

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
Tübingen  
Abteilung Innere Medizin III  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Seipel**

**Auswirkungen des Antiarrhythmikums AVE 0118  
auf Kaliumströme im Vorhof des  
menschlichen Herzens**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Roman Laszlo  
aus Stuttgart**

**2004**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. V. Kühlkamp

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Quast

Meinen Eltern gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das kardiale Aktionspotential</b>	<b>2</b>
1.1.1	Morphologie des Aktionspotentials	2
1.1.2	Phasen des Aktionspotentials	3
1.1.3	Ionenströme während eines Aktionspotentials	3
1.1.3.1	Der Natriumkanal	4
1.1.3.2	Der Calciumkanal	5
1.1.3.3	Die Kaliumkanäle	5
<b>1.2</b>	<b>Die verschiedenen Kaliumkanäle im menschlichen Herzen</b>	<b>6</b>
1.2.1	Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle	6
1.2.1.1	Die Nomenklatur der spannungsabhängigen Kaliumkanäle	6
1.2.1.1	Der molekulare Aufbau spannungsgesteuerter Kaliumkanäle	6
1.2.2	Einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle	8
1.2.2.1	Einwärtsgleichrichtung – physikalische Grundlagen	8
1.2.2.2	Der molekulare Aufbau einwärtsgleichrichtender Kaliumkanäle	10
1.2.3	Die anderen Kaliumkanäle	11
1.2.4	Die kardialen Kaliumkanäle im Einzelnen	12
1.2.4.1	Der transiente Auswärtstrom $I_{to}$	12
1.2.4.2	Die verzögerten Gleichrichter	13
1.2.4.2.1	Die langsame Komponente $I_{Ks}$	13
1.2.4.2.2	Die schnelle Komponente $I_{Kr}$	13
1.2.4.2.3	Der ultraschnelle Komponente $I_{Kur}$	14
1.2.4.2.3.1	Die biophysikalischen Eigenschaften von $I_{Kur}$	14
1.2.4.2.3.2	Die molekulare Grundlage von $I_{Kur}$	15
1.2.4.2.3.3	Kv1.5 ist ein vorhofspezifischer Kanal	15
1.2.4.2.3.4	Die adrenerge Modulation von Kv1.5	15
1.2.4.2.3.4	Regulation der Genexpression von Kv1.5	16
1.2.4.3	$I_{K1}$ , $I_{K,Ach}$	17
1.2.4.3.3	$I_{K1}$	17
1.2.4.3.4	$I_{K,Ach}$	17
<b>1.3</b>	<b>Vorhofflimmern</b>	<b>18</b>
1.3.1	Geschichte	18
1.3.2	Die Epidemiologie	19
1.3.3	Die Kennzeichen des Vorhofflimmerns	19
1.3.4	Die Ätiologie	19
1.3.5	Die Symptomatik	20
1.3.6	Die Komplikationen	20
1.3.7	Formen des Vorhofflimmerns	21
1.3.8	Die Pathophysiologie des Vorhofflimmerns	21
1.3.8.1	Der elektrophysiologische Mechanismus des Vorhofflimmerns	21
1.3.8.2	Die Initiation von Vorhofflimmern	23
1.3.8.3	Folgen des Vorhofflimmerns	24
1.3.8.3.1	Die atriale Fibrosierung	24
1.3.8.3.2	Die elektrischen Veränderungen	25
1.3.8.3.3	weitere Folgen	25
1.3.9	Die Therapieprinzipien	26
1.3.9.1	Die Therapie durch Antiarrhythmika	26
1.3.9.1.1	Einteilung der Antiarrhythmika	26
1.3.9.1.2	Antiarrhythmika zur Therapie des VHF	28

1.4	<b>Probleme bei der Therapie mit Antiarrhythmika</b>	<b>28</b>
1.4.1	Torsade de pointes	28
1.5	<b>Der vorhofspezifische Klasse III antiarrhythmische Effekt durch selektive Kv1.5-Blockade</b>	<b>29</b>
1.6	<b>Antiarrhythmika mit Wirkung auf Kv1.5</b>	<b>29</b>
1.7	<b>Die neue antiarrhythmische Substanz AVE 0118</b>	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>33</b>
2.1	<b>AVE 0118</b>	<b>34</b>
2.2	<b>Zellgewinnung</b>	<b>35</b>
2.2.1	Patientencharakteristika	35
2.2.2	Verwendete Lösungen und Substanzen	35
2.2.3	Materialgewinnung	39
2.2.3.1	Operationsaal und Transport in das Labor	39
2.2.3.2	Herstellung der Verdauungslösungen	39
2.2.3.3	Gewebeprobenaufbereitung	39
2.2.3.4	Verdauungsschritt 1	39
2.2.3.5	Verdauungsschritt 2	40
2.2.3.6	Stoppen der enzymatischen Verdauung	40
2.2.3.7	Weiteres Vorgehen	41
2.3	<b>Aufzeichnung der Ionenströme</b>	<b>41</b>
2.3.1	Aufzeichnung von $I_{\text{sus}}/I_{\text{Kur}}$	43
2.3.1.1	Die Stromamplitude am Ende des Testpulses ( $I_{\text{sus}}$ ) setzt sich aus $I_{\text{Kur}}$ und einem unspezifischen Kationenkanal zusammen	44
2.3.1.2	Die untersuchten Parameter	46
2.3.1.2.1	Konzentrationsabhängigkeit des $I_{\text{Kur}}$ -Blocks durch AVE 0118	46
2.3.1.2.2	Strom-/Spannungsbeziehung und Spannungsabhängigkeit	46
2.3.2	Aufzeichnung von $I_{\text{to},1}$	47
2.3.2.1	Untersuchte Parameter	48
2.3.2.1.1	Bestimmung des $I_{\text{to},1}$ „peak current“	49
2.3.2.1.2	Ladungsfluß durch den offenen Kanal während eines Testpulses von +50 mV	49
2.3.2.1.3	Bestimmung der zeitlichen Inaktivierung von $I_{\text{to},1}$	51
2.3.2.1.4	Zeitliche Abhängigkeit der $I_{\text{to},1}$ Blockade	51
2.3.3	Aufzeichnung von $I_{\text{K1}}$	53
2.4	<b>Technisch bedingte Fehler bei der Messung im Whole Cell Mode</b>	<b>54</b>
2.4.1	Die Membrankapazität	55
2.4.2	Der Serienwiderstand	56
2.5	<b>Statistik</b>	<b>57</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>59</b>
3.1	<b>Beurteilung der meßtechnisch bedingten Verfälschung der Ergebnisse</b>	<b>60</b>
3.1.1	Serienwiderstand	60
3.1.1.1	$I_{\text{Kur}}/I_{\text{sus}}$	60
3.1.1.2	$I_{\text{to},1}$	60
3.1.1.3	$I_{\text{K1}}$	60
3.1.2	Membrankapazität	61
3.1.2.1	$I_{\text{Kur}}/I_{\text{sus}}$	61
3.1.2.2	$I_{\text{to},1}$	61
3.1.2.3	$I_{\text{K1}}$	61

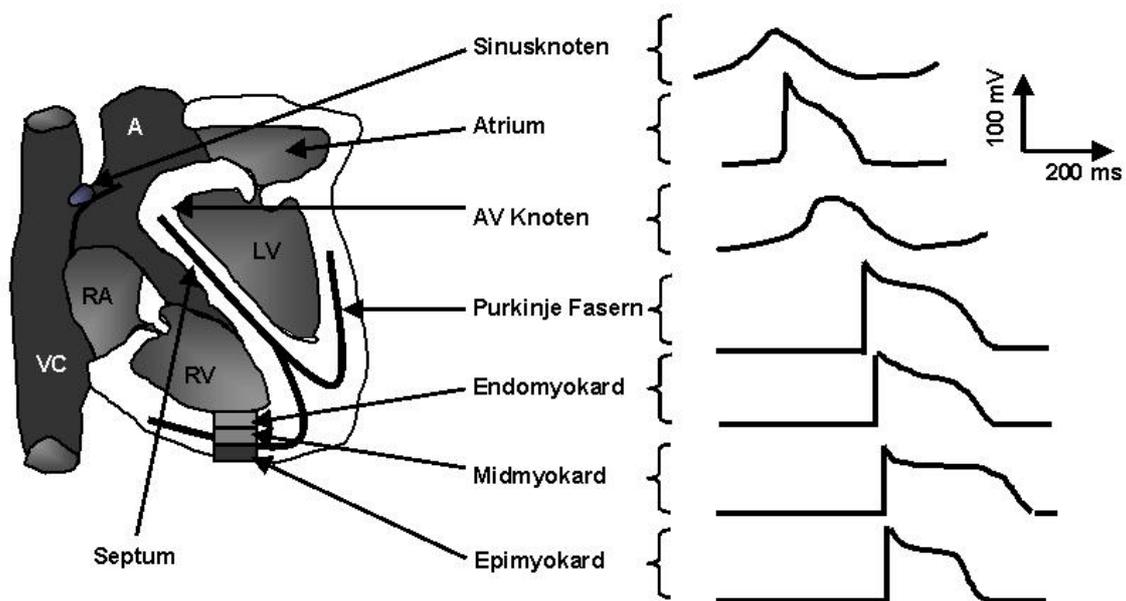
<b>3.2</b>	<b>Wirkung von AVE 0118 auf atriale Ionenströme .....</b>	<b>62</b>
3.2.1	$I_{Kur}$ .....	62
3.2.1.1	Konzentrationsabhängigkeit des $I_{Kur}$ -Blocks durch AVE 0118.....	62
3.2.1.2	Strom-/Spannungsbeziehung und Spannungsabhängigkeit .....	64
3.2.1.3	Washout.....	66
3.2.2	$I_{to,1}$ .....	67
3.2.2.1	$I_{to,1}$ peak current .....	67
3.2.2.1.1	Konzentrationsabhängigkeit .....	67
3.2.2.2	Inaktivierung von $I_{to,1}$ .....	70
3.2.2.3	Ladungsfluß durch $I_{to,1}$ während des Testpulses .....	73
3.2.2.4	Vergleich der verschiedenen Modellrechnungen.....	75
3.2.2.5	Zeitliche Abhängigkeit der $I_{to,1}$ Blockade .....	76
3.2.2.6	Washout.....	77
3.2.3	$I_{K1}$ .....	78
3.2.3.1	Wirkung von 10 $\mu$ mol/l AVE 0118 auf $I_{K1}$ .....	78
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>79</b>
<b>4.1</b>	<b>Material und Methoden – mögliche Fehlerquellen.....</b>	<b>80</b>
4.1.1	Zellen .....	80
4.1.2	Lösungen .....	80
4.1.3	Geräte.....	81
4.1.4	Auswertung.....	81
4.1.5	Meßtechnisch bedingte Verfälschung der Meßergebnisse .....	82
4.1.5.1	Serienwiderstand .....	82
4.1.5.1.1	$I_{Kur}/I_{sus}$ -Messung .....	82
4.1.5.1.2	$I_{to,1}$ -Messung .....	82
4.1.5.1.3	$I_{K1}$ -Messung .....	82
4.1.5.2	Membrankapazität .....	83
4.1.5.2.1	$I_{Kur}/I_{sus}$ -Messung .....	83
4.1.5.2.2	$I_{to,1}$ -Messung .....	83
4.1.5.2.3	$I_{K1}$ -Messung .....	83
<b>4.2</b>	<b>Ergebnisdiskussion.....</b>	<b>84</b>
4.2.1	Die Blockade von $I_{sus}$ durch AVE 0118.....	84
4.2.1.1	Konzentrationsabhängigkeit.....	84
4.2.2	$I_{to,1}$ Blockade .....	85
4.2.2.1	Konzentrationsabhängigkeit des Blocks von $I_{to,1}$ .....	85
4.2.2.2	Möglicher Mechanismus der $I_{to,1}$ Blockade .....	86
4.2.3	$I_{K1}$ -Blockade .....	87
<b>4.3</b>	<b>Klinische Bedeutung .....</b>	<b>87</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>112</b>

# **1 Einleitung**

## 1.1 Das kardiale Aktionspotential

### 1.1.1 Morphologie des Aktionspotentials

Die Morphologie des kardialen Aktionspotentials ist abhängig von der Herzregion, in der es abgeleitet wird. Ursächlich hierfür sind lokale Unterschiede in der Ausstattung der Myozyten mit verschiedenen Ionenkanälen.<sup>10</sup> Die Aktionspotentialform ändert sich im Verlauf des Erregungsleitungssystems des Herzens vom Sinusknoten bis zu den Purkinjefasern, es kommen aber auch transmurale Unterschiede (endo-, mid-, epikardial) vor (Abbildung 1).

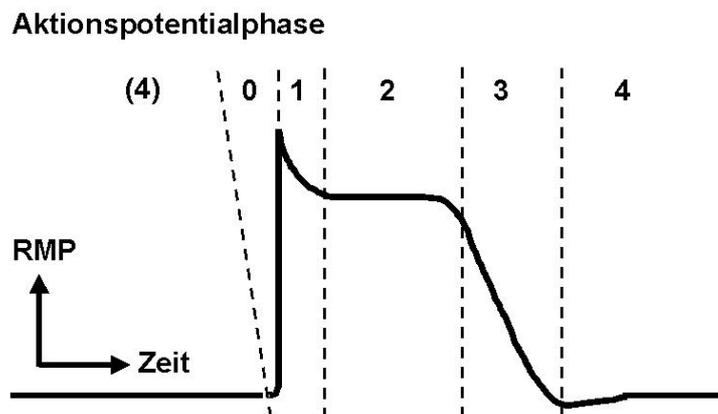


**Abbildung 1:** Lokale Unterschiede der Form kardialer Aktionspotentiale. VC = Vena cava, RA = rechtes Atrium, A = Aorta, RV = rechter Ventrikel, LV = linker Ventrikel.<sup>92</sup>

## 1.1.2 Phasen des Aktionspotentials

Das Aktionspotential lässt sich in fünf zeitliche Phasen einteilen (Abbildung 2)

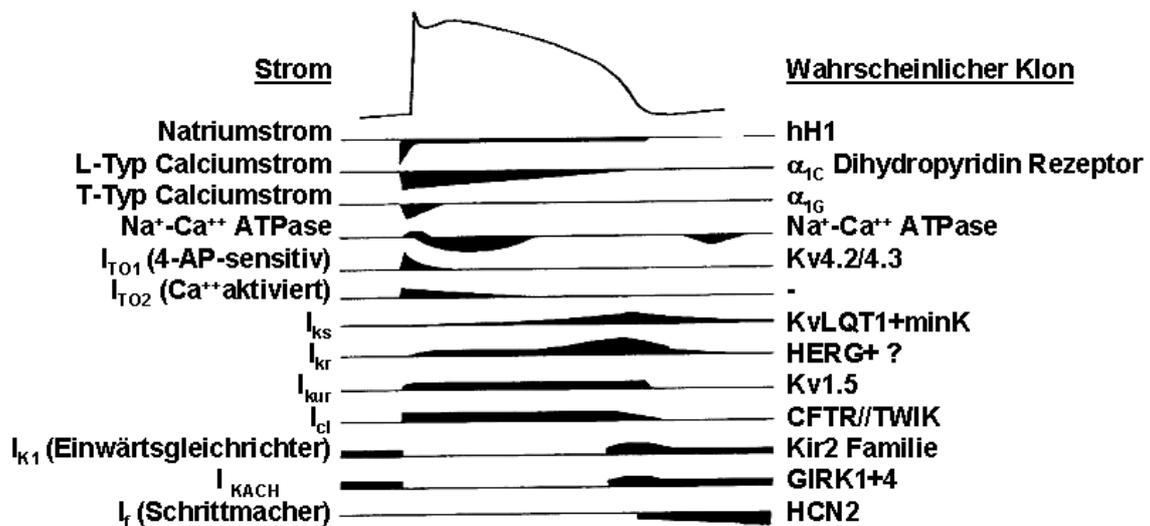
- *Phase 0*: schnelle Depolarisation der Zelle. Das Ruhemembranpotential (RMP) erreicht positive Werte.
- *Phase 1*: frühe oder schnelle Repolarisation.
- *Phase 2*: Plateauphase des Aktionspotentials.
- *Phase 3*: späte oder langsame Repolarisationsphase.
- *Phase 4*: Rückkehr zum RMP. Eventuell eine kurzzeitige Hyperpolarisation der Zelle.



**Abbildung 2:** Phasen des Aktionspotentials am Beispiel eines ventrikulären Aktionspotential. RMP = Ruhemembranpotential.

## 1.1.3 Ionenströme während eines Aktionspotentials

Das kardiale Aktionspotential wird durch den Fluß von Natrium-, Kalium-, Calcium- und Chlorid-Ionen durch Ionenkanäle in der Zellmembran generiert. Abbildung 3 zeigt eine Übersicht der am Aktionspotential beteiligten Ströme. Die regionale Distribution der Kanäle weist jedoch Unterschiede auf, was auch die unterschiedlichen Aktionspotentialmorphologien in den verschiedenen Herzregionen (Kapitel 1.1.1) erklärt.<sup>92</sup>



**Abbildung 3:** Die unterschiedlichen Ionenkanäle, die an der Erzeugung des kardialen Aktionspotentials beteiligt sind. Links im Bild der Strom, jeweils daneben die Öffnungszeit der Kanäle während eines Aktionspotentials, ganz rechts der wahrscheinliche Kanalklon, der den Strom verursacht. Die regionale Diversizität der Aktionspotentialmorphologie rührt von der unterschiedlichen Verteilung der Ionenkanäle in den Myokardarealen her.

### 1.1.3.1 Der Natriumkanal

Der Natriumstrom ist für die schnelle Depolarisation (Phase 0, Kapitel 1.1.2) der Zelle verantwortlich. Trifft ein Reiz auf eine erregbare Zelle, so führt dies zu einer Positivierung des Ruhemembranpotentials (bei Schrittmacherzellen kann dies auch in der Phase 4 (Kapitel 1.1.2) geschehen). Ist das so genannte Schwellenpotential für die Auslösung eines Aktionspotentials erreicht, öffnen sich die Natriumkanäle schlagartig und die Zelle depolarisiert auf positive Membranpotentiale. Natriumkanäle inaktivieren sehr schnell mit einer spannungsabhängigen Zeitkonstante in der Größenordnung von 5 ms.<sup>51</sup>

### **1.1.3.2 Der Calciumkanal**

Durch die Positivierung des Ruhemembranpotentials öffnet sich der spannungsabhängige L-Typ Calciumkanal langsam und führt zu einer weiteren Depolarisation der Zelle. Das Aktionspotential erreicht die Plateauphase (Kapitel 1.1.2). Calcium spielt bei der Kopplung zwischen elektrischer Erregung und mechanischer Kontraktion eine entscheidende Rolle.

### **1.1.3.3 Die Kaliumkanäle**

Wenn sich Kaliumkanäle öffnen, so führt dies letzten Endes zu einer Annäherung des Membranpotentials an das Kaliumgleichgewichtspotential. Deshalb sind diese Kanäle für die Stabilisierung des Ruhemembranpotentials und die Repolarisation von erregbarem Gewebe von großer Bedeutung.

Innerhalb der Familie der Kaliumkanäle gibt es verschiedene Subfamilien, die sich in ihrer Molekularstruktur und damit folglich in ihren biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden. Die strukturelle Variabilität ist, verglichen mit jener der  $\text{Na}^+$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ - oder  $\text{Cl}^-$ -Kanäle weitaus größer.<sup>51</sup>

## **1.2 Die verschiedenen Kaliumkanäle im menschlichen Herzen**

### **1.2.1 Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle**

#### **1.2.1.1 Die Nomenklatur der spannungsabhängigen Kaliumkanäle**

Die ersten spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanäle wurden von der Fruchtfliegenmutante *Drosophila shaker* geklont.<sup>58,97,124</sup> Später wurden neben *shaker* noch drei weitere Gene gefunden, die bei der Fruchtfliege für Kaliumkanäle kodieren: *shal*, *shab* und *shaw*.<sup>16,26,136</sup> Für diese Gene wurden beim Säuger Homologe gefunden.<sup>10,20</sup>

Zur besseren Übersichtlichkeit wurde 1991 eine Nomenklatur für spannungsabhängige  $K^+$ -Kanäle eingeführt. Die Kanalproteine werden nach dem Schema KvX.Y bezeichnet, wobei Kv für „Kalium, voltage gated“ steht.

Das Säugetierhomologe für die *Shaker*-Genklasse ist die *Kv1*-Subfamilie, das für *Shab* *Kv2*. *Shaw* entspricht *Kv3* und *Shal* *Kv4*. Innerhalb dieser Subfamilien gibt es einzelne Gene, die mit der zweiten Ziffer (Y) klassifiziert werden.<sup>19</sup>

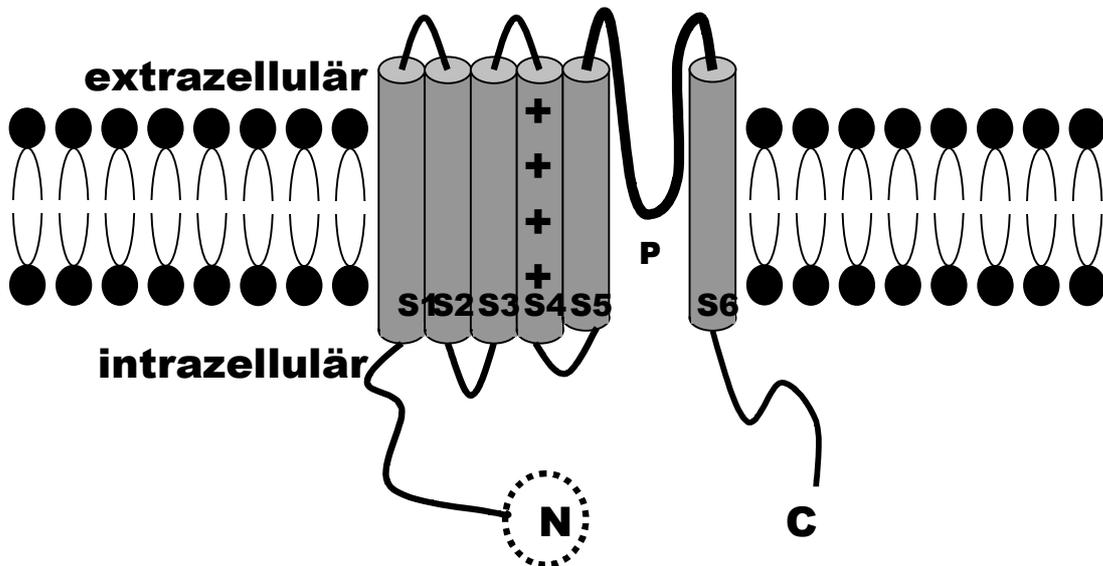
#### **1.2.1.1 Der molekulare Aufbau spannungsgesteuerter Kaliumkanäle**

Die durch die KvX.Y-Gene kodierten Proteine enthalten sechs transmembranäre Segmente S1-S6 (siehe Abbildung 4), sowohl das C-terminale als auch das N-terminale Ende befinden sich intrazellulär. Um einen funktionsfähigen Kanal zu erhalten, ist es notwendig, daß sich jeweils vier dieser Proteine, sogenannte  $\alpha$ -Untereinheiten, zu einem Homo- oder Heteromer zusammenfügen.<sup>18</sup>

Neben diesen KvX.Y-Kanälen gibt es noch andere  $K^+$ -Kanäle, die nach dem selben Prinzip aufgebaut sind: KvLQT1 und HERG. Diese Kanäle wurden auf der Basis ihrer Beteiligung bei kongenitalen Herzrhythmusstörungen geklont. In der Kv Nomenklatur sind dies die Kanäle Kv 7.1 (KvLQT1), zu denen als  $\beta$ -Untereinheit noch minK (KCNE1)<sup>111</sup> hinzukommt, für HERG ist es Kv11.1<sup>112,127</sup> (+MiRP (KCNE2)<sup>1</sup>).

Die eigentliche Pore, durch die die  $K^+$ -Ionen fließen, wird durch eine aus zirka 20 Aminosäuren bestehende, sogenannte P-Region zwischen S5 und S6 gebildet (siehe Abbildung 4).<sup>55,102,103</sup>

Die Kalium-Selektivität wird durch eine bestimmte Aminosäuresequenz in der P-Region erreicht.<sup>77</sup> Das S4-Segment ist der Spannungssensor des Kanals.<sup>18</sup>



**Abbildung 4:** Schema einer Kaliumkanaluntereinheit mit sechs transmembranären Domänen. Die S4 Untereinheit dient als Spannungssensor. Die P-Region bildet, zusammen mit dem unteren Teil von S6, die ionenselektive Pore. Am N-terminalen Ende befindet sich unter Umständen ein „molekularer Ball“, der bei der N-Typ-Aktivierung die Pore verschließt. Dieser Mechanismus ist aber nicht bei allen spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanälen nachweisbar. Quellennachweise im Text.

Einige spannungsabhängige  $K^+$ -Kanäle inaktivieren nach einer initialen Aktivierung. Dies bedeutet, daß sie in einen nichtleitenden Zustand übergehen, obwohl die Zelle weiterhin depolarisiert ist.

Man unterscheidet wenigstens zwei verschiedene Inaktivierungsmechanismen. *Shaker*- $K^+$ -Kanäle besitzen die sogenannte „N-Typ-Inaktivierung“.<sup>53,105</sup> Hierbei bewegt sich nach der Öffnung des Kanals das N-terminale Ende des Kanalproteins in die innere Öffnung der Pore und verschließt diese. Bildlich wird

dieser sehr schnelle Inaktivierungsprozeß auch als „Ball and chain“-Mechanismus bezeichnet.

Ein zweiter Inaktivierungsmechanismus existiert bei fast allen  $K^+$ -Kanälen: Die „C-Typ-Inaktivierung“. Diese ist gewöhnlich langsam und unvollständig. Der Verschuß der Pore wird hier durch eine „Konstriktion“, das heißt Konformationsänderung, der äußeren Kanalöffnung verursacht.<sup>75</sup> Die C-Typ Inaktivierung kann durch eine Vielzahl von Faktoren moduliert werden. So können Substanzen wie zum Beispiel TEA (Porenblocker)<sup>22</sup>, Mutationen - sowohl der Porenregion als auch unmittelbar benachbarter Strukturen<sup>54</sup> - und schließlich auch die extrazelluläre Kationenkonzentration<sup>76</sup> die Inaktivierungskinetik beeinflussen. Auch kann die Inaktivierung, ähnlich wie bei  $Na^+$ -Kanälen, durch kanalassoziierte  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten moduliert werden.<sup>48,107</sup>

## **1.2.2 Einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle**

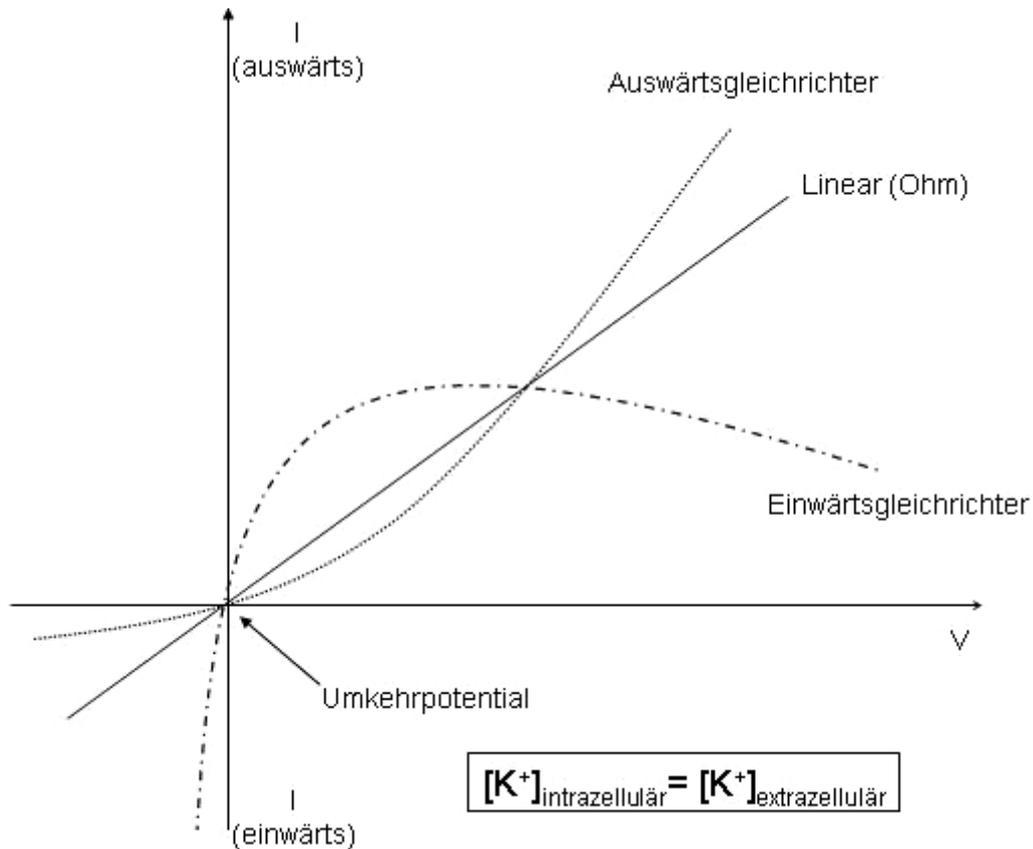
Die zweite große Klasse der Kaliumkanäle sind die einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle.

Der Begriff Gleichrichtung beschreibt die Abhängigkeit der Leitfähigkeit eines Kanals vom Membranpotential (Abbildung 5).

### **1.2.2.1 Einwärtsgleichrichtung – physikalische Grundlagen**

Ohm'sche oder nichtgleichrichtende Kanäle, wie zum Beispiel die spannungsabhängigen Kaliumkanäle, gehorchen dem Ohm'schen Gesetz ( $I=U/R$ ), was bedeutet, daß einerseits die Stromstärke linear vom Membranpotential abhängig ist, aber andererseits der Widerstand des Kanals spannungsunabhängig ist.

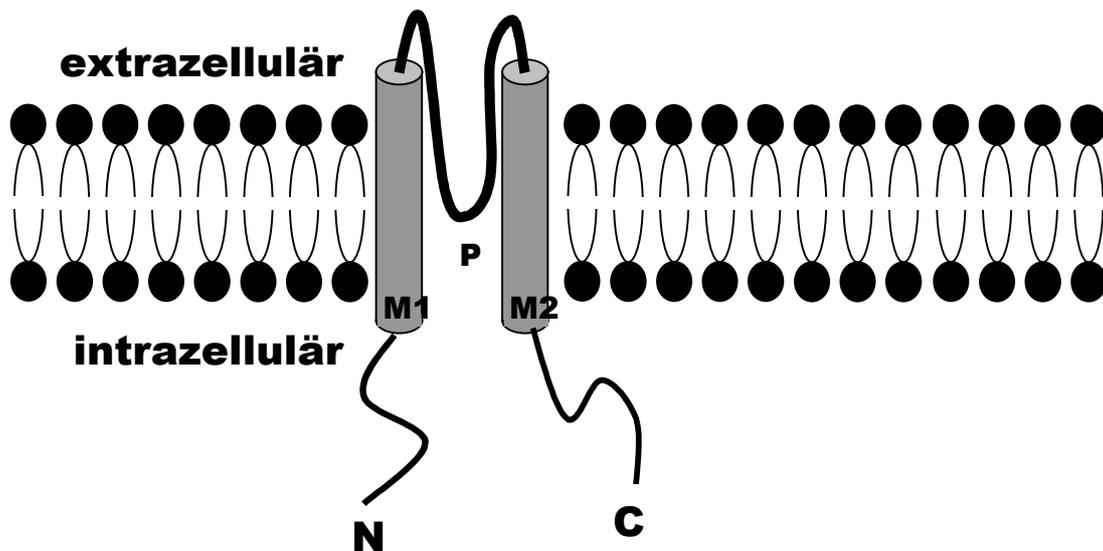
Ist ein Kanal nun ein Einwärtsgleichrichter, so bedeutet dies, daß er dem Einwärtsstrom von Ionen bei Membranpotentialen, die negativer als das Umkehrpotential der jeweiligen Ionen sind, weniger Widerstand entgegensetzt als bei Potentialen, die positiver sind als das Umkehrpotential. Dementsprechend umgekehrt verhalten sich Auswärtsgleichrichter (Abbildung 5).



**Abbildung 5** Strom-Spannungsbeziehung verschiedener Kaliumkanäle bei gleicher intra- bzw. extrazellulärer Kaliumkonzentration, um die Eigenschaft der Gleichrichtung zu verdeutlichen. Der Ionenstrom (Ordinate) ist gegen das Membranpotential (Abszisse) aufgetragen. Der Ionenstrom durch die Membran beträgt beim Umkehrpotential 0 A. Der Strom fließt bei Potentialen, welche negativer als das Umkehrpotential sind, nach innen und bei positiveren nach außen. Ein Ohm'scher Strom verändert sich linear in Abhängigkeit vom Membranpotential, da der Widerstand des Kanals spannungsunabhängig ist. Kanäle mit einwärtsgleichrichtenden Eigenschaften leiten bei Potentialen, die negativer als das Umkehrpotential sind, besser als bei positiveren. Entsprechend umgekehrt verhalten sich Auswärtsgleichrichter.

### 1.2.2.2 Der molekulare Aufbau einwärtsgerichtender Kaliumkanäle

Der Unterschied zu den spannungsgesteuerten Kanälen besteht darin, daß die  $\alpha$ -Untereinheit dieser Kanäle lediglich zwei transmembranäre Domänen besitzt (M1, M2, siehe Abbildung 6). Dazwischen befindet sich, homolog zu der S5-P-S6-Poren-Sektion der *Shaker*-Kanäle, die P-Region.<sup>56</sup> Auch die Aminosäuresequenzen, welche für die Kalium-Selektivität verantwortlich sind, ähneln sich. Jedoch fehlt diesen - nach der KirX.Y Nomenklatur eingeteilten Kanalklasse (Kalium, inward rectifier) - der Spannungssensor und damit die für die KvX.Y-Kanäle so typischen spannungsabhängigen Aktivierungs- beziehungsweise Inaktivierungs-Kinetiken. Auch hier sind zur Bildung eines funktionsfähigen Kanals wieder vier  $\alpha$ -Untereinheiten notwendig.



**Abbildung 6:** Aufbau einer Untereinheit eines einwärtsgerichtenden Kanals. Vier dieser Untereinheiten bilden einen Kanal. Die Untereinheiten besitzen jeweils nur zwei transmembranäre Domänen.

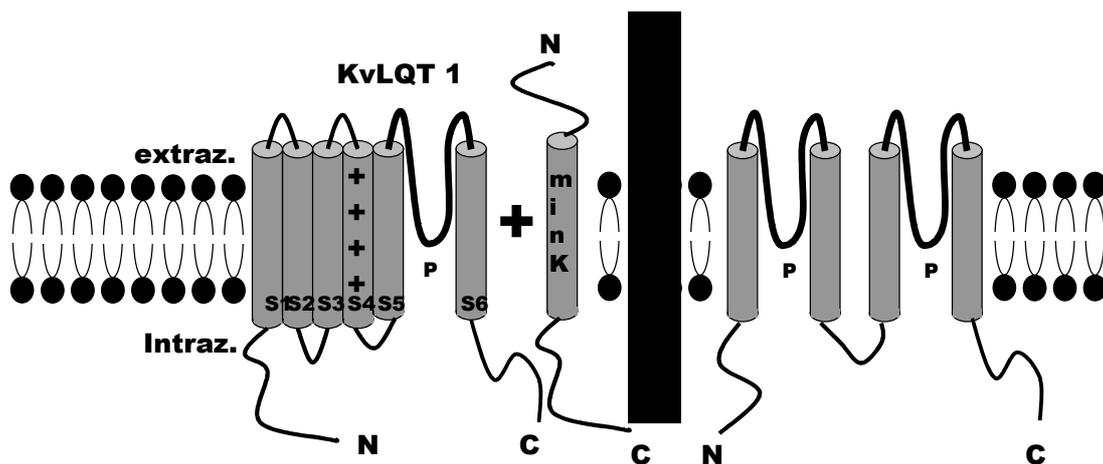
Durch einwärtsgerichtende Kaliumkanäle wird das Ruhemembranpotential der Herzmuskelzelle stabilisiert; damit sind sie maßgeblich für die generelle Erregbarkeit des Herzmuskels von Bedeutung. Die Kanäle wirken aber auch mit ihrer Auswärtskomponente bei der terminalen Repolarisationsphase mit. Während spannungsabhängige Kaliumkanäle nur in einem definierten

Spannungsbereich geöffnet sind, leiten einwärtsgerichtete Ionenkanäle bei allen physiologischen Membranpotentialen. Die Leitfähigkeit ist bei sehr negativen Potentialen aber größer (Kapitel 1.2.2.1).<sup>51</sup>

### 1.2.3 Die anderen Kaliumkanäle

Neben diesen beiden Klassen gibt es noch andere Kaliumkanäle, die sich in der Anzahl der transmembranären Segmente (zum Beispiel TWIK<sup>68</sup>) oder Poren (zum Beispiel TOK1<sup>63</sup>) unterscheiden (Abbildung 7 rechts).

Eine Besonderheit weist das sogenannte  $I_{SK}$ - oder minK-Protein auf. Hierbei handelt es sich um ein Protein, das die Zellmembran nur einmal durchquert und nur durch Zusammenschluß mit Proteinen, welche wiederum sechs transmembranäre Domänen besitzen, zum Beispiel dem KvLQT1-Protein, einen funktionsfähigen Kanal bilden kann (Abbildung 7 links).



**Abbildung 7:** Das minK ( $I_{SK}$ )- Protein bildet nur zusammen mit einem anderen Protein (KvLQT1), das wiederum den „klassischen Aufbau“ eines spannungsgesteuerten  $K^+$ -Kanals besitzt, einen funktionsfähigen Kanal (links). Einige  $K^+$ -Kanal-Untereinheiten besitzen eine variable Anzahl an ionenselektiven Poren (hier: zwei) und transmembranären Domänen (hier: zwei). Wahrscheinlich bilden zwei dieser Untereinheiten einen Kaliumkanal wie TOK1 oder TWIK1 (rechts).

## 1.2.4 Die kardialen Kaliumkanäle im Einzelnen

Die Zahl an verschiedenen Proteinen, die Kalium-Ionenkanäle darstellen, ist vielfältig.<sup>92</sup> Es ist sogar so, daß ein und derselbe Strom bei verschiedenen Spezies durch unterschiedliche Kanalproteine erzeugt wird.<sup>92</sup> Wenn im folgenden molekulare Grundlagen für einen Strom angegeben werden, so handelt es sich immer um die für den Menschen.

### 1.2.4.1 Der transiente Auswärtstrom $I_{to}$

$I_{to}$  besteht aus zwei Komponenten.<sup>61,62,23</sup>  $I_{to,1}$  ist ein Kaliumkanal,  $I_{to,2}$  ein Chloridkanal.<sup>61,62,143</sup> Der durch Calciumionen aktivierte  $I_{to,1}$  wiederum besteht mindestens aus zwei verschiedenen Kanälen,  $I_{to,fast}$  und  $I_{to,slow}$ <sup>92</sup>, die regionale Verteilung dieser Kanäle im Herzen ist unterschiedlich.<sup>14,137,132,140</sup>

$I_{to,fast}$  konnte beim Menschen sowohl im Atrium<sup>116,33</sup> als auch im Ventrikel<sup>65,89</sup> nachgewiesen werden. Sowohl die Aktivierung als auch die Reaktivierung nach Inaktivierung dieses Kanals geht sehr schnell von statten.<sup>92</sup>

Die molekulare Grundlage von  $I_{to,fast}$  beim Menschen scheint Kv4.3 zu sein.<sup>31</sup> Es wurden auch zwei Splice-Varianten beim Menschen identifiziert<sup>66</sup>, deren Verteilung im Myokard unterschiedlich ist.<sup>92</sup>

Im Gegensatz dazu steht der ebenfalls schnell aktivierende  $I_{to,slow}$ : Die Reaktivierung nach Inaktivierung dieses Stroms ist verglichen mit  $I_{to,fast}$  langsam.<sup>132</sup> Das heterolog exprimierte Kv1.4 Protein ähnelt in seinen Eigenschaften denen von  $I_{to,slow}$ , so daß es als molekulare Grundlage in Frage kommt.<sup>128,99</sup>

$I_{to}$  spielt eine wichtige Rolle bei der Phase 1 Repolarisation (Kapitel 1.1.2) der Zelle.

#### **1.2.4.2 Die verzögerten Gleichrichter**

Bereits 1968 konnte an Herzmuskelzellen, ebenso wie bei der Nervenzelle oder dem Skelettmuskel, ein verzögerter Gleichrichtungsstrom nachgewiesen werden.<sup>95</sup>

Durch Einführung und Verbesserung der Einzelzell Patch-Clamp Methode wurde es möglich, die kardialen Gleichrichterströme sehr viel genauer zu untersuchen.<sup>46</sup> Bis dato konnten drei Komponenten mit unterschiedlichen Aktivierungszeitkonstanten im Bereich von 200 bis 2000 ms identifiziert werden.<sup>113,133</sup>

Gemeinsam ist allen drei Komponenten die - verglichen mit  $I_{to}$  - spätere Aktivierung während des Aktionspotentials; durch sie wird die späte Repolarisationsphase (Kapitel 1.1.2) verursacht.

##### **1.2.4.2.1 Die langsame Komponente $I_{Ks}$**

Die Aktivierungsgeschwindigkeit von  $I_{Ks}$  ist sehr langsam, des weiteren inaktiviert der Kanal während eines Herzzyklus praktisch nicht.<sup>92</sup>

Die molekulare Grundlage von  $I_{Ks}$  scheint KvLQT1, ein den Kv-Proteinen ähnliches Protein, im Komplex mit minK (siehe Kapitel 1.2.3) zu sein.<sup>111</sup>

##### **1.2.4.2.2 Die schnelle Komponente $I_{Kr}$**

Die schnelle Komponente  $I_{Kr}$  aktiviert und inaktiviert sehr schnell und kann durch einige Klasse III-Antiarrhythmika wie beispielsweise Dofetilide, E-4031 oder Sotalol geblockt werden.<sup>113</sup>

$I_{Kr}$  scheint durch einen Komplex von HERG<sup>112,127</sup> und MiRP<sup>1</sup> gebildet zu werden.

Der jeweilige Anteil von  $I_{Kr}$  und  $I_{Ks}$  an der Repolarisation ist abhängig von der Herzfrequenz. Während unter Ruhebedingungen die Stromamplituden ungefähr gleich groß sind, kann bei hohen Herzfrequenzen der  $I_{Ks}$ -Anteil um bis zum Zehnfachen von  $I_{Kr}$  gesteigert werden. Ursächlich hierfür ist unter anderem die langsame Deaktivierung der  $I_{Ks}$ -Kanäle, die bei hohen Frequenzen dann akkumulativ geöffnet sind.<sup>113</sup>

#### 1.2.4.2.3 Der ultraschnelle Komponente $I_{Kur}$

1993 wurde erstmals ein Strom in humanen Herzmuskelzellen beschrieben, der sehr schnell aktiviert und nahezu nicht inaktiviert.<sup>133</sup> Um die schnellere Aktivierung im Vergleich der „klassischen“ delayed-rectifier- Ströme  $I_{Ks}$  und  $I_{Kr}$ <sup>113</sup> zu betonen, wurde vorgeschlagen, diesen Strom als  $I_{Kur}$  zu bezeichnen. Kur bedeutet „Kalium, ultra rapid“.<sup>133</sup>

Der ultraschnelle Strom konnte in einer Vielzahl von Organismen nachgewiesen werden, wobei interspezifische Unterschiede sowohl in der Kinetik als auch der Ionenspezifität bestehen.<sup>90</sup>

##### 1.2.4.2.3.1 *Die biophysikalischen Eigenschaften von $I_{Kur}$*

Die biophysikalischen Eigenschaften wurden von Wang und Kollegen untersucht:<sup>133</sup>

$I_{Kur}$  aktiviert bei Menschen bei Spannungen, wie sie während der Plateauphase des Aktionspotentials (ca. 0 mV) auftreten, bei Raumtemperatur in einer Zeitspanne von 1-10 ms. Die Aktivierungsgeschwindigkeit nimmt mit steigender Temperatur noch zu. Bei Körpertemperatur ist die Aktivierung so schnell, daß sie mit heutigen Meßmethoden nicht erfaßt werden kann. Die Stromamplitude ist nicht signifikant temperaturabhängig.

Im Gegensatz zur schnellen Aktivierung steht die Inaktivierung, diese ist extrem langsam. Selbst nach einer Depolarisation der Zelle auf ein Potential von +40 mV für 50 Sekunden ist die Inaktivierung von  $I_{Kur}$  nicht vollständig.<sup>36</sup>

Desweiteren ist die Reaktivierung beim typischen Ruhemembranpotential ebenfalls langsam, was zu einer signifikanten Frequenzabhängigkeit der  $I_{Kur}$  Amplitude bei physiologischen Stimulierungsfrequenz und Depolarisationsdauer führt.<sup>36,37</sup>

#### *1.2.4.2.3.2 Die molekulare Grundlage von $I_{Kur}$*

Die mit der von  $I_{Kur}$  vergleichbare Empfindlichkeit auf 4 AP bzw. die Resistenz auf TEA von Kv1.5 spricht dafür, daß es sich bei diesem Kanalklon um die molekulare Basis des nativen  $I_{Kur}$  Stroms beim Menschen handelt.<sup>133</sup> Ferner wurden durch eine Reihe von elektrophysiologischen Untersuchungen gezeigt, daß Kv1.5 eine Vielzahl der Eigenschaften besitzt, um die von Tamkun et al.<sup>122</sup> vorgeschlagenen Kriterien zur Identifizierung der molekularen Grundlage eines Ionenkanales zu erfüllen.<sup>133,34,118,134,104,119,81,35</sup>

Neuere Untersuchungen konnten zeigen, daß die Untereinheit Kv $\beta$ 1.2 an der Bildung des Kv1.5 Stroms ebenfalls beteiligt ist.<sup>79</sup>

#### *1.2.4.2.3.3 Kv1.5 ist ein vorhofspezifischer Kanal*

Die Existenz von Kv1.5 wurde immunhistochemisch sowohl im Atrium als auch im Ventrikel nachgewiesen, die Kanaldichte ist besonders hoch im Bereich der Disci intercalares.<sup>81</sup> Wird jedoch die Kv1.5 Kanalexpression in kultivierten menschlichen Ventrikel- bzw. Vorhofzellen durch spezielle Oligodesoxynukleotide gegen Kv1.5 mRNA verhindert, so verringert sich lediglich bei Vorhofzellen die Amplitude des am Ende eines Depolarisationspulses noch vorhandenen Stroms, also genau dem Strom, der von Wang et al.<sup>133</sup> bei Vorhofzellen als  $I_{Kur}$  bezeichnet wird. Bei Ventrikelzellen bleibt die Amplitude dieser verzögerten Komponente unverändert.<sup>35</sup>

Dies spricht dafür, daß die verzögerte Komponente im Ventrikel nicht durch Kv1.5 verursacht wird, sondern durch einen anderen Kanal. Der Kv1.5 Strom ist also wahrscheinlich vorhofspezifisch, eine These die auch durch andere Arbeiten unterstützt wird.<sup>65,7</sup>

#### *1.2.4.2.3.4 Die adrenerge Modulation von Kv1.5*

Die adrenerge Modulation von Auswärtsströmen spielt eine wichtige Rolle, um den zeitlichen Ablauf der kardialen Repolarisation zu steuern. Deshalb überrascht es auch nicht, daß  $I_{Kur}$  ebenfalls durch adrenerge Signalkaskaden

gesteuert wird. So bewirkt eine Proteinkinase A (PKA)-vermittelte  $\beta$ -adrenerge Stimulation von  $I_{Kur}$  eine Erhöhung, umgekehrt eine Proteinkinase C (PKC)-vermittelte  $\alpha$ -adrenerge Stimulation eine Erniedrigung der  $I_{Kur}$ -Amplitude im humanen Vorhof.<sup>73</sup> Die adrenerge Modulation von  $I_{Kur}$  ist streng speziesspezifisch, so bewirkt beispielsweise beim Hund eine  $\alpha$ -adrenerge Stimulation ebenfalls eine Erhöhung der  $I_{Kur}$ -Stromamplitude, die molekulare Grundlage dieses Stromes ist aber Kv3.1.<sup>141</sup>

#### *1.2.4.2.3.4 Regulation der Genexpression von Kv1.5*

Einige Studien haben gezeigt, daß die Expression von kardialen Ionenkanälen nicht fix genetisch determiniert ist, sondern durch eine Reihe von Erkrankungen wie zum Beispiel Tachydysrhythmien<sup>41,129</sup>, Ischämie<sup>101</sup>, Herzhypertrophie oder -insuffizienz<sup>125</sup> verändert werden kann.

Die erste Veröffentlichung über die Änderung der Kv1.5 Kanaldichte durch chronisches Vorhofflimmern von van Wagoner et al<sup>129</sup> beschreibt eine Verringerung der Kanaldichte, neuere Arbeiten konnten jedoch zeigen, daß sich diese nicht ändert.<sup>41,13,139</sup>

Die Regulation der Genexpression von Kv1.5 wurde bisher meistens an Ventrikelzellen von Ratten untersucht:

Die Kv1.5-mRNA wird durch Glucocorticoide hochreguliert<sup>121,69</sup>, Dexamethason induziert innerhalb von Stunden die Gentranskription und Translation.<sup>120</sup>

Die Adrenalectomie verringert und die Injektion von Dexamethason erhöht nur die ventrikuläre mRNA-Expression, wohingegen im Vorhof keine Änderung zu finden ist.<sup>121</sup>

Schilddrüsen-Hormone regulieren die Kv1.5-Expression hoch, dies ist jedoch an die Notwendigkeit der Präsenz von Glucocorticoiden geknüpft.<sup>93,94</sup> IGF-1 erhöht die Proteinexpression in neonatalen Ratten-Ventrikelzellen,  $\alpha$ -adrenerge Stimulation verringert sie.<sup>42,44</sup> Faktoren, die von kardialen Fibroblasten gebildet werden, reduzieren die Kv1.5 Expression, wohingegen mechanischer Streß die Kv1.5 Kanaldichte erhöht.<sup>43</sup>

### 1.2.4.3 $I_{K1}$ , $I_{K,Ach}$

Diese Ionenkanäle tragen auch zur Phase 3 Repolarisation des Aktionspotentials (Kapitel 1.1.2) bei, weiterhin sind sie entscheidend für die Stabilisierung und Regulation des Ruhemembranpotentials (RMP).

Diesen Kanälen ist gemeinsam, daß sie, in unterschiedlich starkem Ausmaß, einwärtsgleichrichtende Eigenschaften besitzen (Kapitel 1.1.2)

Das RMP einer Zelle entsteht aus der Balance zwischen depolarisierenden Hintergrundströmen und den Einwärtsgleichrichtern.

#### 1.2.4.3.3 $I_{K1}$

$I_{K1}$  stabilisiert das RMP. Wird dieses negativer als das Umkehrpotential von  $I_{K1}$ , so fließen Kaliumionen nach intrazellulär und führen somit zu einer Positivierung des RMPs. Umgekehrt leitet der Ionenkanal Kaliumionen nach außen, wenn das RMP positiver als das Umkehrpotential des Kanals ist.

#### 1.2.4.3.4 $I_{K,Ach}$

Die Amplitude von  $I_{K,Ach}$  ist von Acetylcholin und damit vom Vagotonus abhängig. Führt die Anwesenheit von Acetylcholin zu einer Öffnung des Kanals, überwiegt der hyperpolarisierende Strom ( $I_{K1}$ ,  $I_{K,Ach}$  und  $I_{to}$ ) gegenüber den depolarisierenden Hintergrundströmen und es resultiert eine negativeres RMP. Dadurch dauert es länger, bis das Schwellenpotential für die Auslösung eines Aktionspotentials erreicht werden kann, ein Faktor, welcher mit zur negativen chrono- und dromotropen Wirkung von Acetylcholin beiträgt.

## 1.3 Vorhofflimmern

### 1.3.1 Geschichte

Die wohl erste Beschreibung von Vorhofflimmern findet sich wohl in der Schrift *Anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus* des britischen Physiologen William Harvey (1578-1657).<sup>82</sup> Jean Baptiste Senac (1693-1770) beschreibt erstmals die Klinik von Patienten mit „unregelmäßigem Puls“. In seinem Buch *Traité de la structure du coeur de son action et de ses maladies* (1749) verknüpft er diese Beobachtungen mit pathologischen Veränderungen der Mitralklappe beziehungsweise einer Erweiterung der Vorhöfe.<sup>82</sup>

Einen Zusammenhang zwischen irregulärem Puls und Vorhofflimmern bei Tierexperimenten wurde auch durch den Schotten Arthur Cushny (1866-1926) vorgeschlagen. Er verglich arterielle Puls-Kurven einer Patientin mit unregelmäßigem Puls mit denen von Hunden, die eine „fibrilläre Kontraktion des Vorhofes“ zeigten. Er schloß daraus, das die Ursache für den unregelmäßigen Puls bei der Patientin ebenfalls Vorhofflimmern ist.<sup>29</sup>

Zur selben Zeit nahm Heinrich Edwald Hering (1866-1948) an, daß für den *pulsus irregularis perpetuus* beim Menschen Extrasystolen ursächlich seien.<sup>50</sup>

Um 1890 zeichnete der Physiologe James MacKenzie (1853-1925) gleichzeitig arterielle und venöse Druckkurven von mehreren hundert Patienten mit irregulärer Herzaktion auf. Das Fehlen des atrialen Spikes im Jugularispuls und die ausgeprägte systolische Welle („ventrikuläre Form des venösen Pulses“) ließen sich gut mit Cushny's Hypothese vereinbaren.<sup>82</sup>

William Einthoven (1860-1927) registrierte 1906 erstmals ein Vorhofflimmer-EKG auf<sup>74</sup>, er brachte die EKG-Morphologie aber nicht in Zusammenhang mit dieser Herzrhythmustörung. Erst Rothberger und Winterberger bewiesen 1909 mit Hilfe des Saitengalvanometers, daß Vorhofflimmern auch beim Menschen existiert. Sie verglichen dazu Elektrokardiogramme von Hunden mit elektrisch induziertem Vorhofflimmern und Patienten mit *pulsus irregularis perpetuus* und fanden Übereinstimmungen.<sup>108</sup>

Fast gleichzeitig zu dieser Arbeit veröffentlichte Thomas Lewis (1881-1945) seine elektrokardiographischen Studien über Patienten mit einer absoluten Arrhythmie. Er zeigte in seinen Experimenten, daß der irreguläre Puls bei Patienten mit beispielsweise einer Mitralstenose durch Vorhofflimmern verursacht wird.<sup>70,71</sup>

### **1.3.2 Die Epidemiologie**

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste Herzrhythmusstörung im Erwachsenenalter mit über 650.000 Betroffenen in Deutschland. Von den über 65jährigen weisen 6 Prozent, von den über 75jährigen 8 bis 10 Prozent Vorhofflimmern auf.<sup>49</sup>

### **1.3.3 Die Kennzeichen des Vorhofflimmerns**

Kennzeichnend ist eine schnelle und unregelmäßige Aktivierung des Vorhofmyokards, die atriale Frequenz beim menschlichen VHF beträgt zwischen 400 und 600 Vorhofsschlägen in der Minute. Würden Impulse einer so hohen Frequenz auf die Kammer übergeleitet, wäre die daraus resultierende Ventrikelfrequenz zu hoch, um eine adäquate Funktion des Ventrikels zu gewährleisten. Die Folge wäre der schnelle Tod durch funktionellen Herzstillstand. Der AV-Knoten verhindert dies jedoch, er dient als „Frequenzfilter“, es kommt zu einer unregelmäßigen Überleitung („Arrhythmia absoluta“) mit deutlich langsameren Frequenzen.

### **1.3.4 Die Ätiologie**

VHF tritt meistens als Begleitsymptom anderer kardialer Erkrankungen wie der Herzinsuffizienz, der KHK, dem akuten Koronarsyndrom, der linksventrikulären Hypertrophie, dem Hochdruckherz oder den Vitien auf. Diabetes mellitus, Hyperthyreose, arterieller Hypertonus, männliches Geschlecht, Rauchen, der Gebrauch von Diuretika und hohes Alter sind einige der Risikofaktoren für das Auftreten von Vorhofflimmern.<sup>5</sup> Oftmals kommt es nach kardiochirurgischen Eingriffen zur Vorhofflimmern, allgemein kann jegliche Form der Entzündung,

der Vernarbung, der Dehnung bzw. Hypertrophie des Vorhofmyokards zu VHF führen. Auch metabolische, humorale und neuronale Faktoren, wie zum Beispiel die bereits erwähnten Erkrankungen Diabetes mellitus oder Hyperthyreose, können ursächlich für das Auftreten von VHF sein. Wesentlich seltener tritt das sogenannte ideopathische Vorhofflimmern ohne erkennbare Grunderkrankung auf. Es wurde auch ein Gen-Locus für das „familiäre VHF“ identifiziert.<sup>15</sup>

### **1.3.5 Die Symptomatik**

Der Patient bemerkt typischerweise kurze Episoden von VHF als Palpitationen, Schwindel, Präsynkopen, Angina pectoris oder Dyspnoe mit Abnahme der körperlichen Leistungsfähigkeit, es kommen aber auch asymptomatische Verläufe vor.<sup>49</sup>

### **1.3.6 Die Komplikationen**

VHF kann zur Stase des Blutes im Atrium führen, was wiederum die Blutgerinnungskaskade aktiviert und in Thromboembolien resultiert. Diese Blutgerinnsel werden meistens in den zerebralen Blutkreislauf geschwemmt und sind somit ursächlich für einen Schlaganfall; so ist VHF der wichtigste Einzelfaktor als Ursache für ischämische Insulte bei Patienten, die älter als 75 Jahre sind.<sup>91</sup> Es sind aber auch andere embolische Verschlüsse von Gefäßen, zum Beispiel Nieren-, Mesenterial- oder Herzinfarkte möglich.

Bei bereits vorbestehender Herzinsuffizienz kann das Eintreten einer VHF-Episode und der damit verbundenen asynchronen Füllung des linken Ventrikels zu einer kritischen Abnahme des Herzzeitvolumens führen.<sup>49</sup>

### 1.3.7 Formen des Vorhofflimmerns

Man unterscheidet klinisch drei Formen des Vorhofflimmerns:

- Paroxysmales Vorhofflimmern. Diese Rhythmusstörung ist selbstterminierend.
- Persistierendes Vorhofflimmern. Zur Rückführung in den Sinusrhythmus ist eine elektrische oder pharmakologische Kardioversion notwendig.
- Permanentes (chronisches) Vorhofflimmern ist eine anhaltende Rhythmusstörung, die nicht in den Sinusrhythmus überführt werden kann.

### 1.3.8 Die Pathophysiologie des Vorhofflimmerns

#### 1.3.8.1 Der elektrophysiologische Mechanismus des Vorhofflimmerns

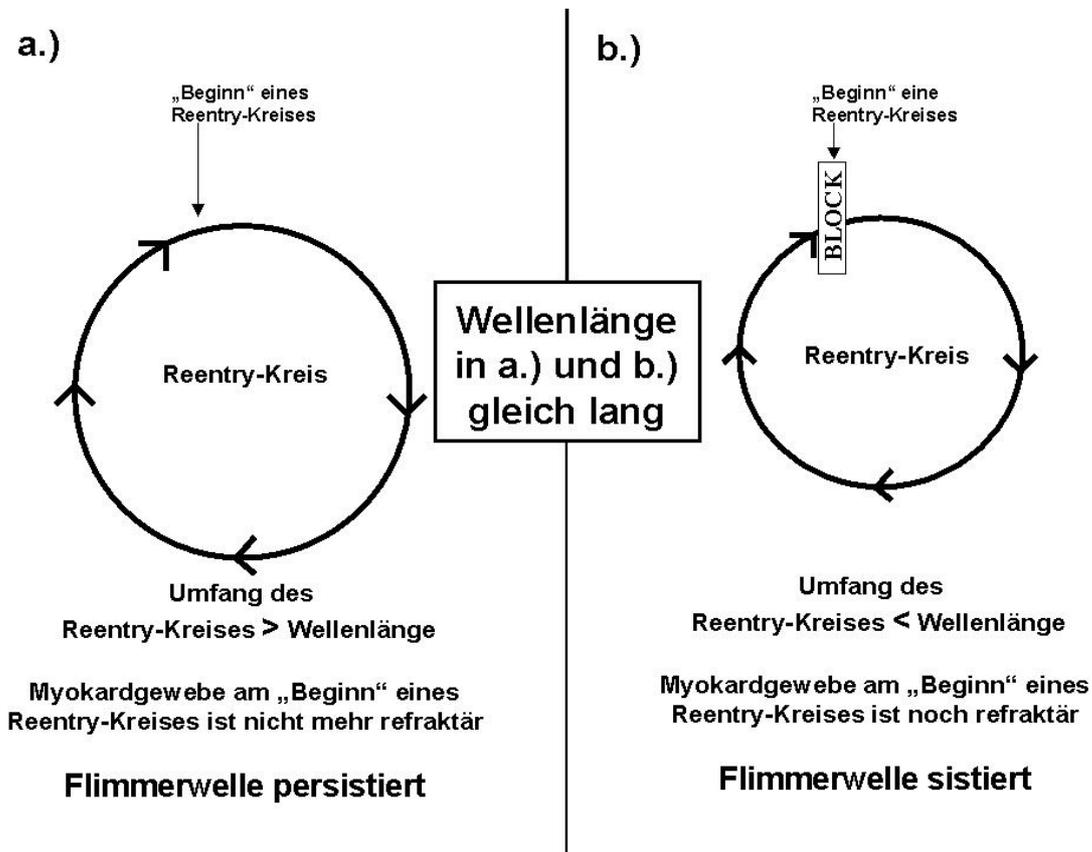
Heutzutage ist die sogenannte „Multiple Wavelet“ Theorie, die ursprünglich von Moe und Kollegen Anfang der Sechziger Jahre beschrieben<sup>85,86,87</sup> und 1985 von Allesie und Mitarbeitern bestätigt wurde<sup>6</sup>, die allgemein anerkannte Theorie für den elektrophysiologischen Mechanismus, der Vorhofflimmern unterhält.

Hierbei führen kleine lokale Differenzen der Refraktärzeit beziehungsweise der Leitungsgeschwindigkeit zu refraktären und damit leitungsblockierenden Myokardarealen, um die die Erregungsfront kreisen kann. Mehrere, in der Anzahl ständig wechselnde, zufällig auftretende und nur wenige hundert Millisekunden bestehende Flimmerwellen erregen den Vorhof. Die einzelnen Erregungsfronten können dabei auseinanderbrechen, miteinander kollidieren oder fusionieren.<sup>6</sup>

Pflanzt sich eine Erregungsfront im Vorhof fort, so hinterläßt sie immer refraktäres Myokard hinter sich. Damit sie kreisen kann, ist es notwendig, daß der Weg, den die Erregungsfront zurücklegt, so lang ist, daß die Zellen am Anfang eines Reentrykreises beim Wiedereintreffen der Front nicht mehr refraktär sind. Diese Bedingung läßt sich durch die sogenannte Wellenlänge beschreiben. Die Wellenlänge ist die Distanz, welche die Erregungsfront in ihrer eigenen Refraktärzeit zurücklegt.<sup>4</sup>

Wellenlänge = Ausbreitungsgeschwindigkeit x effektive Refraktärzeit.

Reentry-Tachykardien, die anatomische Bahnen benutzen (zum Beispiel WPW-Syndrom) bleiben bestehen, wenn die Bahnlänge größer ist als die Wellenlänge, die Erregungsfront läuft nicht in ihren eigenen „Schwanz“ von refraktärem Myokard (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Schema zur Verdeutlichung der Bedeutung der Wellenlänge für das Entstehen von kreisender Erregung.

Die Differenz zwischen Bahnlänge und Wellenlänge wird als „erregbare Lücke“ (*excitable gap*) bezeichnet. Beim sogenannten funktionellen Reentry (Reentry um leitungsblockierte Areale) ist sie jedoch sehr klein oder gar nicht vorhanden.<sup>3,4,2</sup>

Damit Vorhofflimmern in Sinusrhythmus konvertieren kann, müssen alle zu einem Zeitpunkt im Vorhof kreisenden Erregungsfronten gleichzeitig auf refraktäres Myokard treffen und damit ausgelöscht werden. Es ist

nachzuvollziehen, daß die Chance für das Eintreten dieser Situation mit steigender Zahl von Flimmerwellen sinkt. Alessie und Kollegen konnten zeigen, daß durchschnittlich sechs Reentry-Kreise (drei pro Atrium) für das Aufrechterhalten von Vorhofflimmern notwendig sind.<sup>6</sup> Wie viele Flimmerwellen nun gleichzeitig im Vorhof „Platz“ haben, ist wiederum abhängig von der Wellenlänge: Je kürzer die Wellenlänge, desto kleiner ist die minimal nötige Fläche der leitungsblockierenden Myokardareale, um die die Erregungsfront kreisen kann. Es können dann mehr Flimmerwellen im Vorhof kreisen und desto geringer ist demzufolge die Chance, daß alle Flimmerwellen gleichzeitig ausgelöscht werden.<sup>6,117,106</sup>

Daraus ergibt sich ein möglicher Therapieansatz: Substanzen, die die Wellenlänge vergrößern (Erhöhung der Leitungsgeschwindigkeit und/oder Verlängerung der Refraktärzeit), verringern die Anzahl der Flimmerwellen und vergrößern gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit, daß alle Wellen gleichzeitig auf refraktäres Myokard stoßen.

Für Substanzen wie Flecainid, DL-Sotalol und Ambrisolid konnte gezeigt werden, daß diese bei schneller Vorhofaktivierung die atriale Wellenlänge verlängern und damit antiarrhythmisch wirken.<sup>130,131,135</sup>

### **1.3.8.2 Die Initiation von Vorhofflimmern**

Unter bestimmten Bedingungen können folgende Faktoren Auslöser von akutem Vorhofflimmern sein<sup>5</sup>:

- Vegetative Stimulation sowohl sympathisch als auch parasympathisch
- Bradykardie
- Vorzeitige Erregung des Vorhofes durch ektope Foci
- Atriale Tachykardien
- Akzessorische atrioventrikuläre Bahnen
- Akute (Über-)Dehnung des Vorhofs

In der Pulmonalvenenwand wurden Ausläufer von atrialem Gewebe identifiziert, die dem Myokard im Bereich des Koronarsinus und den atrioventrikulären

Klappen ähneln. Unter normalen Bedingungen zeigt dieses Gewebe synchrone elektrische Aktivität, aber durch akute Überdehnung oder bei einer atrialen Tachykardie können sich dort verzögerte Nachdepolarisationen entwickeln.<sup>27</sup> In Experimenten konnte gezeigt werden, daß dann Impulse aus diesen einzelnen Foci ausgehen und sich im Rest des Vorhofs ausbreiten können.<sup>45</sup> Anatomische Hindernisse, Narben oder refraktäre Myokardareale führen zur Aufsplitterung der Flimmerwelle und zur Bildung neuer, multipler Flimmerwellen.<sup>21,78</sup>

Einmal ausgelöst, kann die Vorhofflimmerepisode nur von Kurzer Dauer sein. Bleiben die auslösenden Faktoren jedoch bestehen, verlängert sich diese und ab einem gewissen Punkt persistiert das VHF sogar ohne diese Trigger.<sup>138,88</sup>

Auch wird die Kardioversion und die Prävention von erneutem VHF um so schwieriger, je länger eine Episode besteht („AF begets AF“<sup>138</sup>).

Ursächlich hierfür könnte das elektrische und strukturelle „Remodeling“ sein, morphologisch gekennzeichnet durch eine Dilatation des Vorhofs und elektrisch durch eine Verkürzung und zunehmende Dispersion der atrialen effektiven Refraktärität.<sup>5</sup> Dies erleichtert das Entstehen von multiplen Reentry-Kreisen.

Die Faktoren, die letztlich das permanente, nicht in Sinusrhythmus konvertierbare Vorhofflimmern verursachen, sind noch nicht bekannt.<sup>5</sup>

### **1.3.8.3 Folgen des Vorhofflimmerns**

#### **1.3.8.3.1 Die atriale Fibrosierung**

Bei Hunden, bei denen Vorhofflimmern durch eine experimentell erzeugte atriale Volumenbelastung induziert wurde, zeigte sich eine ausgeprägte interstitielle Fibrose in Verbindung mit Makro-Reentry und Flimmerwellen.<sup>72</sup>

Eine Eigenschaft der zunehmend fibrosierten Myokardareale ist die verlangsamte elektrische Leitfähigkeit, dies wird durch sogenannte „Zick-Zack“-Bahnen, welche die Erregungswelle durch diese Gebiete durchlaufen muß, verursacht.<sup>30</sup>

#### 1.3.8.3.2 Die elektrischen Veränderungen

Kennzeichnend für Vorhofflimmern sind einerseits die Abnahme der Aktionspotentialdauer und die Senkung des Membranpotentials der Plateauphase des Aktionspotentials.<sup>47,39</sup> Dies führt dazu, daß die Anpassung an schnelle Änderungen der Herzfrequenz verringert und die Gefahr frühzeitiger Depolarisationen erhöht ist.<sup>47</sup> Desweiteren ist in einem chronisch veränderten Vorhof das Ruhemembranpotential an sich weniger negativ und damit näher am Schwellenpotential für die Auslösung eines Aktionspotentials. Ferner ist die schnelle Phase 1 Depolarisation verlangsamt.<sup>80</sup>

Die Ursache hierfür wird auf der Ebene der Ionenkanäle gesucht.

Untersuchungen beim Menschen zeigten eine Verminderung der Amplitude von  $I_{to,1}$ <sup>129,13</sup>, eventuell auch von  $I_{Kur}$  (hierzu gibt es widersprüchliche Angaben<sup>13,129,139</sup>, siehe auch Kapitel 1.2.4.2.3). Gesichert ist bei chronischem Vorhofflimmern auch eine Reduktion des L-Typ Calciumkanals<sup>12,33,84</sup>, der ja für die positive Plateauphase des Aktionspotentials verantwortlich ist. Ferner findet sich eine Erhöhung der Amplitude der Einwärtsgleichrichterströme  $I_{K1}$  und  $I_{K,Ach}$ .<sup>12</sup> Die Summe dieser Veränderungen von Ein- und Auswärtsströmen erklärt die typischen Veränderungen der Aktionspotentialmorphologie (erniedrigte Plateauphase, schnellere Repolarisation).

#### 1.3.8.3.3 weitere Folgen

Neben den elektrischen Veränderungen kommt es auch zu metabolischen und humoralen Änderungen.<sup>57,5,100</sup>

Die Zugbelastung auf Myozyten durch die atriale Volumenbelastung führt in weniger als einer halben Stunde zum Anschalten bestimmter Genprogramme, die Hypertrophie und eine veränderte Aktionspotentialdauer initiieren.<sup>83</sup>

Regional wird die Synthese von Angiotensin II erhöht, was wiederum zu einer Myozytenhypertrophie führt<sup>110</sup> Angiotensin II erhöht ferner den L-Typ  $Ca^{2+}$ -Strom ( $I_{Ca,L}$ ) und verringert den transienten Auswärtsstrom  $I_{to,1}$ , was die elektrische Dispersion des Vorhofs weiter begünstigt.<sup>60</sup>

Während Vorhofflimmern tritt im Vorhof Mangel an Energiereserven (ATP), eine metabolische Azidose<sup>57</sup> und eine Senkung des Sauerstoffpartialdruckes<sup>5</sup> ein. Die  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit des menschlichen L-Typ Calciumkanals wird durch eine klinisch relevante Senkung des Sauerstoffpartialdruckes gehemmt.<sup>5</sup> Dies wird als mögliche Erklärung von postkardiochirurgischem Vorhofflimmern angesehen, bei denen monophasische Aktionspotentiale bei diesen Patienten eine verringerte Dauer haben.<sup>100</sup> Faktoren, die also eine atriale Hypoxie und oder Ischämie provozieren und somit  $I_{Ca,L}$  hemmen, können also ein Auslöser für Vorhofflimmern sein.

Ferner ist der Redox-Zustand der Zellen altersabhängig. Deshalb könnte eine verringerte Energiereserve auch zu der Häufung des Vorhofflimmerns im Alter beitragen.<sup>5</sup>

### **1.3.9 Die Therapieprinzipien**

Das entscheidende Therapieprinzip ist die Behandlung der Grundkrankheit, die das Vorhofflimmern verursacht (Kapitel 1.3.4). Erst in zweiter Linie kommen Antiarrhythmika in Frage, die entweder zu einer Konversion in den Sinusrhythmus führen oder der Kontrolle der Ventrikelfrequenz dienen. Auch besteht die Möglichkeit einer interventionellen Therapie.

#### **1.3.9.1 Die Therapie durch Antiarrhythmika**

##### **1.3.9.1.1 Einteilung der Antiarrhythmika**

Antiarrhythmika werden klassischerweise, wie zuerst von Vaughan-Williams und Singh vorgeschlagen, nach Ihrer vorherrschenden Wirkung auf Natrium-, Calcium- und Kaliumkanäle oder  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren eingeteilt. Die neuere Silician Gambit Einteilung<sup>114</sup> berücksichtigt die Dissoziationsrate des Blockers vom Kanal bzw. die Geschwindigkeit der Erholung vom Block. Abbildung 9 vereinigt diese beiden Klassifikationen.

## ANTIARRHYTHMIC DRUG ACTIONS

Vaughn-Williams Class	DRUG	CHANNELS			RECEPTORS				Clinical Effects				ECG Changes	
		Na	Ca	K	$\alpha$	$\beta$	ACh	Ado	Pro-Arrhy	LV Fx	Heart Rate	Extra Cardiac		
I	A Quinidine Procainamide Disopyramide (Norpace)	○		●	○		○		●			○		
		○		○			○		○			○		
		○		○			○		○			○		
	B Lidocaine (Xylocaine) Mexiletine (Mexitil) C Propafenone (Rythmol) Flecainide (Tambocor)	○							○			○		
		○					○		○		↓	○		
		●							○			○		
II	$\beta$ adrenergic antagonists					●		○	↓		○			
III	Bretylium (Bretylol) Sotalol (Betapace) Amiodarone (Cordarone) Ibutilide (Corvert)			●	▲	▲		○		↓	○			
				●		●		○	↓	↓	○			
		○	○	●	○	○	○		○		↓		○	
		△		●				○					○	
IV	Verapamil (Calan, Isoptin) Diltiazem (Cardizem)		●					○		↓	○			
			○					○	↓	↓	○			
Misc	Adenosine (Adenocard)							△	○	↓	○			

Antagonist  
 Relative potency  
 ○ Low    ◐ Moderate    ● High  
 △ = Agonist  
 ▲ = Agonist/Antagonist

**Abbildung 9** : Modifizierte Sicilian Gambit Klassifikation der Antiarrhythmika<sup>114</sup>, die auch die "traditionelle" Vaughan-Williams Einteilung berücksichtigt. Die Natrium-Kanal Blocker sind, aufgrund unterschiedlicher Wirkungen auf den QRS Komplex bzw. die QT Zeit, in die Gruppen A, B und C unterteilt. Die Wirkorte (Natrium-, Kalium oder Kalziumkanal,  $\alpha$ -,  $\beta$ -adrenerger, cholinerg oder Adenosinrezeptor ) der einzelnen Pharmaka sind in der obersten Zeile angegeben. Die nächste Spalte vergleicht die klinische Wirkung der Substanzen wie Proarrhythmogenität, Effekt auf den linken Ventrikel, Herzfrequenz oder extrakardiale Wirkungen. Rechts wird die Wirkung der Pharmaka auf das Oberflächen EKG dargestellt, der jeweilige Wirkzeitpunkt ist unterstrichen. Die Wirkweise (Agonist / Antagonist) bzw. die relative antagonistische Potenz ist mit unterschiedlichen Symbolen gekennzeichnet. Die Anzahl und Richtung gibt die Wirkung und das Ausmaß der Wirkung an.

### 1.3.9.1.2 Antiarrhythmika zur Therapie des VHF

Aktuell werden zur Therapie des VHF Antiarrhythmika der Klasse Ia, Ic, II, III und IV verwendet.

Diese Substanzen führen entweder zur Konversion in den Sinusrhythmus (Klasse Ic und III) oder zu einer Kontrolle der ventrikulären Frequenz bei weiterbestehendem VHF (Klassen II-IV, auch Digitalis).

## 1.4 Probleme bei der Therapie mit Antiarrhythmika

Ein Problem bei der Therapie mit Antiarrhythmika ist, daß diese unter bestimmten Bedingungen selbst Herzrhythmusstörungen auslösen können, wie in klinischen Studien wie beispielsweise der CAST-Studie<sup>109</sup> für die Ic Medikamente Encainid oder Flecainid oder in der SWORD-Studie<sup>123</sup> für d-Sotalol (Klasse III) gezeigt werden konnte.

### 1.4.1 Torsade de pointes

Eine Verlängerung der Repolarisation durch Klasse III Antiarrhythmika kann vor allem zur Entstehung von sogenannten Torsade de pointes Arrhythmien führen, bei einer Therapie mit beispielsweise d-Sotalol (dosisabhängig mit einer Inzidenz von bis zu 3,5 %<sup>52</sup>) oder aber auch bei den neueren Substanzen Dofetilid (Diamond-CHF und DIAMOND-MI Studie) und Azimilid.<sup>17</sup> Diese Herzrhythmusstörung tritt auch bei angeborener (zum Beispiel Jervell/Lange-Nielsen Syndrom) wie auch bei erworbener<sup>59</sup> Verlängerung des QT-Intervalls auf.

Als Ursache wird zum einen das Entstehen von frühen Nachdepolarisationen, zum anderen eine gesteigerte Dispersion der Repolarisation in verschiedenen Myokardarealen angesehen.<sup>52</sup>

## **1.5 Der vorhofspezifische Klasse III antiarrhythmische Effekt durch selektive Kv1.5-Blockade**

Der funktionelle Kv1.5-Kaliumkanal scheint nur im Vorhof exprimiert zu sein (Kapitel 1.2.4.2.3.3). Dieser Kanal sollte also der optimale Angriffspunkt für ein Antiarrhythmikum zur Behandlung von Vorhofflimmern sein, seine selektive Blockade sollte spezifisch die Repolarisation im Vorhof verlängern und keine Wirkung auf den Ventrikel zeigen.

Mit Hilfe einer Computersimulation konnte gezeigt werden, daß sich theoretisch die Aktionspotentialdauer durch eine 90 %ige  $I_{Kur}$ -Blockade nur bei einer durch chronisches Vorhofflimmern „remodellierten“ Zelle verlängern sollte, bei einer Zelle mit „normaler“ Ionenkanalausstattung sollte die Aktionspotentialdauer jedoch unverändert bleiben.<sup>24,25</sup>

Die Aktionspotentialdauerverlängerung durch eine 90%ige Blockade der anderen beiden verzögerten Gleichrichter  $I_{Ks}$  und  $I_{K,r}$  ist zwar viermal größer<sup>24,25</sup>, aber diese Kanäle werden eben sowohl im Vorhof als auch im Ventrikel exprimiert.

Theoretisch scheinen Substanzen, die Kv1.5 selektiv blockieren, also geeignet, um Vorhofflimmern zu terminieren.

## **1.6 Antiarrhythmika mit Wirkung auf Kv1.5**

Eine Reihe von Antiarrhythmika weisen einen hemmenden Effekt auf den Kaliumkanal Kv1.5 auf. So blockieren beispielsweise die Calciumkanalblocker Mibefradil<sup>98</sup>, Verapamil<sup>134</sup> und Nifedipin<sup>142</sup> diesen Kanal. Auch Perhexilin vermindert die Kv1.5 Stromamplitude von humanen Vorhofzellen<sup>104</sup>, ebenso Chinidin, Ambasilid und Flecainid<sup>134</sup> oder Propafenon.<sup>38,115</sup> Jedoch weisen all diese Substanzen, zum Teil in wesentlich geringeren Konzentrationen, auch Effekte auf andere Ionenkanäle, die sowohl im Vorhof als auch im Ventrikel exprimiert werden, auf.

Das „ideale“ Antiarrhythmikum zur Behandlung von Vorhofflimmern sollte jedoch keine oder nur geringe Wirkung auf die Hauptkammer zeigen – es sollte „vorhofselektiv“ oder zumindest stark „vorhofpräferentiell“ sein - um „ventrikuläre“ Nebenwirkungen wie beispielsweise die in Kapitel 1.4.1 beschriebenen Torades de pointes zu minimieren. Die Anwendung der erwähnten unselektiven Ionenkanalblocker bringt diese Gefahr mit sich, möglichst selektive Blocker von hKv1.5 jedoch könnten diese verhindern oder zumindest verringern.

## **1.7 Die neue antiarrhythmische Substanz AVE 0118**

Ausgehend von den in Kapitel 1.5 und Kapitel 1.6 diskutierten Punkten wurde die neue antiarrhythmische Substanz AVE 0118 entwickelt. In Experimenten mit *Xenopus* Oocyten und mit CHO-Zellen konnte gezeigt werden, daß AVE 0118 ein potenter Inhibitor des heterolog exprimierten Kv1.5 Kanals ist (siehe unten, Aventis Pharma, Frankfurt, unpublizierte Daten).

Bei in vivo-Experimenten mit anästhesierten Schweinen<sup>67</sup> stellte sich heraus, daß sich die linksatriale effektive Refraktärzeit bei einer Dosis von 0.5 mg/kg um 30 Prozent verlängert, ein Effekt vergleichbar mit dem von Amiodaron (5 mg/kg). Die korrigierte QT-Zeit verlängerte sich in diesen Experimenten nach Gabe von AVE 0118 (1mg/kg) nicht signifikant, ein Zeichen dafür, daß die Substanz auf ventrikulärer Ebene nur wenig wirkungsvoll ist. Ferner konnte durch Gabe von AVE 0118 (0,5 mg/kg) die Induzierbarkeit von supraventrikulären Tachyarrhythmien (programmierte atriale Stimulation 400S2) um 100 % verringert werden. Dieser Effekt ist viel ausgeprägter als bei anderen in diesem Experiment verwendeten Substanzen (Amiodaron, Dofetilid, Azimilid). Nur Amiodaron (5mg/kg) war ähnlich effektiv (75 prozentige Reduktion).

Untersuchungen mit Ziegen zeigten, daß auch hier die atriale Refraktärzeit durch AVE 0118 verlängert wird. Die prozentuale Steigerung der Refraktärzeit war bei Ziegen mit experimentell induziertem Vorhofflimmern von 48 h Dauer signifikant größer als bei den Kontrolltieren. Die atriale Aktionspotentialdauer

bei Tieren mit persistierendem Vorhofflimmern (82 h) wurde verlängert, ohne daß sich das RR-Intervall oder die QT Zeit im Oberflächen EKG änderte.<sup>11</sup>

AVE 0118 wurde auch an CHO Zellen und an Vorhofzellen des Meerschweins untersucht<sup>40</sup>. AVE 0118 verringert den Nettoladungsfluß durch hKv1.5 in CHO Zellen mit einer IC<sub>50</sub> von 0,9 µmol/l. hKv4.3+Kchip2S (=I<sub>to,1</sub>) wurde ebenfalls blockiert (IC<sub>50</sub> von ungefähr 6 µmol/l), wobei die Inaktivierung des Kanals deutlich beschleunigt wurde.

Beim Schwein wurde durch die Blockade von I<sub>to,1</sub> ebenfalls dessen Inaktivierung beschleunigt, die IC<sub>50</sub> für Verringerung des Nettoladungsflusses durch den Kanal lag hier bei 0,7 µmol/l. Die nachhaltige („sustained“) Komponente des Stromes (Kv.1.5 bzw. ein unspezifischer Kanal) wurde bei hohen Konzentrationen von AVE 0118 (100 µmol/l) nur um 47% gehemmt. Der Acetylcholin aktivierte Kaliumstrom wird mit einer IC<sub>50</sub> von 4,1 µmol/l gehemmt. Auf I<sub>K1</sub> (atriale Zellen des Schweins), I<sub>Kr</sub>, I<sub>Ks</sub> und den L-Typ Calcium Kanal (aufgezeichnet bei ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens) zeigten sich keine Effekte von AVE 0018 auf diese Ströme.

In dieser Arbeit soll die Wirkung von AVE 0118 auf die Ionenströme I<sub>Kur</sub>, I<sub>to,1</sub> und I<sub>K1</sub> in isolierten humanen atrialen Myozyten untersucht werden.



## **2 Material und Methodik**

## 2.1 AVE 0118

Die in dieser Arbeit verwendete neue antiarrhythmische Substanz AVE 0118 wurde freundlicherweise von Aventis Pharma Frankfurt zur Verfügung gestellt. Das Molekulargewicht von des Biphenyls AVE 0118 beträgt 479,6 g/mol (Abbildung 10).

Zum Zeitpunkt der Drucklegung dieser Arbeit ist es leider aus patentrechtlichen Gründen nicht möglich, die Strukturformel von AVE 0118 hier zu veröffentlichen.

Abbildung 10 : Die chemische Struktur von AVE 0118.

Das Lösungsmittel für AVE 0118 zur Produktion von Stammlösungen besteht je zur Hälfte (Volumen/Volumen) aus DMSO und 99% Ethanol.

Zur Herstellung einer 10 mmol/l Stammlösung wurden 4,796 mg der Substanz in 1 ml Lösungsmittel gelöst, niedrigere Konzentrationen wurden durch Herstellung einer Verdünnungsreihe gewonnen. Für die Herstellung der 30 mmol/l bzw. 100 mmol/l Stammlösung wurden direkt 14,388 mg bzw. 47,960 mg eingewogen und im Lösungsmittel gelöst,

Je 50 µl der Stammlösung in der zu untersuchenden Konzentration wurden kurz vor den Versuchen in 50 ml Tyrode (Kapitel 2.2.2, Tabelle 2e) gelöst.

## **2.2 Zellgewinnung**

Die Zellen wurden aus Gewebeproben (rechtes Herzohr) gewonnen, die während Herzoperationen mit extrakorporaler Zirkulation (ACVB, Mitralklappenersatz) anfielen. Alle Patienten haben im Rahmen der Operationsaufklärung zugestimmt, das eventuell während der Operation anfallende Gewebeproben für wissenschaftliche Zwecke verwendet werden dürfen. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen lag vor.

### **2.2.1 Patientencharakteristika**

Für die Untersuchungen wurden Proben von insgesamt 27 Patienten verwendet. Davon waren lediglich vier Personen weiblich. Zum Zeitpunkt der Operation waren die Patienten im Mittel  $67,7 \pm 8,7$  Jahre alt.

Tabelle 1 (Seite 36) zeigt ferner eine Übersicht der von den Patienten eingenommenen Medikamente.

### **2.2.2 Verwendete Lösungen und Substanzen**

Tabelle 2 (Seite 37) zeigt eine Übersicht der bei der Zellisolation und bei den Patch-Clamp Experimenten verwendeten Substanzen.

	KHK	Klappenvitium
kardiale Grunderkrankung	25	2
	männlich	weiblich
Geschlecht	23	4
	absolut	Prozent
β-Blocker	18	67%
Calciumkanalblocker (Non-Dihydropyridin)	7	26%
Calciumkanalblocker (Dihydropyridin)	3	11%
ACE Hemmer	19	70%
AT1-Rezeptor-Blocker	2	7%
Digitalis	1	4%
Antianginosum	16	59%
Diuretikum	9	33%
HMG-CoA Reduktase Inhibitor	13	48%
Gerinnungshemmer	21	78%
Psychopharmakon	4	15%
Magenprotektivum	11	41%
Urikostatikum	4	15%
Schilddrüsenhormon	2	7%

**Tabelle 1** : Die Charakteristika der Patienten, aus deren Herzohr Myozyten isoliert wurden.

a.)

<i>KB Lösung</i>	
Substanz	c [mmol/l]
KCl	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10
Glucose	25
Mannitol	40
Albumin	0,10%
L-Glutaminsäure	70
β-Hydroxy-Buttersäure	10
Taurin	20
EGTA	10
pH	7,35
titriert mit	KOH

b.)

<i>Kardioplege Lösung</i>	
Substanz	c [mmol/l]
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50
MgSO <sub>4</sub>	8
HEPES	10
Adenosin	5
Glucose	140
Mannitol	100
Taurin	10
pH	7,35
titriert mit	KOH

c.)

<i>EIM / EGTA Lösung</i>	
Substanz	c [mmol/l]
NaCl	137
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5
MgSO <sub>4</sub>	1
Glucose	10
Hepes	5
Taurin	10
EGTA (nur in EGTA Lösung)	0,1
pH	7,35
titriert mit	NaOH

d.)

<i>Pipetten Lösung</i>	
Substanz	c [mmol/l]
GTP (Lithium Salz)	0,1
DL-Aspartat (Kalium Salz)	110
KCl	20
MgCl <sub>2</sub>	1
Mg <sup>2+</sup> -ATP	5
HEPES	10
EGTA	5
Phosphokreatinin	5
pH	7,35
titriert mit	KOH

e.)

<i>Tyrode</i>	
Substanz	c [mmol/l]
NaCl	126
KCl	5,4
MgCl <sub>2</sub>	0,8
CaCl <sub>2</sub>	1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,33
Hepes	10
Glucose	5,5
pH	7,35
titriert mit	NaOH

f.)

<i>Ionenkanalblocker in Tyrode</i>	
Substanz	c [mmol/l]
<b>I<sub>Kur</sub> Aufzeichnung</b>	
CdCl <sub>2</sub> (I <sub>Ca,L</sub> )	0,2
BaCl <sub>2</sub> (I <sub>K1</sub> )	1
Atropin (I <sub>K,Ach</sub> )	0,001
TEA (I <sub>K</sub> )	1
<b>I<sub>to,1</sub>/I<sub>K1</sub> Aufzeichnung</b>	
Nisoldipin (I <sub>Ca,L</sub> )	0,001
Dofetilide (I <sub>K,r</sub> )	0,001

**Tabelle 2:** Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Lösungen. (c= Konzentration)

Tabelle 2a: Die KB („Kraftbühne“)-Lösung wurde für die Aufbewahrung der Zellen nach dem Verdauungsvorgang verwendet.

Tabelle 2b: Die kardioplege Lösung wurde für den Transport des Herzgewebes aus dem OP in das elektrophysiologische Labor benötigt.

Tabelle 2c: In der EIM Lösung wurden die Verdauungsenzyme Kollagenase und Protease gelöst. Die EGTA-Lösung gleicht von der Zusammensetzung der EIM Lösung, zusätzlich wurde hier jedoch noch 0,1 mmol/l des Komplexbildners EGTA zugegeben. Diese Lösung wurde zum Waschen des Herzohres vor dem Verdauungsvorgang verwendet.

Tabelle 2d: zeigt die Zusammensetzung der in diesen Versuchen verwendeten Pipettenlösung.

Die obigen Substanzen wurden in größeren Menge hergestellt, aliquotiert, in den jeweiligen Portionen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und bei Bedarf aufgetaut.

Tabelle 2e: Die Tyrodelösung wurde während der Versuche kontinuierlich in das Zellbad eingewaschen. Sie wurde am jeweiligen Versuchstag aus einer zehnfach konzentrierteren Stammlösung durch Verdünnung mit zweifach destilliertem Wasser gewonnen.

Tabelle 2f: Zur Blockade von Ionenströmen, die mit dem jeweils zu messenden Strom interferieren könnten, wurden verschiedene Substanzen verwendet. Während der Aufzeichnung von  $I_{\text{sus}}/I_{\text{Kur}}$  wurde  $I_{\text{Ca,L}}$  mit  $\text{CdCl}_2$ ,  $I_{\text{K1}}$  mit  $\text{BaCl}_2$ ,  $I_{\text{K1}}$  mit TEA und  $I_{\text{K,Ach}}$  mit Atropin blockiert. Wang und Kollegen haben gezeigt, daß diese Interventionen keinen Einfluß auf die  $I_{\text{Kur}}$  Messung haben.<sup>133,134,135</sup> Bei den Experimenten, bei denen  $I_{\text{to,1}}$  beziehungsweise  $I_{\text{K1}}$  der zu messende Strom war, wurde Nisoldipin zur Blockade des L-Typ Calciumkanals und Dofetilide zur Blockade von  $I_{\text{Kr}}$  verwendet.<sup>13</sup>

## **2.2.3 Materialgewinnung**

### **2.2.3.1 Operationsaal und Transport in das Labor**

Nach der Abtrennung des Gewebstückes vom rechten Herzohres durch den Operateur wurde dieses sofort für den Transport ins Labor in eine kardioplege Lösung (Kapitel 2.2.2, Tabelle 2b) gegeben.

Die Dauer des Transportes der Gewebeprobe vom Operationssaal zum Labor dauerte durchschnittlich circa 7 Minuten. Im Labor angekommen, wurden die Zellen bis zur Isolation ca. 2 Minuten mit 100 % Sauerstoff begast.

In dieser Zeit wurden die Isolationslösungen hergestellt.

### **2.2.3.2 Herstellung der Verdauungslösungen**

In 30 ml EIM-Lösung (siehe Kapitel 2.2.2, Tabelle 2c) wurden 30 µg Albumin gelöst. Zur Verdauung des Gewebes wurden dann ca. 15 µg Kollagenase Typ 5 (Sigma C9269) hinzugegeben (Verdauungslösung 2). Von dieser Lösung wurden dann 5 ml entnommen, in der dann nochmals ca. 5 µg Kollagenase und ca. 5 µg Protease (Sigma) gelöst wurden (Verdauungslösung 1).

### **2.2.3.3 Gewebeprobenaufbereitung**

Das Gewebestück wurde von Fett- und Perikardresten gesäubert. Ferner wurden einige Inzisionen in die Probe geschnitten, damit die Oberfläche des Herzohres möglichst groß ist und die Kollagenase bzw. die Protease das Gewebe besser angreifen kann.

Kurz vor dem Beginn der enzymatischen Verdauung wurde das bearbeitete Gewebestück noch in einer EGTA-Lösung (Kapitel 2.2.2, Tabelle 2c) gewaschen und von Calcium befreit.

### **2.2.3.4 Verdauungsschritt 1**

Zunächst wurde die Probe für 30 Minuten in die Verdauungslösung 1 gegeben. Das Behältnis wurde ständig in einem Wasserbad (37°C) bewegt.

Nach 30 Minuten wurde die Verdauungslösung 1 abgegossen und unter dem Mikroskop beurteilt. In der Regel fanden sich in dieser nur Gewebsdetritus, Fettreste und Erythrozyten, so daß sie verworfen wurde.

#### **2.2.3.5 Verdauungsschritt 2**

Sofort wurde das Herzohr in 5 ml Verdauungslösung 2 und wieder zurück in das Wasserbad gegeben. Nach ca. 15 Minuten wurde erstmals ein Tropfen der Verdauungslösung entnommen und auf potentiell vorhandene vitale Myozyten unter dem Mikroskop untersucht.

Als Kriterien für vitale Myozyten galten: rechteckig, nicht granuliert und gut sichtbare Querstreifung.

Waren in dem entnommenen Tropfen Myozyten, die den obigen Kriterien entsprachen, so wurde die gesamte Zellsuspension abgegossen. In das Behältnis mit der Gewebeprobe wurden wieder 5 ml neue Verdauungslösung 2 gegeben und in dieses Bad zurückgestellt.

#### **2.2.3.6 Stoppen der enzymatischen Verdauung**

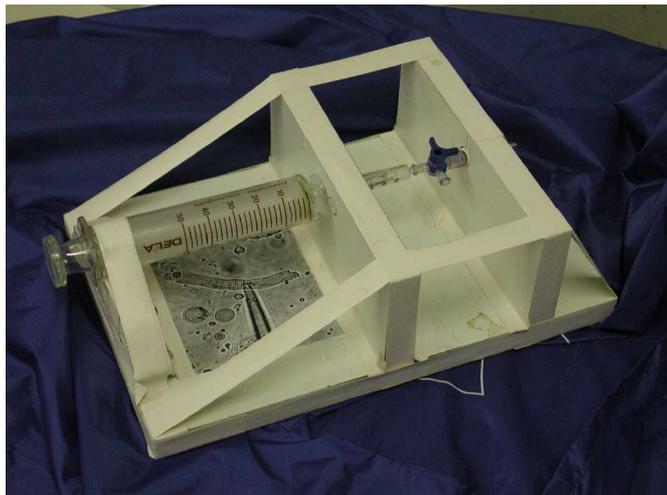
Zur gewonnenen Zellsuspension wurden dann 5 ml KB-Lösung (Kapitel 2.2.2, Tabelle 2a) gegeben, um die Aktivität der Kollagenase durch Verdünnung zu mindern. Die Zelllösung wurde dann unmittelbar darauf in den Kühlschrank (+4°C) gestellt. Diese Maßnahme verringert zum einen die Aktivität des Verdauungsenzyms weiter, zum anderen „überlebten“ die Zellen länger, wenn sie erst unmittelbar vor den Versuchen auf Raumtemperatur gebracht wurden. Der Verdauungsvorgang konnte auf diese Weise jedoch nur deutlich verlangsamt, nicht aber angehalten werden. Dies hatte zur Folge, daß die isolierten Zellen nur circa sechs bis sieben Stunden verwendet werden konnten, danach waren sie „überverdaut“ und starben ab.

### **2.2.3.7 Weiteres Vorgehen**

Der Verdauungsschritt 2 (Kapitel 2.2.3.5) wurde dann circa alle 5 Minuten wiederholt, um mehrere Zellisolate zu gewinnen. In der Regel waren die Zellen nach 25 Minuten Verdauung in Lösung 2 am besten verwendbar.

## **2.3 Aufzeichnung der Ionenströme**

Zu Beginn des Versuches wurden einige Tropfen der Zellsuspension in das Bad der Patch-Clamp-Apparatur gegeben. Dann wurde dieses mit Tyrode (ohne Blocksubstanzen, Kapitel 2.2.2) gefüllt. Damit die Zellen absinken konnten und am Boden des Bades adhärirten, wurde danach einige Minuten gewartet.



**Abbildung 11:** Glasspritze für die Patch-Clamp Experimente.

Eine Mikropipette wurde in die Patch-Clamp-Apparatur eingespannt und mit Hilfe einer Glasspritze (Abbildung 11) in ihr ein leichter Überdruck erzeugt, damit nach Eintauchen in die Badlösung keine Zelltrümmer in sie gesaugt werden.

Daraufhin wurde eine geeignete Zelle ausgewählt (Kriterien siehe Kapitel 2.2.3.5) und die Pipettenspitze mit Hilfe des Mikromanipulators dieser angenähert. Unmittelbar vor dem Aufsetzen der Pipette auf die Zelle wurde am Verstärker das Nullpotential eingestellt. Wenn zwischen offener Pipette und

Erdelektrode kein Strom fließt, so wurde dies als besagtes Nullpotential definiert.<sup>96</sup>

Die Pipette wurde dann vorsichtig auf die Zelle aufgesetzt. Der Überdruck in der Pipette wurde im folgenden abgelassen, was meistens dazu führte, daß sich ein Gigaseal ausbildete. Sollte dies nicht geschehen sein, wurde noch vorsichtigst mit Hilfe der Glasspritze ein kleiner Unterdruck in der Pipette angelegt, bis sich der Gigaseal ausbildete.

Da durch das Aufsetzen der Pipette die Membran etwas instabil wird, wurde nach dem Aufsetzen wiederum einige Minuten gewartet, damit sie sich vom pipettenbedingten Scherstress „erholen“ konnte.

Die kapazitiven Artefakte von Pipette, Pipettenhalter und Zellmembran wurden nun mit Hilfe des Verstärkers kompensiert.

Durch vorsichtiges Ziehen an der Glasspitze wurde schließlich versucht, die Zellmembran zu rupturieren, ohne den bestehenden Gigaseal wieder zu öffnen. Die Zerstörung des Gigaseals führte dazu, daß der Versuch an dieser Zelle beendet werden mußte.

Die Rupturierung von humanen Vorhofzellen erwies sich als sehr schwierig, weil diese Zellen sehr empfindlich waren. Bei nur etwa 1% der „gesealten“ Zellen gelang dies ohne einer Zerstörung des Gigaseals.

Nach erfolgreicher Rupturierung der Zellmembran wurde einige Minuten gewartet, damit sich die Membran wieder stabilisieren konnte.

Während dieser Zeit wurde mit langsamem Fluß Tyrode, die die Ionenkanalblocker für die nicht zu messenden Ströme enthält (Kapitel 2.2.2, Tabelle 2f), eingewaschen.

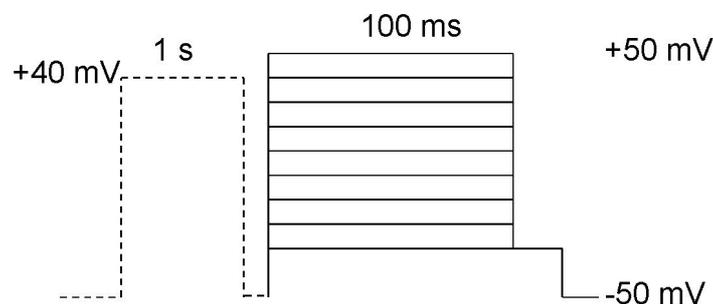
Mit Hilfe des Verstärkers wurden der Serienwiderstand und die Membrankapazität der Zelle optimiert (siehe auch Kapitel 2.4).

Nach der Aufzeichnung der Kontrollströme wurde AVE 0118 mindestens 5 Minuten eingewaschen, bevor die Hemmströme aufgezeichnet wurden. Die Lösungsmittelkonzentration (DMSO/Ethanol) im Bad betrug bei allen Experimenten 0,1 Vol%. Wenn sich zwei hintereinander aufgezeichnete Ströme bis auf die methodisch bedingte Schwankung der Stromstärke nicht mehr unterschieden, wurde ein *steady state* des Blockes angenommen. Der letzte

aufgezeichnete Strom wurde für die Auswertung verwendet. Danach wurde AVE 0118 ausgewaschen und es wurden nach ungefähr 10 Minuten wieder die Ströme aufgezeichnet, um die Reversibilität des Blockes zu evaluieren.

### 2.3.1 Aufzeichnung von $I_{\text{sus}}/I_{\text{Kur}}$

$I_{\text{sus}}/I_{\text{Kur}}$  wurde mit einem Standardpulsprotokoll für diesen Strom aufgezeichnet.<sup>133,134,73,36,141</sup>

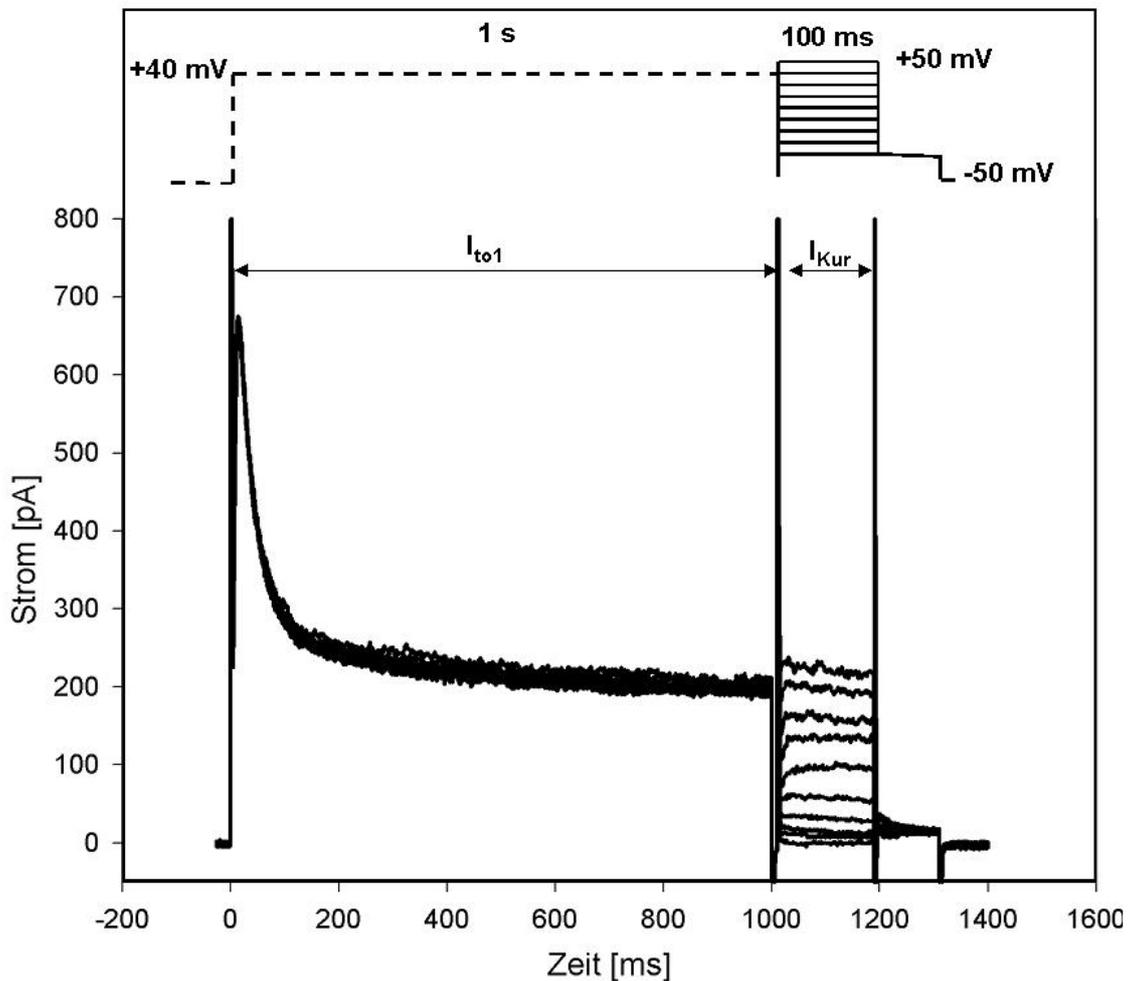


**Abbildung 12:** Pulsprotokoll zur Aufzeichnung von  $I_{\text{sus}}/I_{\text{Kur}}$ . Vom Haltepotential (-50 mV) wird die Zelle für 1 Sekunde auf +40 mV depolarisiert,  $I_{\text{to},1}$  inaktiviert dadurch vollständig.<sup>133</sup> Nachdem die Zelle für 10 ms wieder auf -50 mV geklemmt wird, werden die Testströme durch Depolarisation der Zelle auf verschiedene Potentiale zwischen -40 mV und +50 mV induziert. Abschließend wird die Zelle kurz auf -40 mV gehalten, um tail-Ströme aufzuzeichnen. Danach wird die Zelle wieder auf das Haltepotential (-50 mV) geklemmt. Die Pulsfrequenz betrug 1 Hz.

$I_{\text{K}}$  wurde mit 1 mmol/l TEA,  $I_{\text{K}1}$  mit  $\text{BaCl}_2$  (1 mmol/l),  $I_{\text{Ca,L}}$  mit 200  $\mu\text{mol/l}$   $\text{CdCl}_2$  und  $I_{\text{K,Ach}}$  mit 1  $\mu\text{mol/l}$  Atropin blockiert. Die Aufzeichnung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt (Kapitel 2.2.2).

Bei dem in Abbildung 12 dargestellten Pulsprotokoll resultieren die in Abbildung 13 gezeigten Ströme. In allen weiteren Stromgrafiken werden aus Gründen der

Übersichtlichkeit nur die  $I_{\text{sus}}/I_{\text{Kur}}$  Ströme gezeigt, auf die Darstellung des Präpulses zur Inaktivierung von  $I_{\text{to},1}$  wird verzichtet.



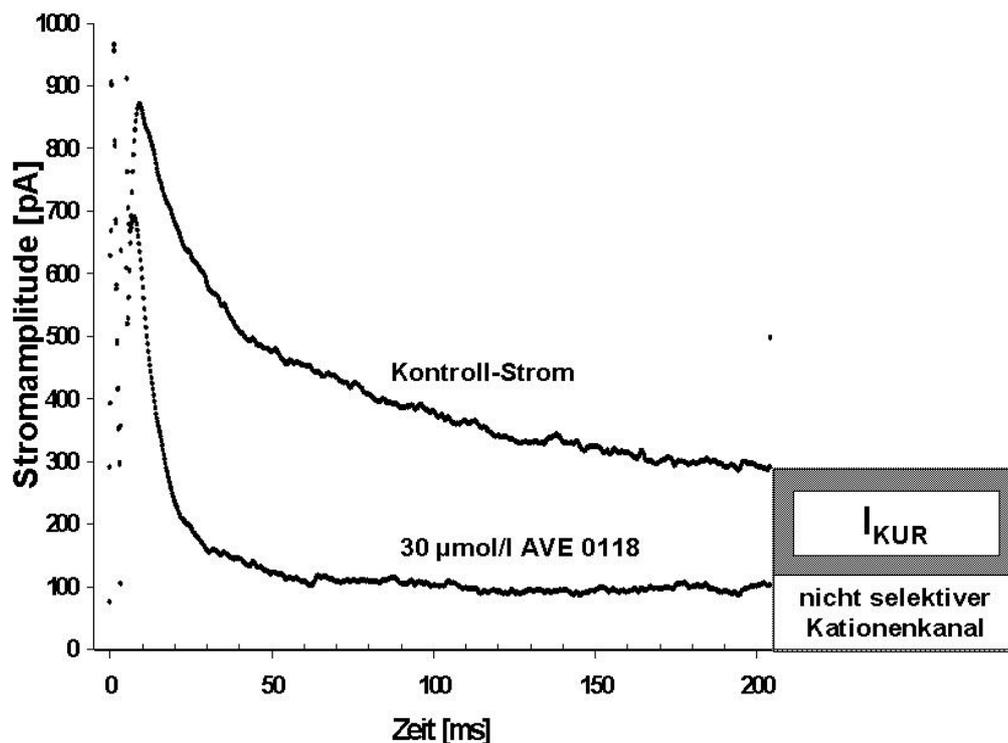
**Abbildung 13:** Originalregistrierung einer  $I_{\text{sus}}/I_{\text{Kur}}$  Aufzeichnung

### 2.3.1.1 Die Stromamplitude am Ende des Testpulses ( $I_{\text{sus}}$ ) setzt sich aus $I_{\text{Kur}}$ und einem unspezifischen Kationenkanal zusammen

In einer Arbeit von Crumb und Kollegen<sup>28</sup> wurden native humane Vorhofzellen mit 10 mmol/l 4-Aminopyridin (4-AP) perfundiert. Diese Konzentration blockt  $I_{\text{Kur}}$  vollständig.<sup>133</sup> Jedoch blieb bei diesen Experimenten am Ende des Testpulses ein steady-state Strom erhalten, dessen Amplitude ungefähr 30 % vom Kontrollstrom betrug. Nach weiteren Experimenten kamen die Autoren zum Ergebnis, daß es sich bei diesem Strom, der nach Superfusion von 10 mmol/l 4-AP bestehen bleibt, um einen nicht selektiven Kationenstrom handelt.<sup>28</sup>

Der steady-state-Strom am Ende eines Testpulses ( $I_{\text{sus}}$ ) besteht also aus (1)  $I_{\text{Kur}}$  und (2) einem unselektiven Kationenstrom (Abbildung 14).

Wenn keine weitere Reduktion von  $I_{\text{sus}}$  durch Erhöhen der Konzentration von AVE 0118 erreicht werden konnte, wurde angenommen, daß ein vollständiger Block von  $I_{\text{Kur}}$  erreicht und die übrige Stromamplitude von  $I_{\text{sus}}$  durch den nicht selektiven Kationenstrom verursacht wurde.



**Abbildung 14** Nach der Superfusion von 10 µmol/l AVE 0118 verringerte sich der Kontrollstrom um circa 70 % (nicht dargestellt). Auch eine weitere Erhöhung der Konzentration von AVE 0118 führte zu keiner weiteren Verminderung des steady-state Stromes (*hier* : 30 µmol/AVE 0118 führt ebenfalls zu einer Hemmung von ungefähr 70 %, Details siehe Kapitel 3.2.1.1). Der nach dem Einwaschen des  $I_{\text{Kur}}$ -Blockers noch vorhandene Reststrom ist ein nicht selektiver Kationenkanal.<sup>28</sup>

### **2.3.1.2 Die untersuchten Parameter**

#### **2.3.1.2.1 Konzentrationsabhängigkeit des $I_{Kur}$ -Blocks durch AVE 0118**

Zur Erstellung der Konzentration/Wirkungs-Kurve des  $I_{Kur}$  Blockes durch AVE 0118 wurde die Stromamplitude am Ende des Testpulses gemessen. Zur Erstellung einer Konzentration/Wirkungs-Kurve wurde eine Hill-Regression verwendet :

$$f(x) = \frac{a}{1 + 10^{-n \cdot (px - pK)}}$$

**Formel 0-1** : Hill Regression zur Erstellung einer Konzentrations-/Wirkungsbeziehung.

Dabei ist a die Hemmung bei der jeweiligen Konzentrationstufe, n der Hill-Koeffizient, x die Konzentrationsstufe und k der Mittelpunkt der Kurve, wobei  $px = -\log(x)$  und  $pK = EC_{50} = -\log(K)$  ist.<sup>9</sup>

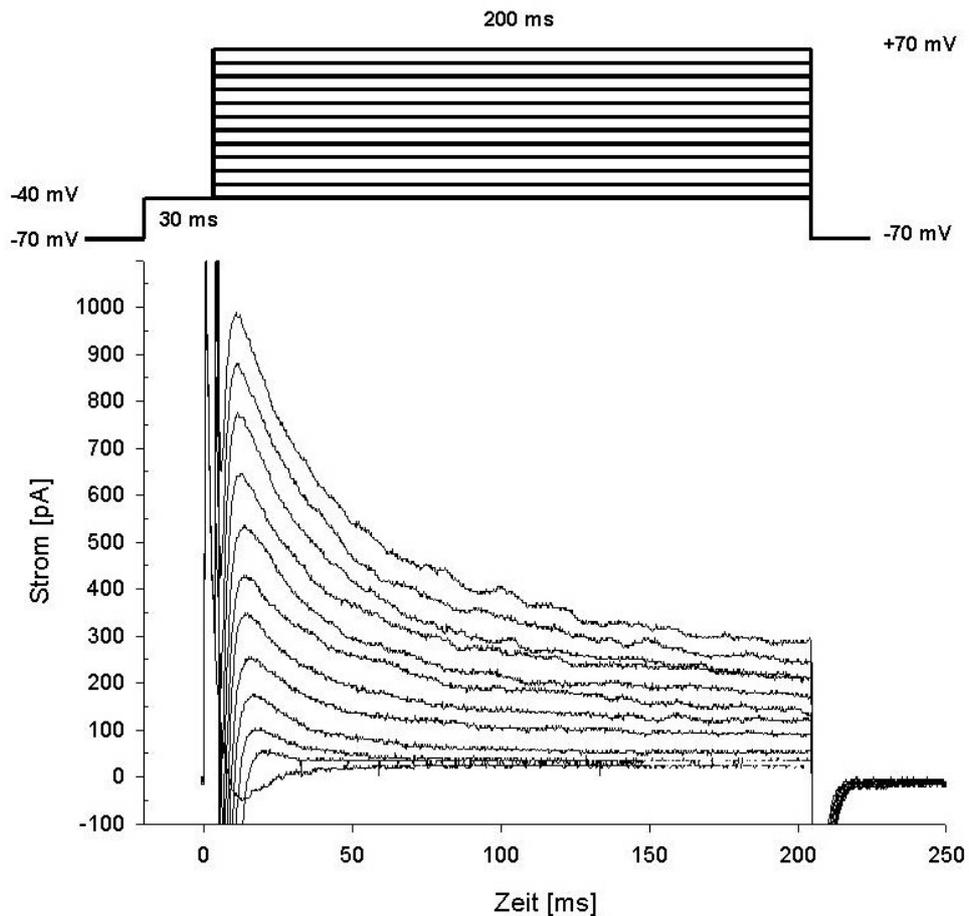
Die Signifikanz der ermittelten Meßwerte wurde mit Hilfe des gepaarten t-Testes evaluiert.

#### **2.3.1.2.2 Strom-/Spannungsbeziehung und Spannungsabhängigkeit**

Zur Evaluation der Spannungsabhängigkeit wurden die Stromamplituden von  $I_{sus}$  (Einheit pA) in Stromdichten (Einheit pA/pF) umgerechnet. Dazu wurde die jeweilige Stromamplitude durch die Zellkapazität dividiert. Die Betrachtung der Spannungsabhängigkeit von  $I_{sus}$  läßt indirekt Schlüsse auf die von  $I_{Kur}$  zu, da AVE 0118 bei den verwendeten Konzentrationen keinen Effekt auf den unspezifischen Kationenkanal hat (Nach dem Einwaschen von 10  $\mu\text{mol/l}$  und 30  $\mu\text{mol/l}$  AVE 0118 ändert sich der verbleibende Reststrom – also der unspezifische Kationenkanal- nicht. Eine Effekt von AVE 0118 auf diesen Kanal bei Konzentrationen größer als 30  $\mu\text{mol/l}$  kann aber nicht ausgeschlossen werden). Auch hier wurde die Signifikanz der Meßwerte mit dem gepaarten t-Test untersucht.

### 2.3.2 Aufzeichnung von $I_{to,1}$

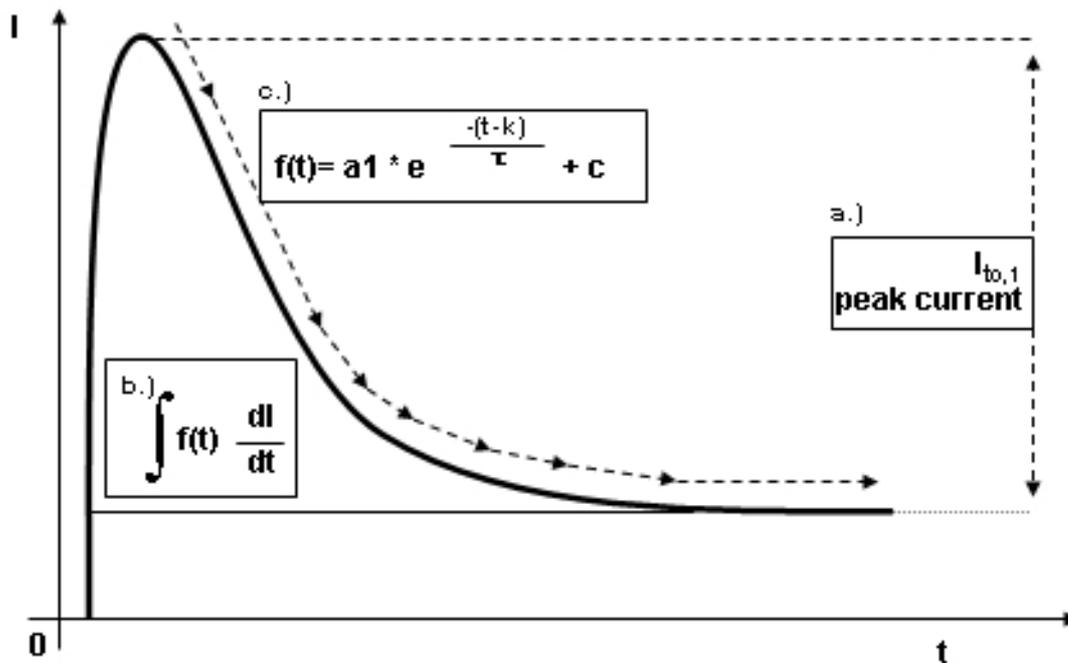
$I_{to,1}$  wurde ebenso mit einem Standardpulsprotokoll für diesen Strom aufgezeichnet.<sup>13</sup>



**Abbildung 15:** Originalaufnahme einer  $I_{to,1}$ -Aufzeichnung. Über dem Strom das Pulsprotokoll zur Aufzeichnung von  $I_{to,1}$ . Vom Haltepotential (-70 mV) wurde die Zelle für 30 ms auf -40 mV depolarisiert, um die schnellen  $\text{Na}^+$ -Kanäle zu inaktivieren. Es folgen die Testpulse, wobei die Zelle für 200 ms auf verschiedene Potentiale zwischen -40 mV und +70 mV geklemmt wurde.

### 2.3.2.1 Untersuchte Parameter

Bei der Aufzeichnung von  $I_{to,1}$  wurden die in Abbildung 16 gezeigten Meßwerte untersucht. Desweiteren wurde die zeitliche Abhängigkeit der  $I_{to,1}$  Blockade durch AVE 0118 evaluiert (ohne Abbildung).



**Abbildung 16:** Parameter, die bei der Auswertung von  $I_{to,1}$  bestimmt wurden. Der  $I_{to,1}$ -„peak current“ als Differenz von größter Amplitude und „steady-state“-Strom (a), die Ladung [C], welche während des Testpulses durch den Ionenkanal fließt ( $\int \frac{dI}{dt}$ ) (b) und die Zeitkonstante  $\tau$  als Maß für die zeitliche Inaktivierung des Kanals (c).

### 2.3.2.1.1 Bestimmung des $I_{to,1}$ „peak current“

Der  $I_{to,1}$  „peak current“ ist die Differenz zwischen der größten Amplitude und dem steady-state-Stroms am Ende des Testpulses, der ja  $I_{Kur}$  und einem unspezifischen Kationenkanal (Kapitel 2.3.1.1) entspricht. (Abbildung 16a).

### 2.3.2.1.2 Ladungsfluß durch den offenen Kanal während eines Testpulses von +50 mV

Zur Bestimmung der Ladung, die während eines Testpulses von +50 mV durch den Ionenkanal fließt (Abbildung 16b), wurde wie folgt verfahren:

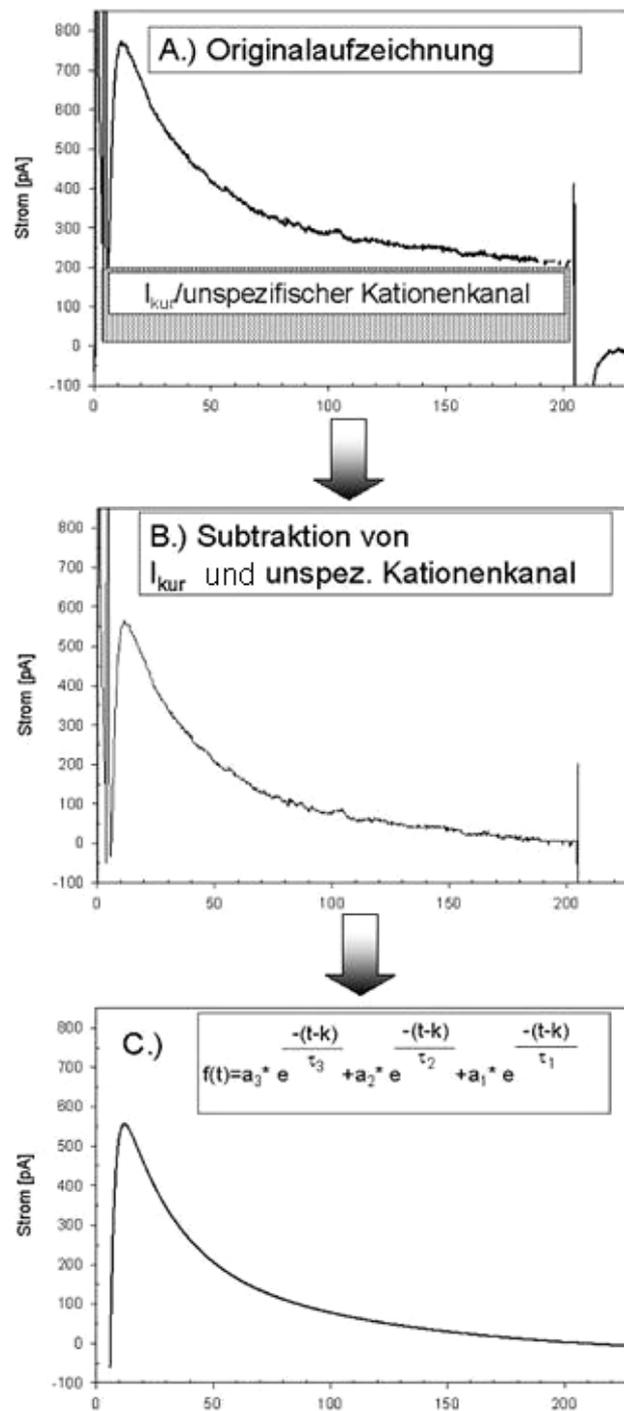
- Bestimmung der Amplitude des „steady-state“ Stroms am Ende des Testpulses ( $I_{Kur}$ , unspezifischer Kationenkanal) und Subtraktion dieses Wertes von jedem Meßpunkt. (Abbildung 17a.) und b.)
- Iteration des resultierenden, gesamten Stromverlaufes (auf- und absteigender Schenkel) mit einer Superposition von drei Exponentialfunktionen:

$$f(t) = a_1 * e^{\frac{-(t-k)}{\tau_1}} + a_2 * e^{\frac{-(t-k)}{\tau_2}} + a_3 * e^{\frac{-(t-k)}{\tau_3}}$$

**Formel 0-2:** Formel zur Iteration des Stromverlaufes von  $I_{to,1}$

- Berechnung des Integrals  $\frac{dI}{dt}$  von  $t=0$  ms bis 200 ms dieser Funktion.

Dieser Wert entspricht der Netto-Ladung, die während des Testpulses durch den  $I_{to,1}$  – Ionenkanal fließt.



**Abbildung 17** Verfahren zur Berechnung des Netto-Ladungsfluß durch  $I_{to,1}$  während eines Testpulses (+50mV). a.) Originalstrom, b.) Subtraktion von  $I_{Kur}$  bzw. unspezifischer Kationenkanal und c.) Iteration des Stromverlaufes mit Hilfe einer triexponentiellen Funktion

Zur Erstellung einer Konzentration/Wirkungsbeziehung wurde Formel 0-1 verwendet.

#### 2.3.2.1.3 Bestimmung der zeitlichen Inaktivierung von $I_{to,1}$

Zur Bestimmung der zeitlichen Inaktivierung von  $I_{to,1}$  wurde wie folgt verfahren:

- Iteration der Inaktivierung des Ionenkanals mit Hilfe einer exponentiellen Funktion erster Ordnung der Form

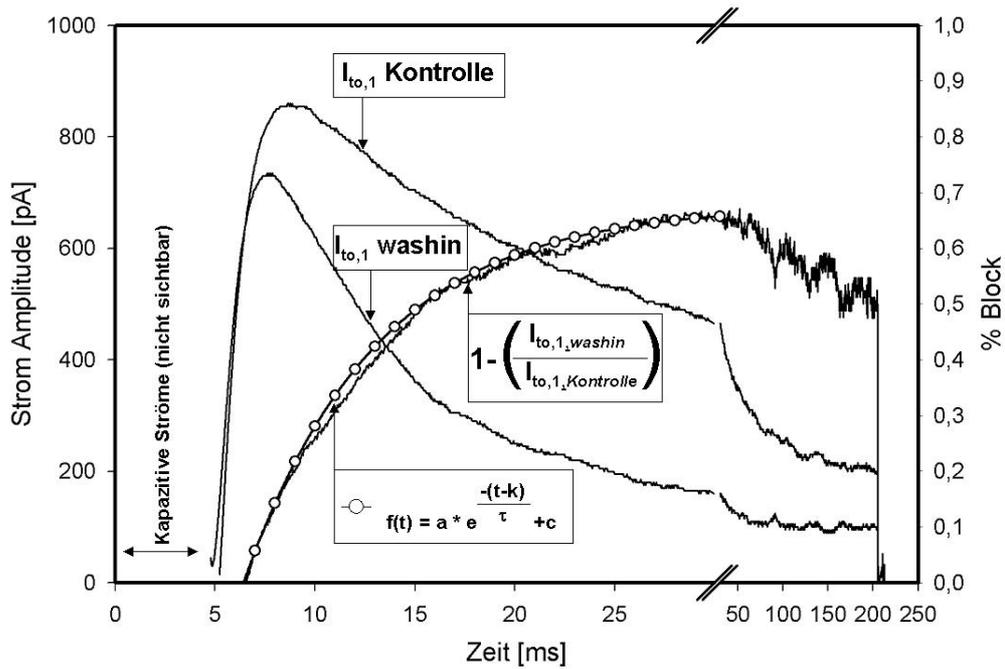
$$f(t) = a * e^{\frac{-(t-k)}{\tau}} + c$$

**Formel 0-3:** Formel zur Iteration der Inaktivierung des  $I_{to,1}$  Stroms und zur Annäherung des Einsetzens der  $I_{to,1}$  Blockade (siehe Kapitel 2.3.2.1.4).

Die Inaktivierungszeitkonstante  $\tau$  dient als Maß für die Inaktivierung des Ionenkanals (Abbildung 16c), der Parameter  $k$  dient der Korrektur, da der Stromverlauf nicht bei  $t=0$  ms beginnt.

#### 2.3.2.1.4 Zeitliche Abhängigkeit der $I_{to,1}$ Blockade

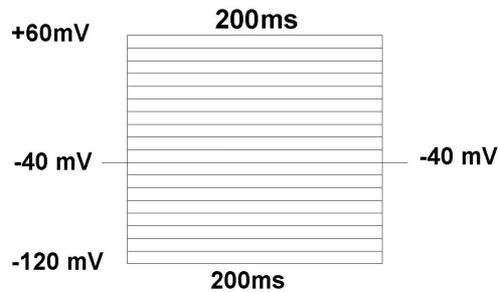
Zur Bestimmung der zeitlichen Abhängigkeit der Blockade wurden mit Hilfe des Auswertungsprogrammes (Axon Clampfit) die Stromkurve bei einem Testpotential von +50 mV nach dem Einwaschen durch die entsprechende Kontrollkurve dividiert. Dann wurde der erhaltene Wert zu jedem Zeitpunkt von 1 subtrahiert, es resultierte eine Kurve, die Zeitabhängigkeit der  $I_{to,1}$  Blockade darstellt. Diese wurde mit Hilfe einer monoexponentiellen Funktion (Formel 0-3) angenähert, die resultierende Zeitkonstante  $\tau$  dient hier als Maß für die Geschwindigkeit des Einsetzens der Blockade<sup>134</sup>, wobei jedoch auch beachtet werden muß, daß die „physiologische“ Inaktivierung des Kanals (unabhängig von AVE 0118) in diesem Modell nicht berücksichtigt wird (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Ermittlung der Zeitkonstanten  $\tau$  als Maß für die zeitliche Abhängigkeit der I<sub>to,1</sub> Blockade. Nähere Erläuterungen im Text.

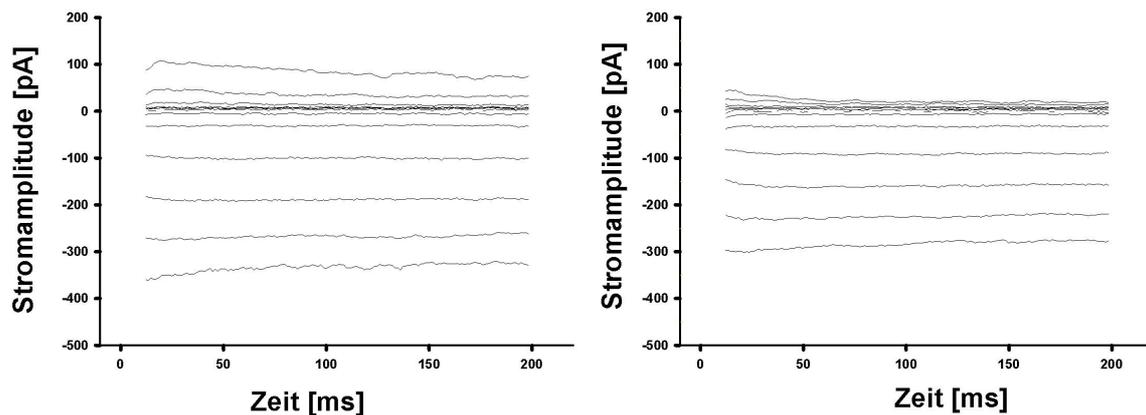
### 2.3.3 Aufzeichnung von $I_{K1}$

Für die Aufzeichnung von  $I_{K1}$  wurde das folgende Spannungsprotokoll verwendet (Abbildung 19):



**Abbildung 19:** Aufzeichnung von  $I_{K1}$ . Ausgehend von einem Haltepotential von  $-40$  mV wurde die Zelle für  $200$  ms auf verschiedene Membranpotentiale zwischen  $-120$  mV und  $+60$  mV geklemmt.

Bei den Messungen von  $I_{K1}$  wurde  $I_{Ca,L}$  mit  $1 \mu\text{mol/l}$  Nisoldipin und  $I_{Kr}$  mit  $1 \mu\text{mol/l}$  Dofetilide blockiert. Ab ca.  $-30$  mV ist mit Überlagerungen durch andere kardiale Ionenströme zu rechnen ( $I_{to,1}$ ,  $I_{sus}/I_{Kur}$ ). Deshalb wurden bei der Auswertung nur die aufgezeichneten Ströme von  $-120$  mV bis  $-30$  mV berücksichtigt. Abbildung 20 zeigt eine Originalaufzeichnung von  $I_{K1}$ .



**Abbildung 20:** Originalaufzeichnung von  $I_{K1}$ . Links vor dem Einwaschen, rechts nach dem Einwaschen von  $10 \mu\text{mol/l}$  AVE 0118. Die kapazitiven Artefakte am Beginn bzw. am Ende des Pulses wurden nachträglich entfernt.



## 2.4.1 Die Membrankapazität

Die Zellmembran kann also - wie erwähnt - als ein Kondensator mit einem dazu parallel geschalteten Widerstand aufgefaßt werden. Bevor nun ein Strom durch einen Ionenkanal fließen kann, muß der „Membrankondensator“ der Zelle zunächst aufgeladen werden. Dies bedeutet, daß der zu Beginn eines Testpulses gemessene Strom nicht durch den Ionenkanal fließt, sondern den Strom darstellt, der zur Ladung der Zellmembran notwendig ist.

Die Dauer des Aufladevorgangs ist einerseits vom „Nadelöhr“ Pipette (quantifizierbar durch den Pipettenwiderstand  $R_p$ ), durch die der Strom fließen muß, andererseits von der Größe des „Membrankondensators“ abhängig. Es ist also wichtig zu evaluieren, ob zum Zeitpunkt der Messung der Stromamplitude ( $I_{kur}/I_{sus}$ ,  $I_{t0,1}$ ,  $I_{K1}$ ) der Ladevorgang der Zellmembran weitestgehend abgeschlossen ist.

Für die Zeitabhängigkeit des Aufladestroms eines Kondensators gilt <sup>100</sup>:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-(1/\tau) \cdot t}$$

$I(t)$  ist der zum Zeitpunkt  $t$  zur Aufladung des Kondensators fließende Strom,  $I_0$  die Amplitude des Ladestroms zum Zeitpunkt 0.  $\tau$  ist ein Zeitkonstante, die abhängig von  $C_M$  und  $R_S$  ist, sie ist durch ein spezielles Protokoll während des Versuches bestimmbar. Der Strom sinkt also exponentiell mit der Zeit, er nähert sich der Amplitude 0 A an, erreicht diese jedoch nie. Für die Versuche wurde evaluiert, wann der Membrankondensator zu 99,9 % aufgeladen ist:

$$0,001 \cdot I_0 = I_0 \cdot e^{-(1/\tau) \cdot t}$$

Durch Auflösen nach  $t$  erhält man:

$$t = - \tau \cdot \ln(0,001)$$

**Formel 0-4:** Formel zur Berechnung nach welcher Zeit  $t$  nach Beginn des Testpulses der „Membrankondensator“ zu 99,9 % aufgeladen ist.

Für die Versuche ist es deshalb wichtig, möglichst kleine Zellen auszuwählen (damit die Kapazität der Zelle möglichst klein ist und daß der Serienwiderstand möglichst gering ist). Beides führt zu einer schnelleren Aufladung der

Zellmembran. Der Patch-Clamp Verstärker besitzt Kompensationsschaltungen, mit deren Hilfe der Serienwiderstand des Systems minimiert werden kann.

## 2.4.2 Der Serienwiderstand

Der Serienwiderstand führt bei der Messung von Ionenströmen dazu, daß bei Voltage-Clamp-Versuchen ein Teil der „geklemmten“ Spannung bereits vor der Zelle abfällt. Wenn laut Spannungsprotokoll ein Potential von -50 mV geklemmt werden soll, so führt der Serienwiderstand dazu, daß die Zelle beispielsweise nur auf -45 mV geklemmt wird, ein Phänomen, das in der englischen Literatur als „voltage drop“ bezeichnet wird.

Gemäß der Kirchhoff'schen Maschenregel gilt, daß in einem geschlossenen Stromkreis (Masche) die Summe aller Spannungen der enthaltenen Spannungsquellen gleich der Summe aller Spannungsabfälle an elektrischen Bauelementen unter Berücksichtigung der Vorzeichen der Spannungen ist.<sup>126</sup>

Für das Ersatzschaltbild der Patch-Clamp-Meßanordnung (Abbildung 21) gilt also:

$$U_{\text{Kommando-Potential}} = U_{\text{voltage drop}} + U_{\text{Zelle}}$$

Durch Umstellen läßt sich die bei einem Kommandopotential (Testpuls) tatsächlich an der Zelle anliegende Spannung berechnen:

$$U_{\text{Zelle}} = U_{\text{Kommando-Potential}} - U_{\text{voltage drop}}$$

$U_{\text{voltage drop}}$  läßt sich mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes berechnen:

$$U_{\text{voltage drop}} = R_S * I_{\text{Meß}}$$

**Formel 0-5:** Formel zur Berechnung des „voltage drops“, also der Spannung, die bereits an der Pipette abfällt.  $R_S$  ist der Serienwiderstand,  $I_{\text{Meß}}$  der gemessene Strom durch einen Ionenkanal.

Auch hier wird deutlich, daß der Serienwiderstand möglichst gering sein sollte, damit möglichst wenig Spannung an der Pipette abfällt.

## **2.5 Statistik**

Das Signifikanzniveau von Unterschieden zwischen Meßdaten wurde mit Hilfe des gepaarten t-Testes überprüft. Die Daten waren dabei normal verteilt. Ein Wert wurde als statistisch signifikant gesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  kleiner als 0,05 war.



## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Beurteilung der meßtechnisch bedingten Verfälschung der Ergebnisse**

Wie in Kapitel 2.4 bereits erwähnt, können einige physikalische Parameter die Meßergebnisse verfälschen.

#### **3.1.1 Serienwiderstand**

##### **3.1.1.1 $I_{Kur}/I_{sus}$**

Die Amplitude von  $I_{Kur}$  bei +30 mV vor dem Einwaschen von AVE 0118 betrug im Mittel  $98 \pm 10$  pA. Der Serienwiderstand nach bestmöglicher Kompensation betrug im Mittel  $12 \pm 2$  M $\Omega$ . Der „voltage drop“, verursacht durch den seriellen Widerstand, beträgt gemäß der Formel 0-5 (Seite 56) dann ungefähr 1 bis 1,5 mV.

##### **3.1.1.2 $I_{to,1}$**

Die Amplitude von  $I_{to,1}$  bei +50 mV vor dem Einwaschen von AVE 0118 betrug im Mittel  $676 \pm 106$  pA. Der Serienwiderstand nach bestmöglicher Kompensation betrug im Mittel  $15 \pm 2$  M $\Omega$ . Berechnet man den „voltage drop“ mit Hilfe der Formel 0-5 so erhält man einen Wert von ungefähr 10 mV. Die Bedeutung dieses Fehlers wird in Kapitel 4.1.5.1.2 diskutiert.

##### **3.1.1.3 $I_{K1}$**

Die Amplitude von  $I_{K1}$  bei –90 mV beträgt im Mittel  $-184 \pm 51$  pA (vor dem Einwaschen von AVE 0118). Der durchschnittliche Serienwiderstand bei den Zellen, die für die  $I_{K1}$  – Messung verwendet wurden, betrug  $19 \pm 4$  M $\Omega$ . Für den „voltage drop“ bei diesen Versuchen errechnet man einen Wert von ungefähr 3,5 mV.

## 3.1.2 Membrankapazität

### 3.1.2.1 $I_{kur}/I_{sus}$

Die Bestimmung der Zeitkonstante  $\tau$  des „Membrankondensators“ ergab bei den Zellen, die für die  $I_{kur}$  – Messung verwendet wurden, einen Wert von  $1,0 \pm 0,1$  ms. Mit Hilfe der Formel 0-4 kann man dann berechnen, daß nach 7,2 ms der Membrankondensator zu 99,9% aufgeladen ist.

### 3.1.2.2 $I_{to,1}$

Bei den Zellen, die für die  $I_{to,1}$  Messung verwendet wurden, betrug  $\tau$  im Durchschnitt  $1,0 \pm 0,2$  ms. Es dauert also (Formel 0-4) 7,2 ms, bis sich die Zellmembran zu 99,9% aufgeladen hat. Der Meßzeitpunkt des  $I_{to,1}$ -peak currents ist von der Aktivierungsgeschwindigkeit von  $I_{to,1}$  abhängig, also von Zelle zu Zelle unterschiedlich. Im Durchschnitt wurde der  $I_{to,1}$  peak current  $7,8 \pm 0,3$  ms nach Beginn des Testpulses gemessen.

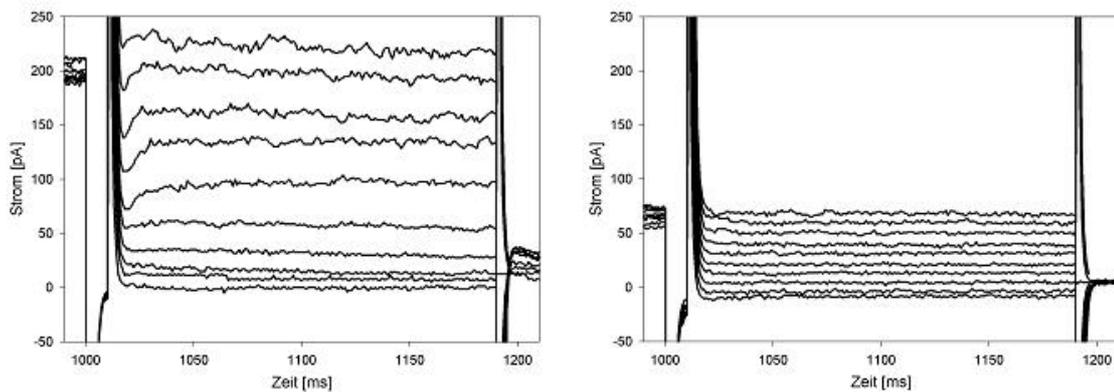
### 3.1.2.3 $I_{K1}$

$\tau$  betrug bei den Messungen von  $I_{K1}$  durchschnittlich  $1,6 \pm 0,3$  ms. Es dauert 10,9 ms, bis sich der Membrankondensator aufgeladen hat.

## 3.2 Wirkung von AVE 0118 auf atriale Ionenströme

### 3.2.1 $I_{Kur}$

#### 3.2.1.1 Konzentrationsabhängigkeit des $I_{Kur}$ -Blocks durch AVE 0118



**Abbildung 22:**  $I_{sus}$  vor (links) und nach (rechts) der Applikation von 10  $\mu\text{mol/l}$  AVE 0118. Höhere Konzentrationen führten zu keiner weiteren Hemmung von  $I_{sus}$ .

AVE 0118 hemmt  $I_{sus}$  konzentrationsabhängig ab ca. 10  $\mu\text{mol/l}$  (Tabelle 3, Tabelle 4). Die maximale Hemmung von  $I_{sus}$  (=  $I_{Kur}$  und unspezifischer Kationenkanal, siehe Kapitel 2.3.1.1), die mit AVE 0118 erreicht werden konnte, betrug circa 70% vom Kontrollstrom (Abbildung 23, Tabelle 4). Diese Reduktion wurde bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  erreicht. Weitere Konzentrationssteigerung (30  $\mu\text{mol/l}$ ) führten zu keiner weiteren Hemmung von  $I_{sus}$ .

Bei jeder Konzentration wurden 3-7 Zellen gepatcht. Es wurden insgesamt 34 Zellen untersucht.

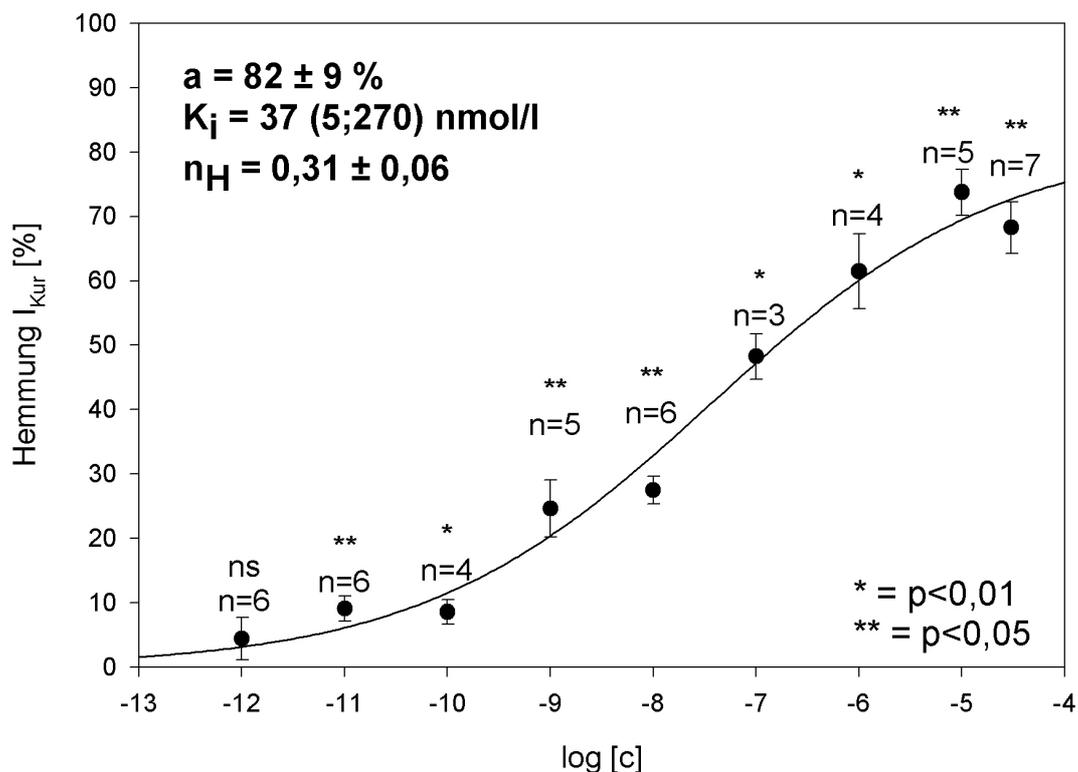
Die Konzentrations-/Wirkungsbeziehung ist in Tabelle 3 und Abbildung 23 exemplarisch bei einer Testspannung von +40 mV dargestellt.

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die Parameter zur Erstellung einer Konzentrations-/Wirkungskurve auf verschiedenen Testspannungsniveaus, die mit Hilfe von Formel 0-1 berechnet wurden,.

Die Hemmung war auf jeder Konzentrationsstufe ab 10 pmol/l statistisch signifikant.

Konzentration	n=	p =	Hemmung von $I_{\text{Sus}}$	SEM
1 pmol/l	6	ns	4 %	3 %
10 pmol/l	6	0,04	9 %	2 %
100 pmol/l	4	0,01	9 %	2 %
1 nmol/l	5	0,04	25 %	4 %
10 nmol/l	6	0,02	27 %	2 %
100 nmol/l	3	0,01	48 %	4 %
1 $\mu\text{mol/l}$	4	0,01	61 %	6 %
10 $\mu\text{mol/l}$	5	0,03	74 %	4 %
30 $\mu\text{mol/l}$	7	0,03	68 %	4 %

**Tabelle 3:** Hemmung von  $I_{\text{kur}}/I_{\text{Sus}}$  durch AVE 0118 bei einer Testspannung von +40 mV. n = Anzahl der gepatchten Zellen pro Konzentrationsstufe, p = Irrtumswahrscheinlichkeit (gepaarter t-Test).



**Abbildung 23 :** Wirkung von AVE 0118 auf  $I_{\text{Sus}}$  bei einer Testspannung von +40 mV. n=Anzahl der gepatchten Zellen. Sterne über den Punkten geben das Signifikanzniveau (gepaarter t-Test) an.

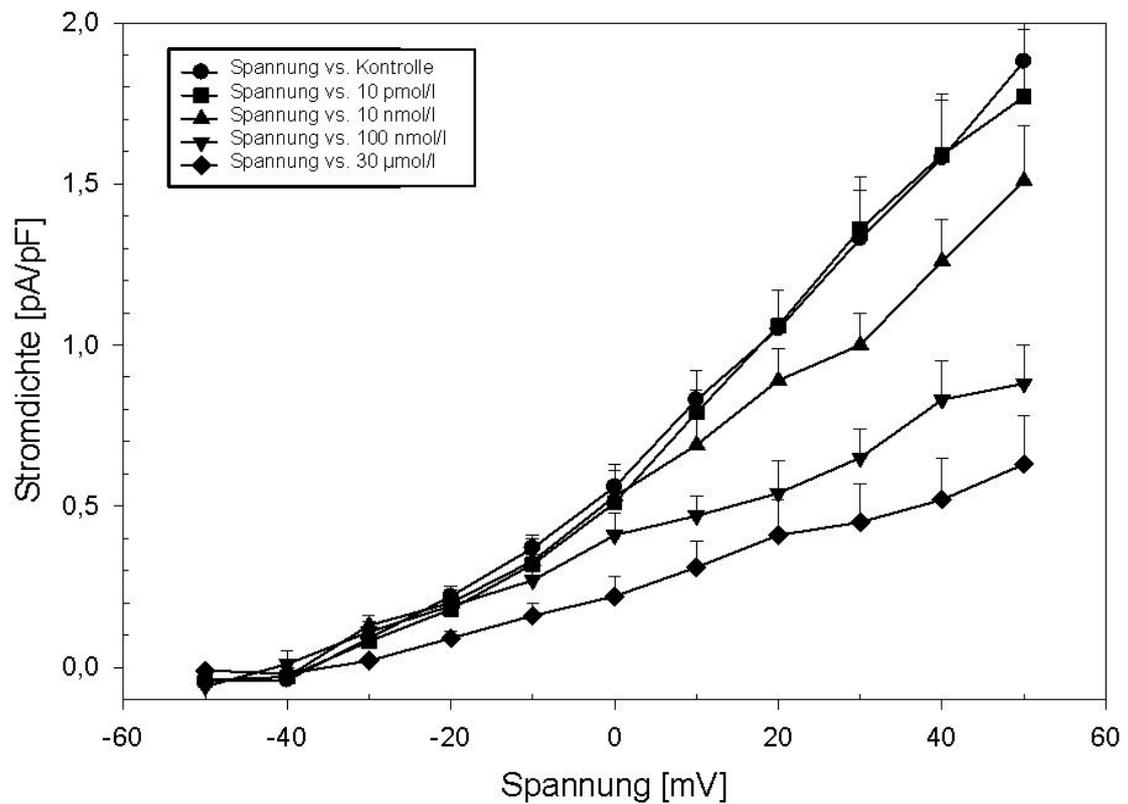
### 3.2.1.2 Strom-/Spannungsbeziehung und Spannungsabhängigkeit

Wie in Abbildung 24 ersichtlich, hemmt AVE 0118  $I_{\text{sus}}$  bei jeder Testspannung ab ca.  $-10$  mV. Dies paßt gut zu den biophysikalischen Daten von  $I_{\text{Kur}}$ , der ab diesem Membranpotentialbereich leitfähig wird.<sup>133</sup> Alle Hemmungen der Stromamplitude von  $I_{\text{sus}}$  sind statistisch signifikant (gepaarter t-Tests).

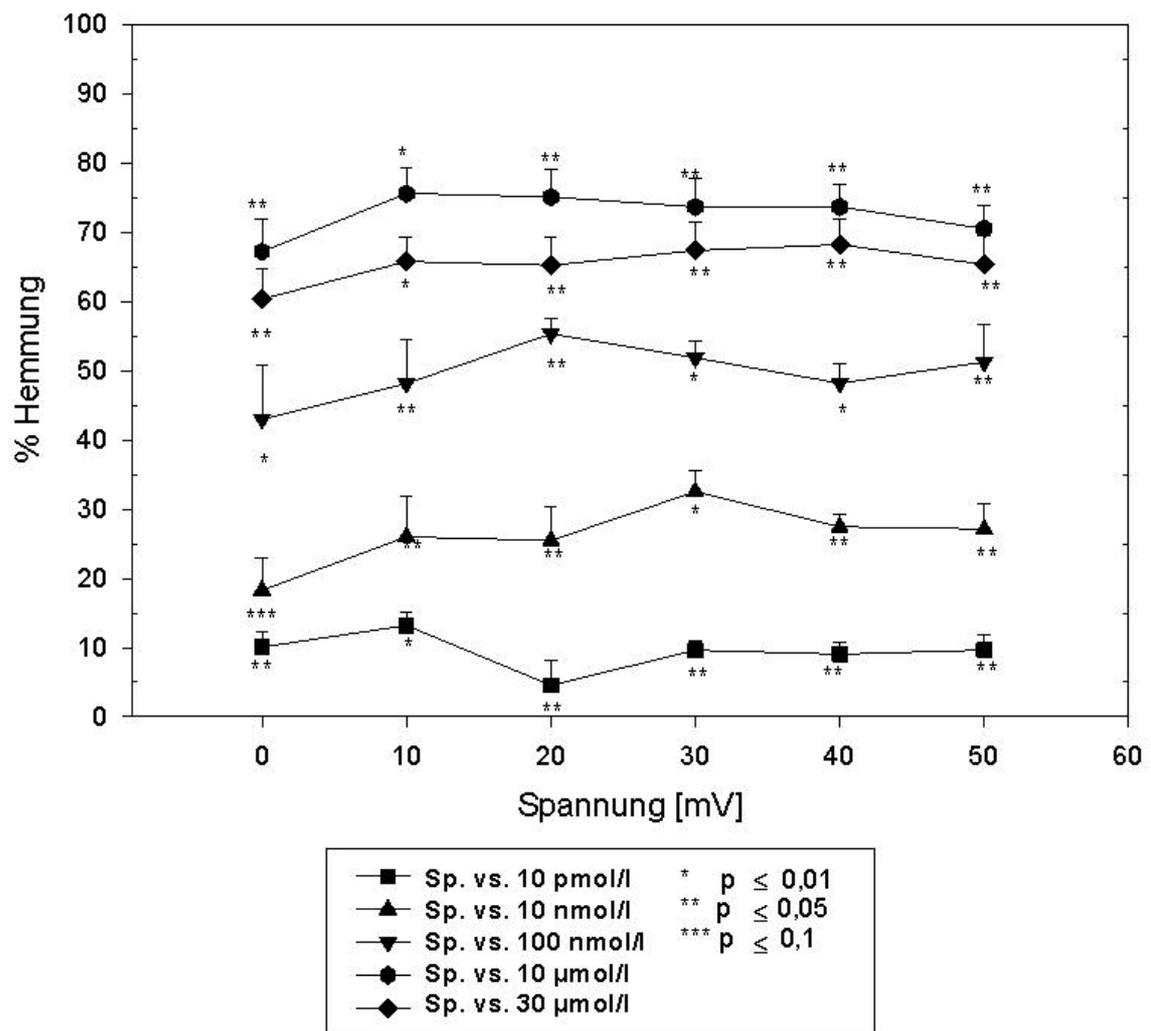
Die Spannungsabhängigkeit des Blockes wurde geprüft, indem die prozentuelle Hemmung gegen die Testspannung aufgetragen wurde (Abbildung 25). Es zeigte sich keine Spannungsabhängigkeit. Weiterhin wurde bei den verschiedenen Testpotentialen die in Abbildung 24 exemplarisch für  $+40$  mV gezeigte Konzentrationsabhängigkeit des Blockes untersucht und nach Formel 0-1 analysiert. Tabelle 4 zeigt, dass die Fitparameter (Sättigung  $a$ ,  $pK_i$ , Hill Koeffizient) nicht signifikant von der Testspannung abhängen.

U [mV]	$pK_i$	$\sigma_{pK_i}$	$P_{pK_i}$	$K_i$ [nmol/l]	$10^{pK_i-2\sigma}$ [nmol/l]	$10^{pK_i+2\sigma}$ [nmol/l]	Hill Faktor	$\sigma_{\text{Hill}}$	$P_{\text{Hill}}$	$a$ [%]	$\sigma_a$ [%]
0	-6,81	1,21	0,011	155	0,6	4154	0,25	0,08	0,02	84	23
10	-6,47	0,25	<0,0001	338	105	1081	0,21	0,03	<0,001	107	55
20	-7,7	0,50	<0,0001	20	2	196	0,34	0,09	0,01	76	9
30	-7,75	0,22	<0,0001	18	6	50	0,33	0,04	<0,001	74	4
40	-7,43	0,43	<0,0001	37	5	270	0,31	0,06	0,02	82	9
50	-7,7	0,42	<0,0001	20	3	140	0,32	0,06	0,025	76	8

**Tabelle 4** : Parameter zur Erstellung der Konzentrations-/Wirkungskurve bei verschiedenen Testspannungen. Die Stromamplituden im Bereich von 0 bzw. 10 mV liegen im Bereich des messtechnisch bedingten Rauschen des Signals, weswegen diese Werte für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt worden sind.



**Abbildung 24:** Strom-/ Spannungsbeziehung des  $I_{kur}$  Blockes durch AVE 0118. Die Hemmung ist ab einer Spannung von 0 mV statistisch signifikant (gepaarter t-Test) Zur besseren Übersichtlichkeit wurden in dieser Abbildung die Signifikanzniveaus nicht eingezeichnet, diese können der Abbildung 25 entnommen werden.



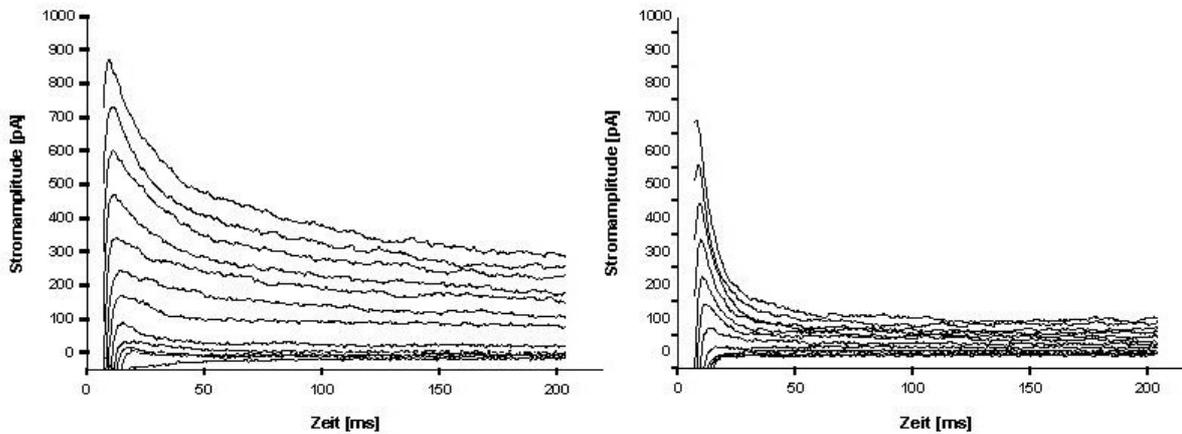
**Abbildung 25:** Evaluation Spannungsabhängigkeit des  $I_{sus}$  Blockes durch AVE 0118. Die Hemmung ist statistisch signifikant (gepaarter t-Test). Ferner ist die Reduktion von  $I_{sus}$  nicht spannungsabhängig. Sp= Spannung.

### 3.2.1.3 Washout

Die Blockade von  $I_{Kur}$  scheint irreversibel zu sein. Selbst über 15 Minuten nach dem Auswaschen der Testsubstanz bleibt  $I_{Kur}$  gehemmt (siehe auch Kapitel 3.2.2.6, Abbildung 33, Seite 77)

### 3.2.2 $I_{to,1}$

In Abbildung 26 ist eine Original-Aufzeichnung von  $I_{to,1}$  dargestellt:



**Abbildung 26:** Originalaufnahme von  $I_{to,1}$ . Links vor und rechts nach dem Einwaschen von  $10 \mu\text{mol/l}$  AVE 0118. Verwendet wurde das in Kapitel 2.3.2 beschriebene Pulsprotokoll.

#### 3.2.2.1 $I_{to,1}$ peak current

##### 3.2.2.1.1 Konzentrationsabhängigkeit

Der  $I_{to,1}$  peak current bei  $+50 \text{ mV}$  (Kapitel 2.3.2) wurde durch AVE 0118 im Vergleich zu  $I_{Kur}$  kaum gehemmt. Bei einer Konzentration von  $30 \mu\text{mol/l}$  wird  $I_{to,1}$  um  $31 \pm 6 \%$  reduziert (diese Konzentration führt zur vollständigen Blockade von  $I_{Kur}$ , siehe Kapitel 3.2.1.1).

Es wurden bei den Versuchen Konzentrationen von AVE 0118 bis zu  $30 \mu\text{mol/l}$  verwendet, höhere Konzentrationen wurden von den Myozyten nicht toleriert ( $n=6$ ). Dies liegt wahrscheinlich eher an der Substanzkonzentration als am Lösungsmittel, da dessen Konzentration bei allen Experimenten mit  $0,1 \text{ Vol } \%$  gleich war.). Bei der höchsten getesteten Konzentration war noch keine Sättigung des Blockes erreicht (Tabelle 5).

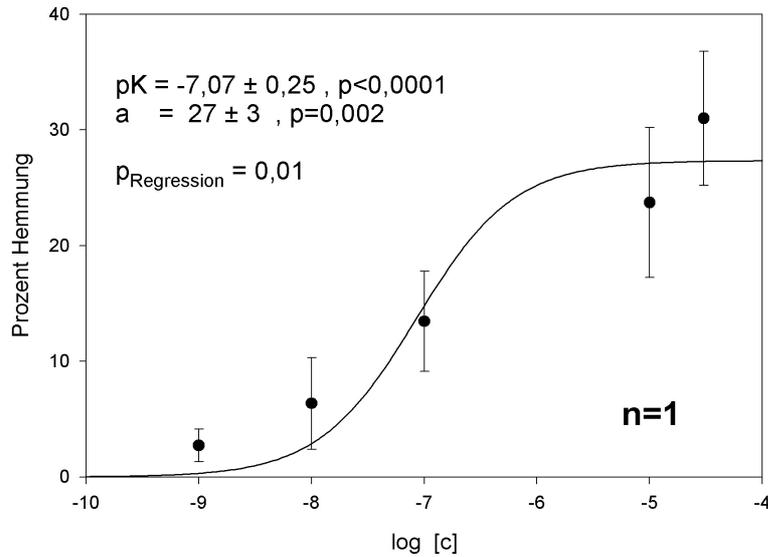
Konzentration	n=	p=	Hemmung	SEM
1nmol/l	4	0,388	3 %	1 %
10 nmol/l	3	0,325	6 %	4 %
100 nmol/l	7	0,067	13 %	4 %
10 $\mu$ mol/l	12	0,004	24%	6 %
30 $\mu$ mol/l	5	0,021	31 %	6 %

**Tabelle 5:** Blockade des  $I_{to,1}$  peak current durch AVE 0118. n = Zahl der gepatchten Zellen, p = Irrtumswahrscheinlichkeit (gepaarter t-Test).

Die Konzentrations-/Wirkungskurve (Abbildung 27) zeigt, dass auch bei 30  $\mu$ mol/l des Hemmstoffs noch keine Sättigung des Effekts erreicht war : Zur Anpassung an die Hill Gleichung wurden deshalb zwei Modellannahmen gemacht :

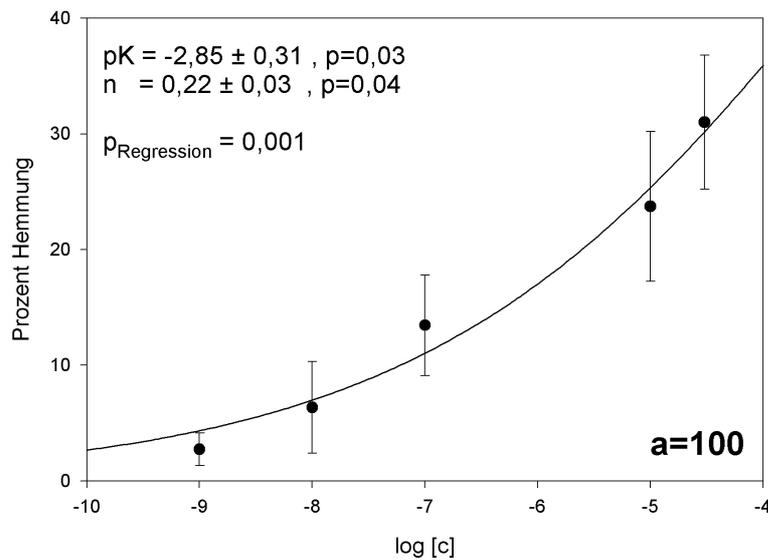
- a < 100 %, Hill Koeffizient = 1 (Abbildung 27 oben)
- a = 100 %, Hill Koeffizienz frei (Abbildung 27 unten)

Die Interpretation der Ergebnisse muß unter Berücksichtigung der anderen Parameter, die bei der  $I_{to}$  Messung bestimmt worden sind (Netto-Ladungsfluss, Beschleunigung der Inaktivierung), erfolgen. Hierzu sei auf Kapitel 3.2.2.4 verwiesen.



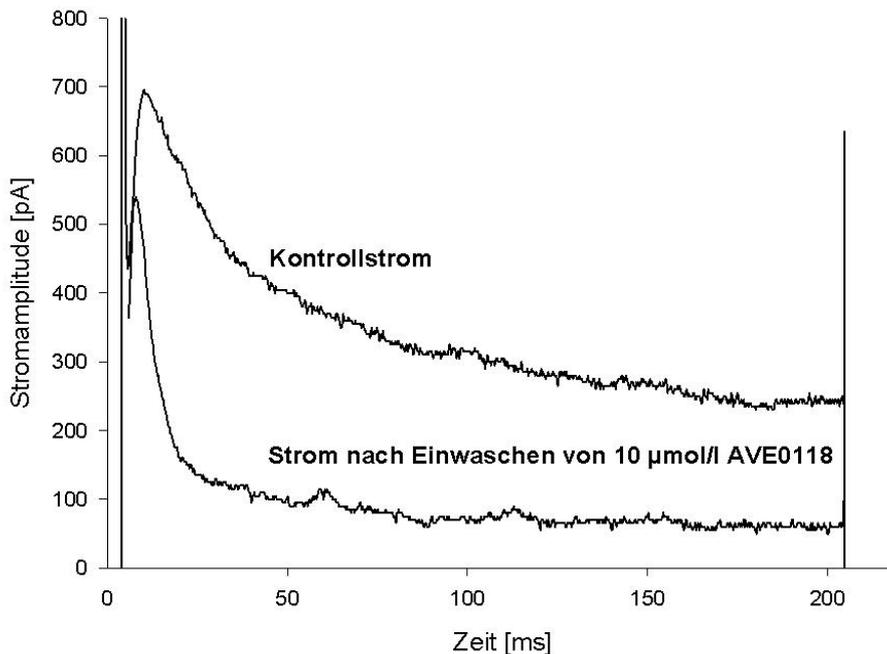
$$f(x) = \frac{a}{1 + 10^{-n \cdot (px - pK)}}$$

, wobei  $px = -\log(x)$ ,  $pK = -\log(k)$ ,  $n = \text{Hill Faktor}$ ,  $a = \text{maximale Hemmung}$



**Abbildung 27:** Modellberechnung zur Bestimmung des  $pK_i$  Wertes der  $I_{to}$  peak current Hemmung durch AVE 0118. Es wurde Formel 0-1 (siehe auch Abbildungsmitte) verwendet. Bei der oberen Kurve wurde bei der Regression der Konzentrationswirkungskurve der Hill Koeffizient auf 1 festgelegt, bei der unteren die maximale Hemmung auf 100 % ( $a=100$ ). In der linken oberen Ecke der jeweiligen Konzentrations-/Wirkungskurve die berechneten Parameter. Zur Interpretation dieser Modellberechnung siehe Kapitel 3.2.2.4.

### 3.2.2.2 Inaktivierung von $I_{to,1}$



**Abbildung 28:** Nach dem Einwaschen von AVE 0118 beschleunigt sich die zeitliche Inaktivierung von  $I_{to,1}$ , hier exemplarisch dargestellt bei einer Konzentration von  $10\mu\text{mol/l}$ . In der Abbildung ist der Stromverlauf bei 50 mV vor und nach dem Einwaschen gegenübergestellt.

Nach dem Einwaschen von AVE beschleunigt sich die Inaktivierung des Ionenkanals (Abbildung 29). Als Größe des Ausmaßes der zeitlichen Inaktivierung wurde exemplarisch bei +50 mV die Strominaktivierung mit einer monoexponentiellen Funktion angenähert (siehe Kapitel 2.3.2.1).

Die Verringerung der Inaktivierungszeitkonstante  $\tau$  des Kanals ist konzentrationsabhängig (Abbildung 29).

Es wurde dann der Quotient  $(\tau_{\text{nach AVE 0118}} / \tau_{\text{Kontrolle}}) \cdot 100$  errechnet (Tabelle 6).

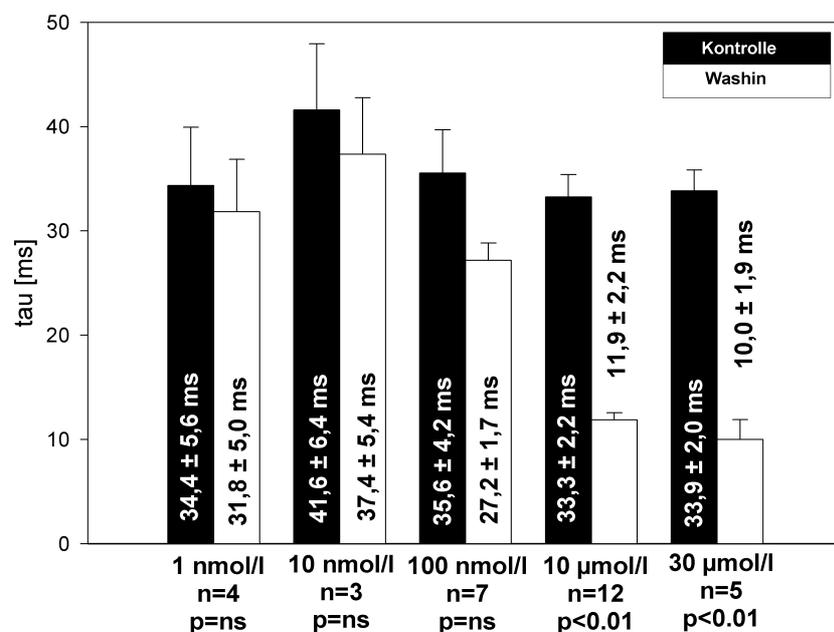
Bei der höchsten getesteten Konzentration ( $30\mu\text{mol/l}$ ) war noch keine Sättigung erreicht, es lässt sich also, ähnlich wie beim  $I_{to}$  peak current, nicht sagen, ob die

Beschleunigung der Inaktivierung gegen  $\tau = 0$  läuft oder bereits vorher eine Sättigung eintritt.

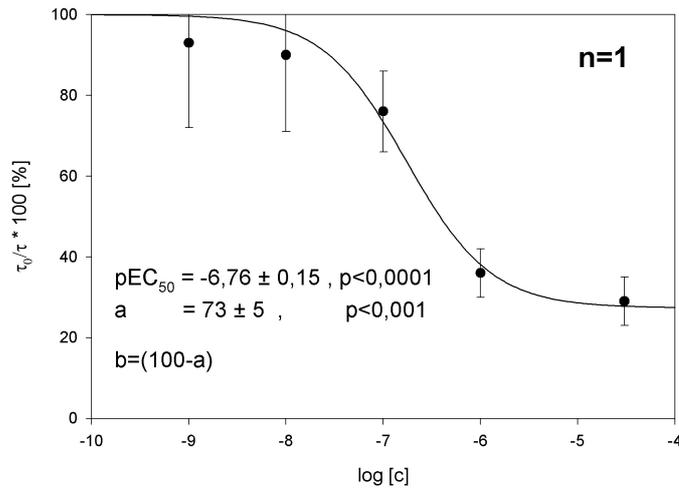
Deshalb wurden auch hier zwei Modellberechnungen durchgeführt, einmal wurde das eine Mal die Hill-Konstante auf 1 festgelegt (Abbildung 30 oben), das andere Mal eine maximale Sättigung von 100% angenommen (Abbildung 30 unten). Die Interpretation der Ergebnisse muß auch wieder unter Berücksichtigung der anderen Parameter, die bei der  $I_{to}$  Messung bestimmt worden sind (Netto-Ladungsfluss,  $I_{to}$  peak current), erfolgen. Hierzu sei wiederum auf Kapitel 3.2.2.4 verwiesen.

log [c]	$(\tau_{AVE\ 0118}/\tau_{Kontrolle}) * 100$ [%]	$\sigma$ [%]
-9	93	21
-8	90	19
-7	76	10
-5	36	6
-4,52	29	6

**Tabelle 6** : Veränderung der Inaktivierungszeitkonstanten in Abhängigkeit der Konzentration von AVE 0118. Die Fehlerfortpflanzung wurde bei  $\sigma$  berücksichtigt.

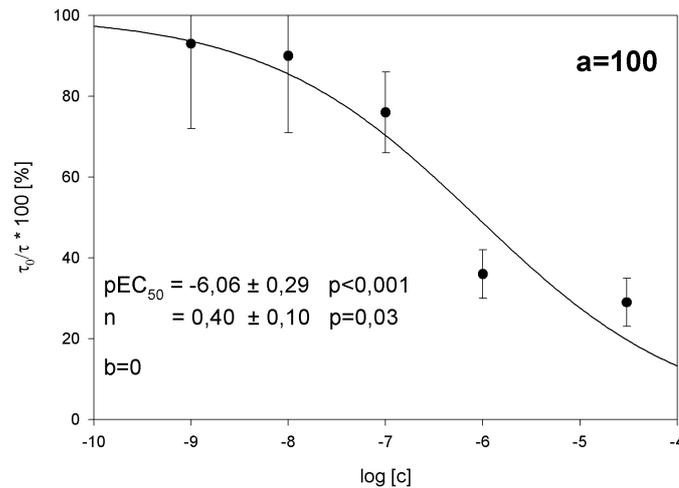


**Abbildung 29**: Veränderung der Inaktivierungskonstanten  $\tau$  durch AVE 0118.



$$f(x) = \frac{a}{1 + 10^{-n \cdot (px - pEC_{50})}} + b$$

wobei  $px = -\log(x)$ ,  $pEC_{50} = -\log(EC_{50})$ ,  $n = \text{Hill Faktor}$ ,  
 $a = \text{maximale Hemmung}$ ,  $b = \text{Konstante}$



**Abbildung 30:** Modellberechnung zur Bestimmung der  $pEC_{50}$  der Inaktivierungszeitkonstante  $\tau$  durch AVE 0118. Es wurde Formel 0-1 (siehe Abbildungsmitte) verwendet, eine Konstante  $b$  wurde zum besseren Annähern hinzugefügt. Bei der oberen Kurve wurde bei der Regression der Konzentrationswirkungskurve der Hill Koeffizient auf 1 festgelegt, bei der unteren die maximal mögliche Beschleunigung der Inaktivierung auf 100 % ( $a=100$ ). In der linken oberen Ecke der jeweiligen Konzentrations-/Wirkungskurve die berechneten Parameter. Zur Interpretation dieser Modellberechnung siehe Kapitel 3.2.2.4.

### 3.2.2.3 Ladungsfluß durch $I_{to,1}$ während des Testpulses

Der Ladungsfluß läßt sich, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, durch Berechnung der sogenannten *Area under the curve* (AUC) bestimmen. Diese ändert sich nach Applikation von AVE 0118 konzentrationsabhängig (Tabelle 7, Abbildung 31).

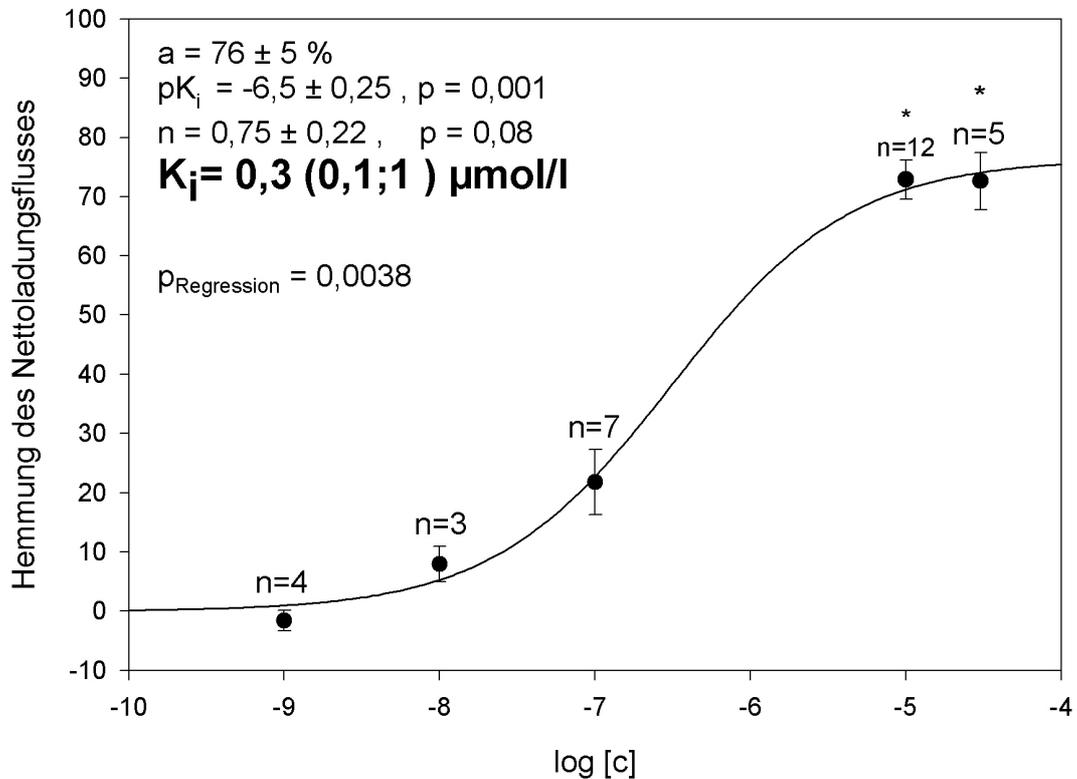
Zur Annäherung wurde Formel 0-1 verwendet.

Für die Hemmkurve des Nettoladungsflusses wurden folgende Werte berechnet:

- $EC_{50} = 0,3 (0,1;1) \mu\text{mol/l}$
- $n = 0,75 \pm 0,22$
- $a = 76 \pm 5 \%$

Konzentration	n=	p=	Hemmung	SEM
1nmol/l	4	0,575	-2%	2%
10 nmol/l	3	0,076	8%	3%
100 nmol/l	7	0,015	22%	5%
10 $\mu\text{mol/l}$	12	0,014	73%	3%
30 $\mu\text{mol/l}$	5	0,001	73%	5%

**Tabelle 7:** Verringerung des Ladungsflusses durch  $I_{to,1}$  während eines Testpulses (Testspannung 50 mV).



**Abbildung 31:** Konzentrationsabhängigkeit der Änderung des Ladungsflusses durch  $I_{to,1}$  während eines Testpulses (+50 mV). Auf der Abszisse die logarithmierte Konzentration AVE 0118, auf der Ordinate die Hemmung der Area under the curve (AUC, entspricht der Netto-Ladung). Über den Meßpunkten die Anzahl der gepatchten Zellen und das Signifikanzniveau (gepaarter t-Test).

### 3.2.2.4 Vergleich der verschiedenen Modellrechnungen

	I <sub>to</sub> peak current		Inaktivierung		AUC
	Modell 1	Modell 2	Modell 1	Modell 2	
p <sub>Ki</sub> / pEC <sub>50</sub>	-7,07 ± 0,25	-2,85 ± 0,31	-6,76 ± 0,15	-6,06 ± 0,29	-6,5 ± 0,25
n	1	0,22 ± 0,03	1	0,40 ± 0,10	0,75 ± 0,22
a	27 ± 3	100	73 ± 5	100	76 ± 5

**Tabelle 8** : Vergleich der verschiedenen Modellberechnungen der Konzentrations-/Wirkungskurven von I<sub>to</sub> peak current, der Inaktivierungszeitkonstanten und des Nettoladungsflusses.

Tabelle 8 zeigt eine Zusammenstellung der verschiedenen, in Kapitel 3.2.2 durchgeführten Modellberechnungen. Wie bereits erwähnt, wurde bei den Messungen der Hemmung der Inaktivierungszeitkonstanten beziehungsweise der Hemmung des I<sub>to</sub> peak Stroms keine maximale Sättigung des Blockes erreicht. Deshalb war es notwendig, je zwei Modellrechnungen durchzuführen.

Bei der Konzentrationswirkungskurve des Nettoladungsflusses war bei der höchsten gemessenen Konzentration von AVE 0118 bereits ein gesättigter Block sichtbar, deshalb waren hier keine Modellberechnungen notwendig.

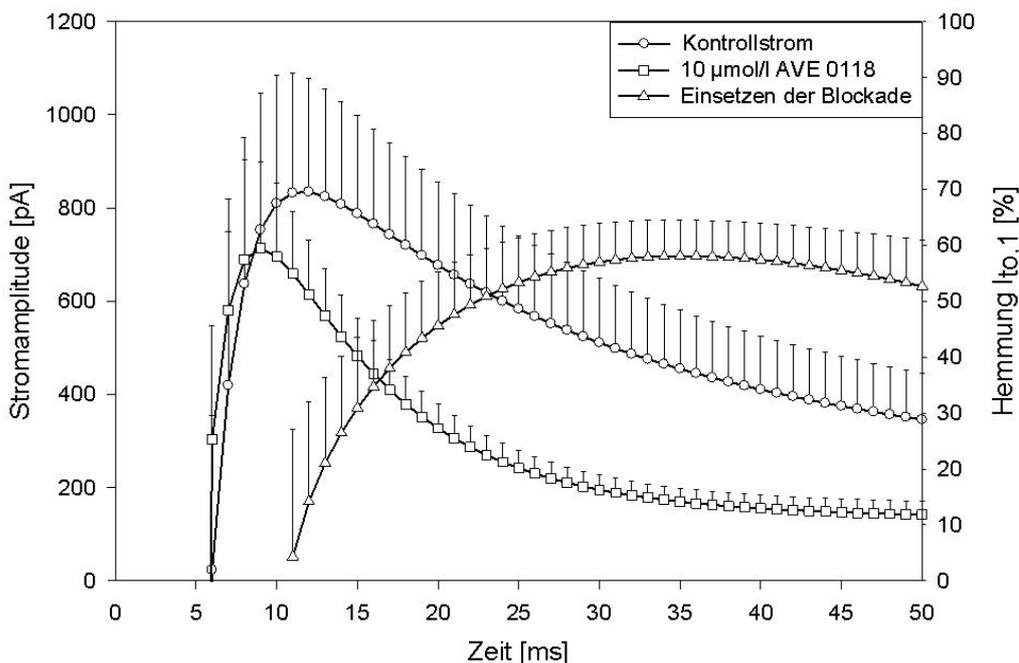
Es stellt sich nun die Frage, welches Modell genauer ist. Beim Vergleich der p<sub>Ki</sub>-Werte in Tabelle 8 fällt auf, dass die des Modelles 1 (Hillfaktor = 1) eher dem der p<sub>Ki</sub>-Wert des Nettoladungsflusses entsprechen (In Tabelle grau hinterlegt). Zum anderen sind die Hillfaktoren in Modell 2 sehr gering.

Man kann also schließen, dass Modell 1 eher den „wahren Gegebenheiten“ der Blockade von I<sub>to,1</sub> durch AVE 0118 entspricht.

### 3.2.2.5 Zeitliche Abhängigkeit der $I_{to,1}$ Blockade

Für die Untersuchung der zeitlichen Abhängigkeit der  $I_{to,1}$ -Blockade wurden 5 Zellen bei einer Testkonzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  untersucht. Bei jeder Zelle wurde, wie in Kapitel 2.3.2.1.4 beschrieben, die Zeitkonstante  $\tau$  als Maß für die Geschwindigkeit des Einsetzens der Blockade ermittelt. Der durchschnittliche Wert betrug  $7,4 \pm 0,6$  ms.

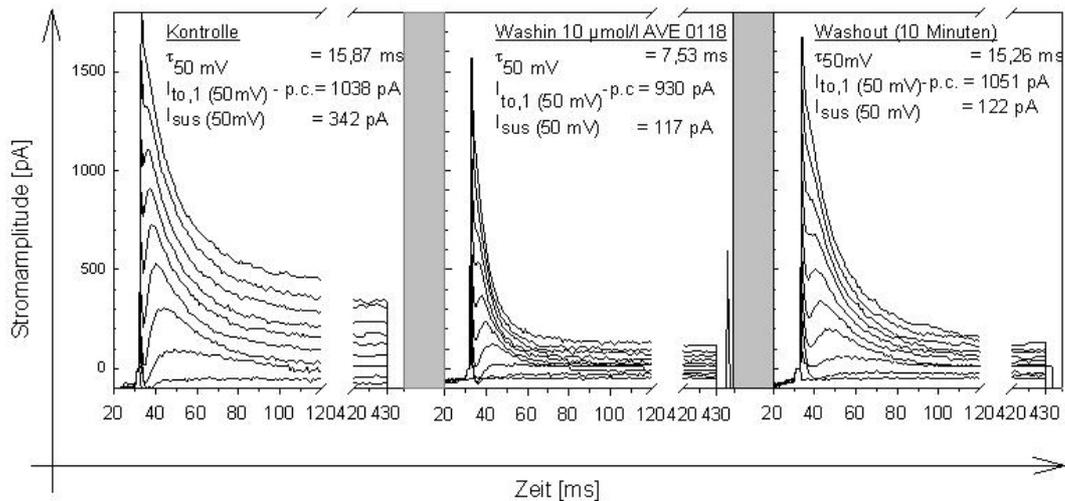
Abbildung 32 zeigt die durchschnittlichen Werte für den Kontroll- und Hemmstrom beziehungsweise den Verlauf des Einsetzens der  $I_{to,1}$  Blockade. Wie bereits in Kapitel 2.3.2.1.4 erwähnt, wurde in diesem Modell die „physiologische Inaktivierung“ (unabhängig von AVE 0118) nicht berücksichtigt, es ist durchaus möglich daß Hemmung und Beschleunigung der Inaktivierung interagieren.



**Abbildung 32:** Einsetzen der  $I_{to,1}$ -Blockade ( $n=5$ ). Dargestellt ist zu jedem Zeitpunkt die durchschnittliche Stromamplitude des Kontroll- beziehungsweise Hemmstroms (Ordinate links) und die durchschnittliche  $I_{to,1}$  Blockade (Ordinate rechts). Zeitkonstante  $\tau = 7,4 \pm 0,6$  ms.

### 3.2.2.6 Washout

Die  $I_{to,1}$ -Blockade durch AVE 0118 konnte durch 10 minütiges Auswaschen vollständig rückgängig gemacht haben (Abbildung 33).

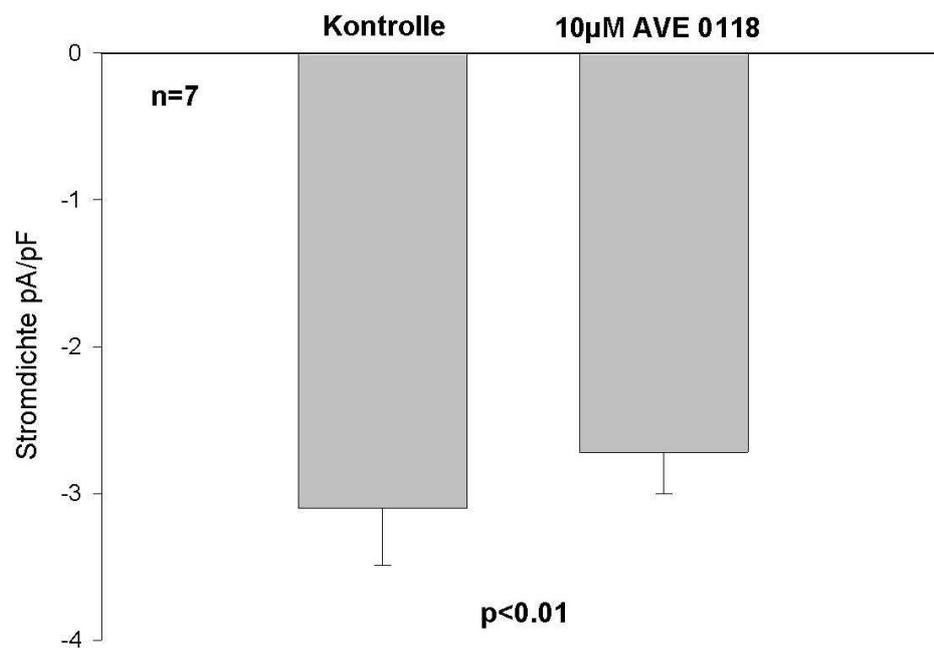


**Abbildung 33:** Reversibilität der  $I_{to,1}$ -Blockade am Beispiel einer Zelle, die mit 10 µmol/l AVE 0118 superfundiert wurde. Es wurde das in Kapitel 2.3.2 beschriebene Protokoll verwendet, der Depolarisationspuls dauerte jedoch 400 ms (anstatt 200ms). Gezeigt wird jeweils der Stromverlauf von 20ms bis 120ms und das Ende des Testpulses von 420 bis 430 ms.  $\tau_{50\text{mV}}$  = Inaktivierungszeitkonstante bei +50mV (siehe Kapitel 2.3.2.1.3),  $I_{to,1} (50\text{mV})$ -p.c. =  $I_{to,1}$  peak current Stromamplitude (siehe Kapitel 2.3.2.1.1),  $I_{sus(50\text{mV})}$ =Stromamplitude der *sustained* Komponente (=  $I_{Kur}$  und unspezifischer Ionenkanal, siehe Kapitel 2.3.1.1). Links vor dem Einwaschen von 10 µmol/l AVE 0118. In der Mitte nach der Superfusion von AVE 0118, die Inaktivierungszeitkonstante von  $I_{to,1}$  ist deutlich verringert, ebenso  $I_{sus}$ . Der  $I_{to,1}$  peak current ist nur geringfügig kleiner als vor dem Einwaschen. Rechts nach 10 minütigem Auswaschen der Testsubstanz. Der  $I_{to,1}$  peak current erreicht seinen Ausgangswert, ebenso die Inaktivierungszeitkonstante  $\tau$ . Die Hemmung von  $I_{sus}$  ist nicht reversibel (siehe auch Kapitel 3.2.1.3).

### 3.2.3 I<sub>K1</sub>

#### 3.2.3.1 Wirkung von 10 µmol/l AVE 0118 auf I<sub>K1</sub>

AVE 0118 hat nur eine minimale Wirkung auf I<sub>K1</sub>. So hemmt 10 µM AVE 0118 I<sub>K1</sub> bei -90 mV nur um 11 ± 3 %. In Abbildung 34 sind die Stromdichten vor und nach Einwaschen der Testsubstanz dargestellt.



**Abbildung 34** Hemmung der I<sub>K1</sub> Stromdichte durch AVE 0118. 10 µM AVE 0118 verringert die Stromdichte um 11 ± 3 %.

## **4 Diskussion**

## **4.1 Material und Methoden – mögliche Fehlerquellen**

### **4.1.1 Zellen**

Die Zellen wiesen nach der Präparation Unterschiede in der Qualität auf. Schlechte Qualität äußerte sich in einem positiveren Ruhemembranpotential und einem höherem basalen Leakstrom. Für die Versuche wurden nur Zellen verwendet, die ein Ruhemembranpotential von mindestens  $-30$  mV aufwiesen. Desweiteren überstieg der basale Leakstrom bei einem Haltepotential von  $-50$  mV ( $I_{\text{sus}}/I_{\text{Kur}}$ -Messungen) beziehungsweise  $-40$  mV ( $I_{\text{K1}}$ -Messung) niemals  $20$  pA, bei einem Haltepotential von  $-70$  mV ( $I_{\text{to,1}}$ ) war dieser nie größer als  $-40$  pA. Auch die Stromamplituden der Ströme variierten. Dies ließ sich zwar mit der Zellgröße korrelieren, die Schwankungen der Stromdichte (pA/pF) waren deutlich geringer, doch es wurden für die Versuche keine Zellen verwendet, die bei einem Testpotential von  $+50$  mV bei den  $I_{\text{sus}}/I_{\text{Kur}}$  Messungen eine Stromamplitude kleiner als  $80$  pA zeigten.

Es kann nie ausgeschlossen werden, daß Ionenkanalblocker von Patient zu Patient unterschiedlich starke Wirkungen zeigen. Deshalb wurde zur Erstellung eines Hemmwertes bei einer bestimmten Konzentration AVE 0118 Zellen von wenigstens drei verschiedenen Patienten verwendet.

### **4.1.2 Lösungen**

Der pH-Wert der verwendeten Lösungen wurde am Versuchstag kontrolliert und korrigiert. Nicht ausgeschlossen werden konnten Verunreinigungen der Lösungen durch den Herstellungsprozeß. AVE 0118 wurde, gemäß den Angaben der Herstellerfirma, portioniert tiefgefroren aufbewahrt. Am Versuchstag wurde jeweils eine Portion aufgetaut und in Tyrode gelöst. Grundsätzlich wurden lichtdichte Behältnisse verwendet. Eine Veränderung der Substanzen durch Licht und Temperatur können jedoch trotzdem nicht vollständig ausgeschlossen werden.

### 4.1.3 Geräte

Elektrische Störungen, die von anderen Geräten oder der Raumbeleuchtung ausgingen, wurden weitestgehend durch einen Faraday'schen Käfig und durch Erdung der metallischen Gegenstände auf dem Versuchstisch verringert, konnten aber nicht vollständig vermieden werden. Eine Beschädigung der AgCl-Elektrode wurde durch regelmäßiges Neubeschichten korrigiert.

Nach jedem Versuch wurde das Perfusionssystem gut gereinigt, damit zuvor benutzte Substanzen beziehungsweise Wirkstoffkonzentrationen im nächsten Versuch die Ergebnisse nicht beeinflussen.

### 4.1.4 Auswertung

Bei den Konzentrations-/Wirkungsbeziehungen angegebene  $EC_{50}$ -Werte sind als interpolierte Werte aufzufassen, die von der Güte des „fittings“ mit Hilfe der jeweiligen Hill-Regression abhängen. Ebenso sind die Analysen der Zeitkonstanten der Inaktivierung ( $I_{t_{0,1}}$ -Messung) durch eine monoexponentielle oder die Annäherung des gesamten  $I_{t_{0,1}}$ -Stromverlaufes (Kapitel 3.2.2.3) durch eine triexponentielle Funktion von der etwas variierenden Genauigkeit der Annäherung abhängig.

Natürlich gibt wie bei allen statistischen Auswertungen von Meßdaten auch bei den durchgeführten Analysen eine Irrtumswahrscheinlichkeit. Eine Aussage wurde als statistisch signifikant erklärt, wenn eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als fünf Prozent ( $p \leq 0,05$ ) vorlag.

## 4.1.5 Meßtechnisch bedingte Verfälschung der Meßergebnisse

### 4.1.5.1 Serienwiderstand

#### 4.1.5.1.1 $I_{Kur}/I_{Sus}$ -Messung

Der berechnete „voltage drop“ von ca. 1,5 mV bedeutet, daß bei einem Puls auf +30 mV in Wirklichkeit die Zelle nur auf ca. 28,5 mV geklemmt wird.  $I_{Kur}$  ist bei diesen Spannungen aber bereits maximal aktiviert<sup>133</sup>, so daß der Fehler der Stromamplitude nur gering ausfallen dürfte.

#### 4.1.5.1.2 $I_{to,1}$ -Messung

Der „voltage drop“ bei den Versuchen mit  $I_{to,1}$  ist mit ca. 10 mV bei den Kontrollstromamplituden relativ hoch. Beachtet werden muß, vor allem bei diesen Versuchen, daß der „voltage drop“ direkt abhängig von der gemessenen Stromamplitude ist (Formel 0-5). Dies bedeutet vor allem bei großen Differenzen der Kontroll- beziehungsweise Hemmstromamplitude, daß der voltage drop des Kontrollstromes größer ist als der des Hemmstromes. Ein gezwungenermaßen im Versuchsverlauf ansteigender Serienwiderstand der Pipette („Verstopfen der Öffnung durch Zellbestandteile“) vermag diesen Unterschied zwar etwas zu minimieren aber sicher nicht zu kompensieren. Folglich ist sowohl der gemessene Kontroll- als auch der Hemmstrom zu klein, wobei ersterer stärker vom „wahren“ Wert abweicht (höherer „voltage drop“), als Konsequenz davon ist der berechnete Hemmwert zu hoch.

Für die durchgeführten Versuche kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, daß die angegebenen Hemmwerte von  $I_{to,1}$  durch AVE 0118 vor allem im hohen Konzentrationsbereich zu hoch ausfallen.

#### 4.1.5.1.3 $I_{K1}$ -Messung

Hier betrug der „voltage drop“ im Mittel 3,5 mV. Die Stromamplitudendifferenz zwischen Kontrolle und Hemmung ist so gering, daß der unterschiedliche voltage drop vor und nach dem Einwaschen der Testsubstanz den Hemmwert nur gering verfälscht.

## 4.1.5.2 Membrankapazität

### 4.1.5.2.1 $I_{Kur}/I_{sus}$ -Messung

Die Messungen der  $I_{Kur}$ -Amplitude wurden 200 ms nach Beginn des Testpulses ausgemessen. Zu diesem Zeitpunkt dürften (fast) keine kapazitiven Ströme mehr fließen, die die Messung verfälschen könnten. (Der Membrankondensator ist im Mittel 7,21 ms nach Beginn des Testpulses zu 99,9% aufgeladen, siehe Kapitel 3.1.2.1).

### 4.1.5.2.2 $I_{to,1}$ -Messung

Der  $I_{to,1}$  peak current wurde relativ früh nach Beginn des Testpulses gemessen (durchschnittlich  $7,75 \pm 0,30$  ms nach Beginn). Dieser Zeitpunkt liegt zeitlich relativ nahe am berechneten Zeitpunkt, bei dem der Membrankondensator zu 99,9% aufgeladen ist (im Schnitt nach 7,18 ms). Es ist also, verglichen mit den  $I_{sus}/I_{Kur}$ - beziehungsweise  $I_{K1}$ -Messungen, wahrscheinlicher, daß kapazitive Ströme das Meßergebnis beeinflussen. Die kapazitiven Ströme sind aber, selbst wenn der Zeitpunkt der  $I_{to}$ -Messung genau auf den „99,9%-Wert“ fallen würde, verglichen mit der  $I_{to,1}$ -Amplitude, schon so gering, daß der Meßfehler nur gering ausfallen dürfte.

### 4.1.5.2.3 $I_{K1}$ -Messung

Für die  $I_{K1}$ -Messung gilt, ebenso wie bei  $I_{sus}/I_{Kur}$ , daß der Meßzeitpunkt deutlich hinter dem berechneten „99,9%-Wert“ liegt, so daß wohl (fast) keine kapazitiven Ströme die Messung beeinflussen dürften.

## **4.2 Ergebnisdiskussion**

### **4.2.1 Die Blockade von $I_{\text{sus}}$ durch AVE 0118**

#### **4.2.1.1 Konzentrationsabhängigkeit**

Bei den durchgeführten Experimenten erwies sich AVE 0118 als potenter Blocker von  $I_{\text{sus}}$ . Schon ab Konzentrationen von 10 pmol/l zeigt sich eine signifikante Reduktion von  $I_{\text{sus}}$ . Es wurde exemplarisch bei einer Testspannung von +40 mV eine  $IC_{50}$  von 37 (5;270) nmol/l berechnet. Die Konzentrations-/Wirkungskurve steigt relativ flach an. Der Hill Faktor lag bei einer Testspannung von +40 mV bei  $0,31 \pm 0,06$ . Auch bei anderen von Aventis an humanen Myozyten getesteten - in der chemischen Struktur ähnlichen - Kv1.5-Blockern war dieser vergleichbar niedrig.

Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade von  $I_{\text{sus}}$  durch AVE 0118 nicht spannungsabhängig ist, die Fitparameter  $pK_i$ , Sättigung  $a$  und der Hill Koeffizient der Konzentrations-/Wirkungskurve liegen alle in derselben Größenordnung. Ferner scheint die Blockade irreversibel zu sein.

Auffällig ist, daß diese Konzentration um mehrere Zehnerpotenzen geringer ist als die  $IC_{50}$  bei CHO Zellen ( $0,9 \mu\text{mol/l}^{40}$ ). Dieses Phänomen wurde auch schon bei einem anderen selektiven Kv1.5 Blocker der selben chemischen Substanzklasse beschrieben<sup>8</sup>, die Autoren dieser Veröffentlichung sehen als Grund hierfür das Vorhandensein einer modulierenden  $\beta$ -Untereinheit (Kv $\beta$ 2 oder 3)<sup>8</sup> beim Menschen, die im CHO System fehlt.

Es ist schwierig zu sagen, welcher Mechanismus der Kv1.5-Blockade durch AVE 0118 in Frage kommt, da die Kinetiken als Diskriminierungsfaktor der einzelnen Blockadetypen bei Kv1.5 nur schwierig experimentell erfassbar sind (sehr schnelle Aktivierung, sehr langsame Inaktivierung).

## 4.2.2 $I_{to,1}$ Blockade

### 4.2.2.1 Konzentrationsabhängigkeit des Blocks von $I_{to,1}$

Verglichen mit der Hemmwirkung auf Kv1.5 ist die auf den  $I_{to,1}$  peak current eher gering. So ist bei der experimentell möglichen Höchstdosis von 30  $\mu\text{mol/l}$  noch keine Sättigung des Blockes erreicht. Zur Berechnung einer  $IC_{50}$  waren Modellberechnungen notwendig. In Kapitel 3.2.2.4 wurde gezeigt, welche der beiden möglichen Modellberechnung wahrscheinlich eher den wahren Gegebenheiten entspricht.

Mit Hilfe des „besseren“ Modells (Hillfaktor = 1) konnte für den Block des  $I_{to,1}$  peak current eine  $IC_{50}$  von 90 (27;269)  $\text{nmol/l}$  bei einer kalkulierten maximalen Hemmbarkeit von  $27 \pm 3 \%$  berechnet werden.

Auch für die Berechnung der  $IC_{50}$  der prozentualen Änderung der Inaktivierungszeitkonstanten  $\tau$  wurde das Modell verwendet, bei dem der Hillfaktor gleich 1 gesetzt wurde. Hier konnte eine  $IC_{50}$  von 200 (87;347)  $\text{nmol/l}$  bei einer theoretischen maximalen prozentualen Änderung der Inaktivierungszeitkonstante von  $73 \pm 5 \%$  berechnet werden, was ungefähr einer Beschleunigung der Inaktivierung um den Faktor 3 bedeutet.

Zusammenfassend gilt für die Blockade von  $I_{to,1}$  durch AVE 0118 also :

- Hemmung des  $I_{to,1}$  peak current um (theoretisch) maximal circa 30 %
- Hemmung des Nettoladungsflusses durch den Kanal bei 50 mV um maximal circa 75 %
- Beschleunigung der Inaktivierung von  $I_{to,1}$  um ungefähr den Faktor 3

Grundsätzlich handelt es sich aber hierbei um Modelle, zur sicheren Evaluation müsste die Testkonzentration von AVE 0118 noch erhöht werden, was aber nicht möglich war, da, wie bereits erwähnt, die Kardiomyozyten AVE 0118 Konzentrationen  $< 30 \mu\text{mol/l}$  nicht tolerierten.

Bei der Untersuchung der Hemmung des Nettoladungsflusses durch  $I_{to,1}$  war bei der höchsten getesteten Konzentration schon eine Sättigung des Blockes erreicht, hier konnte die  $IC_{50}$  mit 300 (100;1000)  $\text{nmol/l}$  direkt berechnet werden.

#### 4.2.2.2 Möglicher Mechanismus der $I_{to,1}$ Blockade

Auffallend war, daß sich die Inaktivierung von  $I_{to,1}$  nach der Superfusion von AVE 0118 deutlich beschleunigt (Abbildung 28, Seite 70).

Die Inaktivierungszeitkonstante verringert sich bei der höchsten untersuchten Konzentration von AVE 0118 (30  $\mu\text{mol/l}$ ) auf  $29 \pm 6 \%$  vom Ausgangswert. Durch die beschleunigte zeitliche Abnahme der Stromamplitude ist der Fluß durch  $I_{to,1}$  während eines Testpulses deutlich geringer, er wird gegenüber der Kontrolle bei 30  $\mu\text{mol/l}$  AVE 0118 um  $72,63 \pm 4,79 \%$  gehemmt (Abbildung 31).

Eine ähnlich starke Beschleunigung der Inaktivierungszeitkonstante wurde beispielsweise auch bei den Substanzen Flecainid, Chinidin und 4-Aminopyridin beobachtet.<sup>134</sup> Die Autoren dieser Arbeit führen dies auf eine beschleunigte Inaktivierung des Kanals zurück. Es kommt jedoch auch in Betracht, daß die beschleunigte Inaktivierung durch die einsetzende Blockade der Ionenkanäle „imitiert“ wird. Durch eine schnell einsetzende Blockade des geöffneten Kanals verläßt der Kanal medikamenteninduziert schneller den geöffneten Zustand als durch spontane endogene Inaktivierung<sup>32</sup>.

Um diese Möglichkeit weiter zu untersuchen, wurde die Zeitabhängigkeit des  $I_{to,1}$  Blockes betrachtet:

Die zeitabhängige Hemmung von  $I_{to}$  steigert sich von nahezu 0% Hemmung mit fortschreitender Zeit bis zum Erreichen eines *steady state*, der Verlauf läßt sich durch eine monoexponentielle Funktion annähern.

Die Zeitkonstante  $\tau$  dieser Annäherung liegt bei 10  $\mu\text{mol/l}$  AVE 0118 mit  $7,4 \pm 0,6$  ms in derselben Größenordnung wie die Inaktivierungszeitkonstante ( $11,89 \pm 2,15$  ms) bei derselben Konzentration.

Die Tatsache, daß zum Beginn des Testpulses keine signifikante Hemmung des Stroms vorliegt und es nach der Kanalöffnung noch eine gewisse Zeit dauert, bis eine signifikante  $I_{to,1}$  Hemmung auftritt (Abbildung 32, auch Originalaufzeichnung in Abbildung 18), spricht dafür, daß die Öffnung des Ionenkanals eine Bedingung für das Einsetzen der Blockade ist. Bei einem „*open channel block*“ liegt die Medikamentenbindungsstelle intrazellulär oder in der Pore<sup>32</sup>, so das dieser Blockadetyp für AVE 0118 in Frage kommt

### 4.2.3 I<sub>K1</sub>-Blockade

Die I<sub>K1</sub> Blockade fällt mit  $11 \pm 3 \%$  bei 10  $\mu\text{mol/l}$  AVE 0118 (-90mV Testpuls) sehr gering aus und dürfte wohl nur einen geringen Beitrag zur Wirkung von AVE 0118 leisten.

## 4.3 Klinische Bedeutung

Wie bereits in Kapitel 1.6 diskutiert, sollte eine möglichst selektive Blockade des hKv1.5 Kanals das Risiko der Proarrhythmogenität als mögliche Nebenwirkung des Medikamenteneinsatzes zur Behandlung von Vorhofflimmern aufheben oder zumindest deutlich vermindern.

In Kapitel 1.7 wurde beschrieben, daß AVE 0118 bei anästhesierten Schweinen (Dosis 0,5 mg/kg) durch eine 30 prozentige Verlängerung der linksatrialen effektiven Refraktärzeit ohne signifikanter Verlängerung der QT-Zeit die Induzierbarkeit von supraventrikulären Tachyarrhythmien durch programmierte atriale Stimulation (400S2) um 100% vermindern kann.<sup>67,64</sup> Ebenso wurde in diesem Kapitel erwähnt, daß die Substanz die atriale Refraktärzeit bei Ziegen verzögert, ohne die QT Zeit signifikant zu verlängern. Der Effekt (prozentuale Verlängerung) ist bei chronisch remodellierten Tieren sogar größer als bei der Kontrollgruppe. Auch konnte bei dieser Spezies Vorhofflimmern durch Gabe von AVE 0118 terminiert und die Reinduktion verhindert werden.<sup>11</sup>

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß AVE 0118 eine Antiarrhythmikum mit neuem Wirkprofil ist. Der Vergleich der IC<sub>50</sub> Konzentrationen der I<sub>Kur</sub> bzw. I<sub>to,1</sub> Blockade zwischen Mensch und Tier lässt vermuten, daß der Mensch noch empfindlicher auf die Gabe von AVE 0118 reagiert, es bleibt abzuwarten, was die ersten Studien (die zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Schrift geplant sind) am gesunden Probanden zeigen.



## **5 Zusammenfassung**

Vorhofflimmern ist die häufigste supraventrikuläre Tachyarrhythmie beim Menschen und besitzt eine sehr große klinische und auch wirtschaftliche Bedeutung. Obwohl in den vergangenen Jahren eine Vielzahl nicht pharmakologischer Therapieansätze entwickelt worden sind, ist die medikamentöse Therapie immer noch die Option erster Wahl für die Mehrzahl der betroffenen Patienten. Die gegenwärtige pharmakologische Therapie ist durch eine niedrige Effizienz und ein beträchtliches proarrhythmisches Potential der verwendeten Substanzen gekennzeichnet. Diese unerwünschten Herzrhythmusstörungen, zum Beispiel Torsade de pointes Arrhythmien für die Klasse III Antiarrhythmika, werden vorwiegend durch Wirkung der Substanzen auf ventrikulärer Ebene verursacht.

Der ultraschnelle Auswärtsgleichrichter Kaliumstrom  $I_{Kur}$  beziehungsweise dessen molekulare Grundlage, der Kaliumkanal Kv1.5 und die Untereinheit Kv $\beta$ 1.2, sind ein interessanter Angriffspunkt für neue Substanzen zur Behandlung von Vorhofflimmern und anderen supraventrikulären Arrhythmien.

$I_{Kur}$  scheint beim Menschen nur im Vorhof zu existieren, deshalb sollte eine Blockade dieses Stroms die Repolarisation nur auf atrialer Ebene verlängern.

In CHO Zellen, in denen Kv1.5 exprimiert wurde, zeigte sich die neue antiarrhythmische Substanz AVE 0118 als potenter Inhibitor dieses Kanals.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung auf die Kaliumkanäle  $I_{Kur}$ ,  $I_{to,1}$  und  $I_{K1}$  in nativen menschlichen atrialen Myozyten untersucht.

Die Myozyten wurden von Patienten gewonnen, die sich einer Operation mit extrakorporaler Zirkulation unterzogen hatten. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur mit Hilfe der Patch Clamp Technik (*Ganzzellkonfiguration*) durchgeführt.

AVE 0118 zeigte sich als potenter Inhibitor von Kv1.5 mit einer  $IC_{50}$  von 37 (5;270) nmol/l (Testspannung +40 mV) bei einer extrapolierten maximal möglichen Hemmung von  $82 \pm 9$  %. Der Hillfaktor dieser Konzentrations-/Wirkungskurve lag mit  $0,31 \pm 0,06$  sehr niedrig. Die Blockade ist nicht spannungsabhängig. Die Hemmung scheint irreversibel zu sein, selbst lange Auswaschzeiten konnten die Blockade des Kanals nicht aufheben. Der  $I_{to,1}$  peak current wird im Vergleich dazu eher wenig gehemmt. Unter der modellhaften

Annahme eines Hill-Koeffizienten von 1 konnte für den Block des  $I_{to,1}$  peak current eine  $IC_{50}$  von 90 (27;269) nmol/l bei einer kalkulierten maximalen Hemmbarkeit von  $27 \pm 3 \%$  berechnet werden.

Dahingegen verringert sich der totale Kaliumflux durch  $I_{to,1}$  während eines Testpulses aufgrund einer konzentrationsabhängigen stärkeren zeitabhängigen Abnahme der Stromamplitude (Abnahme der Inaktivierungszeitkonstante  $\tau$ ) erheblich. So ändert sich beispielsweise die Inaktivierungszeitkonstante  $\tau$  bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  AVE 0118 auf den Wert von  $36 \pm 6 \%$  des Ausgangswertes, was zu einer Verringerung des Ladungsflusses durch  $I_{to,1}$  um  $73 \pm 3 \%$  führt. Ebenfalls unter der Annahme eines Hill-Koeffizienten von 1 bei der Konzentrations-/Wirkungskurve der Änderung der Zeitkonstanten  $\tau$  konnte eine  $EC_{50}$  von 200 (87;347) nmol/l bei einer theoretischen maximalen Hemmbarkeit von  $73 \pm 5 \%$  für die Beschleunigung der Inaktivierungszeitkonstante  $\tau$  berechnet werden. Bei der Untersuchung der Reduzierung des Nettoladungsflusses durch  $I_{to,1}$  war bei der höchsten getesteten Konzentration schon eine Sättigung des Blockes erreicht, hier konnte die  $IC_{50}$  mit 300 (100;1000) nmol/l direkt kalkuliert werden.

Die stärkere zeitabhängige Abnahme der Stromamplitude und das zeitabhängige Einsetzen der  $I_{to,1}$  Blockade (Aktivierungszeitkonstante  $\tau$  bei 10  $\mu\text{mol/l}$  AVE 0118 mit  $7,40 \pm 0,60$  ms im selben Bereich wie die Inaktivierungszeitkonstante  $\tau$  bei dieser Konzentration [ $11,89 \pm 2,15$  ms]) geben Hinweise auf einen *open channel block* als möglichen Mechanismus.

Die Wirkung von AVE 0118 auf  $I_{K1}$  war gering, so wurde der Strom bei einem Testpotential von  $-90$  mV durch 10  $\mu\text{mol/l}$  AVE 0118 nur um  $11 \pm 3$  Prozent gehemmt. Sowohl die  $I_{to,1}$ - als auch die  $I_{K1}$ -Blockade war durch genügend lange Auswaschzeiten reversibel.

Zusammenfassend ist AVE 0118 als eine antiarrhythmische Substanz mit neuartigem Wirkungsmechanismus anzusehen. Substanzen mit überwiegender Wirkung auf  $I_{Kur}$  und damit einer Verzögerung der Repolarisation überwiegend oder selektiv auf Vorhofebene stellen deshalb vielversprechende Alternativen zu den derzeit verwendeten Antiarrhythmika dar.



## **6 Literaturverzeichnis**

1. Abbott, G. W., Sesti, F., Splawski, I, Buck, M. E., Lehmann, M. H., Timothy, K. W., Keating, M. T., Goldstein, S. A. (1999)  
MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia  
*Cell* 97, 175-187
2. Allesie, M. A., Bonke, F. I., Schopman, F. J. (1973)  
Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia  
*Circ.Res.* 33, 54-62
3. Allesie, M. A., Bonke, F. I., Schopman, F. J. (1976)  
Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. II. The role of nonuniform recovery of excitability in the occurrence of unidirectional block, as studied with multiple microelectrodes  
*Circ.Res.* 39, 168-177
4. Allesie, M. A., Bonke, F. I., Schopman, F. J. (1977)  
Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. III. The "leading circle" concept: a new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle  
*Circ.Res.* 41, 9-18
5. Allesie, M. A., Boyden, P. A., Camm, A. J., Kleber, A. G., Lab, M. J., Legato, M. J., Rosen, M. R., Schwartz, P. J., Spooner, P. M., Van, Wagoner, Waldo, A. L. (2001)  
Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation  
*Circulation* 103, 769-777
6. Allesie, M. A., Lammers, W. J., Bonke, F. I., Hollen, J. (1985)  
Experimental evaluation of Moe's multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation  
*in*  
Allesie, M. A., Lammers, W. J., Bonke, F. I., Hollen, J.  
*Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias (Grune&Stratton)*, 265-275
7. Amos, G. J., Wettwer, E., Metzger, F., Li, Q., Himmel, H. M., Ravens, U. (1996)  
Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes  
*J.Physiol* 491 ( Pt 1), 31-50

8. Bachmann, A., Gutscher, I., Kopp, K., Brendel, J., Bosch, R. F., Busch, A. E., Gogelein, H. (2001)  
 Characterization of a novel Kv1.5 channel blocker in *Xenopus* oocytes, CHO cells, human and rat cardiomyocytes  
*Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 364, 472-478
9. Bachmann, A., Russ, U., Quast, U. (1999)  
 Potent inhibition of the CFTR chloride channel by suramin  
*Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360, 473-476
10. Barry, D. M., Nerbonne, J. M. (1996)  
 Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity  
*Annu.Rev.Physiol* 58, 363-394
11. Blaauw, Y., Tieleman, M., Allessie, M. A. (2002)  
 Acute reversal of atrial electrical remodeling by a *I<sub>Kr</sub>/I<sub>to</sub>* blocker (AVE 0118) in the goat  
*Circulation* 106-II, 155-155
12. Bosch, R. F., Grammer, J. B., Kuhlkamp, V, Seipel, L. (2000)  
 Elektrisches Remodeling bei Vorhofflimmern--Zellulare und molekulare Mechanismen. [Electrical remodeling in atrial fibrillation--cellular and molecular mechanisms]  
*Z.Kardiol.* 89, 795-802
13. Bosch, R. F., Zeng, X, Grammer, J. B., Popovic, K., Mewis, C., Kuhlkamp, V (1999)  
 Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation  
*Cardiovasc.Res.* 44, 121-131
14. Brahmajothi, M. V., Campbell, D. L., Rasmusson, R. L., Morales, M. J., Trimmer, J. S., Nerbonne, J. M., Strauss, H. C. (1999)  
 Distinct transient outward potassium current (*I<sub>to</sub>*) phenotypes and distribution of fast-inactivating potassium channel alpha subunits in ferret left ventricular myocytes  
*J.Gen.Physiol.* 113, 581-600
15. 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
16. Butler, A., Wei, A. G., Baker, K., Salkoff, L. (1989)  
 A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*  
*Science* 243, 943-947

17. Camm, A. J., Karam, R., Pratt, C. M. (1998)  
The azimilide post-infarct survival evaluation (ALIVE) trial  
*Am.J.Cardiol.* 81, 35D-39D
18. Catterall, W. A. (1995)  
Structure and function of voltage-gated ion channels  
*Annu.Rev.Biochem.* 64, 493-531
19. Chandy, K. G. (1991)  
Simplified gene nomenclature [letter]  
*Nature* 352, 26-26
20. Chandy, K. G. Heinemann, S. (1995)  
Voltage gated potassium channels  
*in*  
Chandy, K. G. Heinemann, S.  
Handbook of receptors and channels : ligand- and voltage-gated ion  
channels (1-71)
21. Chen, J., Mandapati, R., Berenfeld, O., Skanes, A. C., Jalife, J. (2000)  
High-frequency periodic sources underlie ventricular fibrillation in the  
isolated rabbit heart  
*Circ.Res.* 86, 86-93
22. Choi, K. L., Aldrich, R. W., Yellen, G. (1991)  
Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation  
mechanisms in voltage-activated K<sup>+</sup> channels  
*Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 88, 5092-5095
23. Coraboeuf, E., Carmeliet, E. (1982)  
Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje  
fibers  
*Pflugers Arch.* 392, 352-359
24. Courtemanche, M., Ramirez, R. J., Nattel, S. (1998)  
Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties:  
insights from a mathematical model  
*Am.J.Physiol.* 275, H301-H321
25. Courtemanche, M., Ramirez, R. J., Nattel, S. (1999)  
Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation-induced electrical  
remodeling: insights from a mathematical model  
*Cardiovasc.Res.* 42, 477-489
26. Covarrubias, M., Wei, A. A., Salkoff, L. (1991)  
Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K<sup>+</sup> current systems  
*Neuron* 7, 763-773

27. Cranefield, P, Aronson, P. (1988)  
Cardiac Arrhythmia : The role of triggered activity and other mechanisms (Futura)
28. Crumb, W. J. Jr, Pigott, J. D., Clarkson, C. W. (1995)  
Description of a nonselective cation current in human atrium  
Circ Res 77, 950-956
29. Cushny, A. R, Edmunds, C. W (1907)  
Paroxysmal irregularity of the heart and auricular fibrillation  
Am J Med Sci 133, 67-77
30. de-Bakker, J. M., van-Capelle, F. J., Janse, M. J., Tasseron, S., Vermeulen, J. T., de-Jonge, N., Lahpor, J. R. (1993)  
Slow conduction in the infarcted human heart. 'Zigzag' course of activation  
Circulation 88, 915-926
31. 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<sup>+</sup> channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current  
Circ.Res. 79, 659-668
32. Dukes, I. D., Morad, M. (1989)  
Tedisamil inactivates transient outward K<sup>+</sup> current in rat ventricular myocytes  
Am J Physiol JID - 0370511 257, H1746-H1749
33. Escande, D., Coulombe, A., Faivre, J. F., Coraboeuf, E. (1986)  
Characteristics of the time-dependent slow inward current in adult human atrial single myocytes  
J.Mol.Cell Cardiol. 18, 547-551
34. Fedida, D., Wible, B., Wang, Z., Fermini, B., Faust, F., Nattel, S., Brown, A. M. (1993)  
Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K<sup>+</sup> channel current  
Circ.Res. 73, 210-216
35. Feng, J., Wible, B., Li, G. R., Wang, Z., Nattel, S. (1997)  
Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cultured adult human atrial myocytes  
Circ.Res. 80, 572-579

36. Feng, J., Xu, D., Wang, Z., Nattel, S. (1998)  
 Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: properties and consequences  
 Am.J.Physiol. 275, H1717-H1725
37. Fermini, B., Wang, Z., Duan, D., Nattel, S. (1992)  
 Differences in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium  
 Am.J.Physiol. 263, H1747-H1754
38. Franqueza, L., Valenzuela, C., Delpon, E., Longobardo, M., Caballero, R., Tamargo, J. (1998)  
 Effects of propafenone and 5-hydroxy-propafenone on hKv1.5 channels  
 Br J Pharmacol 125, 969-978
39. Gaspo, R., Bosch, R. F., Talajic, M., Nattel, S. (1997)  
 Functional mechanisms underlying tachycardia-induced sustained atrial fibrillation in a chronic dog model  
 Circulation 96, 4027-4035
40. Gögelein, H., Brendel, J., Steinmeyer, K., Strübing, C, Bachmann, A., Kopp, K., Busch, A. E., Bleich, M. (noch nicht veröffentlicht)  
 Effects of the biphenyl AVE 0118 on cardiac ion channels in expression systems and pig atrial myocytes
41. Grammer, J. B., Bosch, R. F., Kuhlkamp, V, Seipel, L. (2000)  
 Molecular remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation  
 J.Cardiovasc.Electrophysiol. 11, 626-633
42. Guo, W., Kada, K., Kamiya, K., Toyama, J. (1997)  
 IGF-I regulates K(+)-channel expression of cultured neonatal rat ventricular myocytes  
 Am.J.Physiol. 272, H2599-H2606
43. Guo, W., Kamiya, K., Kada, K., Kodama, I, Toyama, J. (1998)  
 Regulation of cardiac Kv1.5 K+ channel expression by cardiac fibroblasts and mechanical load in cultured newborn rat ventricular myocytes  
 J.Mol.Cell Cardiol. 30, 157-166
44. Guo, W., Kamiya, K., Yasui, K., Kodama, I, Toyama, J. (1998)  
 alpha1-adrenoceptor agonists and IGF-1, myocardial hypertrophic factors, regulate the Kv1.5 K+ channel expression differentially in cultured newborn rat ventricular cells  
 Pflugers Arch. 436, 26-32

45. Haissaguerre, M., Jais, P., Shah, D. C., Takahashi, A., Hocini, M., Quiniou, G., Garrigue, S., Le-Mouroux, A., Le-Metayer, P., Clementy, J. (1998)  
Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins  
*N.Engl.J.Med.* 339, 659-666
46. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F. J. (1981)  
Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches  
*Pflugers Arch.* 391, 85-100
47. Hara, M., Shvilkin, A., Rosen, M. R., Danilo, P., Boyden, P. A. (1999)  
Steady-state and nonsteady-state action potentials in fibrillating canine atrium: abnormal rate adaptation and its possible mechanisms  
*Cardiovasc.Res.* 42, 455-469
48. Heinemann, S., Rettig, J., Scott, V., Parcej, D. N., Lorra, C., Dolly, J., Pongs, O. (1994)  
The inactivation behaviour of voltage-gated K-channels may be determined by association of alpha- and beta-subunits  
*J Physiol Paris.* 88, 173-180
49. Hennersdorf, M. G., Perings, C., Kelm, M., Strauer, B. E. (2001)  
Vorhofflimmern. [Atrial fibrillation]  
*Internist.(Berl.)* 42, 1631-1640
50. Hering, H. E (1903)  
Analyse des pulsus irregularis perpetuus  
*Prag Med Wchnschr* 38, 377-381
51. Hille, B. (1992)  
Ionic channels of excitable membranes (Sinauer Associates Inc.)
52. Hohnloser, S. H. (1997)  
Proarrhythmia with class III antiarrhythmic drugs: types, risks, and management  
*Am.J.Cardiol.* 80, 82G-89G
53. Hoshi, T., Zagotta, W. N., Aldrich, R. W. (1990)  
Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation [see comments]  
*Science* 250, 533-538
54. Hoshi, T., Zagotta, W. N., Aldrich, R. W. (1991)  
Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region  
*Neuron* 7, 547-556

55. Jan, L. Y., Jan, Y. N. (1992)  
Structural elements involved in specific K<sup>+</sup> channel functions  
*Annu.Rev.Physiol* 54, 537-555
56. Jan, L. Y., Jan, Y. N. (1997)  
Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels  
*J Physiol Lond.* 505, 267-282
57. Jayachandran, J. V., Zipes, D. P., Weksler, J., Olgin, J. E. (2000)  
Role of the Na(+)/H(+) exchanger in short-term atrial  
electrophysiological remodeling  
*Circulation* 101, 1861-1866
58. Kamb, A., Iverson, L. E., Tanouye, M. A. (1987)  
Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a  
potassium channel  
*Cell* 50, 405-413
59. Karaguezian, H. S. (2000)  
Acquired long QT syndromes and the risk of proarrhythmia  
*J.Cardiovasc.Electrophysiol.* 11, 1298-
60. Kass, R. S., Blair, M. L. (1981)  
Effects of angiotensin II on membrane current in cardiac Purkinje fibers  
*J.Mol.Cell Cardiol.* 13, 797-809
61. Kenyon, J. L., Gibbons, W. R. (1979)  
4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje  
fibers  
*J.Gen.Physiol.* 73, 139-157
62. Kenyon, J. L., Gibbons, W. R. (1979)  
Influence of chloride, potassium, and tetraethylammonium on the early  
outward current of sheep cardiac Purkinje fibers  
*J.Gen.Physiol.* 73, 117-138
63. 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
64. Knobloch, K., Brendel, J., Peukert, S., Rosenstein, B., Busch, A. E.,  
Wirth, K. J. (2002)  
Electrophysiological and antiarrhythmic effects of the novel I(Kur)  
channel blockers, S9947 and S20951, on left vs. right pig atrium in vivo  
in comparison with the I(Kr) blockers dofetilide, azimilide, d,l-sotalol and  
ibutilide  
*Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 366, 482-487

65. Konarzewska, H., Peeters, G. A., Sanguinetti, M. C. (1995)  
Repolarizing K<sup>+</sup> currents in nonfailing human hearts. Similarities  
between right septal subendocardial and left subepicardial ventricular  
myocytes  
*Circulation* 92, 1179-1187
66. 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
67. Laszlo, R., Gögelein, H., Bachmann, A., Wirth, K., Brendel, J., Gogel, J.,  
Kühlkamp, V., Bosch, R. F. (2001)  
Block of human ultrarapid potassium channel, I<sub>Kur</sub>, by S0001185  
(AVE0118)  
Kongreßbeitrag zum 25.Treffen der European working group of cardiac  
cellular electrophysiology (EWGCCE)Dresden 09/01
68. Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey,  
G., Barhanin, J. (1996)  
TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a  
novel structure  
*EMBO J* 15, 1004-1011
69. Levitan, E. S., Hershman, K. M., Sherman, T. G., Takimoto, K. (1996)  
Dexamethasone and stress upregulate Kv1.5 K<sup>+</sup> channel gene  
expression in rat ventricular myocytes  
*Neuropharmacology* 35, 1001-1006
70. Lewis, T (1909)  
Auricular fibrillation : a common clinical condition  
*Br Med J* 2, 1528
71. Lewis, T (1910)  
Auricular fibrillation and its relationship to clinical irregularity of the heart  
*Heart* 1, 306-372
72. Li, D., Fareh, S., Leung, T. K., Nattel, S. (1999)  
Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of  
a different sort  
*Circulation* 100, 87-95
73. Li, G. R., Feng, J., Wang, Z., Fermini, B., Nattel, S. (1996)  
Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in  
human atrial myocytes  
*Circ.Res.* 78, 903-915

74. Lip, G. Y., Beever, D. G. (1995)  
 ABC of atrial fibrillation. History, epidemiology, and importance of atrial fibrillation  
*BMJ* 311, 1361-1363
75. Liu, Y., Jurman, M. E., Yellen, G. (1996)  
 Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K<sup>+</sup> channel during gating  
*Neuron* 16, 859-867
76. Lopez, Barneo J., Hoshi, T., Heinemann, S. H., Aldrich, R. W. (1993)  
 Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels  
*Receptors.Channels.* 1, 61-71
77. MacKinnon, R. (1995)  
 Pore loops: an emerging theme in ion channel structure  
*Neuron* 14, 889-892
78. Mandapati, R., Skanes, A., Chen, J., Berenfeld, O., Jalife, J. (2000)  
 Stable microreentrant sources as a mechanism of atrial fibrillation in the isolated sheep heart  
*Circulation* 101, 194-199
79. Martens, J. R., Kwak, Y. G., Tamkun, M. M. (1999)  
 Modulation of Kv channel alpha/beta subunit interactions  
*Trends Cardiovasc.Med.* 9, 253-258
80. Mary-Rabine, L., Albert, A., Pham, T. D., Hordof, A., Fenoglio, J. J., Malm, J. R., Rosen, M. R. (1983)  
 The relationship of human atrial cellular electrophysiology to clinical function and ultrastructure  
*Circ.Res.* 52, 188-199
81. Mays, D. J., Foose, J. M., Philipson, L. H., Tamkun, M. M. (1995)  
 Localization of the Kv1.5 K<sup>+</sup> channel protein in explanted cardiac tissue  
*J.Clin.Invest.* 96, 282-292
82. McMichael, J. (1982)  
 History of atrial fibrillation 1628-1819 Harvey - de Senac - Laennec  
*Br Heart J* 48, 193-197
83. Meghji, P., Nazir, S. A., Dick, D. J., Bailey, M. E., Johnson, K. J., Lab, M. J. (1997)  
 Regional workload induced changes in electrophysiology and immediate early gene expression in intact in situ porcine heart  
*J.Mol.Cell Cardiol.* 29, 3147-3155

84. Mewes, T., Ravens, U. (1994)  
L-type calcium currents of human myocytes from ventricle of non-failing and failing hearts and from atrium  
*J.Mol.Cell Cardiol.* 26, 1307-1320
85. Moe, G. K. (1962)  
On the multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation  
*Arch Int Pharmacodyn Ther* 140, 183-188
86. Moe, G. K., Abildskov, J. A (1959)  
Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge  
*Am Heart J* 58, 59-70
87. Moe, G. K., Rheinboldt, W. C., Abildskov, J. A (1964)  
A computer model of atrial fibrillation  
*Am Heart J* 67, 200-220
88. Moreira, D. A., Shepard, R. B., Waldo, A. L. (1989)  
Chronic rapid atrial pacing to maintain atrial fibrillation: use to permit control of ventricular rate in order to treat tachycardia induced cardiomyopathy  
*Pacing.Clin.Electrophysiol.* 12, 761-775
89. Nabauer, M., Beuckelmann, D. J., Uberfuhr, P., Steinbeck, G. (1996)  
Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle  
*Circulation* 93, 168-177
90. Nattel, S., Yue, L., Wang, Z. (1999)  
Cardiac ultrarapid delayed rectifiers: a novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity  
*Cell Physiol.Biochem.* 9, 217-226
91. Nattel, Stanley (2002)  
New ideas about atrial fibrillation 50 years on  
*Nature* 415, 219-226
92. Nerbonne, J. M. (2000)  
Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium  
*J.Physiol.* 525 Pt 285-298
93. Nishiyama, A., Kambe, F., Kamiya, K., Seo, H., Toyama, J. (1998)  
Effects of thyroid status on expression of voltage-gated potassium channels in rat left ventricle  
*Cardiovasc.Res.* 40, 343-351

94. Nishiyama, A., Kambe, F., Kamiya, K., Yamaguchi, S., Murata, Y., Seo, H., Toyama, J. (1997)  
Effects of thyroid and glucocorticoid hormones on Kv1.5 potassium channel gene expression in the rat left ventricle  
*Biochem.Biophys.Res.Commun.* 237, 521-526
95. Noble, D., Tsien, R. W. (1968)  
The kinetics and rectifier properties of the slow potassium current in cardiac Purkinje fibres  
*J.Physiol.* 195, 185-214
96. Numberger, M., Draguhn, A. (1996)  
Patch-Clamp Technik
97. Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (1987)  
Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*  
*Science* 237, 749-753
98. Perchenet, L, Clément-Chmienne, O (2000)  
Characterization of Mibefradil block of the human heart delayed rectifier hKv1.5  
*J.Pharmacol.Exp.Ther.* 295, 771-778
99. Petersen, K. R., Nerbonne, J. M. (1999)  
Expression environment determines K<sup>+</sup> current properties: Kv1 and Kv4 alpha-subunit-induced K<sup>+</sup> currents in mammalian cell lines and cardiac myocytes  
*Pflugers Arch.* 437, 381-392
100. Pichlmaier, A. M., Lang, V, Harringer, W., Heublein, B., Schaldach, M., Haverich, A. (1998)  
Prediction of the onset of atrial fibrillation after cardiac surgery using the monophasic action potential  
*Heart* 80, 467-472
101. Pinto, J. M., Boyden, P. A. (1999)  
Electrical remodeling in ischemia and infarction  
*Cardiovasc.Res.* 42, 284-297
102. Pongs, O. (1992)  
Molecular biology of voltage-dependent potassium channels  
*Physiol Rev.* 72, S69-S88
103. Pongs, O. (1993)  
Structure-function studies on the pore of potassium channels  
*J Membr.Biol.* 136, 1-8

104. Rampe, D., Wang, Z., Fermini, B., Wible, B., Dage, R. C., Nattel, S. (1995)  
Voltage- and time-dependent block by perhexiline of K<sup>+</sup> currents in human atrium and in cells expressing a Kv1.5-type cloned channel  
*J.Pharmacol.Exp.Ther.* 274, 444-449
105. 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<sup>+</sup> channels  
*Circ.Res.* 82, 739-750
106. Rensma, P. L., Allessie, M. A., Lammers, W. J., Bonke, F. I., Schalij, M. J. (1988)  
Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs  
*Circ.Res.* 62, 395-410
107. Rettig, J., Heinemann, S. H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D. N., Dolly, J. O., Pongs, O. (1994)  
Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of beta-subunit  
*Nature* 369, 289-294
108. Rothberger, C. J, Winterberg, H (1909)  
Vorhofflimmern und arrhythmia perpetua  
*Wien Klin Wochenschr* 22, 839-844
109. Ruskin, J. N. (1989)  
The cardiac arrhythmia suppression trial (CAST)  
*N.Engl.J.Med.* 321, 386-388
110. Sadoshima, J., Izumo, S. (1997)  
The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress  
*Annu.Rev.Physiol.* 59551-71, 71
111. Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L., Keating, M. T. (1996)  
Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel  
*Nature* 384, 80-83
112. Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., Keating, M. T. (1995)  
A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel  
*Cell* 81, 299-307

113. Sanguinetti, M. C., Jurkiewicz, N. K. (1991)  
Delayed rectifier outward K<sup>+</sup> current is composed of two currents in guinea pig atrial cells  
*Am.J.Physiol.* 260, H393-H399
114. Schwartz, P. J., Zaza, A. (1992)  
The Sicilian Gambit revisited--theory and practice  
*Eur.Heart J.* 13 Suppl F, 23-29
115. Seki, A., Hagiwara, N., Kasanuki, H. (1999)  
Effects of propafenone on K<sup>+</sup> currents in human atrial myocytes  
*Br J Pharmacol* 126, 1153-1162
116. Shibata, E. F., Drury, T., Refsum, H., Aldrete, V, Giles, W. (1989)  
Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium  
*Am.J.Physiol.* 257, H1773-H1781
117. Smeets, J. L., Allessie, M. A., Lammers, W. J., Bonke, F. I., Hollen, J. (1986)  
The wavelength of the cardiac impulse and reentrant arrhythmias in isolated rabbit atrium. The role of heart rate, autonomic transmitters, temperature, and potassium  
*Circ.Res.* 58, 96-108
118. Snyders, D. J., Tamkun, M. M., Bennett, P. B. (1993)  
A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart. Functional analysis after stable mammalian cell culture expression  
*J.Gen.Physiol.* 101, 513-543
119. Snyders, J., Knoth, K. M., Roberds, S. L., Tamkun, M. M. (1992)  
Time-, voltage-, and state-dependent block by quinidine of a cloned human cardiac potassium channel  
*Mol.Pharmacol.* 41, 322-330
120. Takimoto, K., Fomina, A. F., Gealy, R., Trimmer, J. S., Levitan, E. S. (1993)  
Dexamethasone rapidly induces Kv1.5 K<sup>+</sup> channel gene transcription and expression in clonal pituitary cells  
*Neuron* 11, 359-369
121. Takimoto, K., Levitan, E. S. (1994)  
Glucocorticoid induction of Kv1.5 K<sup>+</sup> channel gene expression in ventricle of rat heart  
*Circ.Res.* 75, 1006-1013

122. Tamkun, M. M, Bennett, P. B, Snyders, D. J (1995)  
Cloning and expression of human cardiac potassium channels  
*in*  
Tamkun, M. M, Bennett, P. B, Snyders, D. J  
Cardiac Electrophysiology. From Cell to bedside (WB Saunders Co), 21-31
123. Tan, L. B. (1996)  
SWORD trial of d-sotalol  
Lancet 348, 827-828
124. Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (1987)  
Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*  
Science 237, 770-775
125. Tomaselli, G. F., Marban, E. (1999)  
Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure  
Cardiovasc.Res. 42, 270-283
126. Trautwein, A., Kreibig, U., Oberhausen, E. (1987)  
Physik für Mediziner (de Gruyter Verlag, Berlin)
127. Trudeau, M. C., Warmke, J. W., Ganetzky, B., Robertson, G. A. (1995)  
HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family  
Science 269, 92-95
128. Tseng-Crank, J. C., Tseng, G. N., Schwartz, A., Tanouye, M. A. (1990)  
Molecular cloning and functional expression of a potassium channel cDNA isolated from a rat cardiac library  
FEBS Lett. 268, 63-68
129. Van-Wagoner, D. R., Pond, A. L., McCarthy, P. M., Trimmer, J. S., Nerbonne, J. M. (1997)  
Outward K<sup>+</sup> current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation  
Circ.Res. 80, 772-781
130. Wang, J., Bourne, G. W., Wang, Z., Villemaire, C., Talajic, M., Nattel, S. (1993)  
Comparative mechanisms of antiarrhythmic drug action in experimental atrial fibrillation. Importance of use-dependent effects on refractoriness  
Circulation 88, 1030-1044

131. Wang, J., Feng, J., Nattel, S. (1994)  
Class III antiarrhythmic drug action in experimental atrial fibrillation.  
Differences in reverse use dependence and effectiveness between d-  
sotalol and the new antiarrhythmic drug ambasilide  
*Circulation* 90, 2032-2040
132. 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<sup>+</sup> current in rabbit and human atrial myocytes  
*Circ.Res.* 84, 551-561
133. Wang, Z., Fermini, B., Nattel, S. (1993)  
Sustained depolarization-induced outward current in human atrial  
myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K<sup>+</sup> current similar to  
Kv1.5 cloned channel currents  
*Circ.Res.* 73, 1061-1076
134. Wang, Z., Fermini, B., Nattel, S. (1995)  
Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient  
outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial  
myocytes  
*J.Pharmacol.Exp.Ther.* 272, 184-196
135. Wang, Z., Page, P., Nattel, S. (1992)  
Mechanism of flecainide's antiarrhythmic action in experimental atrial  
fibrillation  
*Circ.Res.* 71, 271-287
136. Wei, A., Covarrubias, M., Butler, A., Baker, K., Pak, M., Salkoff, L. (1990)  
K<sup>+</sup> current diversity is produced by an extended gene family conserved  
in *Drosophila* and mouse  
*Science* 248, 599-603
137. Wickenden, A. D., Jegla, T. J., Kaprielian, R., Backx, P. H. (1999)  
Regional contributions of Kv1.4, Kv4.2, and Kv4.3 to transient outward  
K<sup>+</sup> current in rat ventricle  
*Am.J.Physiol.* 276, H1599-H1607
138. Wijffels, M. C., Kirchhof, C. J., Dorland, R., Allessie, M. A. (1995)  
Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically  
instrumented goats  
*Circulation* 92, 1954-1968
139. Workman, A. J., Kane, K. A., Rankin, A. C. (2001)  
The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human  
atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation  
*Cardiovasc.Res.* 52, 226-235

140. Xu, H., Guo, W., Nerbonne, J. M. (1999)  
Four kinetically distinct depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes  
*J.Gen.Physiol.* 113, 661-678
141. Yue, L., Feng, J., Wang, Z., Nattel, S. (1999)  
Adrenergic control of the ultrarapid delayed rectifier current in canine atrial myocytes  
*J.Physiol.* 516,
142. Zhang, X, Anderson, J. W., Fedida, D. (1997)  
Characterization of Nifedipine Block of the human heart delayed rectifier, hKv1.5  
*J.Pharmacol.Exp.Ther.* 281, 1247-1256
143. Zygmunt, A. C., Gibbons, W. R. (1991)  
Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes  
*Circ.Res.* 68, 424-437

## 7 Publikationsverzeichnis

### Kongreßbeitrag:

*Laszlo,R.; Gögelein,H.; Bachmann,A.; Wirth,K.; Brendel,J.; Gogel,J.; Kühlkamp,V.; Bosch,R.F.*

Block of human ultrarapid potassium channel,  $I_{Kur}$ , by S0001185 (AVE 0118)

Vortrag beim 25. Treffen der European Working Group of Cardiac Cellular Electrophysiology (EWGCCE) Dresden September 2001

### Abstracts

#### **Scientific Sessions 2002**

November 17-20 2002 – Chicago - Illinois

*Ralph F Bosch, Roman Laszlo, Alexander C Schneck, Gogelein Heinz, Markus Bleich, Christian Mewis, Volker Kuhlkamp*

AVE 0118, an Antiarrhythmic Drug with a Novel Mechanism of Action - Block of  $I_{Kur}$  and  $I_{to}$  Potassium Currents in Human Atrial Myocytes

#### **ESC CONGRESS 2002**

31 August - 4 September 2002 - Berlin - Germany

*R. Bosch, R. Laszlo, H. Goegelein, M. Bleich, AC. Schneck, C. Mewis, A.E. Busch, V. Kuehlkamp*

Block of human  $I_{Kur}$  and  $I_{to}$  potassium channels by the new antiarrhythmic drug AVE 0118

*R. Bosch, C. Scherer, S. Woehrl, N. Rueb, R. Laszlo, L. Seipel, K. Steinmeyer, V. Kuehlkamp*

Molecular mechanisms of short-term electrical remodelling in a rabbit model of rapid atrial pacing.

## 8 Danksagung

Mein Dank gilt folgenden Personen:

- Herrn Dr. med. Ralph Bosch für die Betreuung der Doktorarbeit.
- Herrn Prof. Dr. med. Volker Kühlkamp für die Unterstützung.
- Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Quast für die unkomplizierte und schnelle Hilfe bei der Auswertung und Interpretation der Messdaten.
- Den Chirurginnen und Chirurgen der herz- und thoraxchirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums Tübingen für das zur Verfügung stellen der kardialen Gewebeproben.
- Herrn Alexander Schneck für die Einarbeitung in die Patch Clamp Technik.
- Herrn Dr. rer. nat. Alexander Bachmann für nützliche Tips und Tricks rund um die Patch-Clamp Methode.
- Frau Jeannette Gogel für die Mithilfe bei der Zellisolation.
- Aventis Pharma Deutschland, insbesondere Herrn Prof. Dr. Heinz Gögelein für die Bereitstellung von AVE 0118.
- Herrn Stefan Wöhrl für die kritischen Diskussionen in netter Runde.
- Frau cand. med. Sara Dias Loureiro, Herrn Dipl. chem. Jörg Williardt und Herrn Dipl. geol. Wilfried Butscher für die kritische Begutachtung des Manuskripts von „fachfremder“ Seite.

## 9 Lebenslauf

23.04.1977	Geburt in Stuttgart. Eltern Marijan Laszlo (Diplom Ingenieur (FH) für Maschinenbau , Roswitha Laszlo (Verlagsfachangestellte)).
1983-1987	Besuch der Grund- und Hauptschule Stuttgart Wangen.
1987-1996	Besuch des Württemberg Gymnasium Stuttgart Untertürkheim. Abschluß mit der allgemeinen Hochschulreife.
Sep. 1996-Okt. 1997	Zivildienst als Pflegehelfer in Bürgerhospital Stuttgart
Oktober 1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
August 1998	Physikum
August 1999	Erstes Staatsexamen
März 2001	Beginn der Promotionsarbeit im Labor für zelluläre kardiale Elektrophysiologie der Universitätsklinik (Prof. Dr. med. V. Kühlkamp, PD Dr. med. Ralph Bosch)
März 2003	Zweites Staatsexamen
April 2003 – April 2004	Praktisches Jahr im Klinikum am Steinenberg Reutlingen
7. Mai 2004	Drittes Staatsexamen