n = 24$) mit einem Steigungsparameter von $6,5 \pm 0,4$ mV (Abbildung III.22C). Die Erholung von der Inaktivierung wurde mit einem Zwei-Puls-Protokoll bestimmt. Die Zellen wurden für 200 ms auf $+50$ mV depolarisiert und anschließend für verschiedene Zeitdauern bei -80 mV gehalten, um eine Erholung von der Inaktivierung zu erlauben, bevor ein zweiter depolarisierender Puls ausgelöst wurde. Die Zeitkonstante für die Erholung von der Inaktivierung wurde durch einen monoexponentiellen Fit der Zunahme der Spitzen-Stromamplituden des zweiten Pulses in Abhängigkeit vom Zeitraum zwischen den beiden Pulsen bei -80 mV bestimmt. Die Zeitkonstante für die Erholung von der Inaktivierung bei -80 mV war $249,8 \pm 11,3$ ms ($n = 18$). Die Kanäle benötigten somit über 1 s, um sich vollständig von der Inaktivierung zu erholen (Abbildung III.23A und C).

III.C.5 Koexpression beider hKChIP2-Isoformen mit dem hKv4.3long in *Xenopus*-Oozyten

Die alleinige Expression des hKChIP2 in *Xenopus*-Oozyten erzeugte keine Ströme. Die Koexpression beider hKChIP2-Isoformen mit dem hKv4.3long führte zu einer signifikanten Veränderung aller Stromeigenschaften von hKv4.3long, mit Ausnahme der Spannung der halb-maximalen Aktivierung. Die Effekte der beiden hKChIP2-Isoformen auf den hKv4.3-Strom waren fast identisch. Nur die Werte für die Spannung der halb-maximalen Inaktivierung waren statistisch signifikant unterschiedlich (Tabelle III.6).

Tabelle III.6 Funktionelle Effekte der beiden hKChIP2-Isoformen auf den Kv4.3long-Strom nach Koexpression in *Xenopus*-Oozyten. Die Werte sind mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben. * $p < 0,01$ für die Koexpression im Vergleich mit hKv4.3long alleine. + $p < 0,01$ im Vergleich der Koexpression von entweder hKChIP2long oder hKChIP2short mit hKv4.3long.

	Spitzen- Stromamplitude (μA bei +50 mV)	Inaktivierungs- zeitkonstante (τ in ms bei +50 mV)	Erholung von der Inaktivierung (τ in ms bei -80 mV)	$V_{1/2}$ der Inaktivierung (mV)	$V_{1/2}$ der Aktivierung (mV)
hKv4.3long	$12,2 \pm 1,0$ $n = 43$	$62,3 \pm 2,1$ $n = 43$	$249,8 \pm 11,3$ $n = 18$	$-51,0 \pm 1,3$ $n = 24$	$-9,6 \pm 1,2$ $n = 18$
hKv4.3long + hKChIP2long	$23,1 \pm 1,0$ * $n = 93$	$110,7 \pm 6,0$ * $n = 92$	$36,7 \pm 2,2$ * $n = 37$	$-38,9 \pm 0,6$ * + $n = 41$	$-11,3 \pm 1,3$ $n = 21$
hKv4.3long + hKChIP2short	$24,2 \pm 1,7$ * $n = 33$	$114,3 \pm 14,7$ * $n = 19$	$39,8 \pm 4,3$ * $n = 23$	$-32,2 \pm 1,1$ * + $n = 26$	$-7,6 \pm 1,6$ $n = 27$

Die Koexpression des hKv4.3long mit hKChIP2long oder -short führte zu einem signifikanten Stromanstieg von $12,2 \pm 1,0 \mu\text{A}$ ($n = 43$) auf $23,1 \pm 1,0 \mu\text{A}$ ($n = 93$) bzw. $24,2 \pm 1,7 \mu\text{A}$ ($n = 33$) (Abbildung III.21B). Außerdem bewirkte die Koexpression eine verlangsamte Inaktivierung des hKv4.3-Kanals. Die Zeitkonstante stieg von $62,3 \pm 2,1 \text{ ms}$ ($n = 43$) auf $110,7 \pm 6,0 \text{ ms}$ ($n = 92$) für hKChIP2long und auf $114,3 \pm 14,7 \text{ ms}$ ($n = 19$) für hKChIP2short an.

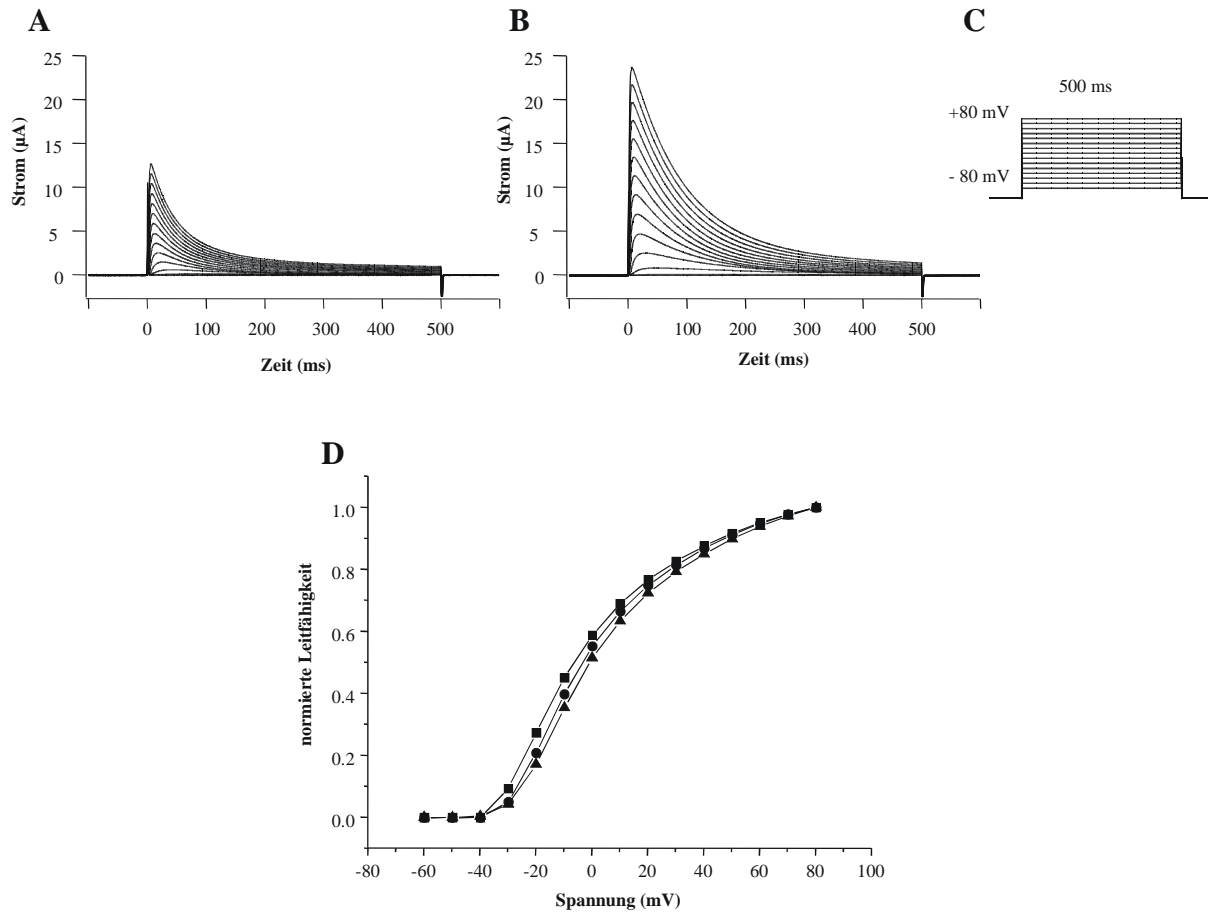


Abbildung III.21: Koexpression des hKChIP2 mit hKv4.3long in *Xenopus*-Oozyten. (A) Die Expression des hKv4.3long erzeugte schnell aktivierende und inaktivierende Kanäle, die einen Schwellenwert der Aktivierung von ungefähr -40 mV und eine Spannung der halb-maximalen Aktivierung ($V_{1/2}$) von $-9,6 \pm 1,2$ mV mit einem Steigungsparameter von $20,3 \pm 0,6$ mV ($n = 18$) haben. (B) Repräsentative Ströme des hKv4.3long koexprimiert mit hKChIP2long. Die Stromamplitude war deutlich erhöht, wohingegen der Schwellenwert der Aktivierung und die Spannung der halb-maximalen Aktivierung nicht signifikant verändert wurden. Diese Resultate wurden auch für die Koexpression des hKv4.3long mit hKChIP2short erhalten. (C) Die Ströme wurden durch 500 ms lange depolarisierende Spannungssprünge, von einem Haltepotential von -80 mV aus, zu Spannungen von -60 bis $+80$ mV in 10 mV Schritten ausgelöst. Eine elektronische Leckstrom-Subtraktion wurde nicht durchgeführt. (D) Repräsentative Leitfähigkeit-Spannungs-Verhältnisse der Aktivierung des hKv4.3long (●), des hKv4.3long koexprimiert mit hKChIP2long (■) und hKv4.3long koexprimiert mit hKChIP2short (▲).

Während die halb-maximale Aktivierung des hKv4.3/hKChIP2-Stroms im Vergleich zum Kv4.3-Strom unverändert blieb, war die Spannung der halb-maximalen Inaktivierung zu mehr positiven Werten verschoben. Die $V_{1/2}$ der Inaktivierung war $-38,9 \pm 0,6$ mV mit einem Steigungsparameter von $4,7 \pm 0,1$ mV ($n = 41$) für hKChIP2long und $-32,2 \pm 1,1$ mV mit einem

Steigungsparameter von $5,7 \pm 0,2$ mV ($n = 26$) für hKChIP2short (Abbildung III.22C). Dies bedeutet, dass sich der *open-window*-Strom des hKv4.3, der sich aus den im Gleichgewicht befindenden aktivierten und inaktivierten Kanälen ergibt, durch den unterschiedlichen Einfluss der beiden Isoformen auf die Spannung der halb-maximalen Inaktivierung verändern kann.

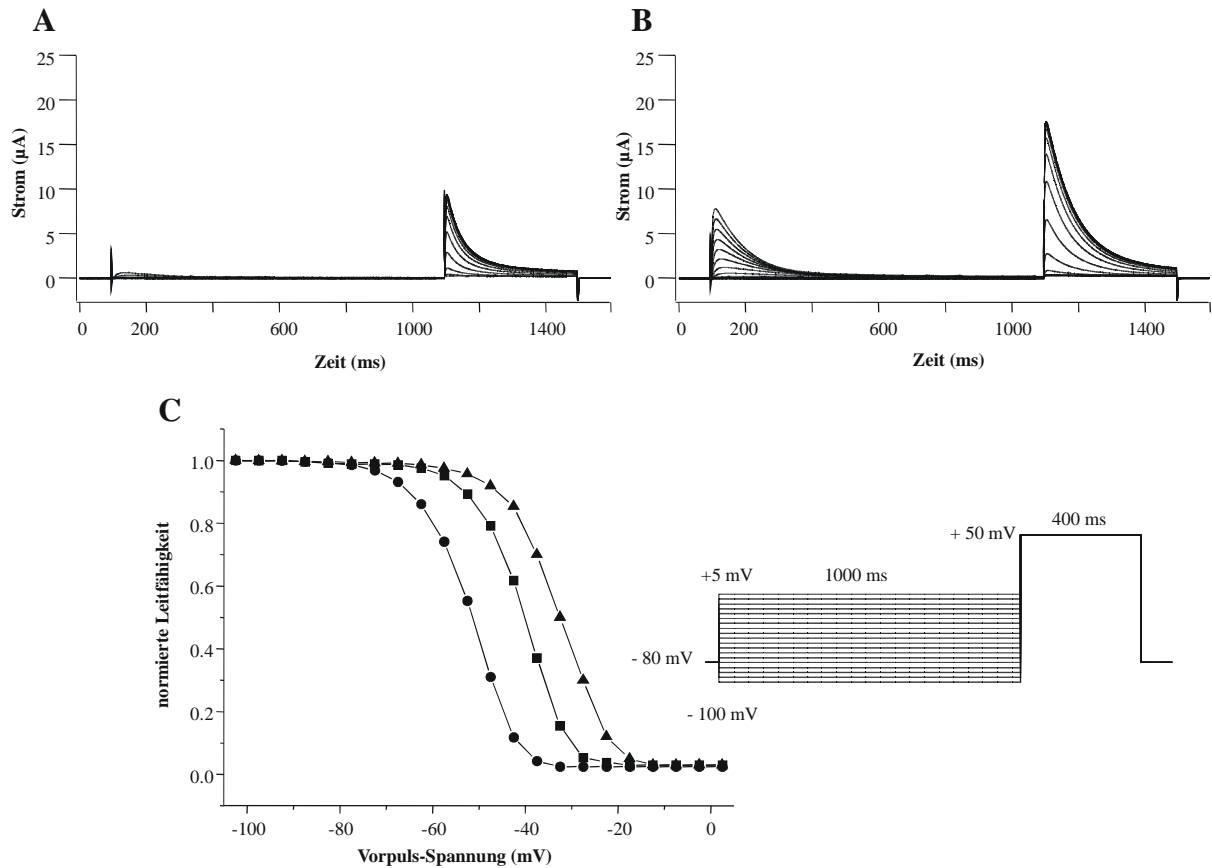


Abbildung III.22: Halb-maximale Spannung der Inaktivierung der hKv4.3-Ströme in *Xenopus*-Oozyten, koexprimiert mit hKChIP2. (A) Messungen von hKv4.3long-Strömen, die durch ein Zwei-Puls-Protokoll erhalten wurden. Der erste Spannungssprung von 1 s Dauer wurde zu Potentialen von -100 mV bis zu $+5$ mV in 5 mV Schritten durchgeführt. Der zweite Spannungssprung wurde immer zu $+50$ mV durchgeführt. (B) Ströme einer Oozyte, die hKv4.3long und hKChIP2long exprimiert. Die gleichen Ergebnisse wurden für die Koexpression mit hKChIP2short erhalten. (C) Repräsentative Vorpuls-Spannung-Leitfähigkeits-Kurven des hKv4.3long (●), des hKv4.3long koexprimiert mit hKChIP2long (■) und des hKv4.3long koexprimiert mit hKChIP2short (▲).

Der deutlichste Unterschied zwischen dem nativen I_{to1} im Herzen und dem hKv4.3-Kanal in *Xenopus*-Oozyten ist die viel schnellere Erholung des I_{to1} von der Inaktivierung (Näbauer *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1998; Dilks *et al.*, 1999). Interessanterweise bewirkte hKChIP2 eine drastische Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung des hKv4.3. Die Zeitkonstante für die

Erholung von der Inaktivierung nahm von $249,8 \pm 11,3$ ms ($n = 18$) auf $36,7 \pm 2,2$ ms ($n = 37$) bzw. auf $39,8 \pm 4,3$ ms ($n = 23$) für Kv4.3/hKChIP2long und Kv4.3/hKChIP2short ab. Diese Werte stehen im Einklang mit den Ergebnissen, die für den I_{to1} aus dem humanen Herzen berichtet wurden (Wettwer *et al.*, 1994; Näbauer *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1998). Nach der Koexpression mit hKChIP2 hatten sich die Kanäle schon nach weniger als 200 ms wieder vollständig von ihrer Inaktivierung erholt (Abbildung III.23B und C).

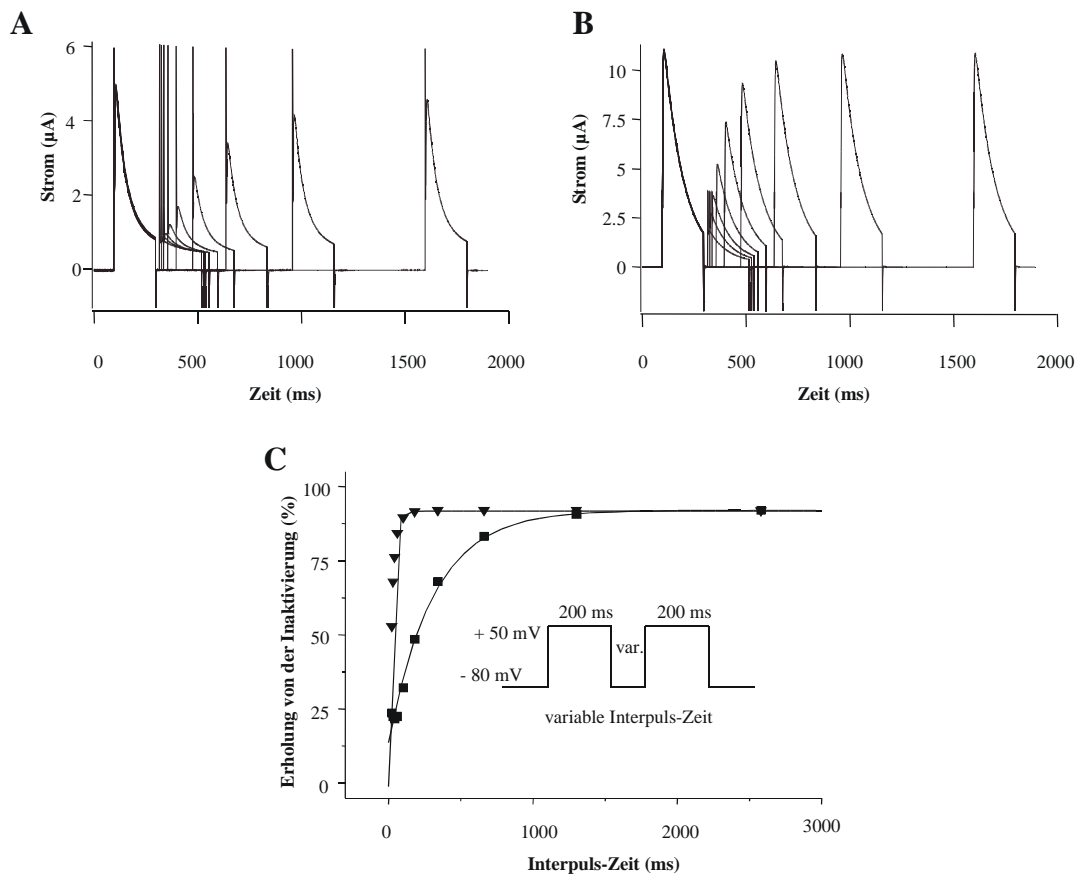


Abbildung III.23: Die Erholung von der Inaktivierung wurde mit einem Spannungsprotokoll untersucht, das zwei 200 ms lange depolarisierende Spannungssprünge zu +50 mV beinhaltete, wobei das Zeitintervall zwischen den beiden Spannungssprüngen variiert wurde. Das Haltepotential und das Potential während des Erholungsintervalls betrug -80 mV. (A) Die Erholung von der Inaktivierung des hKv4.3long alleine oder (B) koexprimiert mit hKChIP2long. Ähnliche Stromkurven wurden durch die Koexpression mit hKChIP2short erhalten. (C) Prozentuale Erholung von der Inaktivierung in Abhängigkeit vom Erholungs-Zeitintervall. Repräsentative monoexponentielle Fits der Spitzen-Ströme des zweiten Spannungssprunges zu verschiedenen Zeitpunkten der Erholung vom ersten inaktivierenden Puls für hKv4.3long alleine (■) und von hKv4.3long, koexprimiert mit hKChIP2long oder hKChIP2short (▼).

In einer weiteren Studie wurde die Sensitivität des hKv4.3/hKChIP2-Stroms für 4-Aminopyridin, einem klassischen I_{to1} -Blocker (Serodio *et al.*, 1996; Kong *et al.*, 1998; McKinnon, 1999), untersucht, um zu überprüfen, ob hKChIP2 neben den Veränderungen der biophysikalischen Eigenschaften auch die Pharmakologie des hKv4.3-Stroms verändert. Keine der beiden Spleiß-Formen des hKChIP2 beeinflusste aber die Affinität des hKv4.3 für 4-Aminopyridin (keine Abbildung).

III.C.6 Koexpression von hKChIP2 mit einer N-terminalen Deletionsmutante (Δ N2-67) des hKv4.3long

Hefe-zwei-Hybrid-Analysen haben gezeigt, dass hKChIP-Proteine mit dem N-Terminus der Kv4-Proteine interagieren (An *et al.*, 2000). Die schnelle Inaktivierung der *Shal*-Verwandten der Kv4-Kanal-Proteine ist im Gegensatz zu der Inaktivierung der Kv1-Kanäle vom *Shaker*-Typ relativ unempfindlich für Deletionen im N-terminalen Ende (Rasmusson *et al.*, 1998). Um zu zeigen, dass die Bindung von hKChIP2 an den N-Terminus auch für die Modulation des hKv4.3-Kanals verantwortlich ist, haben wir hKChIP2 mit einer N-terminal trunkierten hKv4.3-Mutante koexprimiert. Ähnlich wie bei dem Wild-Typ führte die Expression der hKv4.3- Δ N2-67-Mutante zu schnell aktivierenden und inaktivierenden A-Typ-Strömen. Die Spannung für die halb-maximale Aktivierung des Δ N2-67-hKv4.3-Konstrukts war $-8,1 \pm 1,4$ mV mit einem Steigungsparameter von $20,5 \pm 0,7$ mV ($n = 16$). Die Spannung für die halb-maximale Inaktivierung betrug $-48,4 \pm 1,5$ mV mit einem Steigungsparameter von $6,8 \pm 0,4$ mV ($n = 16$). Die Zeitkonstante für die Inaktivierung bei +50 mV war $\tau = 73,5 \pm 3,0$ ms ($n = 16$). Die Zeitkonstante für die Erholung von der Inaktivierung betrug $\tau = 229,8 \pm 15,3$ ms ($n = 16$). Die Koexpression mit hKChIP2 zeigte weder Effekte auf die Stromamplitude, noch wurden die biophysikalischen Eigenschaften der durch die Mutante kodierten Ströme verändert (keine Abbildung). Dies unterstützt die vorangegangene Untersuchung der hKv4.3/hKChIP2-Interaktion, die eine physikalische Bindung an den N-Terminus zeigte, hinsichtlich der Modulation des hKv4.3 über den N-Terminus. Mit Hilfe der Deletionsmutante konnte die Bindungsstelle für hKChIP2 auf das erste Drittel des hKv4.3-N-Terminus eingegrenzt werden.

IV Diskussion

IV.A *Pharmakologie des spezifischen $I_{Cl,swell}$ -Blockers DCPIB sowie der Einfluss des $I_{Cl,swell}$ auf das atriale Aktionspotential*

In fast jeder Zelle führt eine Schwellung zu der Aktivierung des auswärts-rektifizierenden Chloridstroms $I_{Cl,swell}$, der wahrscheinlich an der darauffolgenden regulatorischen Volumenabnahme beteiligt ist. In erregbaren Zellen kann die Aktivierung dieser Chloridleitfähigkeit die elektrische Aktivität beeinflussen. Da das Chlorid-Gleichgewichtspotential in der Nähe des Ruhemembranpotentials (V_{rest}) liegt und $I_{Cl,swell}$ ein auswärts-rektifizierender Strom ist, sollte das Öffnen des $I_{Cl,swell}$ während des Aktionspotentials die Repolarisation der kardialen Membranen beschleunigen und dadurch zu einer Verkürzung der Aktionspotentialdauer führen. Die daraus resultierende Abnahme der effektiven Refraktärzeit könnte das Entstehen von Reentry-Arrhythmien begünstigen (Hiraoka *et al.*, 1998; Mulvaney *et al.*, 2000). Insbesondere die Ischämie und die darauffolgende Reperfusion verursachen eine Schwellung von Kardiomyozyten und führen deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Aktivierung des $I_{Cl,swell}$. Dies kann zu Unterschieden in der Aktionspotentialdauer und der Erregbarkeit von ischämischem im Vergleich zu nicht-ischämischem Gewebe führen (Hiraoka *et al.*, 1998). Die gesteigerte Dispersion der Refraktärzeiten, die mit diesen pathophysiologischen Zuständen assoziiert ist, könnte schließlich das Herz arrhythmisch werden lassen.

Einige Studien haben sich bereits mit der möglichen pathophysiologischen Rolle des $I_{Cl,swell}$ im menschlichen Herzen beschäftigt. Die Schlussfolgerungen, die aus diesen Studien gezogen wurden, sind jedoch aufgrund der Verwendung von unspezifischen und wenig potenten Chloridkanalblockern eingeschränkt. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass DCPIB ein potenter und selektiver Blocker des $I_{Cl,swell}$ -Stroms in verschiedenen Zellen ist. DCPIB ist ein nicht-diuretisches Derivat der Ethacrynsäure (Bourke *et al.*, 1981) und strukturell mit der Indanyloxyessigsäure IAA-94, die ein bekannter Blocker von Chloridkanälen in epithelialen Zellen ist (Landry *et al.*, 1989), verwandt. Für DCPIB wurde ferner gezeigt, dass es sehr effektiv das Adenosin-stimulierte Schwellen von astroglialen Zellen hemmen kann (Bourke *et al.*, 1981), und es wurde vermutet, dass dies über die Hemmung eines gekoppelten Chlorid-Kationen-Transportwegs erreicht wird. Nach derzeitigem Wissen ist der genaue Angriffspunkt des DCPIB in diesem Zellsystem jedoch nicht bekannt. Außerdem bleibt unklar,

ob das entsprechende Transportprotein auch in atrialen Kardiomyozyten exprimiert wird und ob es das Aktionspotential beeinflussen könnte. Die Beobachtung, dass DCPIB die APD unter isotonischen Bedingungen nicht beeinflusst, schließt die Anwesenheit dieses Transportsystems in Kardiomyozyten nicht strikt aus, da es möglicherweise nur bei Zellschwellung aktiv ist. Da DCPIB die Schwellung der astroglialen Zellen, aber nicht die Schwellung der Kardiomyozyten verhindern konnte, ist es aber eher unwahrscheinlich, dass dieser gekoppelte Chlorid-Kationen-Transportweg in atrialen Kardiomyozyten anwesend ist. Der Nachweis der $I_{Cl,swell}$ -Blockade lässt die Möglichkeit zu, dass sie einen positiven Beitrag zu der beschriebenen DCPIB-Wirkung auf die astroglialen Zellen lieferte.

Der IC_{50} für die $I_{Cl,swell}$ -Blockade in endothelialen Zellen war $4,1 \mu\text{M}$. Damit ist DCPIB einer der potentesten bisher bekannten Blocker dieses Stroms. Unsere Untersuchungen haben ergeben, dass DCPIB gegenüber den klassischen Chloridkanalblockern wie DIDS, NPPB, Nifluminsäure und 9-AC mehrere Vorteile besitzt. Bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ war DCPIB selektiv für den $I_{Cl,swell}$. Diese Konzentration hatte keine hemmenden Einflüsse auf eine Reihe von Chlorid- und Kaliumkanälen, die im heterologen Expressions-System untersucht wurden sowie auf native kardiale Ströme, die für die Erzeugung und Formung des Aktionspotentials wichtig sind. Die strukturell verwandte Verbindung IAA-94 ist ein Blocker des $I_{Cl,swell}$, aber nicht als pharmakologisches Hilfsmittel geeignet, da sich die Blockade durch einen sehr langsamen Zeitverlauf (bis zu 20 min) auszeichnet und IAA-94 schon unter basalen Bedingungen (in Abwesenheit einer Zellschwellung) Effekte auf das Aktionspotential zeigt (Sorota, 1994). Außerdem war die Inhibition durch DCPIB, im Gegensatz zu dem in bisherigen Studien verwendeten DIDS (Vandenberg *et al.*, 1997), spannungsunabhängig. Daher spiegeln die durch $I_{Cl,swell}$ -Blockade mit DCPIB auftretenden Veränderungen im Aktionspotential den authentischen Einfluss des $I_{Cl,swell}$ wider und sind nicht in Folge einer unterschiedlichen Blockerwirkung bei verschiedenen Spannungen verfälscht.

Aufgrund seiner Eigenschaften haben wir DCPIB als nützliches Werkzeug angesehen, um Veränderungen des Aktionspotentials während der osmotischen Zellschwellung zu untersuchen. Als Bestätigung dafür haben wir gezeigt, dass DCPIB unter basalen Bedingungen das kardiale Aktionspotential nicht beeinflusst. Obwohl nicht alle Ströme, die an der Formbildung des Aktionspotentials beteiligt sein könnten, individuell getestet wurden, wie z. B. auch Transporter und Austauscher, die unter bestimmten Umständen das Aktionspotential modulieren könnten, steht dieses Ergebnis im Einklang mit der postulierten Spezifität von DCPIB. Es unterstützt

andere Beobachtungen, wonach der $I_{Cl,swell}$ in isolierten Kardiomyozyten unter isoosmotischen Bedingungen nur eine geringe basale Aktivität besitzt.

Frühere Studien haben gezeigt, dass das Schwellen von ventrikulären Kardiomyozyten eine Veränderung des Ruhemembranpotentials und eine Reduktion der Aktionspotentialdauer bewirkt (Vandenberg *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des $I_{Cl,swell}$ beim Aktionspotential atrialer Zellen untersucht, da er dort wahrscheinlich eine wichtigere Rolle spielt. So kommt der $I_{Cl,swell}$ verstärkt in atrialen Zellen vor und atriale Kardiomyozyten schwellen leichter als ventrikuläre Zellen.

In den Versuchen war das Schwellen der atrialen Kardiomyozyten immer von einer starken Verkürzung der Aktionspotentialdauer begleitet. Hierbei war die Verkürzung der APD_{50} stärker als die der APD_{90} , was teilweise durch die Auswärts-Rektifizierung des $I_{Cl,swell}$ erklärt werden kann. Die APD_{50} wird zudem bei einem im Vergleich zum Chlorid-Gleichgewichtspotential (E_{Cl}) mehr positiven Potential ausgewertet, während die APD_{90} in der Nähe des E_{Cl} auftritt, wo der Einfluss der Chloridleitfähigkeit gering ist. Unter normalen physiologischen Bedingungen liegt das E_{Cl} zwischen -71 bis -45 mV (Walker, 1986; Harvey & Hume, 1989), daher ist die treibende Kraft sowohl für die Einwärts- als auch für die Auswärtsströme nahe der APD_{90} sehr gering. Dies resultiert in einer APD -Verkürzung über den gesamten Spannungsbereich, jedoch zu einem geringeren Ausmaß in der späten Phase der Repolarisation. Der für das E_{Cl} berichtete Wert liegt nahe zu dem in unseren Experimenten bestimmten Wert für das V_{rest} der atrialen Kardiomyozyten. Dies erklärt zum Teil die schwache Depolarisation, die während der Zellschwellung beobachtet wurde. Nach Harvey & Hume (1989) besitzen Chloridströme in Kardiomyozyten, die mit einer 22 mM internen Chloridlösung und einer 5,4 mM extrazellulären Kaliumlösung dialysiert werden, nur einen geringen Anteil an der Ruhemembranleitfähigkeit, weil diese von dem einwärts-rektifizierenden Kaliumstrom I_{K1} dominiert wird. Nach den Ergebnissen von Yamawake *et al.* (1992) hätten die beobachteten Effekte auf das Membranpotential ausgeprägter sein können, wenn in unserer Studie eine niedrigere $[K^+]_o$ verwendet worden wäre, da dies die Leitfähigkeit der I_{K1} -Kanäle herabsetzt (Sakmann & Trube, 1984). Vandenberg *et al.* (1997) haben nach osmotischer Zellschwellung von ventrikulären Kardiomyozyten eine Depolarisation des Ruhemembranpotentials um 3,5 mV beobachtet. Dieser Wert entspricht annähernd der Depolarisation um 2,0 mV, die wir für atriale Zellen gemessen haben. Die Depolarisation, die von Vandenberg *et al.* (1997) beobachtet wurde, war jedoch auch in ventrikulären Kardiomyozyten vorhanden, die während der Zellschwellung

keine DIDS-sensitive Komponente der APD-Verkürzung zeigten. Dies deutet darauf hin, dass die etwas stärkere Depolarisation in dieser Studie teilweise unabhängig von der $I_{Cl,swell}$ -Aktivierung war. Demnach weicht die in unseren Messungen beobachtete etwas schwächere Depolarisation nicht wesentlich von den zuvor für ventrikuläre Kardiomyozyten berichteten Werten ab.

Die APD-Verkürzung konnte durch DCPIB sehr wirksam beeinflusst werden. Die Hemmung des $I_{Cl,swell}$ durch DCPIB verursachte eine vollständige Aufhebung der APD-Verkürzung. Nur in einigen Experimenten verblieb eine im Vergleich zu den Ausgangswerten in isotonischem Medium schwache, anhaltende Verkürzung der APD_{50} mit einer leichten Verlängerung der APD_{90} . In anderen Zellen wurde die Verkürzung der APD_{50} und APD_{90} nicht vollständig aufgehoben. Die verbliebenen Unterschiede in der APD nach Schwellung und DCPIB-Behandlung könnten durch Veränderungen anderer Ströme als dem $I_{Cl,swell}$ aufgrund des osmotischen Schwellens verursacht worden sein. Außerdem könnten Veränderungen im Strom-Spannungs-Verhältnis und die Verdünnung der intrazellulären Kalium- und Chloridkonzentration die repolarisierenden Kaliumströme oder das E_{Cl} beeinflusst haben. Die erhaltenen Unterschiede in der APD waren jedoch nicht signifikant (Table III.4A).

Zusätzlich zu den oben erwähnten Veränderungen verursacht eine Zellschwellung auch Veränderungen anderer Ionenströme, die wiederum das APD beeinflussen können. Die Verstärkung des I_{Ks} -Stroms durch Zellschwellung (Rees *et al.*, 1995) würde zu einer verkürzten APD führen, während die Hemmung des I_{Kr} (Rees *et al.*, 1995) und die Zunahme des I_{Ca} durch Zellschwellung zu einer verlängerten APD führt. In der Summe könnten sich diese gegensätzlichen Effekte aufheben. Dies könnte auch die Erklärung dafür sein, dass die APD-Verkürzung durch das Zellschwellen isolierter atrialer Kardiomyozyten des Meerschweinchens offenbar hauptsächlich durch die Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ verursacht wurde und deshalb vollständig durch DCPIB aufgehoben werden konnte.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen mit atrialen Kardiomyozyten konnte die vollständige Blockade des $I_{Cl,swell}$ mit DIDS nur 50% der Schwellungs-induzierten APD-Verkürzung von ventrikulären Zellen aufheben (Vandenberg *et al.*, 1997). Daher wurde angenommen, dass die Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ nicht der einzige Mechanismus ist, der in ventrikulären Kardiomyozyten zur APD-Verkürzung durch osmotisches Schwellen beiträgt (Vandenberg *et al.*, 1997). Der Unterschied zwischen unseren und diesen Ergebnissen kann verschiedene Gründe haben. Es

muss berücksichtigt werden, dass DIDS Ströme wie den I_{Ks} und den $I_{Cl,PKA}$ aktivieren kann (Harvey, 1993; Busch *et al.*, 1994), was ebenfalls zu einer Verkürzung der APD führt. Ferner wurde während der Perfusion der ventrikulären Kardiomyozyten mit hypotonischer Lösung sogar eine initiale APD-Verlängerung beobachtet (Vandenberg *et al.*, 1997), welche in atrialen Kardiomyozyten nicht auftrat. Demnach kann der Anteil der durch den $I_{Cl,swell}$ bedingten APD-Verkürzung zwischen dem Atrium und dem Ventrikel unterschiedlich sein. Auch verschiedene experimentelle Bedingungen könnten die Versuchsergebnisse beeinflusst haben. So wurden die Zellen in den Experimenten von Vandenberg *et al.* nur für 3 min geschwollen, was nur zu einer 30%igen APD-Verkürzung führte. Berücksichtigt man den Zeitverlauf der $I_{Cl,swell}$ -Aktivierung, dann hätte in diesen Experimenten die APD-Verkürzung noch mit der Zeit und somit auch der Anteil des $I_{Cl,swell}$ an der APD-Verkürzung zunehmen müssen. Wie wichtig die experimentellen Bedingungen sind, sieht man daran, dass hauptsächlich der $I_{K,ATP}$ -Strom für die Schwellungsinduzierte Verkürzung der ventrikulären APD verantwortlich gemacht wird, wenn in Kardiomyozyten die intrazelluläre ATP-Konzentration erniedrigt ist (Priebe & Beuckelmann, 1998). In unseren Experimenten konnten wir jedoch keinen Hinweis auf eine mögliche Aktivierung des $I_{K,ATP}$ in den atrialen Zellen nach Schwellung finden.

Während einer Zellschwellung verändern sich mehrere Ströme (Vandenberg *et al.*, 1996), wobei der Zeitverlauf für die Veränderungen der einzelnen Ströme noch nicht bekannt ist und es könnte sein, dass es Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies sowie zwischen Atrium und Ventrikel gibt. Die von uns beobachtete Zunahme der atrialen APD während der Zellschwellung bei längerer Anwesenheit des $I_{Cl,swell}$ -Blockers (Abbildung III.9b) ist zuvor auch für ventrikuläre Zellen berichtet worden (Vandenberg *et al.*, 1997). Hierfür könnten teilweise die durch Schwellung bedingte Hemmung des schnellen, verzögert aktivierenden, rektifizierenden Kaliumstrom (I_{Kr}) (Rees *et al.*, 1995) und die Zunahme von L-Typ- Ca^{2+} -Strömen (Matsuda *et al.*, 1996) verantwortlich sein. Außerdem können, wie bereits erwähnt, Verdünnungseffekte viele Ionenleitfähigkeiten durch Veränderungen der jeweiligen Umkehrpotentiale beeinflussen. Die andauernde Hemmung des $I_{Cl,swell}$ während fortschreitender Zellschwellung könnte zudem mit der regulatorischen Volumenabnahme interferieren und zur Aktivierung noch unbekannter kompensatorischer Mechanismen führen. Daher könnten viele Mechanismen die beobachtete Abweichung in der Aktionspotentialdauer während lang andauernder Zellschwellung und gleichzeitiger $I_{Cl,swell}$ -Blockade erklären.

Unsere Untersuchungen zeigten somit, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen die Schwellungs-induzierte Verkürzung des atrialen Aktionspotentials hauptsächlich durch die Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ verursacht wurde. Der Schwellungs-aktivierte Chloridkanal könnte deshalb an der Veränderung der elektrischen Erregbarkeit des Herzens unter pathophysiologischen Bedingungen beteiligt sein, die mit einer Zellschwellung einhergehen, wie bei Ischämie und Reperfusion. DCPIB stellt deshalb ein wertvolles Werkzeug dar, um in zukünftigen Studien die Rolle des $I_{Cl,swell}$ auf das atriale und ventrikuläre Aktionspotential des Herzens zu untersuchen.

IV.A.1 Untersuchungen des $I_{Cl,swell}$ in normalen und hypertrophierten ventrikulären Kardiomyozyten des Rattenherzens

Zusätzlich zur Ischämie und Reperfusion kann die Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ auch als Folge einer Zellvergrößerung und einer erhöhten mechanischen Belastung, wie sie für die Hypertrophie und die Herzinsuffizienz typisch ist, auftreten. In Übereinstimmung hiermit wurde eine dauerhafte Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ in ventrikulären Kardiomyozyten nachgewiesen, die aus dem Herzen von Hunden mit Tachykardie-induzierter kongestiver Herzinsuffizienz isoliert wurden (Clemo *et al.*, 1999). Es gibt zudem Hinweise, dass es auch in hypertrophierten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte (Benitah *et al.*, 1997) zu einer Induktion eines Chloridstroms kommt. In Übereinstimmung mit der noch fehlenden Beschreibung des Stroms in der Literatur konnten wir an isolierten ventrikulären und atrialen Zellen von gesunden Ratten keinen $I_{Cl,swell}$ -Strom messen. Im Herzen von neonatalen Ratten hingegen war ein $I_{Cl,swell}$ messbar (Coulombe & Coraboeuf, 1992; Kim, 1993). In den Experimenten von Benitah *et al.* (1997) mit den hypertrophierten Rattenherzen wurde aber nicht näher untersucht, ob es sich bei der basal erhöhten Chloridleitfähigkeit tatsächlich um den $I_{Cl,swell}$ handelte. Wir konnten in den hypertrophierten links-ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte nur eine geringfügig erhöhte basale Chloridleitfähigkeit nachweisen, die zudem nicht durch hyperosmolare Lösungen oder durch 50 μ M DCPIB verringert werden konnte. Aus diesem Grund erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass die beobachtete leicht erhöhte basale Chloridleitfähigkeit auf den $I_{Cl,swell}$ zurückzuführen ist. Die von Benitah *et al.* beschriebene Chloridleitfähigkeitserhöhung war ausgeprägter als in unseren Versuchen, was zum Teil durch die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen verursacht sein könnte. In dieser Arbeit konnte z. B. nicht

ausgeschlossen werden, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen auch Kaliumleitfähigkeiten verändert waren (Benitah *et al.*, 1997).

Unseren Resultaten zufolge kommt es also im Gegensatz zum insuffizienten Hundeherzen im hypertrophierten Rattenherzen nicht zu einer basalen Aktivierung des $I_{Cl,swell}$. Es bleibt jedoch offen, ob dies ein Speziesunterschied ist oder ob es erst in den späteren Phasen der Herzinsuffizienz zu einer basalen Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ kommt. In den Kardiomyozyten von insuffizienten humanen Herzen ist das ventrikuläre Aktionspotential verlängert, wodurch Arrhythmien begünstigt werden, insbesondere durch das Auslösen von frühen Nachpolarisationen (engl.: early after depolarisation = EAD). Die persistente Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ und die damit verbundene APD-Verkürzung könnte einer übermäßigen APD-Verlängerung im insuffizienten Herzen entgegenwirken. Ob die pharmakologische Manipulation des $I_{Cl,swell}$ für die Therapie der mit Herzinsuffizienz assoziierten Arrhythmien vorteilhaft sein könnte, muss in zukünftigen Studien an geeigneten Tiermodellen gezeigt werden.

Aufgrund der Abwesenheit des $I_{Cl,swell}$ -Stroms im Herzen der Ratte ist diese Spezies zur Etablierung eines Tiermodells zur Validierung des $I_{Cl,swell}$ als Angriffspunkt für Antiarrhythmika nicht geeignet.

IV.B Charakterisierung des Kaliumkanals TASK-4: kardiales Expressions-Muster sowie seine mögliche physiologische und pathophysiologische Relevanz

Die Kaliumkanäle der Tandem-von-zwei-Poren-Gen-Familie erzeugen Hintergrundleitfähigkeiten, die in Nervenzellen und Kardiomyozyten sehr wahrscheinlich an der Regulation der Erregbarkeit mitwirken. Der in dieser Arbeit neu klonierte TASK-4 hat viele gemeinsame Eigenschaften mit bereits bekannten anderen Familienmitgliedern. Hierzu gehören eine breite Gewebeverteilung, die *Offene-Rektifizierung*, die schnelle Kinetik mit quasi-instantanen Strömen, eine eigenständige Pharmakologie und die Sensitivität gegenüber dem extrazellulären pH-Wert. TASK-4 besitzt die höchste Homologie zum TASK-2, kann aber von diesem durch seine verschobene pH-Abhängigkeit, die schnellere Aktivierungskinetik und die unterschiedliche Sensitivität gegenüber einigen Substanzen unterschieden werden.

Im Herzen wurden Hintergrund-Kaliumströme (I_{Kp}) mit ähnlichen Eigenschaften wie die der TASK-Ströme gefunden, von denen man annimmt, dass sie das kardiale Aktionspotential modulieren (Yue & Marban, 1988; Backx & Marban, 1993). Im menschlichen Herzen zeigt TASK-4 im Vergleich zu den anderen TASK-Familienmitgliedern ein unterschiedliches Expressions-Muster. Während TASK-1 möglicherweise im Atrium und im Ventrikel exprimiert ist (Duprat *et al.*, 1997; Reyes *et al.*, 1998; Lesage & Lazdunski, 2000; Lopes *et al.*, 2000), ist TASK-2 nicht im humanen Herzen exprimiert (Reyes *et al.*, 1998; Lesage & Lazdunski, 2000). TASK-3 der Ratte scheint vorwiegend im Ventrikel vorzukommen (Kim *et al.*, 2000), während TASK-4 in seiner Expression auf das Atrium des Herzens und den Atrioventrikular-Knoten begrenzt ist. Daher könnten native kardiale Kalium-Hintergrundströme in den einzelnen Herzregionen durch verschiedene Mitglieder der TASK-Familie kodiert sein.

Die TASK-4-Ströme waren, wie die Ströme der anderen TASK-Kanäle auch, abhängig vom extrazellulären pH-Wert. Die Inhibition durch extrazelluläre Ansäuerung war aber zu weniger sauren Werten hin verschoben. Da die Öffnungswahrscheinlichkeit des TASK-4 bei pH 7,5 gering war, konnte die Stromamplitude durch weitere Ansäuerung nur um 30% verringert werden. Außerdem war die Stromamplitude des TASK-4 bei diesem pH nicht ausreichend, um das Ruhemembranpotential der Oozyte in die Nähe des Kalium-Gleichgewichtspotential zu verschieben. Aufgrund der geringen Aktivität bei pH 7,5 war deshalb die durch Alkalisierung hervorgerufene Zunahme der Stromamplitude stärker ausgeprägt als bei den anderen Mitgliedern der TASK-Familie. Die Beziehung zwischen pH-Wert und Stromamplitude war sehr steil und erreichte innerhalb des pH-Bereichs, in dem verlässliche Messungen in *Xenopus*-Oozyten möglich sind, keine Sättigung. Dies war auch der Grund, weshalb es uns nicht möglich war, den pKi-Wert zu bestimmen, welcher offensichtlich zu mehr alkalischen Werten verschoben sein muss. Die molekulare Basis für diese veränderte pH-Abhängigkeit ist jedoch noch nicht bekannt. Das TASK-4-Protein besitzt nicht das bei TASK-1 und TASK-3 konservierte Histidin in der P1-Schleife, das für die pH-abhängige Blockade des TASK-3 verantwortlich ist (Kim *et al.*, 2000). Dieser Histidin-Rest ist aber auch im TASK-2-Protein nicht vorhanden, obwohl TASK-2 eine sehr ähnliche pH-Sensitivität im Vergleich mit TASK-1 und TASK-3 besitzt. Dies deutet die Möglichkeit an, dass auch andere Aminosäuren zur pH-Sensitivität der TASK-Kanäle beitragen.

Um makroskopische Ströme mit Amplituden von größer als 1,5 μ A bei +40 mV zu erhalten, wurden die pharmakologischen Eigenschaften des TASK-4 bei pH 8,5 bestimmt. Dies

minimierte Ungenauigkeiten, die durch eine zu kleine Stromamplitude hervorgerufen werden können. Aufgrund der pH-Sensitivität basischer Verbindungen wie Chinin und den Lokalanästhetika Lidocain und Bupivacain bedeutete dies jedoch eine potentielle Fehlerquelle. Die im Vergleich zum TASK-2 gefundene stärkere Inhibition des TASK-4 durch Barium stand im Widerspruch zu einer möglichen Abnahme der Inhibitionsstärke als Folge eines Verlustes von unlöslichem $(\text{BaOH})_2$. Es ist deswegen eher unwahrscheinlich, dass die im Vergleich zu TASK-2 gefundenen Unterschiede in der Pharmakologie allein durch den veränderten pH-Wert bei den Untersuchungen bedingt waren.

Als Folge der in *Xenopus*-Oozyten gefundenen pH-Abhängigkeit ist es fraglich, ob TASK-4 bei physiologischem pH-Wert das Ruhemembranpotential oder andere zelluläre Funktionen beeinflussen kann. Auf der anderen Seite kann TASK-4 aber durch die steile pH-Abhängigkeit seines Stroms dann eine große Wirkung auf das Ruhemembranpotential ausüben, wenn sich der extrazelluläre pH-Wert nur ganz leicht zu alkalischen Werten verschiebt. Dies gilt insbesondere in Geweben mit einem hohen elektrischen Eingangswiderstand wie dem Sinoatrial- und dem Atrioventrikular-Knoten. TASK-4 könnte auch in der Galle und dem Pankreas eine wichtige Rolle spielen, da sich dort der physiologische pH-Wert im Bereich von 7,5 bis 8,5 bewegen kann. Unter diesen pH-Bedingungen kann TASK-4 große Auswärtsströme produzieren, die in der Lage wären, das Ruhemembranpotential stark zu beeinflussen.

Es ist durchaus möglich, dass der native TASK-4-Kanal eine andere pH-Abhängigkeit besitzt als im heterologen Expressions-System und dann, wie die anderen Kalium-Hintergrundkanäle auch, schon bei physiologischem pH-Wert geöffnet ist. Hierbei könnte auch die Regulation der Aktivität des TASK-4-Kanals durch unterschiedliche Signalwege eine wichtige Rolle spielen. Obwohl die Proteinkinase C keine Effekte auf die TASK-4-Ströme zeigte, müssen andere Signalwege, wie z. B. durch G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren vermittelte Signalwege, die auch andere 2P/4TM-Kaliumkanäle beeinflussen (Czirjak *et al.*, 2000; Lesage *et al.*, 2000; Talley *et al.*, 2000), zukünftig noch untersucht werden.

Die Heterogenität der TASK-ähnlichen Hintergrund-Kaliumkanäle könnte durch die Bildung von Heterodimeren noch weiter gesteigert werden. Diese Möglichkeit wird auch durch die überlappenden Expressions-Muster der verschiedenen TASK-Kanäle angedeutet. Diese Hypothese muss ebenfalls in zukünftigen Studien überprüft werden und wird zum besseren Verständnis der TASK-Funktionen im humanen Herzen beitragen.

Zusätzlich zur Heteromerisierung mit anderen Poren-bildenden Untereinheiten könnte die pH-Abhängigkeit und somit die Stromamplitude bei physiologischen pH-Werten durch modulatorische β -Untereinheiten stark moduliert werden, so dass der Einfluss von TASK-4 auf das Ruhemembranpotential größer wäre als es durch die Ergebnisse der heterologen Expression erscheint.

TASK-4 könnte dementsprechend an der Pathologie der kardialen Ischämie beteiligt sein, wo es zu einer Abnahme des extrazellulären pH-Wertes sowie zu einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration kommt. Unter diesen Bedingungen könnte TASK-4 als *Offener-Rektifizierer* und durch seine pH-Abhängigkeit zur Depolarisation des ischämischen Gewebes beitragen. Der Abfall des pH-Wertes reduziert die Kaliumleitfähigkeit der TASK-4-Ströme, was zu einer Depolarisation führt. Gleichzeitig bewirkt die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration den Verlust der starken Auswärts-Rektifizierung, was über einen vermehrten Kalium-Einwärtsstrom ebenfalls zur Depolarisation beiträgt.

Es sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um die Beteiligung des TASK-4 an nativen I_{Kp} -artigen kardialen Strömen und seine mögliche Bedeutung für die Entwicklung von Vorhof-spezifischen Antiarrhythmika zu bestimmen.

IV.C *KChIP2 ist eine funktionelle β -Untereinheit des hKv4.3: Beteiligung an Herzinsuffizienz und Arrhythmien*

Im humanen Herzen ist der I_{to1} -Strom für die initiale Phase der Repolarisation verantwortlich und bestimmt die Plateau-Spannung des kardialen Aktionspotentials. Dadurch beeinflusst der I_{to1} indirekt auch andere Ströme, die an der Formung des kardialen Aktionspotentials beteiligt sind, wie zum Beispiel die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Greenstein *et al.*, 2000). Die Dysfunktion des I_{to1} kann daher zu starken Veränderungen der Form und der Dauer des kardialen Aktionspotentials führen (Greenstein *et al.*, 2000) und somit die Anfälligkeit des Herzens für Arrhythmien erhöhen (Barry *et al.*, 1998). Für den humanen I_{to1} wurden regionale Unterschiede in der Stromdichte, der Kinetik und den pharmakologischen Eigenschaften gefunden. Diese treten auch über die ventrikuläre Herzwand des Menschen auf (Wettwer *et al.*, 1994; Näbauer *et al.*, 1996). Die funktionelle Heterogenität spiegelt sich in der Beteiligung von mehreren Genen an der Bildung des I_{to1} wider. Ursprünglich wurde angenommen, dass der hKv1.4-Kanal das molekulare Korrelat für den kardialen I_{to1} darstellt. Seine langsame Erholung von der

Inaktivierung und seine pharmakologischen Eigenschaften (4-Aminopyridin- und H_2O_2 -Sensitivität) unterschieden sich jedoch stark von den Eigenschaften des nativen humanen I_{to1} (Po *et al.*, 1992; McKinnon, 1999). Nachfolgende Arbeiten haben gezeigt, dass der hKv4.2 und der hKv4.3 für die Bildung des I_{to1} im Herzen der Säugetiere wichtig sind (Dixon *et al.*, 1996; Fiset *et al.*, 1997; Johns *et al.*, 1997; Barry *et al.*, 1998). Aufgrund seines Gewebeexpressions-Musters und seinen biophysikalischen Eigenschaften erzeugt der hKv4.3 den Hauptteil des humanen transienten Auswärtsstroms (Dixon *et al.*, 1996; Kääb *et al.*, 1998a; Wang *et al.*, 1999; Grammer *et al.*, 2000), während der hKv1.4-Kanal möglicherweise den I_{to1} des Endokards vermittelt (Kääb *et al.*, 1998b). Da der native I_{to1} -Strom eine im Vergleich zum hKv4.3 deutlich schnellere Erholung von der Inaktivierung aufweist, ist die Anwesenheit weiterer modulatorischer Proteine im nativen I_{to1} -Kanal-Komplexes wahrscheinlich.

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass mindestens zwei verschiedene modulatorische mRNA-Spezies koexprimiert werden müssen, um in *Xenopus*-Oozyten Kaliumströme zu erhalten, die den vollen Phänotyp des nativen A-Typ-Stroms des Rattengehirns besitzen (Rudy *et al.*, 1988). Außerdem wurde beobachtet, dass die Koinjektion von niedermolekularer mRNA aus Rattengehirn die Eigenschaften von Kv4-Kanälen modifiziert und deren Inaktivierungsgeschwindigkeit beschleunigt (Chabala *et al.*, 1993; Serodio *et al.*, 1996).

Wie kürzlich gezeigt wurde, stellen die KChIP-Proteine mögliche Kandidaten für diese modulatorischen Untereinheiten dar. Die KChIP-Proteine gehören zu einer Familie von neuronalen Kalzium-bindenden-Proteinen und sind in der Lage, die Eigenschaften von Kv4- α -Untereinheiten zu modifizieren (An *et al.*, 2000). Von den bisher vier bekannten KChIP-Proteinen wurde nur KChIP2 im Herzen der Ratte nachgewiesen (An *et al.*, 2000). Interessanterweise konnten wir im Menschen hKChIP2 nur im Herzen nachweisen, wo es ähnlich wie hKv4.3 sowohl im Atrium als auch im Ventrikel exprimiert ist. Die sich überlappenden Expressions-Muster erlauben deshalb eine physikalische Interaktion beider Proteine. Dies hat uns dazu veranlasst zu untersuchen, ob hKChIP2 mit hKv4.3 interagiert.

Der humane Kv4.3 existiert in zwei Isoformen, die sich in der Länge des C-terminalen Endes unterscheiden. Für unsere Koexpressions-Experimente haben wir die lange Isoform des hKv4.3 (hKv4.3long) verwendet, da diese die hauptsächliche Isoform des humanen Herzens ist (Dilks *et al.*, 1999). Wir fanden heraus, dass hKChIP2 in *Xenopus*-Oozyten die Stromdichte, die Inaktivierungskinetik und die Geschwindigkeit der Erholung von der Inaktivierung des hKv4.3

moduliert und damit wichtige Merkmale des nativen I_{to1} -Stroms reproduziert. Zusätzlich zeigten wir, dass die ersten 67 Aminosäuren der Kv4.3- α -Untereinheit für die funktionelle Interaktion mit dem hKChIP2-Protein notwendig sind.

Gleichzeitig mit unseren Untersuchungen haben Ohya *et al.* (2001) ebenfalls die kurze Spleiß-Variante des hKChIP2 identifiziert. Sie konnten, ähnlich wie wir, im humanen Herzen ausschließlich die kurze Isoform nachweisen. Die von uns durchgeführte Koexpression der beiden Isoformen mit hKv4.3 bewirkte in ähnlichem Ausmaß Veränderungen in der Stromdichte und in der Kinetik der hKv4.3-Ströme. Wir haben zum ersten Mal den Einfluss eines KChIP-Proteins auf die halb-maximale Inaktivierung von Kv4-Kanälen untersucht. Interessanterweise war die positive Verschiebung der Spannung der halb-maximalen Inaktivierung durch hKChIP2short stärker ausgeprägt als durch hKChIP2long. Dadurch kann sich der *open-window*-Strom der hKv4.3-kodierten transienten Auswärtsströme in Abhängigkeit von der assoziierten hKChIP2-Variante verändern und damit könnten beide hKChIP2-Isoformen zur Heterogenität der hKv4.3-generierten kardialen I_{to1} -Ströme beitragen. Auch die transmurale Heterogenität der Erholung von der Inaktivierung des humanen I_{to1} könnte teilweise durch einen Gradienten in der KChIP2-Expression über die freie ventrikuläre Wand bedingt sein. Diese Hypothese wurde kürzlich von Rosati *et al.* bestätigt, da sie zeigen konnten, dass im Epikard eine 25-fach höhere Expression des KChIP2 als im Endokard vorliegt (Rosati *et al.*, 2001). Da die Bindung der KChIP-Proteine wahrscheinlich selektiv für Kv4-Kaliumkanäle ist (An *et al.*, 2000), hat hKChIP2 höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf den endokardialen (H_2O_2 -sensitiven) I_{to1} , der durch die Kv1.4-Untereinheit kodiert wird.

Die Koexpression von Kv4.3 der Ratte (rKv4.3) mit niedermolekularer mRNA des Rattengehirns (Serodio *et al.*, 1996) beschleunigte die Inaktivierung, erhöhte die Sensitivität für 4-Aminopyridin und verursachte eine negative Verschiebung in der Spannung der Aktivierung und Inaktivierung. Dies steht im Widerspruch zu unseren Befunden, nach denen das koexprimierte hKChIP2 die Inaktivierung verlangsamt und die Spannung der Inaktivierung der hKv4.3-Ströme zu mehr positiven Werten verschob. Auch die Koexpression von rKv4.2 mit rKChIP-Proteinen in CHO-Zellen führte zu einer Verschiebung der Spannung der halb-maximalen Aktivierung zu mehr negativen Werten (An *et al.*, 2000), wohingegen weder rKChIP1 (An *et al.*, 2000) noch hKChIP2 die Spannung der halb-maximalen Aktivierung der hKv4.3-Ströme in *Xenopus*-Oozyten beeinflusste. Deswegen stellt sich die Frage, ob die KChIP-Proteine nur die Spannung der halb-maximalen Aktivierung des rKv4.2 und nicht die

des hKv4.3 modulieren können oder ob diese Unterschiede durch die verschiedenen Expressions-Systeme bedingt sind.

Insgesamt ähneln die hKv4.3/hKChIP2-Ströme deutlich mehr dem nativen I_{to1} des humanen Epikards. Insbesondere die Veränderungen in der Spannung der halb-maximalen Inaktivierung und die stark beschleunigte Erholung von der Inaktivierung unterstützen die Hypothese, dass hKChIP2 ein physiologischer Modulator von kardialen hKv4.3-Strömen ist, da sich der native I_{to1} -Kanal nur durch diese schnelle Kinetik rechtzeitig vollständig von seiner Inaktivierung erholen kann, bevor das nächste Aktionspotential durchlaufen wird.

Die Werte, die für die Spannung der halb-maximalen Inaktivierung des humanen I_{to1} berichtet wurden, schwanken zwischen -21 und -45 mV (Wettwer *et al.*, 1994). Diese Variabilität könnte durch unterschiedliche experimentelle Bedingungen wie der Verwendung von Cadmium oder Nifedipin als L-Typ-Kalziumkanalblocker und der Verwendung von verschiedenen Konzentrationen an Kalzium-komplexierenden Substanzen verursacht werden (Wettwer *et al.*, 1994). Die von uns beobachtete Verschiebung der Spannung der halb-maximalen Inaktivierung von -51 mV zu -39 bzw. zu -32 mV bedeutet jedoch eine deutliche Annäherung an den nativen Wert vom humanen epikardialen I_{to1} .

Ähnlich wie nach Koexpression von rKChIP2 mit rKv4.2 in CHO-Zellen (An *et al.*, 2000), verlangsamte auch hKChIP2 die Inaktivierung der hKv4.3-Kanäle in *Xenopus*-Oozyten. Die resultierenden Zeitkonstanten der Inaktivierung des heteromeren Stroms waren größer als die für den nativen kardialen I_{to1} . Die Interpretation dieses Unterschiedes ist jedoch schwierig, da es bei höheren Temperaturen sowie durch die Verwendung von Nifedipin, welches für die Messungen des I_{to1} -Stroms in Kardiomyozyten notwendig ist, zu einer Beschleunigung der Inaktivierungsgeschwindigkeit kommt (Wettwer *et al.*, 1994). Die verbleibenden Unterschiede in der Kinetik zwischen hKChIP2/hKv4.3-Strömen und dem nativen I_{to1} -Strom könnten daher durch die verschiedenen Zellsysteme und/oder durch methodische Unterschiede verursacht sein.

Das Vorkommen zusätzlicher Modulatoren des Kv4.3 im humanen Herzen stellt eine weitere Möglichkeit dar. Im Gegensatz zu den Faktoren, die durch die niedermolekulare mRNA des Rattengehirns kodiert werden und über den C-Terminus des Kv4.3 wirken (Serodio *et al.*, 1996), hat die Koexpression mit hKChIP2 die Sensitivität des hKv4.3 gegenüber 4-Aminopyridin nicht verändert. Daher könnte es noch weitere akzessorische Proteine geben, die

im nativen Kanalkomplex anwesend sind und im Gegensatz zu den KChIP-Proteinen mit dem C-terminalen Ende der Kv4-Untereinheiten interagieren (Serodio *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2001).

Pathophysiologische Bedingungen des Herzens, wie sie bei der Herzinsuffizienz auftreten, führen zum elektrischen *Remodelling*, wodurch es zu einem fötalen Expressions-Muster verschiedener Ionenkanäle kommt. In diesem Zusammenhang ist das Fehlen der hKChIP2-Expression in fötalen Herzen ein interessanter Befund, und es stellt sich die Frage, ob das elektrische *Remodelling* in der Herzinsuffizienz auch eine Herunterregulierung der KChIP2-Expression bewirkt. In diesem Falle wäre wie im fötalen Herzen auch im insuffizienten Herzen eine drastische Abnahme der Geschwindigkeit, mit der sich der I_{to1} von der Inaktivierung erholt, zu erwarten. Da sich die I_{to1} -Kanäle dann nicht mehr vollständig von der Inaktivierung erholen könnten, bevor ein neues Aktionspotential beginnt, käme es bereits bei einer physiologischen Herzfrequenz zu einer drastisch Reduzierung der I_{to1} -Stromamplitude. In den Kardiomyozyten von Patienten mit terminalem Herzversagen wurde aber keine Veränderung in der Erholung von der Inaktivierung des I_{to1} gefunden (Beuckelmann *et al.*, 1993; Näbauer *et al.*, 1993).

Betrachtet man die veränderte Expression des I_{to1} bei verschiedenen Herzkrankheiten wie dem Myokardinfarkt (Jeck *et al.*, 1995), dem ventrikulären Herzversagen (Näbauer *et al.*, 1993; Kääb *et al.*, 1996) und Arrhythmien wie der atrialen Fibrillation (Van Wagoner *et al.*, 1997; Yue *et al.*, 1997) sowie vielleicht auch bei neuronalen Funktionsstörungen, dann stellen Gene, die für Komponenten des I_{to1} -Kanalkomplexes kodieren, mögliche Kandidaten für vererbare Formen von Erregbarkeitsstörungen dar. Aus diesem Grund haben wir in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Bernd Wollnik die komplette Exon-Intron-Struktur sowie die chromosomale Lokalisation des *hKCNI2*-Gens auf dem Chromosom 10q24 bestimmt. Dies erlaubt ein systematisches Screening des hKChIP2-Gens nach Mutationen bei vererbaren Krankheiten, die durch Veränderungen im I_{to1} -Kanalkomplex bedingt sein könnten. In der identifizierten Region wurden bereits zwei humane Funktionsstörungen kartiert, nämlich eine vererbare Form der atrialen Fibrillation (Brugada *et al.*, 1997) und eine partielle Epilepsie, welche mit einer Verminderung der Hörfähigkeit einhergeht (Ottman *et al.*, 1995). Beide krankheitsbestimmenden Gene konnten bisher noch nicht identifiziert werden. Die kritische Region des chromosomalen Locus für die atriale Fibrillation überlappt jedoch nicht mit der des *hKCNI2*-Gens, sondern liegt mehr zentromerisch. Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass das *hKCNI2*-Gen ein Kandidaten-Gen für diese atriale Fibrillation ist. Obwohl wir keine

hKChIP2-Transkripte im menschlichen Gehirn nachweisen konnten, kann das *hKCNIIP2*-Gen nicht strikt als mögliches Kandidaten-Gen für die partielle Epilepsie ausgeschlossen werden, da das Expressions-Niveau des hKChIP2 im Gehirn zu gering sein könnte, um es mit der Northern-Blot-Methode nachzuweisen.

Die kürzlich publizierten Ergebnisse, die mit einer KChIP2-Knock-out-Maus erhalten wurden, zeigten, dass das Ausschalten des KChIP2-Gens zu einem kompletten Verlust des I_{to1} führt und eine erhöhte Anfälligkeit für ventrikuläre Arrhythmien verleiht (Kuo *et al.*, 2001). Die potentielle Beteiligung von hKChIP2 bei Krankheiten des humanen Herzens ist sicher eine der interessantesten Fragen, die in Zukunft untersucht werden müssen.

V Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden drei experimentelle Ansätze gewählt, um kardiale Ionenkanäle zu charakterisieren, die möglicherweise einen Einfluss auf das atriale Aktionspotential haben könnten und die somit potentielle neue Ziel-Gene für die Entwicklung neuer Antiarrhythmika darstellen könnten. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die pharmakologische Untersuchung der Rolle des Schwellungs-aktivierten Chloridkanals $I_{Cl,swell}$ für das atriale Aktionspotential. In einer weiteren Studie wurde eine neue regulatorische Untereinheit des hKv4.3-Kanals identifiziert sowie deren physiologische Bedeutung für die Aktivität des transienten Kalium-Auswärtsstroms I_{to1} charakterisiert. Schließlich wurde ein neuer Kaliumkanal, TASK-4, kloniert, der im humanen Herzen ausschließlich im Atrium vorkommt und deshalb einen Einfluss auf die Erregbarkeit des Herzvorhofs ausüben könnte.

Unter mehreren Ethacrynsäure-Derivaten konnte mit DCPIB ein neuer potenter Blocker des $I_{Cl,swell}$ identifiziert werden. Nachfolgende *Patch-Clamp*- und Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmen-Analysen verschiedener nativer und heterolog exprimierter Anionen- und Kationenkanäle zeigten, dass DCPIB spezifisch den $I_{Cl,swell}$ Strom hemmt. Dies war eine Voraussetzung, um die Funktion des $I_{Cl,swell}$ beim atrialen Aktionspotential während osmotischer Zellschwellung zu untersuchen. Die Schwellung atrialer Kardiomyozyten führte zur Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ und als Folge davon zu einer starken Verkürzung der Aktionspotentialdauer. Diese war durch DCPIB vollständig hemmbar. Unter basalen Bedingungen hatte DCPIB keinen Effekt auf das Aktionspotential. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Aktivierung des $I_{Cl,swell}$ unter pathologischen Bedingungen, die mit einer kardialen Zellschwellung einhergehen, eine ursächliche Rolle beim Auftreten von Arrhythmien spielen kann. Viele frühere Untersuchungen über die Rolle des $I_{Cl,swell}$ bei Arrhythmien erfolgten am Rattenherzen. Unter Verwendung von DCPIB konnten wir aber zeigen, dass die in atrialen und ventrikulären Myozyten von normalen und von hypertrophierten Rattenherzen beschriebenen Chloridströme nicht durch den $I_{Cl,swell}$ hervorgerufen werden. Das Fehlen des $I_{Cl,swell}$ im Rattenherzen stellt damit diese früheren Ergebnisse in Frage.

Eine weitere Leitfähigkeit, die im menschlichen Herzen zur Repolarisation der kardialen Membranen während dem Aktionspotential beiträgt, ist der „Plateau-Strom“ I_{Kp} , der in seinen kinetischen Eigenschaften TWIK- oder TASK-artigen Kaliumkanälen ähnelt. Als erster Schritt bei der Identifizierung der molekularen Identität dieses Kaliumkanals wurde in dieser Arbeit mit

TASK-4 ein neues Mitglied der Säure-sensitiven Tandem-von-zwei-Poren-Kaliumkanälen kloniert. Die heterologe Expression des TASK-4 in *Xenopus*-Oozyten erzeugte Kaliumströme, die eine starke Auswärts-Rektifizierung zeigten, die jedoch bei Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration verloren ging. Die TASK-4-Ströme waren abhängig vom extrazellulären pH-Wert, wobei die pH-Sensitivität im Vergleich zu den anderen TASK-Kanälen zu mehr alkalischen Werten verschoben war. Außerdem zeigten die TASK-4-Ströme die für TASK-Kanäle typischen pharmakologischen Eigenschaften. Aufgrund des Vorkommens von TASK-4 im Atrium und dem Atrioventrikular-Knoten des menschlichen Herzens stellt dieser Kaliumkanal einen neuen potentiellen Angriffspunkt für die Entwicklung eines Vorhof-spezifischen Antiarrhythmikums dar.

Im Gegensatz zu dem I_{Kp} -Strom ist der Ca^{2+} -unabhängige transiente Kalium-Auswärtsstrom I_{to1} des Herzens für die initiale Phase der Repolarisation während des Aktionspotentials verantwortlich. In vielen Regionen des Herzens trägt die α -Untereinheit des hKv4.3-Kaliumkanals zum I_{to1} -Strom bei. In dieser Arbeit wurde mit hKChIP2 erstmals eine regulatorische Untereinheit des I_{to1} identifiziert. Northern-Blot-Analysen haben gezeigt, dass das hKChIP2-Gen ausschließlich im humanen Herzen exprimiert ist, wobei es im Atrium und Ventrikel des adulten humanen Herzens, aber nicht im fötalen Herzen, vorkommt. Weiterhin konnten wir eine neue kurze Spleiß-Variante des hKChIP2-Gens (*hKCNIIP2*) isolieren und durch PCR-Analyse nachweisen, dass diese im menschlichen Herzen die Hauptform des hKChIP2 darstellt. Die Koexpression des hKv4.3 mit beiden hKChIP2-Isoformen in *Xenopus*-Oozyten bewirkte eine Zunahme der Stromamplitude, eine Verschiebung der Spannung der halb-maximalen Inaktivierung und eine stark beschleunigte Erholung von der Inaktivierung der hKv4.3-Kanäle, die in Anwesenheit von hKChIP2 deutlich mehr dem nativen I_{to1} -Kanal des humanen Epikards ähnelten. Unsere Ergebnisse sprechen sehr stark dafür, dass hKChIP2 eine physiologisch wichtige regulatorische Untereinheit des hKv4.3 ist, die auch zur Heterogenität der I_{to1} -Ströme im humanen Herzen beiträgt. Da der I_{to1} -Kanal an der Entstehung und dem Fortschreiten verschiedener Herzkrankheiten wie den Arrhythmien und der Herzinsuffizienz beteiligt ist, stellt hKChIP2 ein neues Ziel-Gen für die Entwicklung neuer zukünftiger Klasse-III-Antiarrhythmika dar. Die in Kooperation mit der Universität Istanbul durchgeführte Aufklärung der Exon-Intron-Organisation des *hKCNIIP2*-Gens liefert zudem die Grundlage für ein zukünftiges systematisches Screening nach Mutationen im hKChIP2-Gen in Familien mit vererbbaaren Arrhythmien.

VI Literaturverzeichnis

- Abbott, G.W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, E., Lehmann, M.H., Timothy, K.W., Keating, M.T. & Goldstein, S.A. (1999). MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*, **97**, 175-187.
- Ackerman, M.J., Wickman, K.D. & Clapham, D.E. (1994). Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.*, **103**, 153-179.
- Akiyama, T. & Fozzard, H.A. (1975). Influence of potassium ions and osmolality on the resting membrane potential of rabbit ventricular papillary muscle with estimation of the activity and the activity coefficient of internal potassium. *Circ. Res.*, **37**, 621-629.
- Ammala, C., Moorhouse, A., Gribble, F., Ashfield, R., Proks, P., Smith, P.A., Sakura, H., Coles, B., Ashcroft, S.J. & Ashcroft, F.M. (1996). Promiscuous coupling between the sulphonylurea receptor and inwardly rectifying potassium channels. *Nature*, **379**, 545-548.
- An, W.F., Bowlby, M.R., Betty, M., Cao, J., Ling, H.P., Mendoza, G., Hinson, J.W., Mattsson, K.I., Strassle, B.W., Trimmer, J.S. & Rhodes, K.J. (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*, **403**, 553-556.
- Arellano, R.O. & Miledi, R. (1995). Functional role of follicular cells in the generation of osmolarity-dependent Cl^- currents in *Xenopus* follicles. *J. Physiol.*, **488**, 351-357.
- Arellano, R.O., Woodward, R.M. & Miledi, R. (1996). Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. In *Ion Channels*, vol. 4, pp. 203-259. Plenum Press, New York.
- Backx, P.H. & Marban, E. (1993). Background potassium current active during the plateau of the action potential in guinea pig ventricular myocytes. *Circ. Res.*, **72**, 890-900.
- Bang, H., Kim, Y. & Kim, D. (2000). TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K^+ channel family. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17412-17419.

- Barry, D.M. & Nerbonne, J.M. (1996). Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annu. Rev. Physiol.*, **58**, 363-394.
- Barry, D.M., Xu, H., Schuessler, R.B. & Nerbonne, J.M. (1998). Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4 alpha subunit. *Circ. Res.*, **83**, 560-567.
- Bear, C.E., Duguay, F., Naismith, A.L., Kartner, N., Hanrahan, J.W. & Riordan, J.R. (1991). Cl⁻ channel activity in *Xenopus* oocytes expressing the cystic fibrosis gene. *J. Biol. Chem.*, **266**, 19142-19145.
- Beuckelmann, D.J., Näbauer, M. & Erdmann, E. (1993). Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ. Res.*, **73**, 379-385.
- Bezanilla, F. & Armstrong, C.M. (1977). Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J. Gen. Physiol.*, **70**, 549-566.
- Bezanilla, F., Vergara, J. & Taylor, R.E. (1982). Voltage clamping of excitable membranes. In: Ehrenstein, G. & Lecar, H. (eds), *Methods of experimental physics*. New York, Academic Press 20, 445-511.
- Bode, F., Sachs, F. & Franz, M.R. (2001). Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation. *Nature*, **409**, 35-36.
- Borsani, G., Rugarli, E.I., Tagliatela, M., Wong, C. & Ballabio, A. (1995). Characterization of a human and murine gene (CLCN3) sharing similarities to voltage-gated chloride channels and to a yeast integral membrane protein. *Genomics*, **27**, 131-141.
- Bosch, R.F., Gaspo, R., Busch, A.E., Lang, H.J., Li, G.R. & Nattel, S. (1998). Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow component of the delayed rectifier K⁺ current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.*, **38**, 441-450.

- Boucher, R.C., Stutts, M.J., Knowles, M.R., Cantley, L. & Gatzky, J.T. (1986). Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J. Clin. Invest.*, **78**, 1245-1252.
- Bourke, R.S., Waldman, J.B., Kimelberg, H.K., Barron, K.D., San Filippo, B.D., Popp, A.J. & Nelson, L.R. (1981). Adenosine-stimulated astroglial swelling in cat cerebral cortex in vivo with total inhibition by a non-diuretic acylaryloxyacid derivative. *J. Neurosurg.*, **55**, 364-370.
- Boyle, W.A. & Nerbonne, J.M. (1991). A novel type of depolarization-activated K⁺ current in adult rat atrial myocytes. *Am. J. Physiol.*, **260**, 1236-1247.
- Brugada, R., Tapscott, T., Czernuszewicz, G.Z., Marian, A.J., Iglesias, A., Mont, L., Brugada, J., Girona, J., Domingo, A., Bachinski, L.L. & Roberts, R. (1997). Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. *N. Engl. J. Med.*, **336**, 905-911.
- Burset, M., Seledtsov, I.A. & Solovyev, V.V. (2000). Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4364-4375.
- Busch, A.E., Herzer, T., Wagner, C.A., Schmidt, F., Raber, G., Waldegger, S. & Lang, F. (1994). Positive regulation by chloride channel blockers of I_{sK} channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.*, **46**, 750-753.
- Cairns, J.A., Connolly, S.J., Roberts, R. & Gent, M. (1997). Randomised trial of outcome after myocardial infarction in patients with frequent or repetitive ventricular premature depolarisations: CAMIAT. Canadian Amiodarone Myocardial Infarction Arrhythmia Trial Investigators. *Lancet*, **349**, 675-682.
- Carmeliet, E. (1999). Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol. Rev.*, **79**, 917-1017.
- Chabala, L.D., Bakry, N. & Covarrubias, M. (1993). Low molecular weight poly(A)⁺ mRNA species encode factors that modulate gating of a non-Shaker A-type K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.*, **102**, 713-728.

- Chavez, R.A., Gray, A.T., Zhao, B.B., Kindler, C.H., Mazurek, M.J., Mehta, Y., Forsayeth, J.R. & Yost, C.S. (1999). TWIK-2, a new weak inward rectifying member of the tandem pore domain potassium channel family. *J. Biol Chem.*, **274**, 7887-7892.
- Clapham, D.E. (1998). The list of potential volume-sensitive chloride currents continues to swell (and shrink). *J. Gen. Physiol.*, **111**, 623-624.
- Clark, R.B., Bouchard, R.A., Salinas-Stefanon, E., Sanchez-Chapula, J. & Giles, W.R. (1993). Heterogeneity of action potential waveforms and potassium currents in rat ventricle. *Cardiovasc. Res.*, **27**, 1795-1799.
- Coulombe, A. & Coraboeuf, E. (1992). Large-conductance chloride channels of new-born rat cardiac myocytes are activated by hypotonic media. *Pflügers Arch.*, **422**, 143-150.
- Czirjak, G., Fischer, T., Spat, A., Lesage, F. & Enyedi, P. (2000). TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol. Endocrinol.*, **14**, 863-874.
- Dascal, N. (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC. Crit. Rev. in Biochem.*, **22**, 317-387.
- Deal, K., England, S.K. & Tamkun, M.M. (1996). Molecular physiology of cardiac potassium channels. *Physiol. Rev.*, **76**, 49-67.
- Dilks, D., Ling, H.P., Cockett, M., Sokol, P. & Numann, R. (1999). Cloning and expression of the human Kv4.3 potassium channel. *J. Neurophysiol.*, **81**, 1974-1977.
- Dixon, J.E., Shi, W., Wang, H.S., McDonald, C., Yu, H., Wymore, R.S., Cohen, I.S. & McKinnon, D. (1996). Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ. Res.*, **79**, 659-668.
- Drewnowska, K. & Baumgarten, C.M. (1991). Regulation of cellular volume in rabbit ventricular myocytes: bumetanide, chlorothiazide, and ouabain. *Am. J. Physiol.*, **260**, C122-C131.

- Drumm, M.L., Wilkinson, D.J., Smith, L.S., Worrell, R.T., Strong, T.V., Frizzell, R.A., Dawson, D.C. & Collins, F.S. (1991). Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science*, **254**, 1797-1799.
- Du, X.Y. & Sorota, S. (1997). Cardiac swelling-induced chloride current depolarizes canine atrial myocytes. *Am. J. Physiol.*, **272**, H1904-H1916.
- Duan, D., Winter, C., Cowley, S., Hume, J.R. & Horowitz, B. (1997). Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature*, **390**, 417-421.
- Duprat, M., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C. & Lazdunski, M. (1997). TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.*, **16**, 5464-5471.
- Egan, M., Flotte, T., Afione, S., Solow, R., Zeitlin, P.L., Carter, B.J. & Guggino, W.B. (1992). Defective regulation of outwardly rectifying Cl⁻ channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature*, **358**, 581-584.
- Ehara, T. & Hasegawa, J. (1983). Effects of hypertonic solution on action potential and input resistance in the guinea-pig ventricular muscle. *Jpn. J. Physiol.*, **33**, 151-167.
- Escande, D., Coulombe, A., Faivre, J.F., Deroubaix, E. & Coraboeuf, E (1987). Two types of transient outward currents in adult human atrial cells. *Am. J. Physiol.*, **252**, H142-H148.
- Faivre, J.F. & Findlay, I. (1990). Action potential duration and activation of ATP-sensitive potassium current in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1029**, 167-172.
- Fiset, C., Clark, R.B., Shimoni, Y. & Giles, W.R. (1997). Shal-type channels contribute to the Ca²⁺-independent transient outward K⁺ current in rat ventricle. *J. Physiol.*, **500**, 51-64.
- Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C. & Lazdunski, M. (1996). Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J.*, **15**, 6854-6862.

- Fink, M., Lesage, F., Duprat, F., Heurteaux, C., Reyes, R., Fosset, M. & Lazdunski, M. (1998). A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J.*, **17**, 3297-3308.
- Finkel, A.S. & Gage, P.W. (1985). Conventional voltage clamping with two intracellular microelectrodes. In: Smith, T.G. Jr., Lecar, H., Redman, S.J. und Gage, P.W. (eds.), Voltage and patch clamping with microelectrodes. American Physiological Society, Bethesda, MA, USA.
- Friedrich, T., Breiderhoff, T. & Jentsch, T.J. (1999). Mutational analysis demonstrates that CLC-4 and CLC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J. Biol. Chem.*, **274**, 896-902.
- Gabriel, S.E., Clarke, L.L., Boucher, R.C. & Stutts, M.J. (1993). CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature*, **363**, 263-268.
- Garcia-Dorado, D. & Oliveras, J. (1993). Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury? *Cardiovasc. Res.*, **27**, 1555-1563.
- Goldstein, S.A., Price, L.A., Rosenthal, D.N. & Pausch, M.H. (1996). ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 13256-13261.
- Goldstein, S.A., Wang, K.W., Ilan, N. & Pausch, M.H. (1998). Sequence and function of the two P domain potassium channels: implications of an emerging superfamily. *J. Mol. Med.*, **76**, 13-20.
- Gomez, A.M., Benitah, J.P., Henzel, D., Vinet, A., Lorente, P. & Delgado, C. (1997). Modulation of electrical heterogeneity by compensated hypertrophy in rat left ventricle. *Am. J. Physiol.*, **272**, H1078-H1086.
- Grammer, J.B., Bosch, R.F., Kühlkamp, V. & Seipel, L. (2000). Molecular remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, **11**, 626-633.

- Greenstein, J.L., Wu, R., Po, S., Tomaselli, G.F. & Winslow, R.L. (2000). Role of the calcium-independent transient outward current $I_{(to1)}$ in shaping action potential morphology and duration. *Circ. Res.*, **87**, 1026-1033.
- Gründer, S., Thiemann, A., Pusch, M. & Jentsch, T.J. (1992). Regions involved in the opening of CLC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature*, **360**, 759-762.
- Hagiwara, N., Masuda, H., Shoda, M. & Irisawa, H. (1992). Stretch-activated anion currents of rabbit cardiac myocytes. *J. Physiol.*, **456**, 285-302.
- Harvey, R.D. (1993). Effects of stilbenedisulfonic acid derivatives on the cAMP-regulated chloride current in cardiac myocytes. *Pflügers Arch.*, **422**, 436-442.
- Harvey, R.D. & Hume, J.R. (1989). Autonomic regulation of a chloride current in heart. *Science*, **244**, 983-985.
- Heidbüchel, H., Vereecke, J. & Carmeliet, C. (1990). Three different potassium channels in human atria: contribution to the basal potassium conduction. *Circ. Res.*, **66**, 1277-1286.
- Hilken, G., Iglauer, F. & Richter, H.-P. (1997). Der Krallenfrosch *Xenopus laevis*: Biologie, Haltung, Zucht und experimentelle Nutzung. GV-Solvas, Stuttgart: Enke.
- Hille, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. Second edition. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hiraoka, M., Kawano, S., Hirano, Y., & Furukawa, T. (1998). Role of cardiac chloride currents in changes in action potential characteristics and arrhythmias. *Cardiovasc. Res.*, **40**, 23-33.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. & Katz, B. (1952). Measurements of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.*, **116**, 424-448.
- Irisawa, H., Brown, H.F. & Giles, W. (1993). Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev.*, **73**, 197-227.

- Ismailov, I.I., Awayda, M.S., Jovov, B., Berdiev, B.K., Fuller, C.M., Dedman, J.R., Kaetzel, M. & Benos, D.J. (1996). Regulation of epithelial sodium channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.*, **271**, 4725-4732.
- Jalife, J. (2000). Ventricular Fibrillation: Mechanisms of initiation and maintenance. *Annu. Rev. Physiol.*, **62**, 25-50.
- Janse, M.J. & Wit, A.L. (1989). Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiol. Rev.*, **69**, 1049-1169.
- Jeck, C., Pinto, J. & Boyden, P. (1995). Transient outward currents in subendocardial Purkinje myocytes surviving in the infarcted heart. *Circulation*, **92**, 465-473.
- Jennings, R.B., Reimer, K.A. & Steenbergen, C. (1986). Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **18**, 769-780.
- Jentsch, T.J. & Günther, W. (1997). Chloride channels: an emerging molecular picture. *Bioessays*, **19**, 117-126.
- Jentsch, T.J., Friedrich, T., Schriever, A. & Yamada, H. (1999). The CLC chloride channel family. *Pflügers Arch.*, **437**, 783-795.
- Jentsch, T.J., Steinmeyer, K. & Schwarz, G. (1990). Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature*, **348**, 510-514.
- Johns, D.C., Nuss, H.B. & Marban, E. (1997). Suppression of neuronal and cardiac transient outward currents by viral gene transfer of dominant-negative Kv4.2 constructs. *J. Biol. Chem.*, **272**, 31598-31603.
- Julian, D.G., Camm, A.J., Frangin, G., Janse, M.J., Munoz, A., Schwartz, P.J. & Simon, P. (1997). Randomised trial of effect of amiodarone on mortality in patients with left-ventricular dysfunction after recent myocardial infarction: EMIAT. European Myocardial Infarct Amiodarone Trial Investigators. *Lancet*, **349**, 667-674.

- Jurkiewicz, N.K. & Sanguinetti, M.C. (1993). Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ. Res.*, **72**, 75-83.
- Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K. & Goldstein, S.A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature*, **376**, 690-695.
- Kääb, S., Dixon, J., Duc, J., Ashen, D., Näbauer, M., Beuckelmann, D.J., Steinbeck, G., McKinnon, D. & Tomaselli, G.F. (1998a). Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation*, **98**, 1383-1393.
- Kääb, S., Kartmann, H., Andrassy, J., Hinterseer, M., Barth, A. & Näbauer, M. (1998b). Presence of Kv4.3 and Kv1.4 potassium channel mRNA in human left ventricular myocardium: transmural mRNA-gradients and correlation with current properties. *Circulation*, **98 (Suppl I)**, 4548, I-867.
- Kääb, S., Nuss, H.B., Chiamvimonvat, N., O'Rourke, B., Pak, P.H., Kass, D.A., Marban, E. & Tomaselli, G.F. (1996). Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ. Res.*, **78**, 262-273.
- Kawata, H., Kawagoe, K. & Tateyama, I. (1974). Effects of osmolarity change on the excitation-contraction coupling of bullfrog ventricle. *Jpn. J. Physiol.*, **24**, 587-603.
- Kim, D. (1993). Four different types of mechano-sensitive ion channels in neonatal rat atrial cells. *Circulation*, **88**, I-30.
- Kim, Y., Bang, H. & Kim, D. (2000). TASK-3, a new member of the tandem pore K⁺ channel family. *J. Biol. Chem.*, **275**, 9340-9347.
- Koch, M.C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K.H. & Jentsch, T.J. (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science*, **257**, 797-800.

- Kong, W., Po, S., Yamagishi, T., Ashen, M.D., Stetten, G. & Tomaselli, G.F. (1998). Isolation and characterization of the human gene encoding Ito: further diversity by alternative mRNA splicing. *Am. J. Physiol.*, **275**, H1963-H1970.
- Kornak, U., Kasper, D., Bösl, M.R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G. & Jentsch, T.J. (2001). Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, **104**, 205-215.
- Kozak, M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 857-872.
- Kuo, H.-C., Cheng, C.-F., Clark, R.B., Lin, J.J.-C., Lin, J.L.-C., Hoshijima, M., Nguyen-Tran, V.T.B., Gu, Y., Ikeda, Y., Chu, P.-H., Ross, J. Jr., Giles, W.R. & Chien, K.R. (2001). A defect in the Kv Channel-Interacting Protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I_{to} and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell*, **107**, 801-813.
- Kurachi, Y., Tung, R.T., Ito, H. & Nakajima, T. (1992). G-protein activation of the cardiac muscarinic K^+ channels. *Prog. Neurobiol.*, **39**, 229-246.
- Landry, D.W., Akabas, M.H., Redhead, C., Edelman, A., Cragoe, E.J. Jr. & Al-Awqati, Q. (1989). Purification and reconstitution of chloride channels from kidney and trachea. *Science*, **244**, 1469-1472.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. & Barhanin, J. (1996a). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K^+ channel with a novel structure. *EMBO J.*, **15**, 1004-1011.
- Lesage, F. & Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **279**, F793-F801.
- Lesage, F., Reyes, R., Fink, M., Duprat, F., Guillemare, E. & Lazdunski, M. (1996b). Dimerization of TWIK-1 K^+ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J.*, **15**, 6400-6407.

- Lesage, F., Terrenoire, C., Romey, G. & Lazdunski, M. (2000). Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.*, **275**, 28398-28405.
- Li, G.R., Feng, J., Wang, Z. & Nattel, S. (1996). Transmembrane chloride currents in human atrial myocytes. *Am. J. Physiol.*, **270**, C500-507.
- Li, G.R., Feng, J., Yue, L. & Carrier, M. (1998). Transmural heterogeneity of action potentials and I_{to1} in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am. J. Physiol.*, **275**, H369-H377.
- Lichstein, E., Morganroth, J., Harrist, R. & Hubble, E. (1983). Effect of propranolol on ventricular arrhythmia. The beta-blocker heart attack trial experience. *Circulation*, **67**, I5-I10.
- Litovsky, S.H. & Antzelevitch, C. (1988). Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ. Res.*, **62**, 116-126.
- Litovsky, S.H. & Antzelevitch, C. (1989). Rate dependence of action potential duration and refractoriness in canine ventricular endocardium differs from that of epicardium: role of the transient outward current. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **14**, 1053-1066.
- Lloyd, S.E., Pearce, S.H., Fisher, S.E., Steinmeyer, K., Schwappach, B., Scheinman, S.J., Harding, B., Bolino, A., Devoto, M., Goodyer, P., Rigden, S.P., Wrong, O., Jentsch, T.J., Craig, I.W. & Thakker, R.V. (1996). A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature*, **379**, 445-449.
- Lopes, C.M., Gallagher, P.G., Buck, M.E., Butler, M.H. & Goldstein, S.A. (2000). Proton block and voltage gating are potassium-dependent in the cardiac leak channel Kcnk3. *J. Biol. Chem.*, **275**, 16969-16978.

- Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M. & Honoré E. (1999). Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J. Biol. Chem.*, **274**, 26691-26696.
- Matsuda, N., Hagiwara, N., Shoda, M., Kasanuki, H. & Hosoda, S. (1996). Enhancement of the L-type Ca²⁺ current by mechanical stimulation in single rabbit cardiac myocytes. *Circ. Res.*, **78**, 650-659.
- Matsumura, Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S.B., Hayama, A., Morimoto, T., Liu, W., Arisawa, M., Sasaki, S. & Marumo, F. (1999). Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nat. Genet.*, **21**, 95-98.
- McKinnon, D. (1999). Molecular identity of I_{to}: Kv1.4 redux. *Circ. Res.*, **84**, 620-622.
- Mulvaney, A.W., Spencer, C.I., Culliford, S., Borg, J.J., Davies, S.G., & Kozlowski, R.Z. (2000). Cardiac chloride channels: physiology, pharmacology and approaches for identifying novel modulators of activity. *Drug Discov. Today*, **5**, 492-505.
- Näbauer, M., Beuckelmann, D.J., Überfuhr, P. & Steinbeck, G. (1996). Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of the human left ventricular. *Circulation*, **93**, 168-177.
- Näbauer, M., Beuckelmann, D.J. & Erdmann, E. (1993). Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ. Res.*, **73**, 386-394.
- Nagasaki, M., Ye, L., Duan, D., Horowitz, B. & Hume, J.R. (2000). Intracellular cyclic AMP inhibits native and recombinant volume-regulated chloride channels from mammalian heart. *J. Physiol.*, **523**, 705-717.
- Nattel, S., Li, D. & Yue, L. (2000). Basic mechanisms of atrial fibrillation- Very new insights into very old ideas. *Annu. Rev. Physiol.*, **62**, 51-77.

- Nazir, S.A. & Lab, M.J. (1996). Mechanoelectric feedback in the atrium of the isolated guinea-pig heart. *Cardiovasc. Res.*, **32**, 112-119.
- Nilius, B., Oike, M., Zahradnik, I. & Droogmans, G. (1994). Activation of a Cl⁻ current by hypotonic volume increase in human endothelial cells. *J. Gen. Physiol.*, **103**, 787-805.
- Nilius, B., Prenen, J., Szucs, G., Wei, L., Tanzi, F., Voets, T. & Droogmans, G. (1997a). Calcium-activated chloride channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J. Physiol.*, **498**, 381-396.
- Nilius, B., Prenen, J., Voets, T., Van den Bremt, K., Eggermont, J. & Droogmans, G. (1997b). Kinetic and pharmacological properties of the calcium-activated chloride current in macrovascular endothelial cells. *Cell Calcium*, **22**, 53-63.
- Ohya, S., Morohashi, Y., Muraki, K., Tomita, T., Watanabe, M., Iwatsubo, T. & Imaizumi, Y. (2001). Molecular cloning and expression of the novel splice variants of K⁺ channel-interacting protein 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 96-102.
- Okada, Y. (1997). Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am. J. Physiol.*, **273**, C755-C789.
- Ottman, R., Risch, N., Hauser, W.A., Pedley, T.A., Lee, J.H., Barker-Cummings, C., Lustenberger, A., Nagle, K.J., Lee, K.S., Scheuer, M.L., Neystat, M., Susser, M. & Wilhelmsen, K.C. (1995). Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat. Genet.*, **10**, 56-60.
- Po, S., Snyders, D.J., Baker, R., Tamkun, M.M. & Bennett, P.B. (1992). Functional expression of an inactivating potassium channel cloned from human heart. *Circ. Res.*, **71**, 732-736.
- Pratt, C.M. & Moye, L.A. (1990). The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial: background, interim results and implications. *Am. J. Cardiol.*, **65**, 20B-29B.

- Priebe, L. & Beuckelmann, D.J. (1998). Cell swelling causes the action potential duration to shorten in guinea-pig ventricular myocytes by activating I_{KATP} . *Pflügers Arch.*, **436**, 894-898.
- Rasmusson, R.L., Morales, M.J., Wang, S., Liu, S., Campbell, D.L., Brahmajothi, M.V. & Strauss, H.C. (1998). Inactivation of voltage-gated cardiac K^+ channels. *Circ. Res.*, **82**, 739-750.
- Rees, S.A., Vandenberg, J.I., Wright, A.R., Yoshida, A. & Powell, T. (1995). Cell swelling has differential effects on the rapid and slow components of delayed rectifier potassium current in guinea pig cardiac myocytes. *J. Gen. Physiol.*, **106**, 1151-1170.
- Reyes, R., Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Salinas, M., Farman, N. & Lazdunski, M. (1998). Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K^+ channel from human kidney. *J. Biol. Chem.*, **273**, 30863–30869.
- Roos, K.P. (1986). Length, width, and volume changes in osmotically stressed myocytes. *Am. J. Physiol.*, **251**, H1373-H1378.
- Rosati, B., Pan, Z., Lypen, S., Wang, H.S., Cohen, I., Dixon, J.E. & McKinnon, D. (2001). Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J. Physiol.*, **533**, 119-125.
- Rudy, B., Hoyer, J.H., Lester, H.A. & Davidson, N. (1988). At least two mRNA species contribute to the properties of rat brain A-type potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron*, **1**, 649-658.
- Sakai, R., Hagiwara, N., Kasanuki, H. & Hosoda, S. (1995). Chloride conductance in human atrial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **27**, 2403-2408.
- Sakmann, B. & Trube, G. (1984). Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J. Physiol.*, **347**, 641-657.

- Sanguinetti, M.C., Curran, M.E., Zou, A., Shen, J., Spector, P.S., Atkinson, D.L. & Keating, M.T. (1996). Coassembly of KCNQ1 and MinK (I_{sK}) to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature*, **384**, 80-83.
- Sanguinetti, M.C. & Jurkiewicz, N.K. (1990). Two components of cardiac delayed rectifier K^+ current. *J. Gen. Physiol.*, **96**, 195-215.
- Sanguinetti, M.C. & Jurkiewicz, N.K. (1991). Delayed rectifier outward K^+ current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am. J. Physiol.*, **260**, 393-399.
- Sanguinetti, M.C. & Jurkiewicz, N.K. (1992). Role of external Ca^{2+} and K^+ in gating of cardiac delayed rectifier K^+ currents. *Pflügers Arch.*, **420**, 180-186.
- Schaub, M.C., Hefti, M.A., Zuellig, R.A. & Morano, I. (1998). Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms. *Cardiovasc. Res.*, **37**, 381-404.
- Schmidt-Rose, T. & Jentsch, T.J. (1997). Transmembrane topology of a CLC chloride channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 7633-7638.
- Serodio, P., Vega-Saenz de Miera, E. & Rudy, B. (1996). Cloning of a novel component of A-type K^+ channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J. Neurophysiol.*, **75**, 2174-2179.
- Simon, D.B., Bindra, R.S., Mansfield, T.A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A., Rodriguez-Soriano, J., Morales, J.M., Sanjad, S.A., Taylor, C.M., Pilz, D., Brem, A., Trachtman, H., Griswold, W., Richard, G.A., John, E. & Lifton, R.P. (1997). Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat. Genet.*, **17**, 171-178.
- Shen, M.R., Droogmans, G., Eggermont, J., Voets, T., Ellory, J.C. & Nilius, B. (2000). Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells. *J. Physiol.*, **529**, 385-394.

- Shimoni, Y., Severson, D. & Giles, W.R. (1995). Thyroid status and diabetes modulate regional differences in potassium currents in rat ventricle. *J. Physiol.*, **488**, 673-688.
- Snyders, D.J. (1999). Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc. Res.*, **42**, 377-390.
- Sorota, S. (1992). Swelling-induced chloride-sensitive current in canine atrial cells revealed by whole-cell patch-clamp method. *Circ. Res.*, **70**, 679-687.
- Sorota, S. (1994). Pharmacologic properties of the swelling-induced chloride current of dog atrial myocytes. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, **5**, 1006-1016.
- Steinmeyer, K., Klocke, R., Ortlund, C., Gronemeier, M., Jockusch, H., Gründer, S. & Jentsch, T.J. (1991). Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature*, **354**, 304-308.
- Steinmeyer, K., Lorenz, C., Pusch, M., Koch, M.C. & Jentsch, T.J. (1994). Multimeric structure of CLC-1 chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomsen). *EMBO J.*, **13**, 737-743.
- Steinmeyer, K., Schwappach, B., Bens, M., Vandewalle, A. & Jentsch, T.J. (1995). Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J. Biol. Chem.*, **270**, 31172-31177.
- Stutts, M.J., Canessa, C.M., Olsen, J.C., Hamrick, M., Cohn, J.A., Rossier, B.C. & Boucher, R.C. (1995). CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*, **269**, 847-850.
- Stobrawa, S.M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A.A., Bösl, M.R., Ruether, K., Jahn, H., Draguhn, A., Jahn, R. & Jentsch, T.J. (2001). Disruption of CLC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron*, **29**, 185-196.

- Talley, E.M., Lei, Q., Sirois, J.E. & Bayliss, D.A. (2000). TASK-1, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron*, **25**, 399-410.
- Thiemann, A., Gründer, S., Pusch, M. & Jentsch, T.J. (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature*, **356**, 57-60.
- Tranum-Jensen, J., Janse, M.J., Fiolet, W.T., Krieger, W.J., D'Alnoncourt, C.N. & Durrer D. (1981). Tissue osmolality, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart. *Circ. Res.*, **49**, 364-381.
- Uchida, S., Sasaki, S., Furukawa, T., Hiraoka, M., Imai, T., Hirata, Y. & Marumo, F. (1993). Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *J. Biol. Chem.*, **268**, 3821-3824.
- Vandenberg, J.I., Yoshida, A., Kirk, K. & Powell, T. (1994). Swelling-activated and isoprenaline-activated chloride currents in guinea pig cardiac myocytes have distinct electrophysiology and pharmacology. *J. Gen. Physiol.*, **104**, 997-1017.
- Vandenberg, J.I., Bett, G.C. & Powell, T. (1997). Contribution of a swelling-activated chloride current to changes in the cardiac action potential. *Am. J. Physiol.*, **273**, C541-C547.
- Vandenberg, J.I., Rees, S.A., Wright, A.R. & Powell, T. (1996). Cell swelling and ion transport pathways in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.*, **32**, 85-97.
- Van Wagoner, D.R., Pond, A.L., McCarthy, P.M., Trimmer, J.S. & Nerbonne, J.M. (1997). Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ. Res.*, **80**, 772-781.
- Varro, A., Nanasi, P.P. & Lathrop, D.A. (1993). Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiomyocytes. *Acta Physiol. Scand.*, **149**, 133-142.
- Villmann, C., Bull, L. & Hollmann, M. (1997). Kainate binding proteins possess functional ion channel domains. *J. Neurosci.*, **17**, 7634-7643.

- Waldo, A.L., Camm, A.J., deRuyter, H., Friedman, P.L., MacNeil, D.J., Pauls, J.F., Pitt, B., Pratt, C.M., Schwartz, P.J. & Veltri, E.P. (1996). Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. Survival With Oral d-Sotalol. *Lancet*, **348**, 7-12.
- Walker, J.L. (1986). Intracellular inorganic ions in cardiac tissue. In *The Heart and Cardiovascular System*, H.A. Fozzard, Ed. (Raven Press, New York), pp. 561-572.
- Wei, A., Jegla, T. & Salkoff, L. (1996). Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology*, **35**, 805-829.
- Wang, Z., Feng, J., Shi, H., Pond, A., Nerbonne, J.M. & Nattel, S. (1999). Potential molecular basis of different physiological properties of the transient outward K⁺ current in rabbit and human atrial myocytes. *Circ. Res.*, **84**, 551-561.
- Wettwer, E., Amos, G., Gath, J., Zerkowski, H.R., Reidemeister, J.C. & Ravens, U. (1993). Transient outward current in human and rat ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.*, **27**, 1662-1669.
- Wettwer, E., Amos, G.J., Posival, H. & Ravens, U. (1994). Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ. Res.*, **75**, 473-482.
- Whalley, D.W., Hool, L.C., Ten Eick, R.E. & Rasmussen, H.H. (1993). Effect of osmotic swelling and shrinkage on Na⁺/K⁺ pump activity in mammalian cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.*, **265**, C1201-C1210.
- Yamawake, N., Hirano, Y., Sawanobori, T. & Hiraoka, M. (1992). Arrhythmogenic effects of isoproterenol-activated Cl⁻ current in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **24**, 1047-1058.
- Yang, E.K., Alvira, M.R., Levitan, E.S. & Takimoto, K. (2001). Kvbeta subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C-termini. *J. Biol. Chem.*, **276**, 4839-4844.

Yue, D.T. & Marban, E. (1988). A novel cardiac potassium channel that is active and conductive at depolarized potentials. *Pflügers Arch.*, **413**, 127-133.

Yue, L., Feng, J., Gaspo, R., Li, G.R., Wang, Z. & Nattel, S. (1997). Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ. Res.*, **81**, 512-525.

Zhang, J., Rasmusson, R.L., Hall, S.K. & Lieberman, M. (1993). A chloride current associated with swelling of cultured chick heart cells. *J. Physiol.*, **472**, 801-820.

VII Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Familienname: Decher
Vorname: Niels
Geburtsdatum/-ort: 13.10.1970 in Frankfurt am Main

Schulbildung:

1976-1980 Grundschule in der Hans-Christian-Andersen-Schule in Neu-Isenburg
1980-1982 Förderstufe in der Brüder-Grimm-Schule in Neu-Isenburg
1983-1991 Gymnasium in der Goethe-Schule in Neu-Isenburg

Zivildienst:

1991-1993 Zivildienst bei der TG-Rüsselsheim

Berufliche Ausbildung:

1993-1998 Studium der Pharmazie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main (bei den Professoren Mutschler, Müller, Dingermann, Noe und Kreuter)
1998-1999 Praktisches Jahr in der krankenhausversorgenden Buchen-Apotheke in Lohr am Main
04.06.1999 Approbation als Apotheker
1999-2002 Doktorarbeit bei Aventis Pharma Deutschland GmbH in Frankfurt/Main unter der Anleitung von Prof. Dr. A. E. Busch, PD Dr. K. Steinmeyer sowie Prof. Dr. Dr. E. Mutschler an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main

VIII Eigene Veröffentlichungen

Artikel in internationalen Zeitschriften:

Decher, N., Maier, M., Dittrich, W., Gassenhuber, J., Brüggemann, A., Busch, A.E. & Steinmeyer, K. (2001). Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Letters*, **492**, 84-89.

Decher, N., Uyguner, O., Scherer, C.R., Karaman, B., Yüksel-Apak, M., Busch, A.E., Steinmeyer, K. & Wollnik, B. (2001). hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: Cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. *Cardiovasc. Res.*, **52**, 255-264.

Decher, N., Lang, H.J., Nilius, B., Brüggemann, A., Busch, A.E. & Steinmeyer, K. (2001). DCPIB is a novel selective blocker of $I_{Cl,swell}$ and prevents swelling-induced shortening of guinea pig atrial action potential duration. *Br. J. Pharmacol.*, **134**, 1467-1479.

Kongreßbeiträge:

Decher, N., Busch, A.E., Brüggemann, A. & Steinmeyer, K. (2001). Cloning and functional expression of TASK-4, a novel member of pH-sensitive two pore domain K^+ channels. *Pflügers Archiv*, **441** (6), P28-1.

Wollnik, B., **Decher, N.,** Uyguner, O., Karaman, B., Scherer, C.R., Ghanberl, A., Yüksel-Apak, M. & Steinmeyer, K. (2001). Functional and molecular characterization of the cardiac transient outward current I_{to} and its putative implication in cardiac arrhythmias. *Europ. J. Human Genetics*, **9** (Suppl I), P-0747.

Decher, N., Lang, H.J., Brüggemann, A., Nilius, B., Busch, A.E. & Steinmeyer, K. (2002). DCPIB is a novel selective blocker of $I_{Cl,swell}$ and prevents swelling-induced shortening of guinea pig atrial action potential duration. *Biophys. J.*, **82** (1), P-2971.

IX Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde als externe Doktorarbeit in der Abteilung Cardiovascular Diseases bei der Firma Aventis Pharma Deutschland GmbH angefertigt. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Andreas E. Busch für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit. Für sein Interesse an meinen wissenschaftlichen Arbeiten, die Möglichkeit der Verwirklichung aller Ideen und sein persönliches und förderndes Engagement.

Herrn Prof. Dr. Dr. Ernst Mutschler an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt am Main für die freundliche Betreuung der Arbeit von seiten der Universität, durch die diese externe Doktorarbeit ermöglicht wurde.

Herrn PD Dr. Klaus Steinmeyer für die wissenschaftliche Betreuung bei Aventis, sein stetiges Interesse an wissenschaftlichen Ergebnissen, der engen Zusammenarbeit bei der Erstellung von Veröffentlichungen und sein persönliches Interesse.

Frau Dr. Andrea Brüggemann für die technische Betreuung im Oozyten-Labor.

Herrn Dr. Bernd Wollnik und Frau Constanze R. Scherer für die Kooperation bei der Untersuchung des hKChIP2 und hKv4.3.

Herrn Prof. Dr. Bernd Nilius und Herrn Dr. Hans J. Lang für die Zusammenarbeit bei den Untersuchungen des $I_{Cl,swell}$.

Ferner gilt mein Dank:

Frau Kopp für die freundliche Hilfe bei der Erlernung der *Patch-Clamp*-Technik.

Herrn Stefan Müller und Frau Birgit Herzog für die Präparation der *Xenopus*-Oozyten und die RNA-Synthese.

Dr. Christian Lerche, Dr. Alexander Bachmann, Dr. Guiscard Seebohm, PD Dr. Markus Bleich, Constanze Scherer, Andreas Hertler, Sybille Meister, Astrid Weyermann und Susanne Siefert für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung sowie allen Mitgliedern der Abteilung Cardiovascular Diseases für das freundliche und angenehme Arbeitsklima.