

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Fathema Fischer

aus Pahalgam

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.14

Charakterisierung pathophysiologischer Mechanismen hereditärer Formen von Vorhofflimmern

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Wieland

Prof. Dr. Patrick Most

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	1
Summary	2
1. Einleitung	3
1.1 Kardiale Elektrophysiologie	3
1.2 Ionenkanalkomplexe	6
1.3 Klinischer Hintergrund	7
1.4 Der kardiale $K_v1.5$ -Kanal	12
1.5 Antiarrhythmika	14
1.6 Computermodellierung atrialer Elektrophysiologie.....	16
1.7 Der Transkriptionsfaktor ZFHX3	17
1.8 Zielsetzung der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Standardchemikalien und Geräte	19
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	19
2.3 Zellkulturmethoden.....	19
2.4 Molekularbiologie	23
2.5 Microarray	30
2.6 Präparation von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	31
2.7 Elektrophysiologie	32
2.8 Computersimulation kardialen Gewebes	38
2.9 Zebrafischarbeiten	38
2.9 Datenerfassung und Auswertung	44
3. Ergebnisse	46
3.1 Mutationen im $K_v1.5$ -Kanal bieten ein Substrat für Vorhofflimmern.....	46
3.2 Inhibition von $K_v1.5$ durch Ajmalin	51
3.3 Die Rolle von ZFHX3 in der kardialen Entwicklung des Zebrafischs.....	55
3.4 Auswirkungen des ZFHX3-Knock-Downs in neonatalen Rattenkardiomyozyten.....	63
4. Diskussion	67
4.1 Der kardiale Ionenkanal $K_v1.5$ als Substrat für Vorhofflimmern.....	68
4.2 ZFHX3 als Transkriptionsfaktor der Herzentwicklung und dessen möglicher Beitrag zur Entstehung von Vorhofflimmern	71
4.3 Ausblick.....	76
4.4 Schlussfolgerung.....	78
5. Literatur	79
6. Publikationen	93
7. Danksagung	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	www.Novafeel.de
Abbildung 2	nach voigt et al., 1998
Abbildung 4	www.wikipedia.de
Abbildung 5	nach Nattel et al., 2002
Abbildung 7	nach Fischer et al., 2013
Abbildung 8	www.lifetechnologies.com
Abbildung 10	modifiziert nach Sherman-Gold, 1996

Abkürzungsverzeichnis

AF	„atrial fibrillation“
AFP	alpha fetoprotein
AP	Aktionspotential
APD	„action potential duration“, Aktionspotentialdauer
ANOVA	„Analysis of variance“
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Atrioventrikular
BCL	„basic cycle length“, Basiszyklenlänge
BCIP	5´-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat-p-Toluidinsalz
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy-DNA
CHO	„chinese hamster ovary“
cRNA	copy-RNA
DAD	„delayed afterdepolarisation“, späte Nachdepolarisation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxynukleosid-5´-triphosphat
EAD	„early afterdepolarisation“, frühe Nachdepolarisation
EKG	Elektrokardiogramm
ERP	effektive Refraktärperiode
FDR	„false discovery rate“
hERG	“human ether-à-go-go related gene”
hpf	Stunden nach der Befruchtung, hours post fertilization
$I_{Ca(L)}$	L- Typ Calciumstrom (“long lasting”)
$I_{Ca(T)}$	T- Typ Calciumstrom („tiny“)
IC_{50}	halbmaximale inhibitorische Konzentrationen
I_K	verzögert gleichrichtender Kaliumstrom (“delayed rectifier”)
I_{K1}	einwärts gleichrichtender Kaliumstrom (“inward rectifier”)
I_{Kr}	schnelle Komponente des “delayed rectifier“- Kaliumstromes
I_{Ks}	langsame Komponente des “delayed rectifier“- Kaliumstromes
I_{Kur}	ultra- schnelle Komponente des “delayed rectifier“- Kaliumstromes
I_{Na}	Natriumstrom
I_{to}	transienter Kaliumauswärtsstrom
K_{ir}	„K ⁺ inward rectifier channel“
K_v	spannungsabhängiger Kaliumkanal
LA	linkes Atrium

minK	“minimal K ⁺ channel”
MiRP1	“minK- related peptide 1”
MO	<i>Morpholino</i> , modifiziertes antisense-Oligonukleotid
mRNA	messenger RNA
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RA	rechtes Atrium
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
siRNA	„small interfering RNA“
SNP	„single nucleotide polymorphism“
SOS	"standard oocyte solution"
TdP	"Torsade de Pointes"
TMV	„transmembrane voltage“, Transmembranspannung
V _{1/2}	halbmaximale Aktivierungsspannung
VHF	Vorhofflimmern
WT	Wildtyp
ZFH3	Zinkfinger Homeobox 3

Zusammenfassung

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste Herzrhythmusstörung des Erwachsenen und ist mit einer erhöhten Mortalität und einem 5-fach erhöhten Schlaganfallrisiko assoziiert. Überwiegend entwickelt sich VHF in Folge kardialer Grunderkrankungen, wie arterieller Hypertonie oder Erkrankungen der Herzklappen. In 15 % der Fälle kann jedoch keine auslösende kardiale Grunderkrankung festgestellt werden. Man geht davon aus, dass diese so genannten „primären“ Formen durch genetische Defekte verursacht werden und bezeichnet sie daher auch als „lone atrial fibrillation“ (lone AF). Während der letzten Jahre konnten zahlreiche prädisponierende Gene identifiziert werden, allen voran Gene, die für kardiale Ionenkanalkomplexe kodieren. Aber auch Gene, die Strukturproteine und Transkriptionsfaktoren kodieren scheinen eine Rolle bei der Entstehung von VHF zu spielen. Die exakten Mechanismen der Entstehung von VHF infolge von Mutationen sind bisher nur unvollständig verstanden.

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Aspekte der Entstehung von VHF zu analysieren und somit einen besseren Einblick in die Pathomechanismen zu erlangen. Dazu wurde die Bedeutung von Mutationen, die einerseits in Ionenkanälen ($K_v1.5$) und andererseits in dem Transkriptionsfaktor ZFH3 lokalisiert sind, untersucht. Der von $K_v1.5$ geleitete Ionenstrom I_{Kur} spielt eine wesentliche Rolle in der Repolarisation des Vorhofmyokards. Entsprechend wurden zahlreiche Mutationen in $K_v1.5$ beschrieben, die mit einem gehäuften Auftreten von VHF assoziiert sind. Gleichzeitig stellt $K_v1.5$ aber auch eine interessante pharmakologische Zielstruktur für die Therapie von VHF dar. In dieser Arbeit wurden die elektrophysiologischen Effekte verschiedener $K_v1.5$ Mutationen untersucht. Mit Hilfe von Computersimulationen konnte die Auswirkung dieser Mutationen anschließend detailliert charakterisiert werden. In einem weiteren Teilprojekt wurde die Auswirkung einer pharmakologischen Inhibition von $K_v1.5$ untersucht. Hier konnte mit der Inhibition des $K_v1.5$ Kanals eine neue Seite des pharmakologischen Wirkprofils des Klasse-Ia-Antiarrhythmikums Ajmalin beschrieben werden.

Eine Mutation im Transkriptionsfaktor ZFH3 wurde mit VHF assoziiert. Die genauen Pathomechanismen sind jedoch unverstanden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Knock-Down von ZFH3 im Tiermodell (Zebrafisch) zu einem ausgeprägten kardialen Phänotyp mit Bradykardie und reduzierter Kontraktilität führt. Interessanter Weise konnten mit Hilfe einer exakten Phänotypisierung, sowie molekularer Marker eine Störung der Rechts-Links-Symmetrie nachgewiesen werden. Mit Hilfe eines Knock-Down in neonatalen Rattenkardiomyozyten mit anschließendem Microarray konnte gezeigt werden, dass ZFH3 wesentlich bei der Regulation von Genen der kardialen Muskelkontraktion, sowie von Ionenkanalproteinen beteiligt ist. Darunter fanden sich auch zahlreiche Gene, die mit der Entstehung von VHF assoziiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen maßgeblich zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Entstehung von VHF bei und können in Zukunft helfen gezieltere und damit effektivere Therapieansätze für Patienten mit VHF zu entwickeln.

Summary

Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac arrhythmia in adulthood and is associated with an increased mortality and a 5-fold higher risk of stroke. In most cases atrial fibrillation is caused by underlying cardiac disease, like arterial hypertension or heart valve defects. In 15 % of the cases no underlying triggering disease can be identified. It is assumed that these primary forms are mainly caused by genetic defects and are therefore referred to as "lone atrial fibrillation" (lone AF). In the last decades a variety of predisposing genes have been identified, beginning with genes coding for cardiac ion channel complexes. But also genes coding for structure proteins or transcription factors seem to be implicated in the generation of AF. Nevertheless the mechanisms underlying the generation and maintenance of AF are still incompletely understood.

The aim of this work was to analyze different aspects in the development of AF and thereby gain a better insight into the pathomechanisms. Therefore the role of mutations, on one hand side localized in ion channels ($K_v1.5$) and on the other hand side localized in the transcription factor ZFH3, were studied. The current I_{Kur} , which is conducted by $K_v1.5$ is essentially involved in atrial repolarization. Accordingly, numerous mutations in $K_v1.5$, which are associated with the likelihood of AF were described. At the same time $K_v1.5$ represents an interesting target for the AF therapy. In this work the electrophysiological effects of different mutations in $K_v1.5$ were analyzed. With the help of computer simulations the impact of the mutation could be regarded in detail. In another sub-project the impact of a pharmacological inhibition of $K_v1.5$ was analyzed. Thereby a new side of the profile of the class-Ia-antiarrhythmic Ajmaline was described.

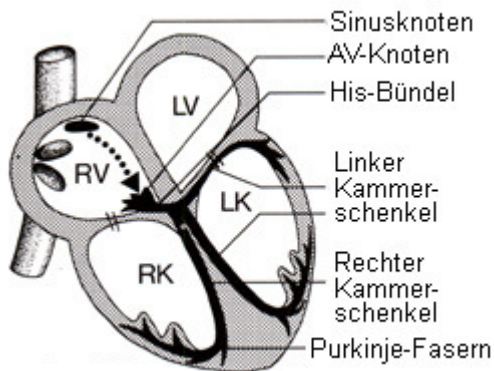
A mutation in the transcription factor ZFH3 was associated with AF. Nevertheless the underlying pathomechanisms were not understood. In this work it could be shown that the knock-down of ZFH3 in an animal model (zebrafish) evoked a distinct cardiac phenotype leading to bradycardia and loss of the heart contractility. Interestingly, after exact phenotyping and with the help of molecular markers, substantial defects in formation of correct left-right-patterning were observed. Performing a knock down in neonatal rat cardiomyocytes, and following microarray experiments, helped to show that ZFH3 is involved in the regulation of genes of the cardiac muscle contraction and of ion channel proteins. Numerous genes, being associated with atrial fibrillation, were differentially expressed after the Knock-Down.

The results of this work contribute essentially to a better understanding of the molecular mechanisms underlying the emergence of AF. In the future these findings can help establishing targeted and hence more effective therapeutic approaches for AF-patients.

1. Einleitung

1.1 Kardiale Elektrophysiologie

Bei normaler körperlicher Aktivität schlägt das menschliche Herz in einer regelmäßigen Abfolge 50 bis 80 mal in jeder Minute, d.h. ca. 100.000 mal pro Tag.



Die Erregungsausbreitung geht vom primären Schrittmacher, dem Sinusknoten aus. Hier wird die Erregung gebildet und über die Muskulatur des Vorhofs auf den Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) übertragen. Über das His-Bündel, die Tawara-Schenkel und kleinste Verzweigungen des Erregungsleitungssystems, die Purkinje-Fasern breitet sich die Erregung bis in die Ventrikel aus.

Abb. 1: Kardiales Reizleitungssystem
(www.novafeel)

So wird eine kontrollierte Abfolge aus Kontraktion (Systole) und Entspannung (Diastole) des ganzen Herzmuskels ermöglicht. Eine Besonderheit des Systems ist, dass grundsätzlich jeder Teil fähig ist eine Erregung zu bilden, sobald ein übergeordnetes Schrittmacherzentrum ausfällt (sekundäre Erregungsbildung).

Molekulare Grundlage für die elektrische Aktivität des Herzens sind Ionenströme über Ionenkanäle und Ionenpumpen. In atrialen und ventrikulären Herzmuskelzellen wurden bisher über fünfundzwanzig verschiedene Ionenkanäle identifiziert. Eine zusätzliche Regulation der Kanäle durch Hormone und intrazelluläre Mediatoren sowie verschiedene Transkriptionsfaktoren zeigt die Komplexität des Systems auf. Der genau getaktete Ein- und Ausstrom von Natrium-, Kalzium- und Kaliumionen bewirkt die Entstehung eines Aktionspotentials, das sich in fünf Phasen aufteilen lässt. Diese Phasen des typischen ventrikulären Aktionspotentials werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

Phase 0:

Kardiomyozyten weisen zunächst ein Ruhemembranpotential von ca. -85 mV auf, was annähernd dem Gleichgewichtspotential von Kaliumionen entspricht. Grund dafür ist eine hohe Permeabilität der Zellmembran für Kaliumionen, durch einwärts gleichrichtende („inward rectifier“) Kaliumkanäle der Kir Familie (Roden *et al.*, 2002). Durch eine Depolarisation kommt es zu einem Anstieg des Membranpotentials auf ca. -65 mV. Dadurch werden spannungsabhängige Natriumkanäle sehr schnell geöffnet, was eine Depolarisation auf ein Potential von 40-50 mV bewirkt. Dieser sog. „Aufstrich“ ist essentiell für Phase 0 des Aktionspotentials.

Phase 1:

Phase 1 ist durch den sog. „notch“, eine Kerbe im Verlauf des Aktionspotentials gekennzeichnet. Dabei führen die schnell inaktivierenden Natriumkanäle sowie ein kurzzeitig aktiver Kaliumstrom (I_{to}) zu einer partiellen Repolarisation. I_{to} ist jedoch nicht in jedem Bereich des Herzens in gleichem Maße vorhanden, weshalb die typische Kerbe nur in atrialen Zellen, epikardialen Zellen des Ventrikels und in Zellen der Purkinje- Fasern zu sehen ist (Carmeliet, 1992).

Phase 2:

Phase zwei zeigt ein typisches Charakteristikum des kardialen Aktionspotentials: eine über 100 ms andauernde Plateauphase. Ein solches Plateau findet sich v.a. in Purkinje-Fasern und im Arbeitsmyokard des Ventrikels (Keating und Sanguinetti, 2001). Grund für die Plateauphase sind einwärts strömende Kalziumionen durch öffnende L- Typ („long lasting“) und T- Typ („tiny“) Kalziumkanäle. Zusätzlich findet ein Ausstrom von Kaliumionen durch späte gleichrichtende Kanäle („delayed rectifier“, I_{Kur} , I_{Kr} , I_{Ks}) statt. Insgesamt strömen mehr Ionen aus der Zelle heraus, sodass eine langsame Repolarisation stattfindet. Da der absolute Ionenstrom während dieser Phase relativ gering ist, können schon kleinste Störungen der Einzelströme einen großen Einfluss auf die Dauer des Aktionspotentials haben (Keating und Sanguinetti, 2001).

Phase 3:

Durch eine Abnahme des Kalziumstroms und eine Zunahme des Kaliumstroms findet eine Repolarisation statt. Die langsame Komponente des „delayed rectifier“ Kaliumstromes I_{Ks} initiiert die Repolarisation. Die schnelle Komponente I_{Kr} nimmt während der Repolarisation stark zu, um dann schnell abzufallen, und wird daher als wichtigste Grundlage der eigentlichen Repolarisation angesehen (Sanguinetti und Jurkiewicz, 1990; Kiehn *et al.*, 1999).

Phase 4:

Am Ende der Repolarisation wird der I_{K1} - Strom wieder aktiv. Er leitet umso weniger Strom, je depolarisierter die Membran ist, gewinnt aber im hyperpolarisierten Bereich deutlich an Bedeutung (Carmeliet, 1992). Er bewirkt die Rückkehr zum Ruhemembranpotential von ca. -85 mV (Roden *et*

al., 2002) und dessen Stabilisierung bis zum Eintreffen des nächsten elektrischen Signals (Shimoni *et al.*, 1992; Nichols *et al.*, 1996).

Im Vergleich zum ventrikulären Aktionspotential zeigt das atriale Aktionspotential eine weniger depolarisierte Plateauphase (Abb. 2). Die meisten Ionenkanäle, die zur Ausbildung der charakteristischen Form des kardialen Aktionspotentials beitragen (I_{Na} , $I_{Ca,L}$, I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} , und I_{K1}), sind sowohl in atrialem als auch ventrikulärem Gewebe vorhanden. Lediglich I_{Kur} und Acetylcholin-aktivierte Kanäle ($I_{K,ACh}$) sind ausschließlich im Atrium exprimiert (Voigt *et al.*, 2010).

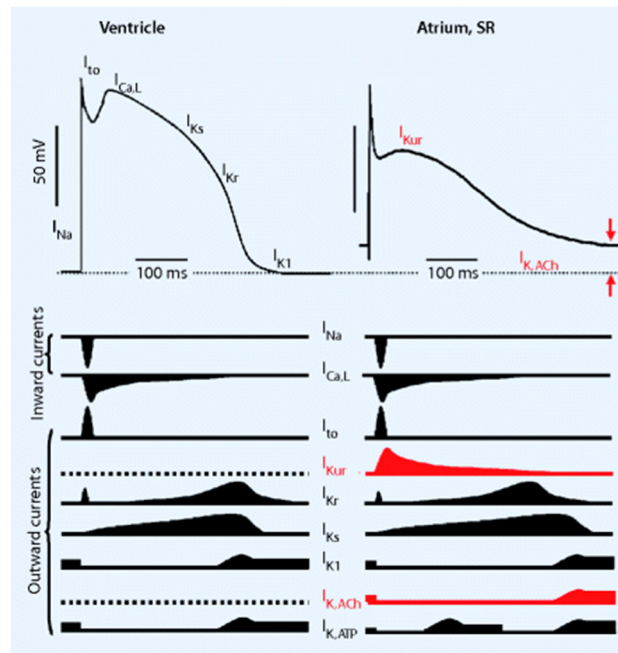


Abb. 2: Schematischer Ablauf verschiedener Aktionspotentiale

Links: ventrikuläres Aktionspotential; Rechts: Atriales Aktionspotential; Im unteren Teil sind schematische Zeitverläufe der einzelnen Ströme zu sehen (rot: nur im atrialen Myokard vorhanden), Die roten Pfeile verdeutlichen die Unterschiede des Ruhemembranpotentials im Vergleich zum ventrikulären Myokard (nach (Voigt *et al.*, 2010))

Nach ca. 300 ms ist das kardiale Aktionspotential terminiert. Die durch die Inaktivierung der Na^+ -Kanäle hervorgerufene Refraktärperiode, die die charakteristische Plateauphase ausmacht, dient dabei als Schutzmechanismus vor zu schnellen, unkoordinierten Kontraktionen, die zu Kammerflimmern und damit zum Tod führen können. Die elektrischen Spannungsänderungen, die über den Herzmuskel laufen, können mit Hilfe von Elektroden über die Körperoberfläche abgeleitet und zeitlich in einem Elektrokardiogramm (EKG) dargestellt werden. So werden Veränderungen in der Erregungsausbreitung sichtbar.

1.2 Ionenkanalkomplexe

Spannungsgesteuerte Ionenkanäle stellen die molekulare Grundlage des Aktionspotentials dar. Diese Kanäle zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich in Abhängigkeit des Membranpotentials öffnen bzw. schließen. Sie weisen in ihrer Aminosäuresequenz geladene Aminosäuren auf, die sich bei Änderungen im elektrischen Feld über die Membran verschieben können. Durch diese Verschiebung einzelner Aminosäuren wird eine Konformationsänderung des ganzen Proteins ausgelöst, was zum Öffnen oder Schließen der Kanalpore führt. Die Kanäle bestehen aus einer porenbildenden α -Untereinheit, sowie akzessorischen β -Untereinheiten. Dabei lagern sich zunächst mehrere α -Untereinheiten, also homomere Proteine, so zusammen, dass sie in der Membran eine wassergefüllte Pore bilden. Durch diese Pore wird der Ionenstrom geleitet. In den meisten Fällen lagert sich zusätzlich eine regulatorische β -Untereinheit an, die wichtige Eigenschaften wie Aktivierung, Inaktivierung und die Sensitivität gegenüber Pharmaka beeinflusst (Roden *et al.*, 2002). Die β -Untereinheiten sind in den meisten Fällen auf der intrazellulären Seite der Membran lokalisiert (Abb. 3). Spannungsgesteuerte Ionenkanäle bestehen aus vier α -Untereinheiten, die eine Pore bilden. Die einzelnen Untereinheiten besitzen jeweils sechs Transmembrandomänen, (S1-S6) wobei das Verbindungsstück zwischen Domäne 5 und 6 dem Poreninneren zugewandt ist (S5-S6). Die S4-Domäne dient als Spannungssensor (Sansom, 2000). β -Untereinheiten können sowohl über kovalente als auch nicht-kovalente Bindungen mit der α -Untereinheit verknüpft sein (Isom *et al.*, 1992). Im Zellinneren können bis zu vier β -Untereinheiten mit einer α -Untereinheit assoziieren.

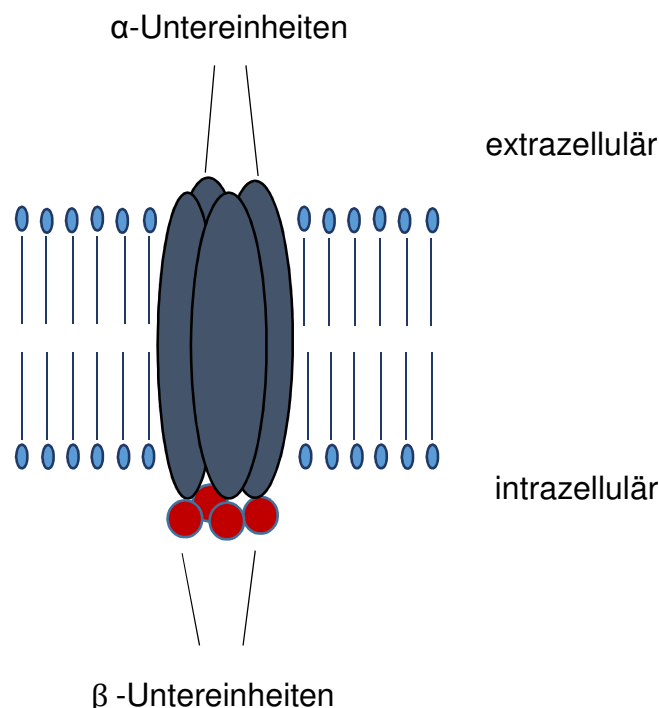


Abb. 3: Schematischer Aufbau eines Ionenkanalkomplexes

Die einzelnen β -Untereinheiten können sich mit verschiedenen α -Untereinheiten zusammenlagern.

Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung einzelner Ionenkanäle des Herzens.

Ionenstrom	α - Untereinheit	β - Untereinheit	Referenz
I _{Na}	SCN5A	β_1, β_2	(Isom <i>et al.</i> , 1994)
I _{Ca L- Typ}	α_1C	$\beta_1, \beta_2, \alpha_2\delta$	(Schultz <i>et al.</i> , 1993; Chien <i>et al.</i> , 1995; De Jongh <i>et al.</i> , 1990)
I _{Ca T- Typ}	$\alpha_1H, (\alpha_1G)$	$\alpha_2\delta$	(Perez-Reyes <i>et al.</i> , 1998; De Jongh <i>et al.</i> , 1990)
I _{TO}	Kv4.3, Kv1.4	-	(Nabauer <i>et al.</i> , 1996)
I _{Ks}	KCNQ1 (KvLQT1)	KCNE1 (minK)	(Barhanin <i>et al.</i> , 1996; Sanguinetti <i>et al.</i> , 1996)
I _{Kr}	KCNH2 (HERG)	KCNE1 (minK), KCNE2 (MiRP1)	(Sanguinetti <i>et al.</i> , 1996; Warmke und Ganetzky, 1994; McDonald <i>et al.</i> , 1997; Abbott <i>et al.</i> , 1999)
I _{K1}	Kir2.1/Kir2.2	-	(Plaster <i>et al.</i> , 2001; Wible <i>et al.</i> , 1995)

Tabelle 1: Molekulare Zusammensetzung der wichtigsten Ionenströme des Herzens

1.3 Klinischer Hintergrund

1.3.1 Verlauf von Vorhofflimmern

Bei Vorhofflimmern (VHF) kommt es zu einer hochfrequenten unregelmäßigen Aktivierung des atrialen Gewebes. Durch die Filterfunktion des AV-Knotens wird davon nur ein Teil an den Ventrikel übergeleitet. So kommt es zu einem unregelmäßigen und schnellen Puls, was innerhalb von Tagen oder Wochen zu einer Herzinsuffizienz führen kann. Durch den Verlust einer koordinierten Kontraktion des Atriums kann sich außerdem die Pumpleistung des Herzens verschlechtern. Bei schon beeinträchtigten Herzen kann dies zu einer Herabsetzung der Belastbarkeit führen. Aufgrund des veränderten Blutflusses in den Atrien können sich Thromben bilden, die sich lösen, und an anderer Stelle Embolien verursachen können. Das Risiko für Schlaganfälle ist in VHF-Patienten bis zu 5-fach erhöht (Go *et al.*, 2013a).

Nach der aktuellen Leitlinie der europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) lässt sich Vorhofflimmern nach der Dauer des Bestehens in folgende Formen einteilen: erstmals entdeckt, paroxysmal (< 7 Tage), persistierend (kann durch Kardioversion beendet werden), lang anhaltend persistierend (über 1 Jahr vorhanden, aber mit rhythmuserhaltender Behandlung) oder permanent (ohne rhythmuserhaltende Behandlung). Neben der Feststellung einer unregelmäßigen und zu schnellen Herzrate dient auch ein Elektrokardiogram (EKG) der Diagnose von VHF. Die „Vorhofwellen“ (P-Wellen) sind nicht zu sehen, stattdessen besteht oft das unregelmäßige Flimmern der Grundlinie. Unregelmäßig auftretende QRS-Komplexe lassen Vorhofflimmern manchmal besser erkennen als diese Flimmerwellen (Abb. 4).



Abb. 4: EKG-Verlauf bei Vorhofflimmern (oben) und im Sinusrhythmus (unten).
Blauer Pfeil: P-Welle; Roter Pfeil: Flimmerwelle (www.wikipedia.de)

Zur Therapie von Vorhofflimmern kann eine medikamentöse oder elektrische Kardioversion herangezogen werden. Falls der Verlauf nicht befriedigend ist, kann auch eine Ablation durchgeführt werden. Um Gebiete elektrisch zu isolieren, die als Substrat für VHF dienen können, werden in einer Herzkatheterprozedur kreisförmige Läsionen um die Mündungen der Pulmonalvenen angelegt. Zusätzlich sollten im Rahmen der Embolieprophylaxe stets Antikoagulantien wie Acetylsalicylsäure (ASS) oder Cumarine verabreicht werden.

1.3.2 Entstehung von Vorhofflimmern

Es existieren verschiedene Erklärungsansätze für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern (Abb.5, (Nattel, 2002)). Im ersten Modell gibt es fokale Erregungszentren, die schnelle elektrische Impulse generieren und so Extrasystolen im Vorhof erzeugen (Abb. 5 a). Diese Zentren können im Vorhof selbst oder in den Pulmonalvenen liegen. Eine mögliche Ursache besteht darin, dass der NCX ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher) infolge eines intrazellulären Kalzium Überschusses oder einer Hochregulation einen Netto-Einwärtsstrom an positiver Ladung bewirkt. Dadurch können

Nachdepolarisationen und, sobald der Schwellenwert überschritten wird, ektope Erregungen entstehen. Im zweiten Modell liegt ein sog. „mother rotor“ vor (Abb. 5 b). Darunter versteht man einen organisierten schnellen Erregungskreis, für dessen Entstehung eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer oder eine Verlängerung der Refraktärperiode erforderlich ist. Ein Substrat hierfür können intrinsische Faktoren wie verminderte Einwärtsströme oder vermehrte Auswärtsströme bzw. fibrotisches Gewebe sein. Die Erregungsfront trifft dann auf ein noch refraktäres Areal, das umgangen wird, jedoch nach Ablauf der Refraktärzeit von der anderen Seite depolarisiert wird. Bei der dritten Theorie gibt es viele kleine und instabile elektrische Erregungskreise, die sog. „wavelets“ (Abb. 5 c). Diese erzeugen elektrisches Chaos und die typischen Flimmerwellen im Vorhof.

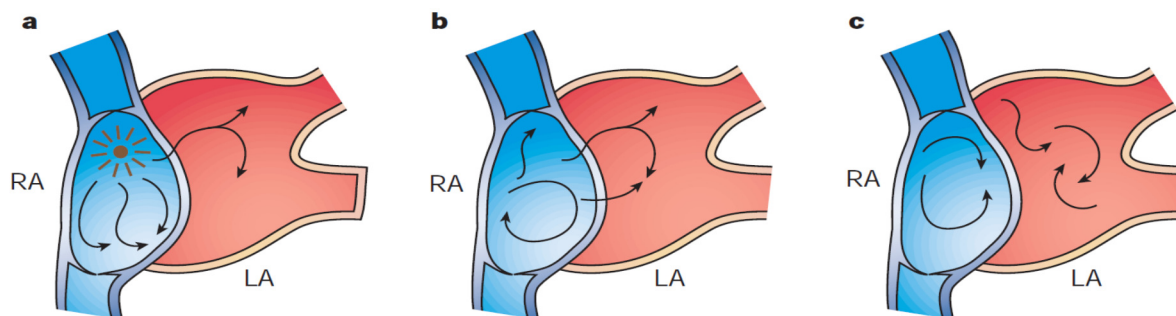


Abb. 5: Konzeptuelle Modelle über die Entstehung von Vorhofflimmern
a: ektope Erregungszentrum; b: single-reentry-Kreis; c: multiple-wavelets.
LA: linkes Atrium; RA: rechtes Atrium. (nach (Nattel, 2002).

In den letzten 50 Jahren wurde das Modell der „multiple wavelets“ favorisiert und der Begriff der „Wellenlänge“ geprägt (Moe *et al.*, 1964). Darunter versteht man die Distanz, die ein elektrischer Impuls während einer Refraktärperiode zurücklegt. Sie ist das Produkt aus der Refraktärzeit und der Leitungsgeschwindigkeit (Rensma *et al.*, 1988). Wenn sich eine Erregungsfront im atrialen Myokard fortpflanzt, befindet sich hinter der Front refraktäres Gewebe. Um eine kreisende Erregungen hervorzurufen, muss der Weg, den die Erregungsfront zurücklegt, lang genug sein, damit die Kardiomyozyten am Anfang eines re-entry Kreises beim Wiederkehren der Erregung nicht mehr refraktär sind. Wenn die Strecke des möglichen Kreislaufes kleiner als die Wellenlänge ist, kann der Impuls den Kreislauf durchqueren und ist am Ausgangspunkt bevor die Refraktärperiode vorbei ist, was seine Unterbrechung zur Folge hat. Die Dauer der Refraktärperiode ist abhängig von der Aktionspotentialdauer, welche wiederum von den intrinsischen Ionenströmen des atrialen Gewebes geprägt ist. Die Leitungsgeschwindigkeit ist abhängig von Natriumströmen und Konnexinen. Eine Möglichkeit die Bildung von re-entry-Kreisen zu unterbrechen besteht darin, die Refraktärzeit zu verlängern (z.B. durch eine Reduktion der Auswärtsströme). Dadurch verlängert sich auch die Wellenlänge, sodass die Erregungskreise eliminiert werden.

Vorhofflimmern selbst bewirkt Veränderungen im Gewebe, die ihrerseits wieder Vorhofflimmern begünstigen (Wijffels *et al.*, 1995). Dieser Vorgang wird als „remodelling“ bezeichnet. Man unterscheidet dabei elektrisches remodelling von strukturellem remodelling. Bei ersterem wird durch eine veränderte Elektrophysiologie des Gewebes (z.B. veränderte Expression von Ionenkanälen oder Gap junction Proteinen) die effektive Refraktärperiode (ERP) verkürzt, was die Entstehung von VHF über reentry, hervorrufen kann (Nattel *et al.*, 2008). Bei strukturellem remodelling bedingt eine morphologische Veränderung (z.B. Vorhoffibrose, Verlust von Sarkomeren) die atriale Erregungsbildungs- oder Erregungsleitungsstörung (Ausma *et al.*, 1997). Eine klare Differenzierung zu schon vorher bestehenden Gewebealterationen ist nicht immer möglich. Das Ausmaß des remodelling entscheidet über den Therapieerfolg nach Kardioversion oder Ablation.

1.3.3 Hereditäres Vorhofflimmern

Vorhofflimmern (VHF) ist eine Krankheit, die die Lebensqualität beeinträchtigt, aber auch schwerwiegende Komplikationen wie Schlaganfall oder sogar plötzlichen Herztod haben kann (Go *et al.*, 2013). VHF ist die häufigste Ursache eines ischämischen Schlaganfalls bei Personen, die älter als 75 Jahre sind (Hart und Halperin, 2001). Die Prävalenz von VHF zeigt eine eindeutige Altersabhängigkeit: sie beträgt 0,5 % bei unter 40-jährigen, 5 % bei über 65-jährigen und sogar über 10 % bei über 80-jährigen, wobei Männer stets häufiger betroffen sind als Frauen (Rutzen-Lopez *et al.*, 2011). Die Altersabhängigkeit liegt darin begründet, dass VHF in den meisten Fällen mit kardialen Grunderkrankungen, wie Hypertonie, Koronarerkrankungen oder Klappenfehlern, verknüpft ist. Solche Erkrankungen häufen sich mit zunehmendem Alter.

Dem gegenüber stehen die primären Formen von VHF. Dabei entsteht das VHF idiopathisch, d.h. es kann keine krankhafte Veränderung des Herzens festgestellt werden und die Symptome zeigen sich häufig schon in der Jugend. Verschiedene Studien zeigen dabei sehr unterschiedliche Anteile an der Gesamtheit der VHF-Patienten. Die Zahlen reichen von 2,7 % (Kopecky *et al.*, 1987) bis 30 % (Levy *et al.*, 1999), je nach Auswahl der Kriterien. Neben Risikofaktoren wie Alkohol- und Tabakkonsum, Persönlichkeitsstrukturen, body mass index und körperlicher Aktivität sind auch genetische Defekte für die primären Formen von VHF verantwortlich. Man spricht in diesen Fällen von hereditärem VHF oder auch von „lone atrial fibrillation“ (lone AF). Der Begriff der „lone auricular fibrillation“ wurde 1954 durch Evans und Swann eingeführt (Evans und Swann, 1954). Dabei besteht ein elektrisches „Problem“, das Einfluss auf die Eigenschaften der Erregungsleitung im Vorhofgewebe verändert und chaotische „Flimmerwellen“ erzeugt. Dabei gibt es verschiedene Mutationen und Einzelnukleotidpolymorphismen („single nucleotide polymorphism“, SNP) in verschiedenen Ionenkanal- und Nicht-Ionenkanal-Genen, die über eine Beeinflussung der elektrischen Eigenschaften des Herzens mit erhöhter VHF-Inzidenz assoziiert sind. Z.B. kann eine Mutation im Kv1.5-Kanal dazu führen, dass durch diesen Kanal mehr Strom fließt (gain of function

Mutation) und die Repolarisation dadurch beschleunigt wird. Durch die Veränderung der Aktionspotentialdauer und damit auch der effektiven Refraktärperiode kann VHF ausgelöst werden (siehe Abschnitt 1.3.2 „Entstehung von Vorhofflimmern“). Zum jetzigen Zeitpunkt sind 52 genetische Veränderungen mit VHF in Verbindung gebracht worden. Solche monokausalen Syndrome eignen sich hervorragend, die grundlegenden Pathomechanismen von VHF besser zu verstehen, da sie jeweils isolierte Veränderungen in den elektrischen Eigenschaften des Herzgewebes aufweisen.

In Tabelle 2 sind die bisher mit Vorhofflimmern in Verbindung gebrachten Mutationen und SNPs zusammengefasst.

Gen	Genprodukt	Beschriebene Mutationen oder SNPs	Referenzen
KCNQ1	α -Untereinheit von K_v LQT1	S140G, R231C, S209P, V141M, G229D	(El Harchi <i>et al.</i> , 2010; Henrion <i>et al.</i> , 2012), (Das <i>et al.</i> , 2009), (Restier <i>et al.</i> , 2008) (Hasegawa <i>et al.</i> , 2013),
KCNE2	β -Untereinheit von K_v LQT1 (MirP1)	R27C	(Yang <i>et al.</i> , 2004)
KCNJ2	α -Untereinheit von Kir2.1	V93I	(Kharche <i>et al.</i> , 2008)
KCNJ5	α -Untereinheit von Kir3.4	Rs6590357, rs7118824	(Jabbari <i>et al.</i> , 2011)
GJA5	Konnexin 40		(Wirka <i>et al.</i> , 2011)
KCNE1	β -Untereinheit von K_v LQT1 (MinK)	G38S, G25V, G60D rs1805127	(Liang <i>et al.</i> , 2013; Prystupa <i>et al.</i> , 2006; Liang <i>et al.</i> , 2013)
KCNA5	α -Untereinheit von K_v 1.5	A576V, T527M, E610K, E375X, E48G, Y155C, A305T, D322H, D469E, P488S	(Yang <i>et al.</i> , 2009; Yang <i>et al.</i> , 2009; Christophersen <i>et al.</i> , 2013; Olson <i>et al.</i> , 2006)
ANK2	Ankyrin 2	E1425G	(Mohler <i>et al.</i> , 2004)
KCNH2	α -Untereinheit von hERG	K897T, N588K	(Sinner <i>et al.</i> , 2008; Cordeiro <i>et al.</i> , 2005)
ABCC9	β -Untereinheit von K_{ATP}	T1547I	(Olson <i>et al.</i> , 2007)
KCNE3	β -Untereinheit von K_v 4.3 (MirP2)	V17M, R53H	(Lundby <i>et al.</i> , 2008; Zhang <i>et al.</i> , 2005)
KCNE5	β -Untereinheit von K_v LQT1 (MirP4)	L65F	(Ravn <i>et al.</i> , 2008)
SCN5A	α -Untereinheit von Na_v 1.5	E428K, H445D, E655K, N470K, M1875T	(Yang <i>et al.</i> , 2009)
SCN1B	β -Untereinheit von Na_v 1.5	R85H, D153N	(Watanabe <i>et al.</i> , 2009)

SCN2B	β -Untereinheit von Na _v 1.5	R28Q, R28W	(Watanabe <i>et al.</i> , 2009)
SCN3B	β -Untereinheit von Na _v 1.5	A130V	(Olesen <i>et al.</i> , 2011)
GJA1	Connexin-43	rs35594137, G-44A	(Wirka <i>et al.</i> , 2011)
GATA4	Gata4 (Transkriptionsfaktor)	M247T, A411V, G16C , H28D	(Posch <i>et al.</i> , 2010; Jiang <i>et al.</i> , 2011)
NPPA	Atriales natriuretisches Peptid (ANF)	Rs5063, rs5065	(Ren <i>et al.</i> , 2010)
KCNN3	SK3 (small-conductance calcium-activated K(+) channel)	rs13376333	(Chang <i>et al.</i> , 2012)
PITX2	Pitx2 (Transkriptionsfaktor)	rs2200733 (nur in der Nähe von Pitx2)	(Olesen <i>et al.</i> , 2012)
ZFHX3	Zfx3 (Transkriptionsfaktor)	rs2106261	(Li <i>et al.</i> , 2011)
NUP155	Nucleoporin	R391H	(Zhang <i>et al.</i> , 2008)

Tabelle 2: Zusammenfassung aller genetischen Veränderungen, die bisher mit Vorhofflimmern assoziiert werden konnten

Indem man die funktionellen Zusammenhänge dieser Veränderungen mit der Entstehung von VHF aufklärt, kann man auch ein besseres Verständnis der wesentlich häufiger auftretenden, sekundären Formen des Vorhofflimmerns erlangen, was die Entwicklung zielgerichteter Therapieverfahren ermöglicht.

1.4 Der kardiale K_v1.5-Kanal

1.4.1 Struktur des K_v1.5-Kanals

Innerhalb der Familie der Ionenkanäle bilden die Kalium-Kanäle die heterogenste Gruppe (Perney und Kaczmarek, 1991). Im Menschen gibt es über 50 Kaliumkanal-Gene, wobei man die Kanäle zunächst nach der Art ihrer Aktivierung unterscheiden kann: es gibt spannungsaktivierte, Kalzium-aktivierte, G-Protein-aktivierte, mechanisch-aktivierte und ATP-sensitive Kanäle.

Kalium-Kanäle sind essentiell für die korrekte Ausbildung des kardialen Aktionspotentials, spielen aber auch eine große Rolle in Nervenzellen (Johnston *et al.*, 2010) und im endokrinen System (Fridlyand *et al.*, 2013). Im kardialen Aktionspotential sind die spannungsabhängigen Kaliumkanäle der K_v-Familie entscheidend, da sie für die Repolarisation der Kardiomyozyten sorgen. Sie öffnen

aufgrund einer Änderung der Membranspannung, und sorgen für einen Ausstrom von Kalium-Ionen und damit für eine Verschiebung des intrazellulären Potentials in den negativeren Bereich. Die K_v -Familie kann wiederum in verschiedene Subfamilien unterteilt werden. K_v1 (Shaker), K_v2 (Shab), K_v3 (Shaw) und K_v4 (Shal) bestehen jeweils aus einer porenbildenden α -Untereinheit, die mit einer regulatorischen β -Untereinheit assoziieren können. Eine α -Untereinheit besteht aus sechs hydrophoben Transmembrandomänen mit einer Poren-Domäne (P) zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne. Die vierte Transmembrandomäne ist teilweise positiv geladen und agiert mit den Transmembrandomänen eins bis drei als Spannungssensor, der die Konformationsänderung bewirkt, die zum Öffnen der Kanalpore beiträgt (Sansom, 2000). Vier solcher α -Untereinheiten lagern sich zu Homotetrameren zusammen und bilden eine funktionsfähige Kanalpore (Abb. 6).

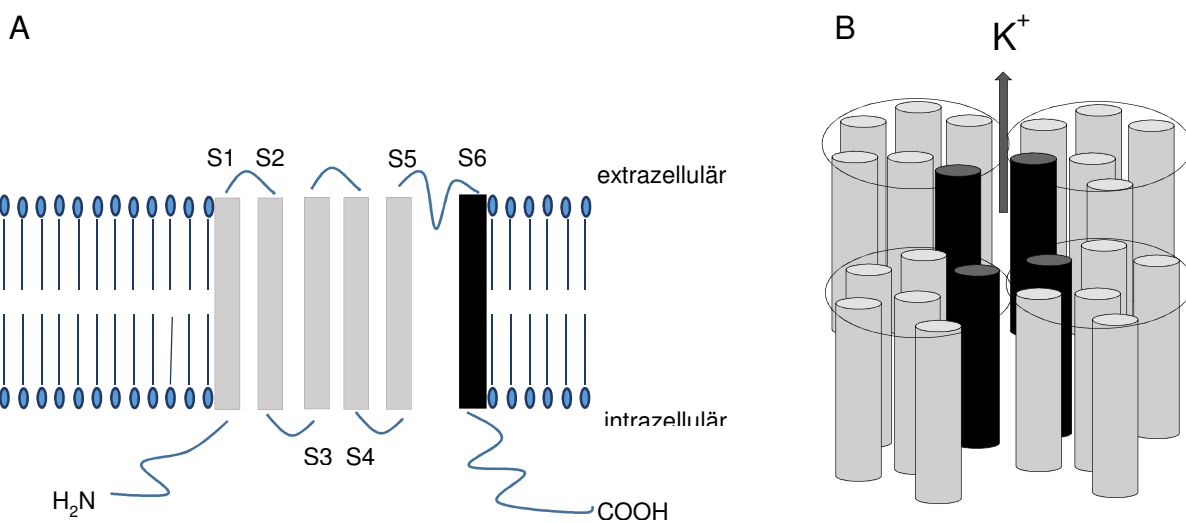


Abb. 6: **A:** Aufbau einer α -Untereinheit aus 6 Transmembrandomänen; **B:** 4 α -Untereinheit lagern sich zu einer Kanalstruktur zusammen; schwarz: S6-Domäne

Das zuerst beschriebene Gen eines spannungsabhängigen Kaliumkanals ist das sog. „shaker“-Gen, das in der Fruchtfliege entdeckt wurde. Mittlerweile gehören sechs Kanäle zu dieser shaker- oder K_v1 -Familie ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$, $K_v1.4$, $K_v1.5$ und $K_v1.6$), die jeweils spezifische physiologische Aufgaben übernehmen. Im folgenden Abschnitt wird der Ionenkanal $K_v1.5$ genauer beschrieben, Dieser spielt eine besondere Rolle, da er nur für die Repolarisation im Atrium, nicht jedoch im Ventrikel, entscheidend ist. Der resultierende Strom ist der Ultra-rapid delayed rectifier Strom (I_{Kur}).

1.4.2 Kinetik des Ultra-rapid delayed rectifier Stroms (I_{kur})

Innerhalb des menschlichen Aktionspotentials besitzen verschiedene Ionenkanäle sehr spezifische Aufgaben, die sie durch ihre unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften ausüben können (siehe 1.1: „kardiale Elektrophysiologie“). Man kann zunächst die einwärts- und die auswärts- gleichrichtenden Kanäle unterscheiden, bei denen entsprechend der Einwärts- bzw. Auswärtsstrom der Kaliumionen überwiegt. Zur Repolarisation einer Zelle tragen der langsam (I_{ks}), der schnell (I_{kr}), sowie der ultraschnell (I_{kur}) aktivierende gleichrichtende Kaliumstrom bei (Nerbonne, 2000).

Wie der Name sagt, handelt es sich bei I_{kur} um einen sehr schnell aktivierenden Kaliumstrom, der jedoch keine relevante Inaktivierung aufweist. Die molekulare Grundlage von I_{kur} stellt der $K_v1.5$ -Kanal dar (Feng *et al.*, 1997). Es konnte bereits 1993 gezeigt werden, dass ein heterolog exprimierter $K_v1.5$ -Kanal, die gleiche Kinetik wie I_{kur} aufweist (Fedida *et al.*, 1993). $K_v1.5$ kann zusätzlich mit regulatorischen β -Untereinheiten assoziieren, die Einfluss auf das „Trafficking“, die Integration in die Plasmamembran, sowie Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften des Kanals haben (Uebele *et al.*, 1998).

Sowohl die mRNA, als auch das Protein von $K_v1.5$ kann in Atrium und Ventrikel nachgewiesen werden (Mays *et al.*, 1995). Der Ionenstrom I_{kur} kann in den meisten Spezies jedoch nur im Atrium nachgewiesen werden, während er im Ventrikel abwesend ist. Diese Tatsache weckt natürlich die Hoffnung auf ein selektives Target in der Therapie von Vorhofflimmern. Durch eine Blockade von I_{kur} könnte man antiarrhythmische Therapien durchführen, ohne proarrhythmische Effekte im Ventrikel zu provozieren. In den letzten Jahren wurden einige Pharmaka mit diesem Ziel entwickelt (Ford und Milnes, 2008), der Erfolg war bisher leider noch nicht zufrieden stellend (Ravens, 2010). Diese Tatsache lässt sich wohl dadurch erklären, dass spannungsabhängige Ionenkanäle stark konservierte Strukturen aufweisen (Decher *et al.*, 2004). So hat z.B. das Biphenyl-Derivat AVE0118 gleichzeitig einen Effekt auf I_{to} und $I_{K,ACH}$ (Gogelein *et al.*, 2004). Um $K_v1.5$ als therapeutisches Ziel nutzen zu können, sind weitere detaillierte Analysen seiner kinetischen Eigenschaften notwendig. Die vorliegende Arbeit kann dazu einen Teil beitragen.

1.5 Antiarrhythmika

Zu den Antiarrhythmika zählen Medikamente, die der Behandlung von Herzrhythmusstörungen dienen. Diese werden klassischerweise in vier Klassen unterteilt (nach Vaughan *et al.*, 1970), wobei ein Antiarrhythmikum auch Eigenschaften mehrerer Klassen aufweisen kann. Zur Klasse I gehören Natriumkanalblocker, zur Klasse II Betablocker, zur Klasse III Kaliumkanalblocker und zur Klasse IV Kalziumkanalblocker. Es gibt auch Antiarrhythmika, die in keine der Klassen eingeordnet werden können, wie z.B. Adenosin, Digitalisglykoside oder Parasympatholytika. Alle Antiarrhythmika können

auch proarrhythmogen wirken, weshalb ihre Gabe besonders überwacht werden muss.

1.5.1 Das Antiarrhythmikum Ajmalin

Ajmalin stellt stofflich ein Indolalkaloid aus den Wurzeln der indischen Schlangenzwurz (*Rauwolfia serpentina*) dar. Es gehört zu den Klasse-Ia-Antiarrhythmika (nach Vaughan Williams Klassifikation) und wird in Deutschland unter dem Handelsnamen Gilurytmal zur Behandlung von Herzrhythmusstörungen eingesetzt. Bereits 1956 wurde die antiarrhythmische Wirkung beschrieben (Arora und Madan, 1956). Es wird von einer Inhibition des schnellen Natriumstrom der Phase 0 des kardialen Aktionspotentials ausgegangen, wodurch sich die Depolarisation verlangsamt und die Aktionspotentialdauer verlängert. Auf molekularer Ebene konnten aber auch Interaktionen mit anderen Ionenkanälen gezeigt werden (Friedrich *et al.*, 2007; Khodorov und Zaborovskaya, 1986; Kiesecker *et al.*, 2004; Kohlhardt *et al.*, 1989; Sakuta *et al.*, 1992). Ajmalin wird in der Klinik aber auch eingesetzt, um Erkrankungen wie das Brugada-Syndrom zu diagnostizieren (Brembilla-Perrot, 2010) oder infra-Hisäre Leitungsstörungen zu demaskieren (Wolpert *et al.*, 2005). Wie andere antiarrhythmische Substanzen hat auch Ajmalin Nebenwirkungen wie Proarrhythmie und Leitungsblock (Dhein *et al.*, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass Ajmalin im *Xenopus*-Expressionssystem einen inhibitorischen Effekt auf K_v1.5-Kanäle besitzt, dieser wurde jedoch nicht weiter charakterisiert (Rolf *et al.*, 2000).

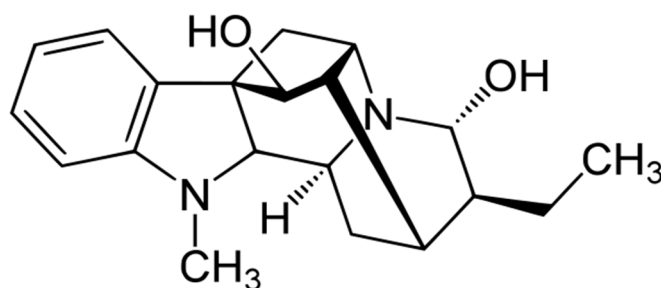


Abb. 7: Strukturformel von Ajmalin (Fischer *et al.*, 2013)

1.6 Computermodellierung atrialer Elektrophysiologie

Um die Funktion des Herzens besser verstehen und nachvollziehen zu können werden zunehmend Computermodelle genutzt. Dabei werden die zuvor generierten biologischen Daten in ein mechanistisches Modell des Gewebes integriert. In diesen Modellen können Veränderungen bestimmter Eigenschaften (z.B. Mutationen in Ionenkanälen) dargestellt und analysiert werden. Ziel ist es, pharmakologische Therapien in einem physiologischen Setting testen zu können. Elektrophysiologische *in-silico*-Modelle bestehen aus drei Hauptkomponenten: (1) einer naturgetreuen Abbildung der anatomischen Strukturen, (2) einer Simulation der physiologischen Erregungsausbreitung und (3) realistischen Modellen der zellulären Elektrophysiologie. Zunächst werden Daten aus bildgebenden Systemen der Medizin, wie Magnet-Resonanz- oder Computer-Tomogramme herangezogen, um die anatomische Grundlage darzustellen. Die Simulation der inhomogenen und anisotropen Ausbreitung der elektrischen Erregung im kardialen Gewebe erfolgt mit Hilfe gekoppelter Poisson-Gleichungen ("Bidomain"-Modell). Hierbei wird berücksichtigt, dass die Zellen sowohl direkt ("Gap-Junctions"), als auch indirekt (extrazelluläre Flüssigkeit) in elektrischem Kontakt stehen. Die elektrophysiologischen Zellmodelle bestehen aus nichtlinear gekoppelten Differentialgleichungen erster Ordnung. Diese Gleichungen beschreiben den zeitlichen Verlauf der Transmembranspannung, der Transmembranströme und -leitfähigkeiten sowie intra- und extrazelluläre Ionenkonzentrationen. Einzelne Ionenkanäle werden über Kombinationen von „Hodgkin-Huxley-type“ Ionenkanalgleichungen im Modell integriert.

Da derzeit die räumliche und zeitliche Auflösung der Diagnostikkatheter nicht gut genug ist, lassen sich die Abläufe bei Vorhofflimmern nur bedingt durch invasive Messungen darstellen oder untersuchen. Mit Hilfe zwei- oder dreidimensionaler Computermodelle konnten bereits wichtige Einblicke in pathophysiologische Mechanismen von Vorhofflimmern erlangt werden (Krummen *et al.*, 2012) (Bers und Grandi, 2011). Die erste Modellierung atrialer Elektrophysiologie wurde 1999 von Courtemanche *et al.* etabliert (Courtemanche *et al.*, 1999). Dieses Modell hat sich auf die transmembranen Ionenkanäle des Aktionspotentials konzentriert, aber das intrazelluläre Kalzium-Handling vernachlässigt. Maleckar *et al.* haben die Beschreibung der Kaliumströme verbessert, jedoch immer noch kein Augenmerk auf Kalziumionen gelegt (Maleckar *et al.*, 2009). Eine erste Verbesserung stellte die Modellierung durch Koivumaki *et al.* 2011 dar (Koivumaki *et al.*, 2011). Grandi *et al.* haben das neueste Modell mit Daten des Kalzium-Handlings bei physiologischer Temperatur entwickelt (Grandi *et al.*, 2011). Mittlerweile sind die Modelle sehr komplex und tragen einen Teil dazu bei, die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern besser verstehen zu können.

1.7 Der Transkriptionsfaktor ZFH3

ZFH3 ist ein Transkriptionsfaktor, der in seiner Proteinstruktur 4 Homeodomänen und 17 Zinkfinger motive besitzt (Morinaga *et al.*, 1991). Es ist bekannt, dass ZFH3 die myogene und neuronale Differenzierung reguliert (Berry *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2005). Es unterdrückt die Expression des alpha-Fetoproteins (AFP), indem es an ein AT-reiches Enhancer-Motiv bindet. Daher stammt auch der ursprüngliche Name ATBF1 für „AT binding factor 1“. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es die Expression von c-Myb negativ reguliert und dadurch den Zellzyklus Inhibitor p21CIP1 transaktiviert (Kaspar *et al.*, 1999). Aus diesem Grund kann ZFH3 als Tumorsuppressor bezeichnet werden. Es wurden z.B. Mutationen beschrieben, die mit Prostatakrebs assoziiert sind (Sun *et al.*, 2005).

Des Weiteren hat sich herausgestellt, dass ZFH3 auch bei der Pathologie des Herzens eine entscheidende Rolle zukommt. 2009 wurde in einer ersten Genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) ein Zusammenhang von ZFH3 mit Vorhofflimmern aufgezeigt (Gudbjartsson *et al.*, 2009). In dieser Studie wurde zusätzlich eine Assoziation mit ischämischem und kardioembolischem Schlaganfall angeführt. 2009 und 2011 wurden zwei weitere GWAS durchgeführt, die einen Zusammenhang von ZFH3 mit Vorhofflimmern bestätigen konnten (Benjamin *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011). Bisher können zwei SNPs (single nucleotide polymorphisms) dafür verantwortlich gemacht werden: rs2106261 und rs7193343. Schon 2007 wurde neben ZFH3 auch der Transkriptionsfaktor Pitx2 mit Vorhofflimmern assoziiert (Gudbjartsson *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Pitx2 eine Rolle im Rechts-Links-Patterning spielt und das Genprogramm für die spontane Automatie im linken Atrium unterdrückt. Wenn die Pitx2-Funktion gestört ist, könnte das zu einer ektopen Bildung von Erregungsbildungszentren führen. Das stellt eine Erklärung für die Entstehung von Vorhofflimmern dar (Franco *et al.*, 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass im heterozygot mutanten Mausmodell die Expression von Gap und tight junction Proteinen sowie verschiedener Kaliumkanäle gestört ist (Kahr *et al.*, 2011). Auch dies erklärt die Entstehung von Vorhofflimmern aufgrund einer veränderten Expression des Transkriptionsfaktors Pitx2. Im Gegensatz dazu ist der Zusammenhang von ZFH3 mit Vorhofflimmern noch völlig unklar und soll in dieser Arbeit aufgeklärt werden.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Der ultraschnell aktivierende „delayed rectifier“ Kaliumstrom I_{kur} ist essentiell für die atriale Repolarisation im menschlichen Herzen. Seine molekulare Grundlage wird durch den Kaliumkanal $K_v1.5$ repräsentiert. Eine gesteigerte Aktivität des $K_v1.5$ -Kanals bewirkt eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer und der effektiven Refraktärperiode, was die Bildung von Vorhofflimmern (VHF) begünstigt (Wiesfeld *et al.*, 2005). Interessanter Weise kann auch eine verminderte Kanalaktivität zur Entstehung von Vorhofflimmern beitragen (Scholz *et al.*, 2007). Bisher wurden zehn Mutationen in $K_v1.5$ identifiziert, die mit Vorhofflimmern in Zusammenhang stehen (siehe Tabelle 2). In keinem anderen kardialen Ionenkanal wurden so viele VHF-assoziierte Mutationen beschrieben. Außerdem spielt $K_v1.5$ auch eine Rolle in der Pathologie von kardialem Arrest (Nielsen *et al.*, 2007). Wegen dieser entscheidenden Rolle von $K_v1.5$ in der Entstehung kardialer Defekte müssen die Funktionsweise und Regulationsmechanismen des Kanals genauer untersucht werden.

Um die Auswirkungen von Mutationen in $K_v1.5$ zu untersuchen, wurden die mittels Mutagenese-PCR eingeführten Veränderungen des Kanals in Patch-Clamp-Versuchen charakterisiert. Die ermittelten Daten wurden durch einen Kooperationspartner in Computermodelle des Vorhofs integriert. So konnte eine genaue Analyse der entstandenen Veränderungen im (simulierten) Vorhofgewebe durchgeführt werden. Ziel ist es dabei die funktionellen Zusammenhänge der elektrophysiologischen Veränderungen und der Entstehung von Vorhofflimmern aufzuklären.

Ajmalin ist ein Klasse-Ia-Antiarrhythmikum, das wie andere Medikamente dieser Art auch, proarrhythmische Nebenwirkungen hat. Es ist bekannt, dass Ajmalin den $K_v1.5$ -Strom inhibiert. Die genaue Kinetik oder Dosisabhängigkeit des Blocks ist jedoch bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit völlig unbekannt. Mit Hilfe von Patch-Clamp-Versuchen sowie Experimenten mit klonierten $K_v1.5$ -Kanälen in *Xenopus* Oozyten sollte die Wirkung von Ajmalin genauer charakterisiert werden.

Auch Mutationen im Transkriptionsfaktor ZFH3 sind mit Vorhofflimmern assoziiert. Hier ist der Zusammenhang zur Entstehung einer Arrhythmie jedoch nicht so offensichtlich wie bei Veränderungen in kardialen Ionenkanälen. Um die Rolle von ZFH3 besser zu verstehen wurden Knock-Down-Experimente im Zebrafisch durchgeführt und die funktionellen und strukturellen Veränderungen analysiert. Zusätzlich wurde ein siRNA Knock-Down in neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt und in einem anschließenden Microarray das veränderte Transkriptom untersucht, um mögliche Links zur Entstehung von Vorhofflimmern zu entdecken. Nur durch neue Erkenntnisse über die grundlegenden Mechanismen der Krankheit ist die Weiterentwicklung der pharmakologischen Therapie möglich.

2. Material und Methoden

2.1 Standardchemikalien und Geräte

Es kamen Laborchemikalien der folgenden Firmen zum Einsatz: Fluka (Neu-Ulm), Merck-Millipore (Schwalbach), Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen), VWR (Bruchsal).

Soweit möglich, wurden aus den Substanzen Stammlösungen hergestellt, die bei Bedarf auf die gewünschte Konzentration verdünnt wurden. Dazu wurde wenn nicht anders erwähnt doppelt deionisiertes Wasser verwendet.

Die im Folgenden genannten Substanzen wurden in DMSO gelöst und darin bei -20 °C gelagert: Phorbol-12-myristat-13-azetat (PMA), 4 α - Phorbol-12-myristat-13-azetat (4 α - PMA), Staurosporin, Ro 31-8220, HBDDE, Chelerythrin, Oleoyl-2-azetyl-sn-glyzerol (OAG), Iripallidal und PKC- Inhibitor (alles von Calbiochem, Darmstadt) sowie Ingenol (von Sigma Aldrich, München). Der PKC β II- Inhibitor (von Sigma Aldrich) wurde in H₂O gelöst und ebenfalls bei -20 °C aufbewahrt.

Auf speziell verwendete Chemikalien und Lösungen, sowie Geräte wird in den entsprechenden Unterkapiteln genauer eingegangen.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Zur Sterilfiltration wurden Filter von Whatman (Dassel) verwendet. Spritzen in diversen Größen stammen von BD (Heidelberg). Injektionskanülen wurden von Braun (Melsungen) benutzt. Des Weiteren wurden Verbrauchsmaterialien von Roth verwendet.

2.3 Zellkulturmethoden

2.3.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle verwendeten Zelllinien wurden im 37°C-Inkubator bei 5% CO₂-Begasung kultiviert (CO₂- Inkubator MCO-18AIC von Sanyo, Secaucus, USA). Bei ca. 80% Konfluenz wurden die Zellen (spätestens) passagiert. Dazu wurde ein Mal mit sterilem PBS (Life Technologies, Karlsruhe)

gewaschen und anschließend Trypsin/EDTA (Life Technologies, Karlsruhe) zugegeben, um die Zellen vom Flaschenboden abzulösen. Die Reaktion wurde mit Kulturmedium abgestoppt, und die gewünschte Zellmenge 3 Minuten bei 300 rpm abzentrifugiert (Zentrifuge: Z320, Hermle, Soltau). Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in eine neue Kulturflasche (Greiner Bio-one, Frickenhausen) überführt.

Um von allen Zelllinien einen Vorrat anzulegen wurden Aliquots von sehr niedrigen Passagen weggefroren. Dazu wurden die Zellen wie im oberen Abschnitt beschrieben gesplittet und die Zellen dann in Cryo-Medium statt Kulturmedium aufgenommen. Das Cryo-Medium besteht aus normalem Kulturmedium, sowie 5% Dimethylsulfoxid (DMSO), welches die Bildung von Eiskristallen verhindern soll. Die Zellen wurden dann in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox von Nalgene (Cryo 1 °C Freezing Container, VWR, Bruchsal) zunächst vier Stunden bei -80 °C langsam eingefroren und dann zur dauerhaften Lagerung in einen Stickstofftank (34XT, Taylor-Wharton, Mildstedt) überführt.

Um die Zellen wieder aufzutauen wurden sie in ein 37 °C Wasserbad gehalten, bis die Lösung flüssig war. Die Lösung wurde dann zügig in eine Kulturflasche mit vorgewärmtem Medium überführt.

2.3.2 Verwendete Zelllinie

CHO-Zellen (chinese hamster ovary) wurden uns freundlicher Weise von Prof. Dr. med. Rolf-Detlef Treede (Institut für Neurophysiologie, Mannheim) zur Verfügung gestellt. Das Medium wurde selbst im Labor hergestellt. Dazu wurde DMEM-Medium von Life Technologies (Karlsruhe) mit 1% Penicillin/Streptomycin (PAA, Cölbe) und 10% FCS (PAA, Cölbe) versetzt und anschließend steril filtriert (Filter von Thermo Fisher scientific, St. Leon Roth).

2.3.3 Transfektion

Um in den CHO-Zellen $K_v1.5$ -Ströme messen zu können, wurde die entsprechende Vektor-DNA mit Hilfe einer transienten Transfektion in die Zellen eingebracht. Dazu wurde das Transfektionsreagenz „Gene Jammer“ von Agilent Technologies (Waldbronn) verwendet. 24 Stunden vor der Transfektion wurden zunächst ca. 10^6 Zellen in ein Schälchen mit 3 cm Durchmesser ausgesät, in das zuvor Plättchen mit 5 mm Durchmesser gelegt wurden. Für ein solches Schälchen wurde dann folgender Transfektionsansatz angesetzt: 190 µl Opti-MEM (serumfreies Medium, Life Technologies, Karlsruhe), 12 µl Gene Jammer, 1 µg $K_v1.5$ DNA. Nach 20-minütiger Inkubation wurde der Ansatz auf die Zellen pipettiert und diese bei 37 °C weiter kultiviert. 16-24 Stunden nach der Transfektion konnten dann die Ströme mittels Patch Clamp gemessen werden.

2.3.4 Präparation und Kultivierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRCM)

Die neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRCM) wurden freundlicherweise von Julia Ritterhoff (AG Most, Uniklinik Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Isolation der nRCMs wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

Neonatale Wistar Ratten (1-3 Tage alt) wurden enthauptet und anschließend der Brustkorb geöffnet, um die Herzen zu entnehmen. Die Herzen wurden in 25 cm Kulturschalen überführt und das umgebende Gewebe, d.h. Atrien und Gefäße, entfernt. Die Herzen wurden dann mit einem Gewebezehacker in ca. 8 mm große Stücke zerteilt. Die Stücke wurden in 5 ml Verdau-Lösung aufgenommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und noch zwei Mal in Verdau-Lösung gewaschen. Dabei müssen sich die Herzstücke vollständig am Boden absetzen, bevor man den Überstand entfernt. In 10 ml Verdau-Lösung wurde dann für 10 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 10 ml Stop-Lösung unterbrochen und das Gewebe mit einer 25 ml Pipette homogenisiert. Der Überstand enthielt dann die Herzzellen und wurde in 2,5 ml gekühltes FCS überführt und auf Eis gelegt. Es wurden neun solcher Verdau Schritte durchgeführt. Die Zellen wurden 15 Minuten bei 60 g und 4°C zentrifugiert und die Pellets in 50 ml Medium 199 (Sigma, Taufkirchen) mit 10 % FCS (Life Technologies, Karlsruhe) resuspendiert. Zusätzlich wurden noch zwei ml DNase zugefügt, um eine Gerinnung der Zellen zu verhindern. Um restliche Gewebestücke zu entfernen, wurden die Zellen dann filtriert (100 µm Poren). Um kardiale Fibroblasten zu entfernen und Kardiomyozyten anzureichern wurde die Zellsuspension in eine 25 cm Schale gegeben und 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Fibroblasten adhäreren schneller und der Überstand enthält dann verhältnismäßig mehr Kardiomyozyten. Der Überstand wurde erneut in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einer 25 ml Pipette homogenisiert. Mithilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und ca. 2×10^6 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesäht. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Medium 199 mit 10 % FCS zugefügt. Die Zellen können dann je nach Experiment behandelt werden.

Verdau-Lösung:

1.5 ml steril-filtriertes Trypsin (10 ml Stock; 1g Trypsin (1:250) für 10 ml HBSS), 300 U/ml DNase I (Thermo Fisher Scientific, St. Leon Roth), 2% P/S (PAA, Cölbe), 40 mM HEPES, 3.2 µM NaOH, add 50ml mit HBSS

Stop-Lösung:

4% FCS (PAA, Cölbe), 300 U/ml DNase I, 2% P/S, 60 mM HEPES, add 50ml HBSS

nRCM-Medium:

Medium 199 (Sigma, Taufkirchen), 10/0.5% FCS (PAA, Cölbe), 1% l-glutamine (PAA, Cölbe), 1 mM CaCl₂ (Merck-Millipore, Schwalbach) , 1% P/S (PAA, Cölbe)

2.3.5 Knock Down in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Um die Funktion von ZFH3 zu untersuchen wurde mit Hilfe einer spezifischen siRNA die Expression gezielt herunterreguliert. Die siRNA wurde bei Ambion/Life Technologies (Karlsruhe) erworben. Als Negativkontrolle diente eine nichtbindende Kontroll-siRNA (ebenfalls von Ambion). Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät. Am Tag eins oder zwei nach dem Aussähen wurde zunächst mit PBS gewaschen und Hungermedium zugegeben (0,5 % FCS). Am Tag 3 wurde die siRNA-Behandlung durchgeführt. Dazu wurde zunächst normales Medium (10% FCS) auf die Zellen gegeben. Dann wurde eine Transfektionslösung angesetzt, so dass die siRNA in einer Endkonzentration von 30 nM vorlag. Als Transfektionsreagenz wurde HiPerFect von Qiagen (Hilden) verwendet (6 µl pro 100 µl Ansatz). Nach 24 Stunden bei 37 °C wurde die RNA isoliert.

2.3.5 RNA-Isolation

Mit *TRIZOL™* Reagenz:

Wenn die RNA nur für Testversuche verwendet werden sollte wurde diese mit *TRIZOL™* isoliert (Qiagen, Hilden). Dabei handelt es sich um eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat. Es wurde immer 1 ml Trizol (Hilden) auf ein Well einer 6-Well-Platte gegeben. Die Zellen wurden dann mit einem Zellschaber (Greiner Bio-one, Frackinghausen) abgekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die weitere Verarbeitung erfolgte nach Herstellerangaben.

Mit *RNeasy™* Kit (Qiagen, Hilden):

Um RNA mit besonders hoher Reinheit zu gewinnen wurde das *RNeasy™* Kit von Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Dies war nötig um RNA für die Micro Array Analyse herzustellen. Die Reinheit und Konzentration wurde in diesem Fall mit einem Nanodrop-Spectrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, St. Leon Roth) bestimmt. Indem man den Quotienten der bei 260nm und 280nm gemessenen Absorption (A260:A280) errechnet, kann man auf die Reinheit der Nukleinsäurepräparation schließen. Ein Quotient im Bereich zwischen 1,9 – 2,1 für RNA spricht für eine reine Präparation.

2.4 Molekularbiologie

2.4.1 Transformation und Plasmid-Isolation

Um DNA-Fragmente, die in einen Vektor kloniert wurden, weiter zu amplifizieren, wurde eine Transformation in kompetente *Escherichia coli* Bakterien (One Shot TOP10-Zellen von Life Technologies, Karlsruhe) durchgeführt. Dazu wurden ca. 3 µl Plasmid-DNA auf 50 µl-Aliquots der Zellen gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 42°C für 45 Sekunden ein Hitzeschock erzeugt, in dessen Folge die Zellen die DNA aufnehmen können. Nach weiteren 2 Minuten auf Eis wurden 300 µl LB-Medium zu den Zellen gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausgestrichen (pSP64 und pcDNA3.1-Vektor mit Ampicillin-Resistenz) und über Nacht bei 37°C inkubiert (Inkubator: Brutschrank 400; Memmert, Schwabach).

Um die Plasmid-DNA aus den Bakterien zu isolieren wurden zunächst einzelne Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) überführt. Nach 16 Stunden bei 37°C konnte dann eine Mini-Präparation durchgeführt werden. Dazu wurde das „Nucleo Spin Plasmid Kit“ von Machery-Nagel (Düren) nach Herstellerprotokoll verwendet. Abschließend wurde die DNA-Konzentration am Photometer gemessen.

LB-Medium:

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l Bacto-Trypton

10 g/l Natriumchlorid

Agar-Platten: 250 ml LB-Medium

7,5 g Agar

100 µg/ml Ampicillin

250 ml *a. dest.*

Zentrifuge: Heraeus Biofuge Pico, NeoLab, Heidelberg

Centrifuge 5804 R, Rotor F34-6-38, Eppendorf, Hamburg

Photometer: BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg

2.4.2 Subklonierung und Kontrollverdau

Um den $K_v1.5$ -Kanal in CHO-Zellen exprimieren zu können, muss dessen cDNA zunächst in einen Vektor kloniert werden, der den Cytomegalovirus-Promotor besitzt (CMV-Promotor). Es wurde der Vektor pcDNA3.1+ verwendet. In einer sogenannten Subklonierung wurde die cDNA zunächst aus dem vorhandenen Plasmid (meist pSP64) mit Hilfe von Restriktionsenzymen herausgeschnitten und dann in den pcDNA3.1+ Vektor, der mit den gleichen Enzymen geschnitten wurde, wieder eingefügt (Ligation). Es wurde jeweils 1 µg Plasmid in einen Verdau eingesetzt und die Reaktion anschließend auf ein Gel aufgetragen und die gewünschten Banden mittels Gelextraktion isoliert (siehe Abschnitt 2.XX „Isolation von DNA aus Agarosegelen“). In einer Ligation wurde das einzubauende Insert immer in einem dreifachen Überschuss zum Plasmid gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei fügen sich dann die entsprechenden Restriktionsschnittstellen zusammen. Für die Ligation wurde die T4-Ligase von Roche (Mannheim) verwendet. Das ligierte Plasmid wurde anschließend in *E.colis* vermehrt und eine Plasmidisolation durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4.1 „Transformation und Plasmid-Isolation“). Um den Erfolg der Subklonierung zu überprüfen wurde ein Testverdau mit den vorher verwendeten Enzymen durchgeführt und die Banden mit Hilfe eines Agarosegels analysiert.

2.4.3 Agarosegelelektrophorese

Um Nukleinsäuren nach ihrer Größe aufzutrennen, und evtl. spezifische Fragmente, die in einer PCR amplifiziert wurden zu isolieren, wird eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden Agarosegele hergestellt, die 1% Agarose in Tris-Acetat-EDTA- (TAE-) Puffer (Sigma, Taufkirchen) enthalten. In die Gele wurde Ethidiumbromid (Sigma, Taufkirchen) eingearbeitet, um die Nukleinsäuren in einem Transluminator (Helmut Saur, Reutlingen) unter UV-Belichtung sichtbar zu machen. Die Proben wurden zunächst mit 1X Ladepuffer (Life Technologies, Karlsruhe) versetzt und dann in einer Gelkammer (Mini-Sub Cell GT Power Pac 300, BioRad, Hercules, USA) bei einer Spannung von 100 V in 1X TAE-Puffer aufgetrennt. Um die Größe der DNA-Fragmente beurteilen zu können wurde gleichzeitig ein Größenmarker aufgetragen (1 Kb Plus DNA Ladder, Life Technologies, Karlsruhe).

2.4.4 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente nach einer elektrophoretischen Auftrennung aus einem Agarosegel zu isolieren wurde eine Gel-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde die zu isolierende Bande mit Hilfe von Gel-

Cutter Tips (Kisker Biotech, Steinfurt) aufgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Greiner Bio-one, Frickenhausen) überführt. Die Aufreinigung wurde mit Hilfe des „Nucleo Spin ExtractII Kits“ von Machery-Nagel (Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dadurch ist das gewünschte DNA-Fragment (z.B. aus einer PCR-Amplifikation) für weitere Experimente verfügbar.

2.4.5 Mutagenese-PCR

Mit Hilfe von Patch Clamp Experimenten sollten mutierte kardiale Ionenkanäle charakterisiert werden. Dazu mussten zunächst die folgenden 27 beschriebenen Mutationen in α - oder β -Untereinheiten der Kanäle nachgebildet werden:

Kv1.5:	A576V, T527M, E610K, E375X
KvLQT1:	S140G, R231C, S209P, V141M
MirP1:	R27C,
Kir2.1:	V93I
MinK:	S38G
hERG:	K897T, N588K
Sur2a:	T1547I
MirP2:	V17M, R53H
MirP4:	L65F
Nav1.5:	E428K, H445D, E655K, N470K, M1875T
Scn1b:	R85H, D153N
Scn2b:	R28Q, R28W
Scn3b:	A130V

Um die genannten Punktmutationen gezielt einzuführen wurde das „QuikChange Site- Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Zunächst wurde ein Codon ausgewählt, dass für die einzusetzende Aminosäure codiert. Entsprechend wurden dann Primer designt, die die gewünschte Mutation ungefähr in der Mitte des umliegenden (nicht mutierten) Bereichs der Nukleotidsequenz tragen. Mutationsprimer sollten außerdem folgende Kriterien erfüllen: Sie müssen zueinander komplementär sein, sie müssen die gewünschte Mutation enthalten (Deletion) und diese sollte möglichst in der Mitte der Primer liegen. Die Primer sollten außerdem zwischen 20 und 40 bp lang sein, auf mind. ein G oder C auf beiden Seiten enden und einen GC-Gehalt von mind. 40% haben. Die Pfu-Turbo-DNA-Polymerase synthetisiert während der PCR DNA an diese Primer und läuft dabei ein Mal komplett um das als Template eingesetzte Plasmid. Am Ende jeder Runde sollte dann ein Plasmid mit der gewünschten Deletion stehen. Die Ausbeute liegt hierbei jedoch nie bei 100%, weshalb eine Selektion notwendig ist. Dazu wird nach der PCR zunächst ein Verdau mit DpnI

durchgeführt, bei dem die als Template eingesetzten Plasmide verdaut werden. Das wird dadurch möglich, dass die Ursprungsplasmide in *E. Coli* vermehrt wurden und deshalb eine Methylierung enthalten. In den meisten Bakterienstämmen wird neugebildete DNA durch die DNA-Adenin-Methylase (dam) an Adeninen in der Folge 5'-GATC-3' methyliert (Heusipp, Falker und Schmidt, 2007). Den in der Mutations-PCR gebildeten Plasmiden fehlt dagegen diese Methylierung. DpnI verdaut dann eben nur Plasmide mit Methylierung, so dass man möglichst nur Plasmide mit Mutation erhält. Es werden hierbei 2 µl DpnI zu jedem PCR-Ansatz (50 µl) gegeben und 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgt eine Transformation in TOP10 kompetente *E.coli* Zellen.

2.4.6 DNA-Sequenzierung

Eine DNA-Sequenzierung war notwendig, um festzustellen, ob eine Mutagenese-PCR fehlerlos abgelaufen ist oder in welcher Orientierung ein Fragment in den Vektor kloniert wurde. Dazu wurden jeweils Proben zur Firma seqlab (Göttingen) geschickt und vom T7-Promotor aus sequenziert.

2.4.7 Isolierung von RNA aus Zebrafischembryonen

Aus ca. 15 Zebrafischembryonen pro Ansatz wurde die Gesamt-RNA isoliert, um daraus cDNA zu machen. Dazu wurde immer 1 ml Trizol (Qiagen, Hilden) verwendet und die Embryonen darin homogenisiert. Anschließend wurde nach Herstellerinformation gearbeitet.

2.4.8 Herstellung von Einzelstrang-cDNA

Nach einem DNase-Verdau (DNase von Fisher Scientific, Schwerte), wurde aus 1 µg RNA durch Erst-Strang-Synthese cDNA hergestellt. Es wurde das Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit von Fisher Scientific (Schwerte) nach Herstellerangaben benutzt.

2.4.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit cDNA als Template

In einer PCR kann mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*) in einer automatisierten Reaktion DNA *in vitro* amplifiziert werden. Um Sonden für die später erwähnten *In situ* Hybridisierungen herzustellen wurden gezielt Fragmente aus der Zebrafisch-cDNA mittels PCR amplifiziert. Dazu wurde der Thermocycler advanced primus 25 von peqlab (Erlangen) und die Dream-Taq Green DNA-Polymerase von Fisher Scientific (Schwerte) benutzt.

Als Primer wurden folgende Oligonukleotide verwendet, die von Sigma (Taufkirchen) hergestellt wurden:

ZFH3-forward: 5'-ACCTATGGTGCCAAGTGGAG-3'

ZFH3-reverse: 5'-GGCACTAGGGTAGGTGGTGA-3'

Lefty1-forward: 5'-GACATCAAGAATCCCCGAGA-3'

Lefty1-reverse: 5'-ACACCTGAACGCCTGGTAAC-3'

Lefty2-forward: 5'-GACCACAGCGATCTCACTCA-3'

Lefty2-reverse: 5'-TGAGCTCACGGAAGTTGATG-3'

Die Oligonukleotide wurden mit Wasser so verdünnt, dass eine Lösung mit einer Konzentration von 100 µM vorlag.

Das Reaktionsprofil der PCR war folgendes:

42,25µl Wasser	1 X	95°C, 3 min	Denaturierung
5µl 10X Dream Taq-Puffer	40 X	95°C, 30 s	Denaturierung
1 µl cDNA aus 1µg RNA		60°C, 30 s	Primer Annealing
0,5 µl Primer Mix (forward+reverse)		72°C, 1,5 min	Extension
1 µl dNTPs	1 X	72°C, 10 min	Elongation
0,25 µl Dream Taq-Polymerase		12°C, forever	

2.4.10 TOPO-cloning

Nach der Herstellung und Isolation eines spezifischen PCR-Produktes wird dieses mittels TOPO-cloning direkt (ohne Ligase) in den pCR2.1-Vektor ligiert. Dazu wurde das TOPO-TA-Kit von

Invitrogen (Karlsruhe) nach Herstellerangaben benutzt.

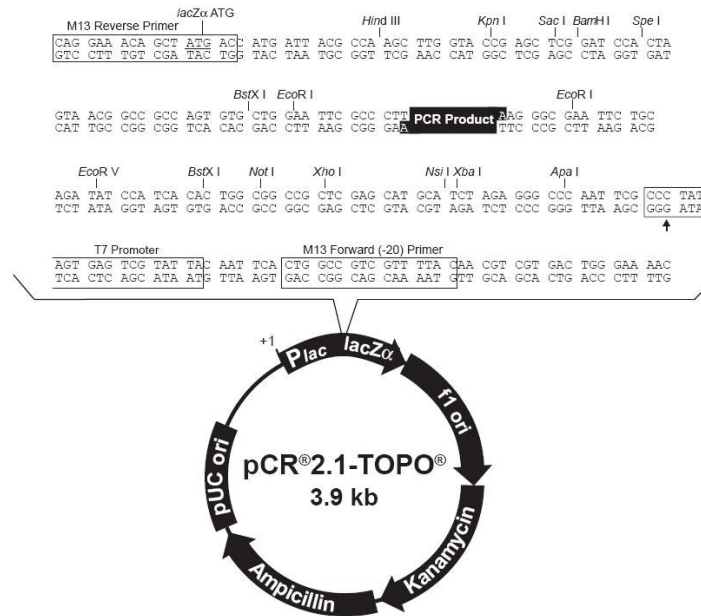


Abb.8: Detailansicht des pCR2.1-Vektor; Ausschnitt der multiple cloning site

2.4.11 Linearisieren von Plasmid-DNA

Um eine *in vitro* Transkription (zur Herstellung von mRNA für die heterologe Expression in *Xenopus* Oozyten, oder zur Herstellung einer RNA-Sonde) durchführen zu können, muss die ringförmige DNA zunächst mit Restriktionsendonukleasen linearisiert werden. Dazu musste immer so geschnitten werden, dass die Transkription vom T7- oder SP6-Promotor innerhalb des pSP64-Plasmids ausgehen kann. Es wurden Restriktionsenzyme von NEB (Frankfurt) benutzt und jeweils 1 μ g Plasmid in einem 20 μ l Ansatz eingesetzt und für 3 Stunden bei 37°C verdaut. Nach dem Restriktionsverdau wurde eine Aufreinigung mittels Gelextraktion durchgeführt (siehe Abschnitt 2.3.4 „Isolation von DNA aus Agarosegelen“). Die linearisierte DNA wurde mit dem „PCR Purification Kit von Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt und zum Schluss in 30 μ l RNase freiem Wasser gelöst. Die linearisierte DNA ist nun zugänglich für eine *in vitro* Transkription.

2.4.12 In vitro Transkription

Eine *in vitro* Transkription beschreibt die Herstellung von cRNA aus zuvor linearisierter cDNA, die sich in einem Plasmid befindet.

Für die Herstellung von cRNA für die Expression in *Xenopus* Oozyten wurde das "mMESSAGEmMachine Kit" von Life Technologies (Karlsruhe) verwendet. Die Transkription wurde je nach Orientierung der cDNA im Plasmid vom T7- oder SP6-Promotor aus gestartet und die jeweilige Polymerase zugegeben. Ein Transkriptionsansatz wurde wie folgt angesetzt:

- 8 µl des linearisierten Plasmids
- 8 µl NTPs
- 2 µl Puffer
- 2 µl Polymerase

Der Ansatz wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend 30 µl Wasser und 30 µl Lithiumchlorid zugegeben und über Nacht bei -80°C die RNA gefällt. Am nächsten Tag wurde bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Die RNA befindet sich dann im Pellet und der Überstand kann verworfen werden. Um die RNA zu reinigen wurde 1 ml 70 % Ethanol zugegeben und erneut zentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig entfernt. Bei offenem Deckel wurde das Pellet ca. 10 Minuten getrocknet. Die RNA wurde dann in 15 µl RNase freiem Wasser gelöst und die Konzentration am Photometer bestimmt (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg).

Ausgehend von PCR-Produkten, die in den pCR2.1-Vektor kloniert wurden, sollten mittels *in vitro* Transkription außerdem markierte antisense-RNA-Sonden für eine *in situ* Hybridisierung (ISH) hergestellt werden. Mit einer ISH kann die Expression eines Gens auf mRNA-Ebene dargestellt werden. Die Sonden werden während der *in vitro* Transkription mit Digoxigenin markiert, welches dann wiederum durch einen enzymgekoppelten Antikörper (Roche, Mannheim) sichtbar gemacht wird. Zur Herstellung der Sonden wurde das DIG RNA Labeling Kit von Roche (Mannheim) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Für folgende Transkripte wurden so Sonden hergestellt: ZFHx3, Lefty1, Lefty2. Es wurde stets die T7-Polymerase benutzt.

2.4.13 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Eine quantitative Real Time PCR (qPCR) ermöglicht eine Quantifizierung von DNA. Die Methode beruht darauf, dass ein interkalierender Farbstoff (SYBR Green) die doppelsträngige DNA markiert und nach jedem Zyklus das Fluoreszenzsignal gemessen wird, um auf die Menge des PCR-Produkts schließen zu können.

Die qPCR wurde durchgeführt, um einen siRNA vermittelten Knock-Down von ZFHx3 auf mRNA-Ebene nachweisen zu können. Es wurde also cDNA von Zellen mit Kontroll-siRNA bzw. cDNA von

Zellen mit ZFH3-siRNA als Template verwendet. Für ZFH3 wurde ein validierter Primer-Assay von Qiagen (Hilden) verwendet. Als Haushaltsgen wurde ribosomale RNA (18S) verwendet. Die Primersequenz war hierbei folgende:

18S-forward: 5'-TCAAGAACGAAAGTCGG-3'

18S-reverse: 5'-GTGATGCCCTTAGATGTCC-3'

Für die qPCR wurde das QuantiFast Kit von Qiagen (Hilden) benutzt.

Reaktionsprofil:

Pro Well einer 96-Well-Platte:

2 µl Wasser	1 X	95 °C, 5 min	Aktivierung der
5µl QuantiFast-Puffer			Polymerase
1 µl Primer Mix (forward+reverse)	40 X	95 °C, 5 s	Denaturierung
2 µl cDNA aus 1µg RNA		60 °C, 30 s	Primer Annealing+Extension
	1 X	60 °C, 10 min	Extension

Lightcycler: C1000 Touch, Bio-Rad (München)

Die Software des Lightcyclers berechnet den sogenannten Ct-Wert (Cycle threshold). Dieser entspricht der Nummer an PCR-Zyklen, die nötig sind, um eine definierte Fluoreszenzintensität zu erreichen. Nach folgender Formel wurde das Verhältnis der RNA-Menge nach Knock-Down (=“Behandlung“) zur RNA-Menge unter Kontrollbedingungen berechnet:

$$\Delta Ct = Ct \text{ des Zielgens} - Ct \text{ des Haushaltsgens}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Behandlung} - \Delta Ct \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Es wurden immer drei biologische und zwei technische Replikate angefertigt.

2.5 Microarray

Um die Funktion von ZFH3 besser verstehen zu können und eine Analyse nachgeschalteter Pathways zu ermöglichen sollte ein Microarray durchgeführt werden. Dabei soll das Transkriptom von Kontrollzellen (Behandlung mit Negativ-siRNA) mit dem Transkriptom von Zellen nach einem

ZFH3-Knock-Down verglichen werden, um Unterschiede in der Genexpression zu erkennen. Ein Microarray ermöglicht die parallele Analyse mehrerer tausend Gene in einer sehr geringen Menge an Ausgangsmaterial.

Es wurde ein GeneChip® Rat Gene ST 2.0 Array von Affymetrix (Santa Clara, USA) benutzt. Dieser erlaubt die genweite Expressionsanalyse von mehr als 27 000 proteinkodierenden Transkripten. Die Affymetrix GeneChips® tragen Millionen verschiedene Oligonukleotide (25mere), die durch ein photolithographisches Verfahren *in situ* direkt auf der Oberfläche des Trägers synthetisiert werden. Damit ist jedes Exon jedes Gens abgedeckt.

Wie in 2.2.2 („Knock Down in neonatalen Rattenkardiomyozyten“ und „RNA Isolation“) beschrieben wurde aus Zellen nach Behandlung mit Negativ- bzw. ZFH3-siRNA RNA gewonnen. Es wurden jeweils 3 Replikate angefertigt. Diese RNA wurde zusammen mit den GeneChips® für eine weitere Bearbeitung zum Kooperationspartner im Zentrum für medizinische Forschung (ZMF) in Mannheim gegeben. Dort gibt es ein Core-Lab für Microarray-Analytik. Alle weiterführenden Arbeiten wurden dort durchgeführt. Es wurde nach Angaben von Affymetrix und mit deren Kits gearbeitet. Die Arbeiten in Mannheim bestanden aus:

- Amplifikation, Markierung mit Biotin und Fragmentierung der RNA
- Hybridisierung (meistens 16h bei 45 °C)
- Waschen und Färben mit einer Fluidics Station 450
- Scannen mit dem Affymetrix GeneArray Scanner3000

Die anschließende bioinformatische Auswertung wurde ebenfalls in Mannheim durchgeführt. Zunächst wurde die Varianz mit einem one-way ANOVA Test analysiert. Dazu wurde das kommerzielle Softwarepaket SAS JMP7 Genomics, version 4, von SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA) verwendet. Eine Korrektur der falsch positiv Rate (false discovery rate (FDR)) von $\alpha=0,5$ wurde als Level der Signifikanz angenommen. Mit den signifikant regulierten Genen wurde eine Pathway und Gene Ontology (GO) Analyse durchgeführt.

2.6 Präparation von *Xenopus laevis* Oozyten

Die Oozyten des weiblichen afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* werden schon seit 1971 genutzt, um Gene heterolog zu exprimieren und zu analysieren (Gurdon et al. 1971). Auch zur Funktionsanalyse kardialer Ionenkanäle hat sich das Oozyten-System etabliert (Nelson et al. 1996). Um einen Ionenkanal untersuchen zu können muss zunächst dessen mRNA in die Oozyten injiziert werden. Der Kanal wird anschließend im endogenen System synthetisiert und in die Membran eingebaut.

Vor der Entnahme der Ovarien wurden die Frösche zunächst in Ethyl- 3- Aminobenzoat-

Methansulfonat (Metacain®, MS222) narkotisiert. Die Ovarien von *Xenopus laevis* enthalten bis zu 30 000 Oozyten der oozytären Entwicklungsstadien I - VI (Dumont 1972). Die Ovarien wurden zunächst manuell mit Pinzetten zertrennt und die Zellen anschließend in kalziumfreies OR2-Medium überführt. Um die Bindegewebshülle, die die Oozyten umschließt zu entfernen wurde für 45 min bei 19°C mit Collagenase verdaut (Typ II; 2 mg/ml, Roche Diagnostics). Dadurch wird gleichzeitig auch das Follikel epithel entfernt, welches für elektrophysiologische Messungen hinderlich wäre. Zum Abbruch der Verdaureaktion wurden die Zellen in OR2-Medium gewaschen und in SOS-Medium überführt. Für eine Verwendung der Oozyten für elektrophysiologische Messungen wurden diese sorgfältig sortiert. Es kamen nur vollständig defollikulierte Oozyten der Stadien V-VI zum Einsatz. Bis zur Injektion der mRNA wurden die Oozyten bei 19 °C auf einem automatischen Rüttelgerät (IKA Vibrax- VXR) im Kühlschrank (yp AL 185, Migge, Heidelberg) gelagert.

Zur Injektion wurden Glasspitzen verwendet, die aus Glaskapillaren (Drummond # 3-0000203-G/X, Helmut Saur, Reutlingen) durch ein Zugerät (Flaming/Brown micropipette puller P-87, Sutter Instruments, Novato, USA) hergestellt wurden. Die Öffnung wurde so gebrochen, dass die Öffnung ca. 15-20 µm groß war. Die zu injizierende RNA wurde dann mit Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt (20-400 ng/µl) und in die Glasspitzen aufgezogen. In jede Oocyte wurden am Mikroskop (Stemi 2000, Zeiss, Jena) mit Hilfe des Nanoject automatic injector (Drummond Broomall, USA) 46 nl der Lösung injiziert. Nach 2-4 Tagen konnten die resultierenden Ströme gemessen werden.

Die Frösche stammen von der Firma „Xenopus Express“ (Lyon, Frankreich).

OR2- Medium:

82,5 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l KCl, 1 mmol/l MgCl₂, 5 mmol/l HEPES, 100 µg/ml Gentamicin (pH = 7,6; eingestellt mit NaOH)

SOS- Medium:

100 mmol/l NaCl, 2 mmol/l KCl, 1,8 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgCl₂, 5 mmol/l HEPES, 2,5 mmol/l Pyruvat, 100 µg/ml Gentamicin (pH = 7,6; eingestellt mit NaOH)

2.7 Elektrophysiologie

2.7.1 Doppelelektroden Voltage-Clamp Technik an *Xenopus laevis* Oozyten

Die Voltage clamp Technik ermöglicht es Ionenströme durch die Membran erregbarer Zellen zu messen. Das entscheidende ist, dass die Membranspannung künstlich auf einem bestimmten Wert gehalten („geklemmt“) werden kann und dann jeweils der resultierende Strom durch die Membran ermittelt wird. So erhält man Strom-Spannungsbeziehungen und kann Aussagen über die Kinetik

und Biophysik bestimmter Ströme treffen.

2.7.1.1 Theoretische Grundlagen

Bei der Doppelelektroden Voltage-Clamp Technik werden zwei Elektroden in eine Oozyte gestochen. Die intrazellulären Elektroden dienen der Spannungsmessung (I1) und der Leitung des festgelegten Klemmstroms (I2). Des Weiteren gibt es zwei extrazelluläre Badelektroden B1 und B2. Mithilfe von I1 und B2 wird über den Regelverstärker ("Oocyte Clamp Amplifier OC-725C"; Warner Instruments, Hamden, USA) kontinuierlich das Membranpotential gemessen. Der Regelverstärker kann fortdauernd die Differenz zwischen der tatsächlich vorhandenen Spannung über die Membran und der eingestellten Sollspannung bestimmen. Über I2 wird ein ausgleichender Strom erzeugt, sodass das Membranpotential möglichst der Sollspannung entspricht.

Aufgrund von Widerständen, kapazitiver Kopplung der beiden Elektroden und weiterer Störfaktoren wird dies jedoch nie ganz erreicht. Der Aufbau und die Verschaltung einer solchen Voltage-Clamp Apparatur ist in Abb. 9 schematisch dargestellt.

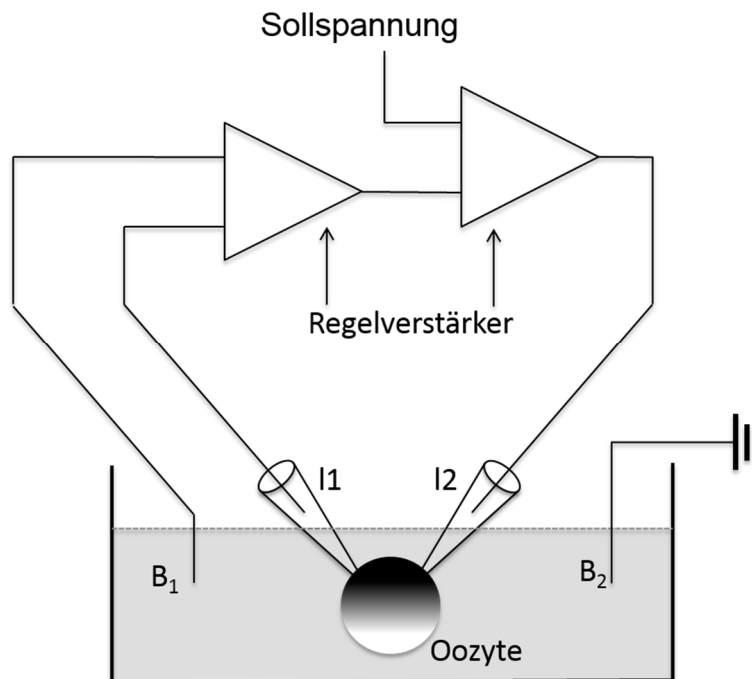


Abb. 9: Aufbau einer Voltage-Clamp Messapparatur

2.7.1.2 Praktische Durchführung

Um die Messelektroden I1 und I2 mit dem Zellinneren in Verbindung zu bringen werden diese in eigens hergestellte Glaskapillaren, die mit 3 M KCl gefüllt sind, eingebracht. Die Glaskapillaren („GB 100F-10“; Science Products, Hofheim) wurden mit dem Flaming/Brown-Zuggerät zunächst in zwei Hälften gezogen und unter dem Mikroskop so gebrochen, dass sie beim Eintauchen in die Badlösung einen Widerstand zwischen ein und zehn M Ω zeigten. Die Elektroden bestanden aus mit Silberchlorid überzogenen Silberdrähten. Die Oozyten wurden zunächst in ein mit 5 KCl-Lösung gefülltes Bad gelegt. Diese wurde mit Hilfe einer Kaltlichtquelle (KL 1500, Zeiss, Jena) ausgelauhtet. Die Elektroden wurden dann unter Mikroskopsicht (Stemi 2000, Zeiss, Jena) in die Zellen eingestochen. Dazu wurde ein Mikromanipulator benutzt (Mikromanipulator MP-2, Narashige, Tokyo, Japan). So konnte eine elektrisch leitende Verbindung zwischen dem Intrazellulärraum, der untersuchten Oozyte und den Elektroden I1 und I2 hergestellt werden. Die Badelektroden B1 und B2 steckten in Eppendorfpipettenspitzen (Volumen 100 μ l), die mit in 3 mol/l KCl gelöstem Agar-Agar (1 % w/v) gefüllt waren und deren offene Spitze in das Bad eintauchte. Die Perfusionslösung wurde aus erhöht aufgehängten Perfusorspritzen, die über ein kurzes Stück Silikonschlauch mit üblichen, klinischen Infusionssystemen verbunden waren, in das Bad zugeleitet. Die Höhendifferenz von den Perfusionsspritzen zur Badkammer stellte einen ausreichenden Perfusionsdruck sicher, wobei die Flussgeschwindigkeit mit Hilfe von Klemmschrauben reguliert werden konnte.

Wenn die Auswirkung einer Substanz auf den zu untersuchenden Strom untersucht werden sollte, wurde die Oocyte nach der Messung aus dem Bad entnommen und in einem Petrischälchen in die Substanz eingelegt. Nach 30 Minuten wurde die Zelle wieder für eine Messung herangezogen.

Die Elektroden waren mit dem Regelverstärker („Oocyte Clamp Amplifier OC-725C“; Warner Instruments, Hamden, USA) verbunden, der selbst über einen Analog-Digital-Wandler („Digidata 1200“; Axon Instruments, Foster City, USA) mit einem Computer (Systemhaus CAT, Heidelberg) verbunden war. Mit Hilfe der „pClamp 8.2“-Software (Axon Instruments) konnten Spannungsprotokolle erstellt werden und die Messdaten aufgezeichnet werden. Um äußere elektrische Störfaktoren zu minimieren war die Messapparatur von einem Faraday'schen Käfig umgeben. Alle Experimente wurden bei 20-22°C durchgeführt.

Badlösung:

100 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 2 mmol/l MgCl₂, 1,5 mmol/l CaCl₂, 10 mmol/l HEPES (pH = 7,4; eingestellt mit NaOH)

2.7.2 Patch-Clamp Versuche an Kulturzellen

Patch Clamp ist eine 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelte Technik, um Ströme durch einzelne Ionenkanäle oder kleine Membranabschnitte (die sog. „patches“) isoliert messen zu können. Die beiden deutschen Zellphysiologen wurden dafür 1991 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Mit der „whole-cell“ Konfiguration kann auch eine elektrische Verbindung zum Zellinneren geschaffen und so die Zelle im Gesamten studiert werden (Hamill *et al.*, 1981) (Beech *et al.*, 1991). Diese Messmethode wurde auch in den durchgeführten Versuchen angewandt.

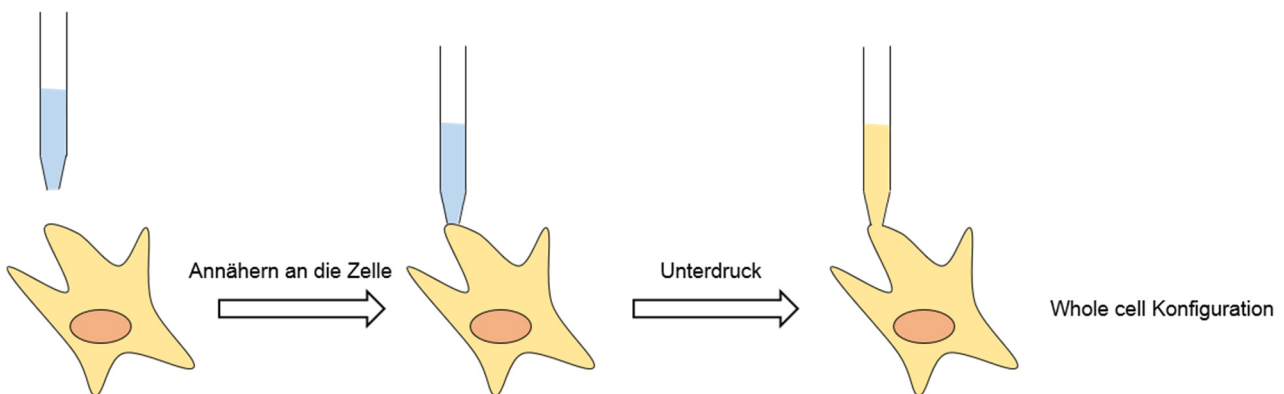


Abb. 10: Darstellung der whole cell Patch-Clamp Konfiguration

2.7.2.1 Theoretische Grundlagen

Um Ströme im Picoampère-Bereich exakt messen zu können muss im verwendeten System zunächst das Hintergrundrauschen maximal reduziert werden. Dazu wird ein kleiner ca. $1 \mu\text{m}^2$ großer Bereich der Zellmembran elektrisch stark von der Umgebung isoliert. Um das zu erreichen wird eine Glaspipette mit niederohmiger, hitzepolierter Öffnung, die eine Elektrode enthält, an die Zellmembran herangeführt bis sie diese berührt. Ein leichter Unterdruck ermöglicht ein Ansaugen der Zellmembran, sodass eine sehr starke Verbindung, mit einem Abdichtungswiderstand im Giga Ohm Bereich, zur Zelle entsteht (Sigworth und Neher, 1980). Man spricht nun von der sog. „cell-attached“-Konfiguration. Man könnte damit Aktivitäten einzelner Ionenkanäle untersuchen. Wenn man aber erneut einen Unterdruck anlegt öffnet sich die Zellmembran im Bereich unter der Pipette und man befindet sich im „whole-cell“ Modus. Damit kann die Leitfähigkeit der gesamten Zelle ermittelt werden.

Über die Pipettenöffnung gleichen sich die Ionenkonzentrationen des Cytoplasmas und der Lösung in der Messpipette durch Diffusion an, das heißt, die intrazellulären Ionenverhältnisse werden durch die Pipettenlösung vorgegeben (Beech *et al.*, 1991).

Anders als für die voltage-clamp Versuche beschrieben kommen beim Patch-clamp nur eine Messelektrode und eine Badelektrode zum Einsatz (Abb. 10).

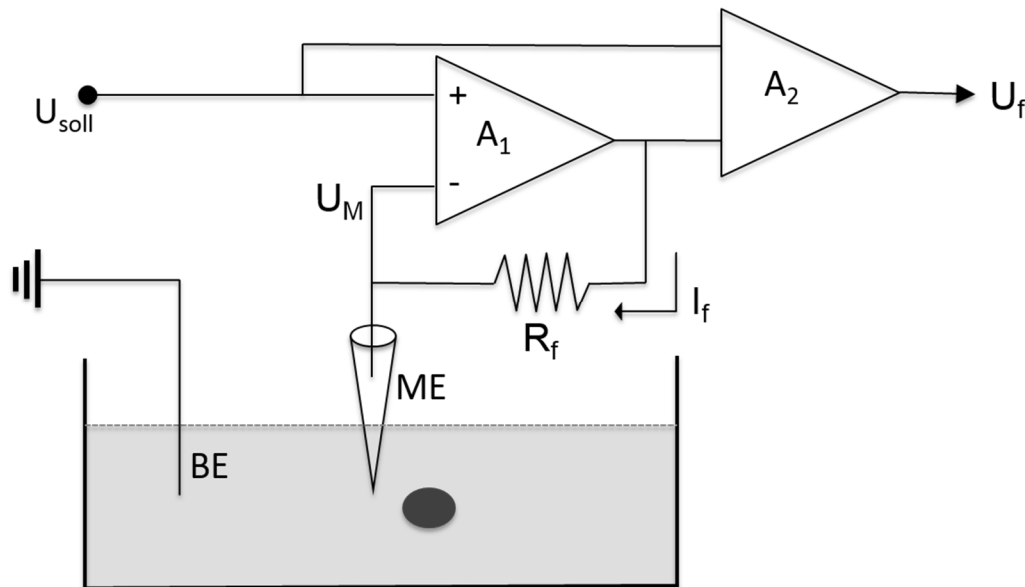


Abb. 11: Schematische Darstellung der Patch-Clamp Methode (modifiziert nach Sherman-Gold, 1993)

Die Messelektrode wird an den negativen Eingang des Eingangsverstärkers (A1) angeschlossen und gibt das Membranpotential (U_M) vor. Als positiver Eingang dient ein einstellbarer Sollwert (U_{soll}). Der hochohmige Widerstand (R_f) vervollständigt die Anordnung um A 1 durch eine „feedback“- Schleife zu einem Strom-Spannungs-Konverter. Die am Widerstand anliegende Spannung (U_f) wird über einen Differentialverstärker (A2) bestimmt, der mit dem Ausgang von A1 und U_{soll} verbunden ist. Der gesamte Strom (I_f), der benötigt wird, um das Membranpotential (U_M) auf dem Sollwert (U_{soll}) zu halten, fließt durch den Widerstand und lässt sich mit U_f und R_f über das Ohmsche Gesetz errechnen. Wie beim Voltage-Clamp Verfahren dient der Klemmstrom (I_f), der Beschreibung des transmembranen Stroms I_M .

2.7.2.2 Praktische Durchführung

Für jede Messung wurden frische Glaspipetten gezogen (Borosilikat-Glaskapillaren 1B120F-4, World Precision Instruments, Sarasota, USA). Dazu wurde der Flaming/Brown micropipette puller P-87 (Sutter Instruments, Novato, USA) verwendet. Die Pipettenspitzen wurden dann noch hitzepoliert, um die Bildung des Giga-Seals besser zu ermöglichen. Dazu wurden die Spitzen unter Mikroskopsicht (Axiovert 25, Zeiss, Jena) an einen glühenden Draht angenähert. Die Widerstände der Pipetten lagen idealerweise zwischen 3 und 5 M Ω . In das Pipetteninnere wurde eine sog. „internal solution“ eingefüllt, die in ihrer Zusammensetzung annähernd dem Intrazellularraum gleicht. Zur Messung wurde jeweils eine Glaspipette auf die Messelektrode aufgesteckt und in einer Halterung (headstage; biologic, Claix, Frankreich) über dem Bad befestigt. Mit Mikromanipulatoren (Luis und Neumann, Ratingen) konnte die Messelektrode ins Bad abgesenkt und unter mikroskopischer Führung (Mikroskop: „Diaphot“; Nikon, Japan) der Zelle angenähert werden. Die Elektroden bestanden wie beim Voltage-Clamp auch aus mit Silberchlorid beschichteten Silberdrähten. Um den notwendigen Unterdruck zu erzeugen war die Messelektrode pneumatisch mit einer 10 ml Glasspritze verbunden. Die Perfusion erfolgte mit der sog. „external solution“, die ional näherungsweise dem Extrazellularraum entspricht. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur (ca. 22°C) durchgeführt.

Die Messelektroden waren mit einem Oszillographen (HM 305-2, HAMEG Instruments, Rufenach, Heidelberg) und einem Messverstärker (RK 400, biologic Science Products, Hofheim) verbunden. Über einen Analog/ Digital- Wandler (Digidata 1200, Axon Instruments) gelangten die Messdaten auf einen Computer (PC Gauch und Sturm, Mannheim), der mit geeigneten Programmen (PClamp 6, Axon Instruments) Spannungsprotokolle generierte und die Messdaten aufgezeichnete. Zur elektrischen Abschirmung befand sich der Messstand in einem Faradayschen Käfig.

„Internal solution“:

140 mmol/l KCl, 5 mmol/l KATP, 1,5 mmol/l MgCl₂, 0,5 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l EGTA, 10 mmol/l HEPES (pH=7,4; eingestellt mit NaOH)

„External solution“:

140 mmol/l NaCl, 3,5 mmol/l KCl, 1,5 mmol/l CaCl₂, 1,4 mmol/l MgSO₄, 10 mmol/l HEPES (pH=7,4; eingestellt mit NaOH)

2.8 Computersimulation kardialen Gewebes

Die durch elektrophysiologische Messungen generierten Daten wurden an die Kooperationspartner des Institutes für biomedizinische Technik (IBT) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) übermittelt. Dort wurden sie in Modelle des Vorhofs integriert. Die im Folgenden erwähnten Methoden der Computersimulation wurden nicht von mir durchgeführt.

Seit der Veröffentlichung der Daten aus dem "Visible-Human"-Projekt, verfügt das IBT über hoch entwickelte Methoden zur Vorverarbeitung, Segmentierung und Visualisierung von anatomischen Daten aus medizinischen Bildgebenden Verfahren. In diesem Zusammenhang wurde das in diesem Projekt zur Anwendung kommende menschliche Vorhofmodell entwickelt. Es ist möglich, die Elektrophysiologie, die Kraftentwicklung und die Erregungsausbreitung in dieser Simulation zu berechnen. Die Erregung des Vorhofs wird entweder extern vorgegeben oder von einem implementierten Sinusknotenmodell übernommen. Ein entsprechendes Modell des menschlichen Sinusknotens wurde in den letzten Jahren am IBT entwickelt. Um die Erregungsausbreitung im Vorhof zu berechnen kam das "Bidomain"-Modell zum Einsatz. Das Berechnungsprogramm wurde in den letzten Monaten komplett überarbeitet und kann nun die äußerst komplexen Prozesse parallel verarbeiten. Das Modell kann einerseits frei wählbare Heterogenitäten berücksichtigen als auch die Anisotropie der elektrischen Eigenschaften, die sich aus der Faserorientierung der Muskelstränge ergeben, abbilden.

Die gemessenen Daten aus Patch-Clamp-Versuchen wurden digital in dieses Modell implementiert. Es wurden Ströme von Einzelzellen und in einem 2D Gewebestück simuliert. Durch diese in-silico-Modellierung kann der Zusammenhang von Mutationen des Kv1.5-Kanals mit der Erregungsausbreitung im Vorhof aufgeklärt werden. Damit kann man vorhersagen, inwiefern die untersuchte Mutation als Substrat für Vorhofflimmern dient.

2.9 Zebrafischarbeiten

2.9.1 Zebrafischstämme

Es wurden für alle Experimente Wildtypfische der Stämme TüAB oder AB verwendet.

2.9.2 Haltung

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) gehört zu den karpfenartigen Fischen (Cyprinidae) und stammt ursprünglich aus den Zuflüssen des Ganges in Bengalen und Pakistan. Er wird maximal fünf cm lang und zeichnet sich durch eine sehr schnelle Embryonalentwicklung sowie durchsichtige Embryonen aus. Ab 48 Stunden nach der Befruchtung (48 hours post fertilization, hpf) ist z.B. eine Veränderung des Herzens sichtbar.

Die adulten Fische wurden bei 28°C in einem Aquariensystem der Firma Schwarz (Göttingen) gehalten und hatten 13 Stunden Licht am Tag (8-21 Uhr). Es erfolgte eine Haltung und Verpaarung nach Westerfield et al. (1995).

2.9.3 Zucht

Um Zebrafischembryonen für ein Experiment zu gewinnen mussten zunächst am Abend zuvor jeweils ein Männchen und ein Weibchen zusammen in einen Plastiktank gesetzt werden. Die Paare wurden jedoch durch eine Trennwand voneinander separiert. Am folgenden Morgen konnten die Trennwände entfernt werden, woraufhin die Eiablage beginnt. Nach ca. 20-30 Minuten konnten die befruchteten Eier, die durch ein Gitter im Ablichttank gefallen sind, abgesammelt und in Petrischalen mit E3-Medium überführt werden.

Um die Pigmentierung zu verhindern wurde dem E3-Puffer 24 hpf 0,2 mM 1-phenyl-2-thiourea (PTU; Sigma) zugesetzt.

E3-Puffer:

4 mM NaCl

0,17 mM KCl

0,33 mM CaCl₂

0,33 mM MgSO₄

2.9.4 Bestimmung der Entwicklungsstadien

Die Zebrafischembryonen wurden unter einem Stereomikroskop (S2X16, Olympus, Hamburg) betrachtet und die Entwicklungsstadien nach Kimmel et al. (1995) bestimmt.

2.9.5 Mikroinjektion in Zebrafischembryonen

Um einen Knock-Down von ZFH3 durchzuführen und anschließend weitere Charakterisierungen durchführen zu können wurden sog. Morpholinos in frisch befruchtete Embryonen injiziert. Morpholinos sind synthetisch hergestellte Nukleinsäure-Analoga, die die Translation oder das Splicing von mRNA hemmen. Eine Injektion ist bis zum Vier-Zell-Stadium möglich, da hier noch eine Verbindung zwischen Dotter und Eizelle besteht, durch die die Morpholinos diffundieren können. Für die Injektionen wurden zunächst Borsilikatkapillaren (World Precision Instruments, Berlin) mit einem Puller (P-10, Narishige, Zollnitz) gezogen und je nach Menge der zu injizierenden Embryonen mit 3-6 µl der Morpholinlösung befüllt. Die Morpholinlösung wurde mit 200 mM KCl angesetzt. Mithilfe eines Mikromanipulators (M-152, Narishige, Zollnitz) und einer Injektionsanlage (Eppendorf, Hamburg) wurde die Lösung in den Dotter der Embryonen injiziert. Die Embryonen lagen dazu in den Vertiefungen einer Agarosegelrampe.

Sequenz der Morpholinos:

ZFH3-Splice-Morpholino: TAACTTAATAAACTCACCTAGTGCT

ZFH3-Translations-Morpholino: CGGGAGACTCACAGCTTTCCATGCT

Wegen des konsistenteren Phänotyps wurde für alle Experimente der Start-Morpholino benutzt. Er wurde in einer Konzentration von 100 µM injiziert.

2.9.6 Charakterisierung von Herzphänotypen

Um den kardialen Phänotyp, der sich nach einem ZFH3-Knock-Down ergab, zu charakterisieren wurden folgende Untersuchungen an Wildtyp- bzw. Morpholino-injizierten Fischen durchgeführt:

- Am Stereomikroskop (S2X16, Olympus) wurden nach 48 und 72 hpf Fotos gemacht (Kamera: DC 500, Leica, Solms)
- Es wurde am Stereomikroskop die Herzrate bestimmt. Dazu wurden die Herzschläge pro Minute bei 6-14 Fischen ausgezählt.
- Es wurden mit einer Videokamera (Typ CF 15/4 MC, Kappa, Gleichen) Filme aufgenommen, um die Fraktionsverkürzung („fractional shortening“) zu untersuchen. Das fractional shortening berechnet sich aus dem Verhältnis des endsystolischen zum enddiastolischen Durchmesser von Atrium oder Ventrikel und dient als Maß für die Kontraktilität des Herzens

2.9.7 Absammeln und Fixieren

Die Zebrafischembryonen wurden zum gewünschten Zeitpunkt (20 Somiten, 48 hpf, 72 hpf) abgesammelt. Dazu wurde zunächst die Eihülle (Chorion) mit Pinzetten entfernt und die Embryonen anschließend in 4% Paraformaldehyd (PFA) über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Embryonen jeweils 5 Minuten in 25 %, 50 %, 75 % und 100 % Methanol überführt und dann in 100 % Methanol bei -20°C gelagert.

2.9.8 In situ Hybridisierung (ISH)

Um die räumliche und zeitliche Expression bestimmter Gene auf mRNA-Ebene darzustellen, wurden *in situ* Hybridisierungen in fixierten Zebrafischembryonen durchgeführt. Dadurch konnten auch Expressionsunterschiede verschiedener Gene zwischen Wildtypfischen und morpholinoinjizierten Fischen aufgezeigt werden.

Es wurden zunächst Digoxigenin-markierte anti-sense RNA-Sonden hergestellt, die dann an die Ziel-mRNA im Gewebe binden. Ein Antikörper gegen Digoxigenin kann dann die hybridisierte RNA erkennen. Eine alkalische Phosphatase die an den Antikörper gekoppelt ist, dient nach Zugabe des Substrats NBT-BCIP der Sichtbarmachung im Gewebe. So sind nur die Zellen gefärbt, in denen die entsprechende RNA vorliegt, also das Gen exprimiert ist.

Das Protokoll stellte sich wie folgt dar (wenn nicht anders erwähnt bei Raumtemperatur):

Rehydrieren:

- je 5 Minuten in: 100 % Methanol
- 75 % Methanol
- 50 % Methanol
- 25 % Methanol
- PBST

Proteinase K-Verdau:

- je nach Stadium in Proteinase K (10 µg/ml, Sigma, Taufkirchen): 20 Somiten: 3 Minuten
- 48 hpf: 40 Minuten
- 72 hpf: 50 Minuten
- ein Mal kurz und ein Mal 5 Minuten in PBST waschen

Refixieren:

- 20 Minuten in 4 % PFA geben
- ein Mal kurz und ein Mal 5 Minuten in PBST waschen

Behandlung mit Essigsäureanhydrid:

- 2,5 µl Essigsäureanhydrid in 1 ml 0,1 M Triethanolamin geben
- Embryonen 10 Minuten inkubieren
- zwei Mal 10 Minuten in PBST waschen

Prähybridisieren:

- 5 Minuten bei 70 °C in HYB⁻ Puffer geben
- 4 Stunden bei 70 °C in HYB⁺ Puffer geben

Hybridisieren:

- Sonde in HYB⁺ Puffer auf die Embryonen geben, über Nacht bei 70 °C

Sonde auswaschen:

- zwei Mal 30 Minuten bei 70 °C in 50 % Formamid/50 % 2XSSCT waschen
- 15 Minuten bei 70 °C in 2XSSCT waschen
- zwei Mal 30 Minuten in 0,2XSSCT waschen
- 5 Minuten bei Raumtemperatur in 0,2XSSCT waschen

Blockieren:

- Embryonen in 24-Well-Platten überführen
- 4-5 Stunden blockieren in 2 % blocking solution von Roche (Mannheim) in MAB-Puffer

Antikörperinkubation:

- Anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche, Mannheim) 1:3000 in 2 % blocking solution in MAB auf die Embryonen geben, über Nacht bei 4 °C inkubieren
- 25 Minuten in 2 % blocking solution in MAB waschen
- drei Mal in MAB-Puffer waschen

Färbereaktion:

- drei Mal 5 Minuten in Staining Buffer equilibrieren
- Staining Buffer mit 20 µl/ml NBT-BCIP-Lösung (Roche, Mannheim) auf die Embryonen geben. Solange inkubieren, bis die Färbung sichtbar wird
- Färbereaktion mit PBST abstoppen, 2 Mal 10 Minuten in PBST waschen und dann bei 4 °C lagern

Verwendete Lösungen:

10X PBS:

80 g NaCl

2 g KCl

14,4 g Na₂HPO₄

2,4 g KH₂PO₄

Mit DEPC-H₂O auf einen Liter auffüllen

pH auf 7,4 einstellen

PBST:

100 ml 10X PBS

900 ml DEPC-H₂O

1 ml Tween-20 (0,1 % final, Sigma, Taufkirchen)

20X SSC:

87,65 g NaCl

44,1 g Natriumcitrat (Sigma, Taufkirchen)

Mit DEPC-H₂O auf 350 ml auffüllen

pH mit Zitronensäure (Sigma, Taufkirchen) auf 4,5-5 einstellen

Mit DEPC-H₂O auf 500 ml auffüllen

2X SSCT:

5 ml 20X SSC

50 µl Tween 20 (0,1 % final)

4 % PFA:

100 ml DEPC-H₂O

8 g PFA

200 µl 10 M NaOH

HYB-:

50 % Ultrapure Formamid (Life Technologies, Karlsruhe)

5X SSC

0,1 % Tween 20

HYB+:

HYB-

50 mg/ml torula RNA (Sigma, Taufkirchen)

50 µg/ml Heparin (Sigma, Taufkirchen)

MAB-Puffer:

100 mM Maleinsäure (Sigma, Taufkirchen)

150 mM NaCl

DEPC-H₂O

pH auf 7,5 einstellen

Staining Buffer:

50 mM MgCl₂

100 mM NaCl

100 mM Tris-HCl, pH 9,5

0,1 % Tween-20

Steril filtrieren!

2.9 Datenerfassung und Auswertung

Es wurde an einem PC mit Windows XP oder Windows 7 gearbeitet.

Folgende Software wurde benutzt: Acrobat Reader (Adobe), ImageJ (Wayne Rasband), ApE (M. Wayne Davis).

Außerdem wurden die Dienste von PubMed und Blast (*NCBI*, www.ncbi.nlm.nih.gov) genutzt.

Bei der statistischen Auswertung wurde stets der Mittelwert \pm den Standardfehler angegeben. Die Anzahl der durchgeführten Experimente wird durch n angezeigt.

Die Signifikanz wurde beim Vergleich zweier Stichproben mittels gepaarten Student's t- Tests überprüft. War der p-Wert $<0,05$ wurden die Daten als signifikant und war er $<0,01$ als hochsignifikant verschieden angesehen.

Die Ergebnisse ausgewählter Messprotokolle wurden aus pharmakologischen Überlegungen heraus mathematisch approximiert. Die Boltzmann- Verteilung diente zur Abschätzung der halbmaximalen Aktivierungsspannung und der Steigung der Aktivierungskurven der Ströme.

Die Dosis- Wirkungsbeziehung für die pharmakologische Auswertung wurde mit Hilfe der Hill- Gleichung bestimmt.

Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Inaktivierung der Kaliumströme wurden an die experimentell ermittelten Stromkurven einfache Funktionen approximiert und deren Zeitkonstante τ ermittelt. Es erfolgte dann eine statistische Auswertung der Verteilung der Zeitkonstanten in Abhängigkeit von der Spannung des Testpulses.

Die Berechnungen wurden mit Origin Software (Microsoft Software Inc., Northampton, MA, USA) durchgeführt. Die graphischen Darstellungen erfolgten sowohl mit der Origin Software als auch mit der Micrografx Designer 7 Software (Micrografx Inc., Unterschleißheim).

3. Ergebnisse

3.1 Mutationen im $K_v1.5$ -Kanal bieten ein Substrat für Vorhofflimmern

Neben den sekundären Formen von Vorhofflimmern, die auf kardiale Grunderkrankungen zurückzuführen sind, gibt es auch primäre Formen, bei denen eine solche Erkrankung nicht festgestellt werden kann. Die Hauptursache dieser Formen sind genetische Defekte (siehe Abschnitt 1.2.3: „Hereditäres Vorhofflimmern“). Am häufigsten betroffen sind dabei kardiale Ionenkanäle. Innerhalb dieser Gruppe stellt der $K_v1.5$ -Kanal den Kanal mit den meisten beschriebenen Mutationen dar (aktuell 10 identifizierte Mutationen).

Zunächst wurden die folgenden Mutationen mittels Mutagenese-PCR in die cDNA von $K_v1.5$ eingeführt: A576V, T527M, E610K. Die cDNA lag in einem für die Zellkultur geeigneten Plasmid vor (pcDNA3.1, mit CMV-Promotor). Nach einer Transfektion von CHO-Zellen konnten die resultierenden Ströme der Kanäle in Patch-Clamp-Experimenten gemessen werden. Dazu wurde ein zweistufiges Spannungsprotokoll verwendet: ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV wurden die Zellen mit variablen Spannungssprüngen (1 250 ms) depolarisiert. Die variablen Spannungssprünge starteten bei -90 mV und stiegen in Schritten von 10 mV auf 50 mV an. Diesen Schritten schloss sich jeweils ein konstanter Spannungssprung auf +50 mV an (50 ms). Ströme je einer repräsentativen Zelle sind in Abbildung 12 gezeigt. Um die Ströme miteinander vergleichen zu können wurde die Stromdichte berechnet. Auf diese Weise werden Unterschiede, die auf die Zellgröße zurückzuführen sind, eliminiert. Die Stromdichte berechnet sich als Quotient aus der Stromstärke (in Ampere, A) und der elektrischen Kapazität (in Farad, F) einer Zelle (Stromdichte $S=A/F$). Es wurden jeweils die Mittelwerte aus drei Zellen ermittelt. Dabei ergab sich für WT-Zellen eine Stromdichte von 40,43 A/F. Im Vergleich dazu lag die Stromdichte bei der A576V Mutation bei 8 A/F, also bei 20 % der Stromdichte des Wildtyps. Bei der E610K Mutation lag die Stromdichte bei 14,8 % (37 %) und bei der T527M Mutation bei 14 A/F (35 %).

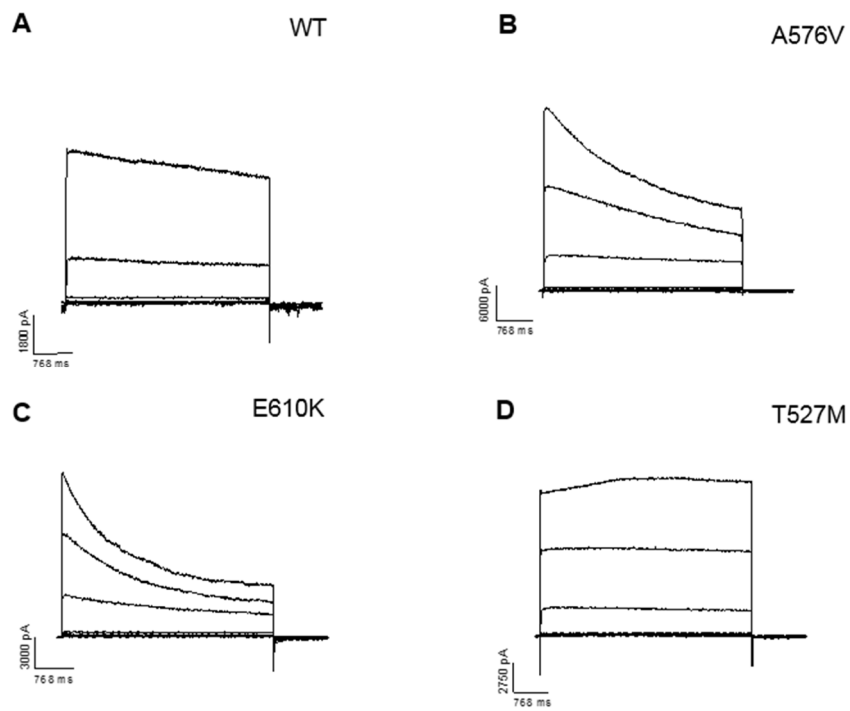


Abb. 12: Exemplarische Stromverläufe von Patch Clamp Messungen in CHO-Zellen (A): WT Strom; (B): A576V; (C): E610K; (D): T527M.

Je drei solcher Messungen wurden an den Kooperationspartner am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) übermittelt, wo die Daten in ein Computermodell des Vorhofs integriert wurden. Dazu wurden die Effekte der Mutationen zunächst in eine Beschreibung der Ströme auf Ionenkanallevel eingefügt. Die resultierenden Veränderungen wurden dann in Modellen von Einzelzellen und einem 2D Gewebestück untersucht.

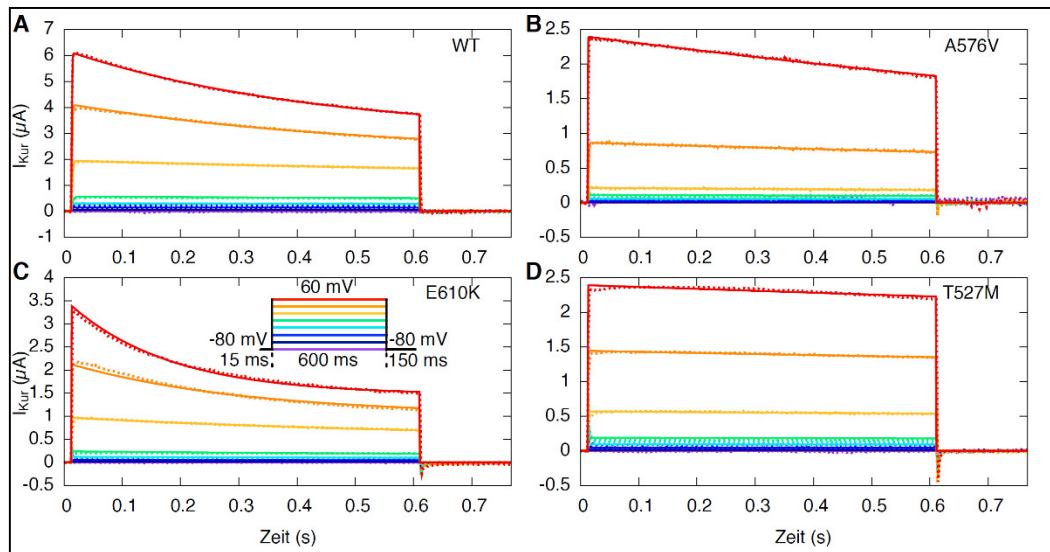


Abb. 13: Gemittelte Stromkurven von Patch-Clamp Aufnahmen (gestrichelte Linie) und die zugehörigen angepassten Simulationen der Ströme (durchgezogene Linie) durch Wildtyp-Kanäle (WT, **A) und durch mutierte Kanäle (A576V (**B**), E610K (**C**), T527M (**D**)); das verwendete Spannungsprotokoll ist in (C) eingezeichnet (Manuskript in Vorbereitung)**

Abb. 13 A (WT) zeigt einen typischen Stromkurvenverlauf von $K_v1.5$. Eine schnelle Aktivierung und langsame Inaktivierung des Kanals sind zu sehen. Im Vergleich zu den Mutationen ist die Amplitude des WT-Stroms am höchsten (ca. $6 \mu\text{A}$). Der Strom der A576V Mutation (Abb. 13 B) zeigt einen fast linearen Stromabfall und eine ca. 2,5 fach kleinere Amplitude (ca. $2,4 \mu\text{A}$). Die Mutation E610K (Abb. 13 C) zeigt einen exponentiell abfallenden Strom und eine maximale Amplitude von ca. $3,4 \mu\text{A}$. Die Ströme der T527M Mutation (Abb. 13 D) sind denen der A576V Mutation ähnlich, wobei die Ströme der Spannungsschritte auf 20 und 40 mV leicht erhöht waren. Der Strom zeigte lediglich eine sehr schwache Abnahme während der variablen Spannungssprünge. Zur weiteren Analyse wurden Aktionspotentiale (APs) in Kardiomyozyten simuliert. Die resultierenden Parameter sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

AP-Parameter	Kontrolle	A576V	E610K	T527M
Amplitude (mV)	105.6	105.4	105.0	104.3
$V_{m,Ruhe}$ (mV)	-81.0	-80.4	-80.4	-80.4
APD ₅₀ (ms)	172.4	225.5	224.8	225.7
APD ₉₀ (ms)	298.4	290.9	293.1	293.9
dV_m/dt_{max} (V/s)	190.9	197.7	198.2	198.2

Tabelle 3: Parameter der Aktionspotentiale (AP) unter Kontrollbedingungen und für die Mutationen in $K_v1.5$ (Manuskript in Vorbereitung).

Die APs der Mutationen sehen prinzipiell gleich aus (Abb. 14 A). Sie weisen eine erhöhte Transmembranspannung nach dem Overshoot auf, was zu einer ausgeprägteren „spike-and-dome“ Morphologie der APs führt. Dieser Effekt war in der A576V Mutation am deutlichsten zu sehen. Die Transmembranspannung stieg bis auf 15 mV an, was zu einer ausgeprägteren Plateauphase und einer über 50 ms verlängerten APD₅₀ (Aktionspotentialdauer bei 50 % der Repolarisation) führte. Da die Repolarisation jedoch schneller vollzogen wurde als im WT, erzeugten die Ströme der mutierten Kanäle einen minimal kleineren APD₉₀ Wert (Aktionspotentialdauer bei 90 % Repolarisation). Die Aufstrichgeschwindigkeiten dV_m/dt_{max} waren durch die Mutationen um 4 % erhöht, während jedoch die Amplituden unverändert waren. Die zugrundeliegenden Ströme, die die Unterschiede der APs verursachen sind in Abb. 14 B gezeigt.

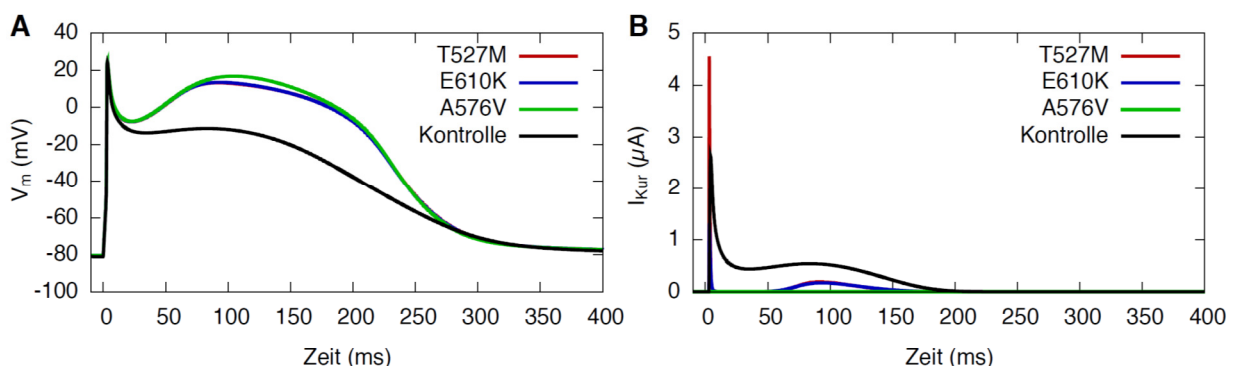


Abb. 14: Aktionspotentiale (A) und zugehörige I_{kur} -Ströme (B) unter Kontrollbedingungen und durch mutierte Kanäle (Manuskript in Vorbereitung).

Als nächstes sollte untersucht werden, ob Mutationen in $K_v1.5$ in der Lage sind, die Entstehung von Rotoren, welche für die Bildung von AF verantwortlich sein können, zu begünstigen. Dazu wurde in simulierten 2D Gewebestückchen ein „Cross-field“ Stimulus, senkrecht zur ursprünglichen Erregungswelle, bei einer Basiszykluslänge (Dauer zwischen den Aufstrichen zweier APs, BZL) von 0,4 s angewandt: drei normale Stimuli wurden durchgeführt bevor der cross-field Stimulus angelegt wurde. Dieser wurde 50 ms nach dem Ende der effektiven Refraktärperiode (ERP) des letzten regulären Stimulus angelegt. Dadurch konnten in den schon wieder erregbaren Gewebeteilen APs ausgelöst werden. Die stimulierte Fläche hat eine quadratische Form (linke Spalte Abb. 15). Die obere Reihe in Abb. 15 zeigt die Kontrollbedingungen. 345 ms nach Initiierung der regulären Erregungswelle wurde der cross-field Stimulus appliziert ($t=0$). In Richtung der vorhergehenden Erregungswelle konnte ein Block gesehen werden, der auf das Gewebe im noch refraktären Zustand zurückzuführen ist. Die Erregung kann sich also nur senkrecht in Richtung der regulären Erregungswelle ausbreiten. 100 ms später erreicht die Erregung dann das vorher refraktäre Gebiet.

Es wurde also kein „reentry“ Kreis initiiert und 426 ms später war das Gewebe komplett repolarisiert. Da die ERP bei allen drei Mutationen bei einer BZL von 0,4 s 5 ms länger ist, wurde der cross-field Stimulus erst nach 350 ms appliziert statt nach 345 ms. Zur Vereinfachung wurde der Zeitpunkt des Stimulus als $t=0$ angesehen. Die Erregungsfront der Mutationen erreichte den Bereich des Stimulus, der nicht mehr refraktär war. Nach 426 ms zeigten sich Erregungswellen mit mehr als einer kompletten Rotation. Nach 426 ms zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Mutationen. Im Fall der A576V Mutation (Abb. 15, 2. Reihe) war der untere linke Bereich des Gewebestücks durch den Rotor erregt, die vorherige Welle verursachte jedoch einen Leitungsblock, so dass die Erregungsfront das Gebiet wieder verlassen konnte, dass dann nach 852 ms repolarisiert war. Im Falle der T527M Mutation war der Ablauf ähnlich (Abb. 15, 3. Reihe). Bei der E610K Mutante entwickelte sich dagegen kein Block, der die Erregungswelle eliminiert hätte. Eine neue Erregungswelle konnte sich durch eine kleine Lücke mit refraktärem Gewebe fortsetzen (Abb. 15, 4. Reihe). Nach 852 ms war jedoch nur noch der hintere Teil der Welle vorhanden, so dass sich kein „reentry“ Kreis gebildet hat und das Gewebe nach 1300 ms repolarisiert war.

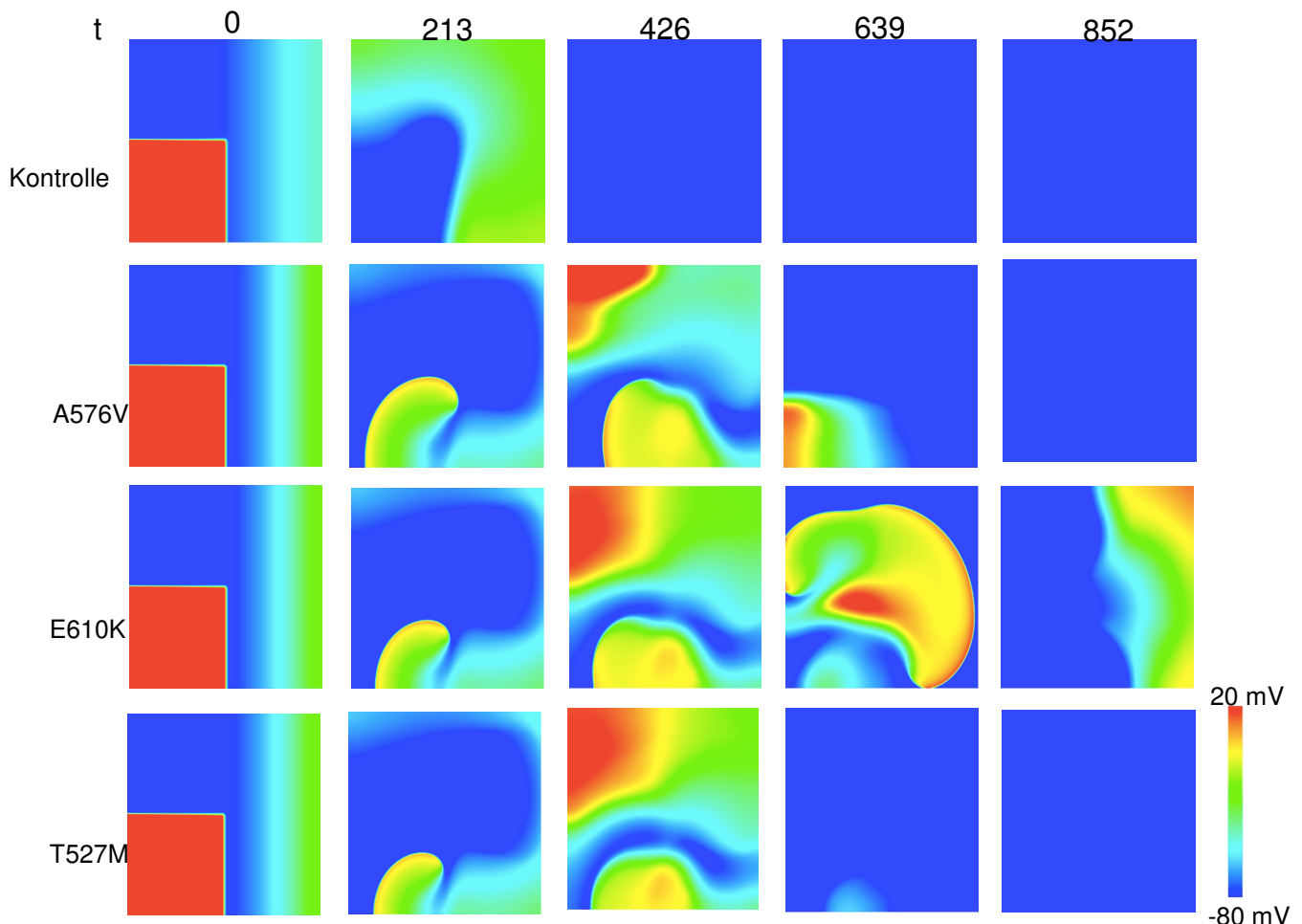


Abb. 15: Bildung von Rotoren in Modellen von Kontrolle (oben) und den Mutationen A576V (2. Reihe), E610K (3. Reihe) und T527M (4. Reihe). Um „reentry“ Kreise auszulösen wurde ein cross-field Protokoll appliziert ($t=0$); Der Stimulus ist als rotes Quadrat dargestellt. Die Verteilung der Transmembranspannung (TMV. Transmembrane voltage) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten abgebildet (immer nach 213 ms).

3.2 Inhibition von K_v1.5 durch Ajmalin

Es ist bekannt, dass Ajmalin heterolog exprimierte K_v1.5-Kanäle (ebenso wie K_v4.3-Kanäle) blockiert (Rolf *et al.*, 2000). Die genauen pharmakologischen Eigenschaften wurden jedoch noch nicht analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Ajmalin auf heterolog exprimierte K_v1.5- und K_v4.3-Kanäle sowohl in *Xenopus* Oozyten als auch in CHO-Zellen untersucht. Dazu wurden Voltage- bzw. Patch-Clamp-Experimente durchgeführt.

3.2.1 Ajmalin inhibiert konzentrationsabhängig heterolog exprimierte K_v1.5- und K_v4.3-Kanäle

Um die inhibitorischen Effekte von Ajmalin zu beschreiben wurden zunächst Voltage-Clamp-Versuche durchgeführt. Dazu wurden K_v1.5- bzw. K_v4.3-Kanäle heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Eine Oozyte wurde gemessen, anschließend aus der Badlösung entnommen und für 30 Minuten in Ajmalin inkubiert. Zur Verdünnung diente die im Bad verwendete 5 M KCl-Lösung. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut gemessen.

Es wurde ein Standardspannungsprotokoll verwendet: in einem Sprung auf 50 mV für 500 ms wurden die Zellen depolarisiert. In Abbildung 16 A sieht man typische Ströme vor bzw. nach Ajmalin-Inkubation. Durch das verwendete Spannungsprotokoll wurde ein schnell aktivierender und kaum inaktivierender auswärtsgerichteter Kaliumstrom generiert. Dies entspricht dem charakteristischen I_{kur} . Die Inkubation mit 300 μ M Ajmalin bewirkt eine deutliche Reduktion des K_v1.5- und K_v4.3-Stroms (Abb. 16 A, B). Mit einem zweistufigen Spannungsprotokoll wurde die Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit analysiert: ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Zellen mit variablen Spannungssprüngen (1 250 ms) depolarisiert. Die variablen Spannungssprünge starteten bei -90 mV und stiegen in Schritten von 10 mV auf 50 mV an. Diesen Schritten schloss sich jeweils ein konstanter Umkehrpuls auf +50 mV an (50 ms). Als absoluter Messwert diente der Peak der Stromamplitude. Unter Kontrollbedingungen (Inkubation in 5 M KCL) zeigte sich für K_v1.5 ein kleiner „Run-up“ auf 115 ± 5.7 % (n=6) und für K_v4.3 auf 101 ± 5.7 % (n=8). Bei Applikation steigender Ajmalin-Konzentrationen (3, 10, 30, 100, 300 und 1000 μ M) ergab sich ein IC₅₀ von 292 ± 2.85 μ M für K_v1.5 bzw. von 186 ± 31.4 μ M für K_v4.3 (n=6–10, Abb. 16 C). Um die pharmakologische Relevanz zu verdeutlichen wurden zusätzlich Patch-Clamp-Versuche in einer Säugetierzelllinie (CHO-Zellen) durchgeführt. Dazu wurde ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV ein depolarisierender Schritt auf 60 mV für 600 ms durchgeführt. Wie zu erwarten, ließ sich ein weit ausgeprägterer Effekt von Ajmalin zeigen. Der IC₅₀ lag hier bei 1.70 ± 0.82 μ M für K_v1.5 und bei 2.66 ± 2.8 μ M für K_v4.3 (n=3-7, Abb. 16 D).

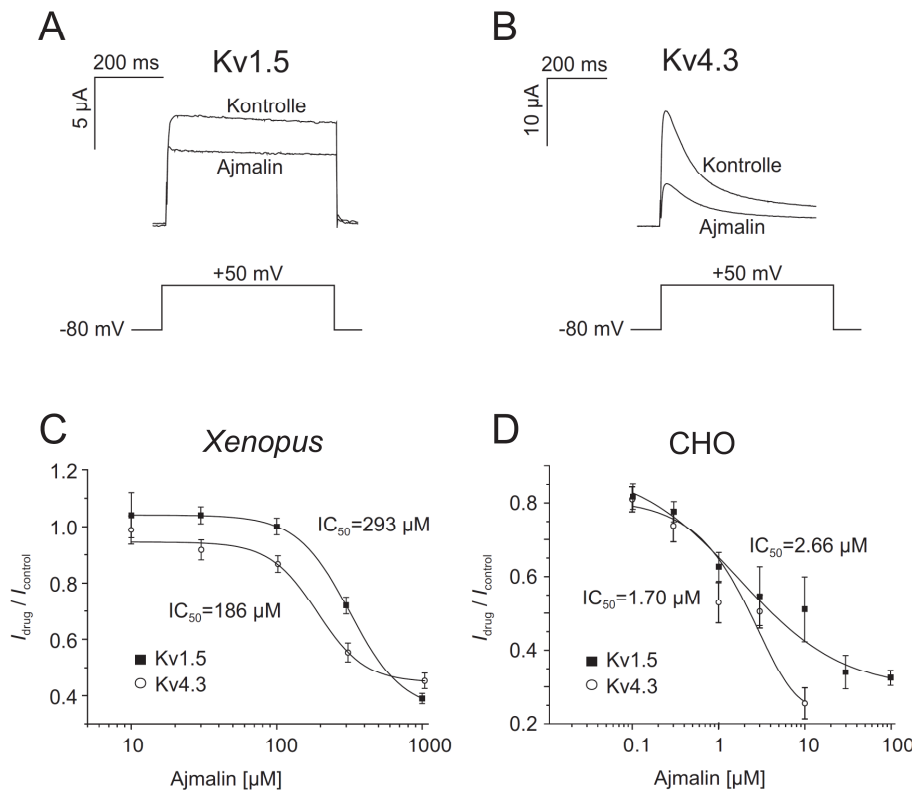


Abb. 16: Ajmalin inhibiert den kardialen $K_v1.5$ - und $K_v4.3$ -Kanal

(A) und (B): repräsentative Stromkurve eines typischen $K_v1.5$ -Stroms, bzw. $K_v4.3$ -Stroms, der durch das eingezeichnete Spannungsprotokoll ausgelöst wurde; 300 μM Ajmalin resultiert in einer Inhibition des $K_v1.5$ - und $K_v4.3$ -Stroms; Dosis-Wirkungs-Kurve der Ajmalin abhängigen Inhibition in *Xenopus*-Oozyten (C) und in CHO-Zellen (D) (Fischer *et al.*, 2013)

3.2.2 Pharmakologische Eigenschaften der Ajmalin-vermittelten $K_v1.5$ - und $K_v4.3$ -Blockade

Zur weiteren Charakterisierung der pharmakologischen Eigenschaften der $K_v1.5$ -Inhibition wurden Voltage-Clamp-Versuche durchgeführt. Dazu wurde erneut das in 3.2.1 beschriebene zweistufige Spannungsprotokoll verwendet. In Abb. 17 A und B sieht man die typischen Stromkurven des $K_v1.5$ -Stroms vor bzw. nach Applikation von 300 μM Ajmalin. Um eine Strom-Spannungskurve zu erstellen wurden die Messwerte an der ersten Linie in A und B herangezogen. Es ergab sich ein Schwellenwert von ca. -10 mV für die Aktivierung des Stroms. Danach stieg der Strom linear an (Abb. 17 C). Die Zugabe von 300 μM Ajmalin bewirkte eine Inhibition des Stroms um $35 \pm 1.9\%$ ($n=6$). Um eine Aktivierungskurve zu erstellen wurde die Stromamplitude der Spannungsspitze durch die zugehörige elektrochemische Antriebskraft geteilt. Anschließend wurde die Kurve mit einer Boltzmann Funktion angenähert. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich eine halbmaximale Aktivierungsspannung ($V_{1/2}$) von -1.6 ± 1.8 mV ($n=6$, Abb. 17 D). Die Applikation von Ajmalin bewirkte eine kleine, aber signifikante Verschiebung dieses Werts ($V_{1/2} = -8.3 \pm 0.87$ mV, $n=6$, $p < 0.05$, Abb. 17

D). Im Gegensatz zu $K_v1.5$ zeigt sich bei $K_v4.3$ keine Veränderung der halbmaximalen Aktivierungsspannung ($V_{1/2} = 0.63 \pm 2.1$ mV, $n = 6$, $p > 0.05$, ohne Abbildung).

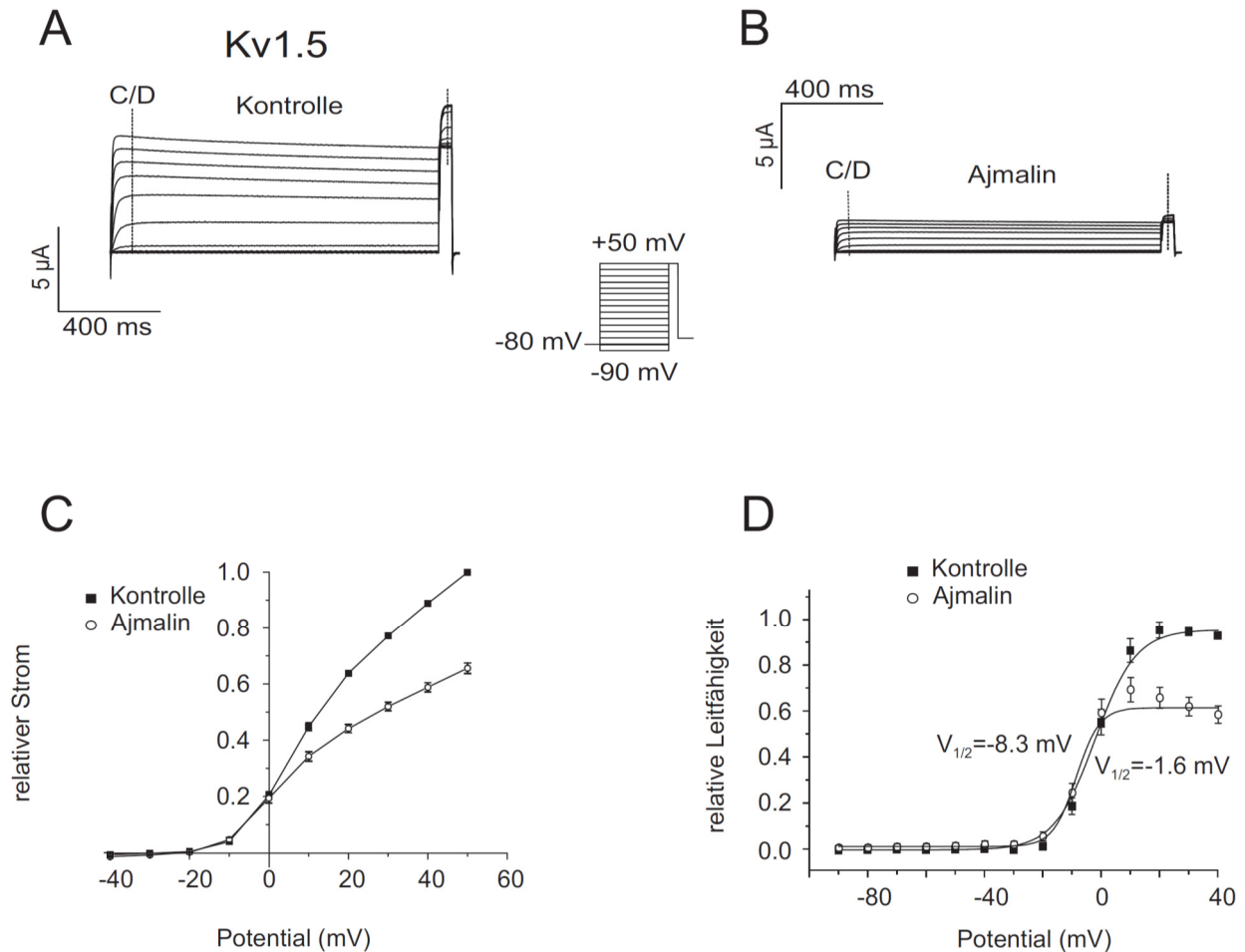


Abb. 17: Pharmakologische Eigenschaften der $K_v1.5$ -Inhibition

Typische Stromkurvenschar eines $K_v1.5$ -Stroms, ausgelöst durch ein zweistufiges Spannungsprotokoll (siehe Inset) vor (**A**) und nach (**B**) Ajmalin-Applikation (300 μ M); (**C**): Strom-Spannungskurve des $K_v1.5$ -Stroms unter Kontrollbedingungen (Vierecke) und mit Ajmalin (Kreise), $n=6$; (**D**): $K_v1.5$ Aktivierungskurven (Peak Stromamplitude geteilt durch die elektrochemische Antriebskraft), Ajmalin verursacht eine kleine, aber nicht signifikante Linksverschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung, $n=6$; (Fischer *et al.*, 2013)

Als nächstes wurde eine Inaktivierungskurve erstellt. Dazu wurde die Tailstromamplitude während des konstanten Umkehrpulses (rechte Linie in Abb. 17 A/B) gegen das Testpulspotential während des variablen Spannungssprungs geplottet. Erneut wurde mit einer Boltzmann Funktion angenähert. Unter Kontrollbedingungen ergab sich eine halbmaximale Inaktivierungsspannung von 2.68 ± 0.82 mV ($n=6$). Nach der Inkubation von 300 μ M Ajmalin zeigte sich keine signifikante Verschiebung dieses Wertes ($V_{1/2} = -0.98 \pm 1.14$ mV, $n=6$, $p > 0.05$, Abb. 18 A). Bei $K_v4.3$ war ebenfalls keine Änderung der Kanalinaktivierung festzustellen (Kontrolle, $V_{1/2} = -38.4 \pm 3.1$ mV; Ajmalin, $V_{1/2} = -38.4 \pm 3.1$ mV, $n=6$, $p > 0.05$, Abb. 18 B).

$V_{1/2} = -39.3 \pm 1.1$ mV, $n = 5-6$, $p > 0.05$, ohne Abbildung).

Im letzten Schritt wurde der Zeitverlauf der Blockentwicklung analysiert, indem ein depolarisierender Spannungssprung auf 40 mV appliziert wurde. Die Stromkurve nach Ajmalin-Inkubation wurde dabei durch die entsprechende Kontrollmessung geteilt. Der Block hat sich mit einer durchschnittlichen Zeitkonstanten von 6.43 ± 2.1 ms (τ) sehr schnell ausgebildet (Abb. 18 B, repräsentatives Experiment aus $n=6$). Bei Messungen mit $K_v4.3$ war die Blockentwicklung ebenfalls sehr schnell 3.98 ± 0.64 ms ($n = 6$).

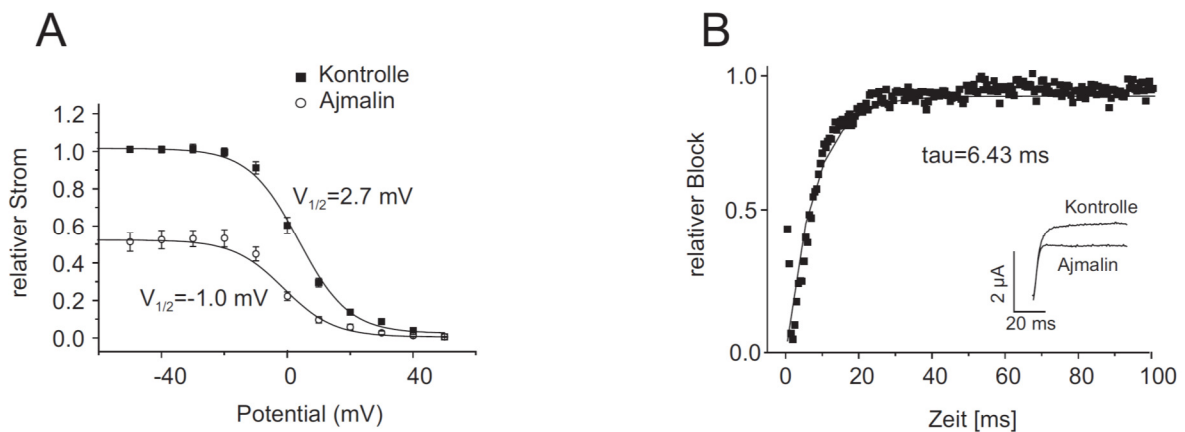


Abb. 18: Pharmakologische Eigenschaften der $K_v1.5$ -Inhibition

(A): $K_v1.5$ Inaktivierungskurven (Tail Stromamplitude gegen das Potential des ersten Spannungssprungs); Ajmalin Applikation verändert $V_{1/2}$ nicht signifikant; (B): Zeitverlauf der Blockentwicklung (Stromspur nach Ajmalin-Inkubation geteilt durch die entsprechende Spur vor der Behandlung);

3.2.3 Die $K_v1.5$ -Inhibition durch Ajmalin zeigt keine Frequenzabhängigkeit

Es kommt häufig vor, dass Inhibitoren von Ionenkanälen in ihrer Wirkung frequenzabhängig sind. Um herauszufinden, ob die $K_v1.5$ -Blockade bei höherer Stimulationsrate stärker ausfällt, wurden drei verschiedene Messprotokolle etabliert. Die Zellen wurden mit einem Spannungssprung auf 50 mV (200 ms) depolarisiert. Dieser Schritt wurde über 16 s mit einer Frequenz von entweder 1,3 oder 5 Herz wiederholt. Die Stromamplitude am Peak des letzten Testpulses, also nach 16 s, wurde gemessen, um die Stärke des Blocks zu ermitteln. In Abbildung 19 sieht man die Auswirkungen von Ajmalin auf die Peak Stromamplitude bei Verwendung der verschiedenen Frequenzprotokolle. Die Applikation von Ajmalin in einer Konzentration von 300 μ M bewirkte eine Reduktion des $K_v1.5$ -Stroms auf 0.72 ± 0.04 , 0.74 ± 0.05 und 0.69 ± 0.02 für 1, 2 und 5 Hz ($n=6$). Bei Gabe von 200 μ M Ajmalin reduzierte sich der $K_v4.3$ -Strom auf 0.60 ± 0.09 , 0.51 ± 0.15 und 0.63 ± 0.14 für 1, 2 und 5 Hz ($n=5$). Es war also bei beiden Kanälen keine Frequenzabhängigkeit der Blockade zu beobachten ($p > 0,05$).

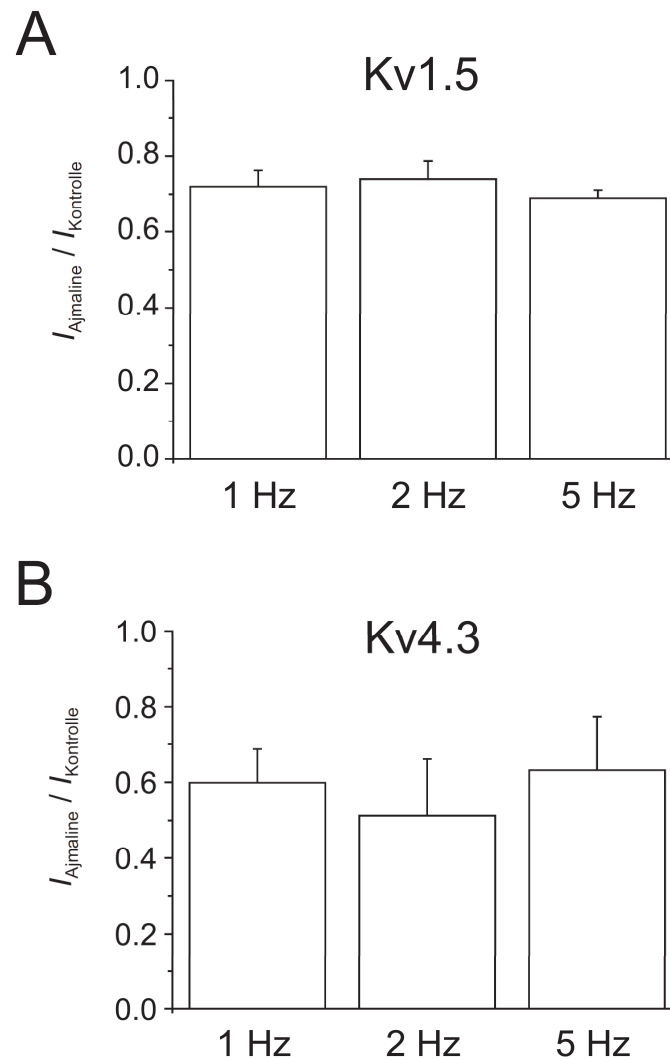


Abb. 19: Frequenzabhängigkeit des $K_v1.5$ und $K_v4.3$ Kanalblocks

Die Frequenzabhängigkeit des Blocks wurde mit drei verschiedenen Frequenzen analysiert: 1 Hz, 2 Hz und 5 Hz; Es war kein Effekt der Frequenz auf den inhibitorischen Einfluss von Ajmalin auf $K_v1.5$ -Kanäle (**A**) und $K_v4.3$ -Kanäle (**B**) zu sehen ($n=5-6$), (Fischer *et al.*, 2013)

3.3 Die Rolle von ZFH3 in der kardialen Entwicklung des Zebrafischs

Für ein funktionelles Herz ist neben der korrekten Struktur und Verteilung von Ionenkanälen, auch die richtige räumliche und zeitliche Expression von Transkriptionsfaktoren entscheidend. Nur mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren kann sich das Herz normal entwickeln und seine Funktion herstellen. Mutationen in Ionenkanälen waren die ersten genetischen Defekte, die mit Vorhofflimmern in Verbindung gebracht wurden, in neuester Zeit wurden aber auch die Transkriptionsfaktoren Pitx2 und ZFH3 mit dieser Herzrhythmusstörung assoziiert (Gudbjartsson *et al.*, 2007; Gudbjartsson *et al.*, 2009). Über den Zusammenhang von einer Mutation in ZFH3 und der Entstehung von Vorhofflimmern ist bislang wenig bekannt, weshalb es sich lohnt, dessen Rolle in der kardialen Entwicklung zu untersuchen, um so die Lücke schließen zu können

3.3.1 Kardialer Phänotyp nach Morpholino induziertem Knock-Down

Um funktionelle Analysen von ZFH3 zu tätigen, wurde ein Knock-Down in Zebrafisch Embryonen durchgeführt. Dazu wurden antisense Morpholinos benutzt, die die Translation von ZFH3 auf mRNA-Ebene blockieren. Zunächst konnte festgestellt werden, dass die Fische nach dem Knock-Down einen spezifischen kardialen Phänotyp aufweisen. In Abbildung 20 sieht man, sowohl bei 48 Stunden alten, als auch bei 72 Stunden alten Fischen (hpf = „hours post fertilization“, Stunden nach der Befruchtung) ein Perikardödem (B, D), was auf eine fehlerhafte Herzentwicklung schließen lässt. Bis auf die herzspezifischen Unterschiede entsprechen die Embryonen morphologisch dem Wildtyp (A, C).

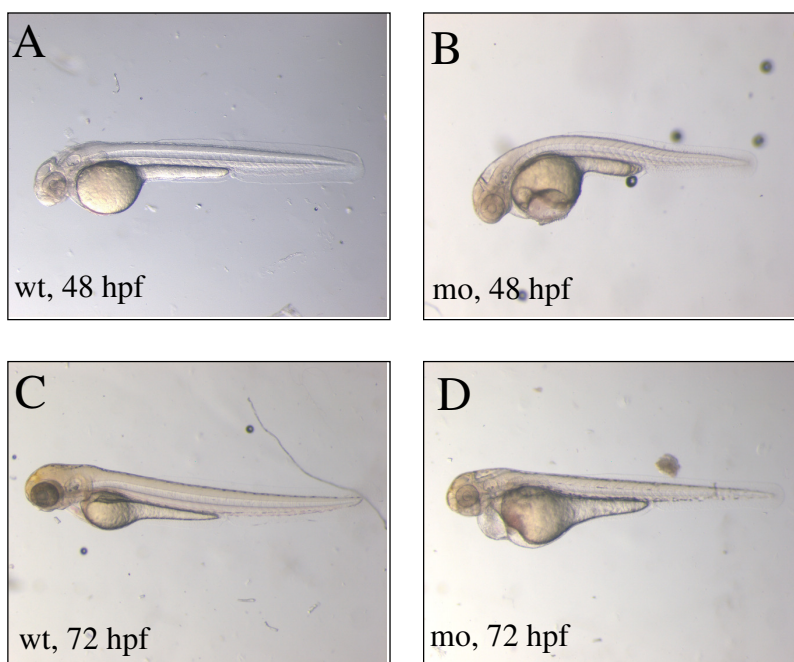


Abb 20: Auswirkung des ZFH3-Morpholinos auf die Morphologie des Herzens im Zebrafisch

Sowohl 48, als auch 72 Stunden nach der Befruchtung sieht man nach der Injektion eines ZFH3-Morpholinos (**B; D**) eine starke Veränderung des kardialen Phänotyps im Vergleich zum Wildtyp (**A; C**). In Folge des ZFH3-Knock-Downs hat sich ein Ödem im Bereich des Herzens gebildet, was auf Fehler in der Entwicklung schließen lässt. wt: Wildtyp; mo: Morpholino injiziert.

3.3.2 ZFH3 Knock-Down führt zu einer verringerten Herzrate

Um weitere Einblicke in die Rolle von ZFH3 zu erlangen wurden funktionelle Analysen durchgeführt. Nach der Morpholino induzierten Herunterregulation von ZFH3 wurde zunächst die Herzrate bestimmt und mit Herzraten von Wildtypfischen verglichen. Bei 5-12 Embryonen wurden die Herzschläge pro Minute ausgezählt. Es wurde deutlich, dass sich in Folge des Knock-Downs eine Bradykardie entwickelt hat. Es zeigte sich eine Reduktion der Herzrate um 13,2 %, bei 48 hpf, bzw. 11,4 % bei 72 hpf. In Beiden Fällen ist die Reduktion signifikant ($p < 0,05$, Abb. 21).

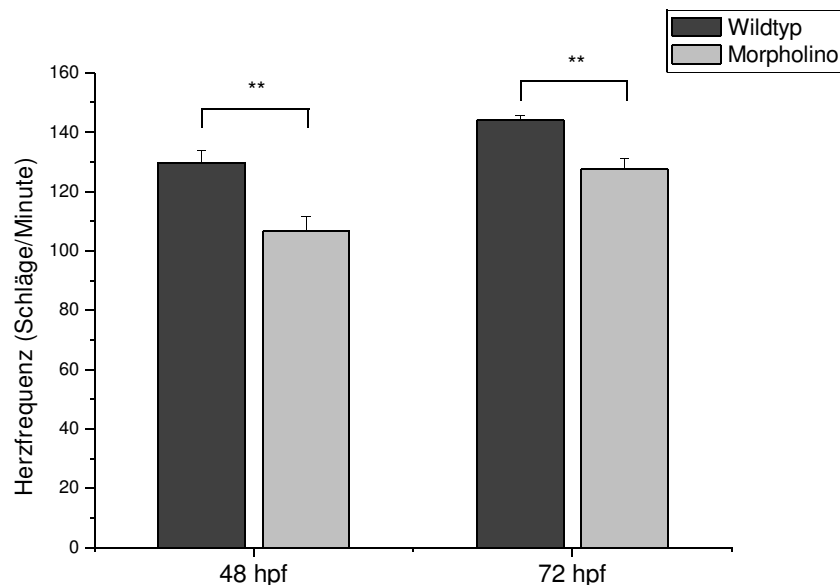


Abb. 21: Bradykardie nach ZFH3-Knock-Down

Nach einem Morpholino vermittelten Knock-Down von ZFH3 sind die Herzfrequenzen der Zebrafischembryonen hochsignifikant verringert. 48 Stunden nach der Befruchtung hat sich die Herzrate um 13,2 % und 72 Stunden nach der Befruchtung um 11,4% verringert ($n=5-12$).

3.3.3 ZFH3 Knock-Down führt zu verminderter Kontraktilität

Neben der Herzrate war auch die Kontraktilität nach dem ZFH3-Knock-Down beeinträchtigt. Als Maß für die Kontraktilität diente das „fractional shortening“. Dazu wurden zunächst Filme der schlagenden Herzen aufgenommen. Hierbei wurde neben den Zeitstadien (48 hpf und 72 hpf) zusätzlich nach Atrium und Ventrikel unterschieden. Das fractional shortening berechnet sich aus dem systolischen und dem diastolischen Durchmesser von Atrium oder Ventrikel. In Abbildung 22 ist zu sehen, dass in beiden Zeitstadien sowohl im Atrium, als auch im Ventrikel die Kontraktilität signifikant verringert ist ($p < 0,05$).

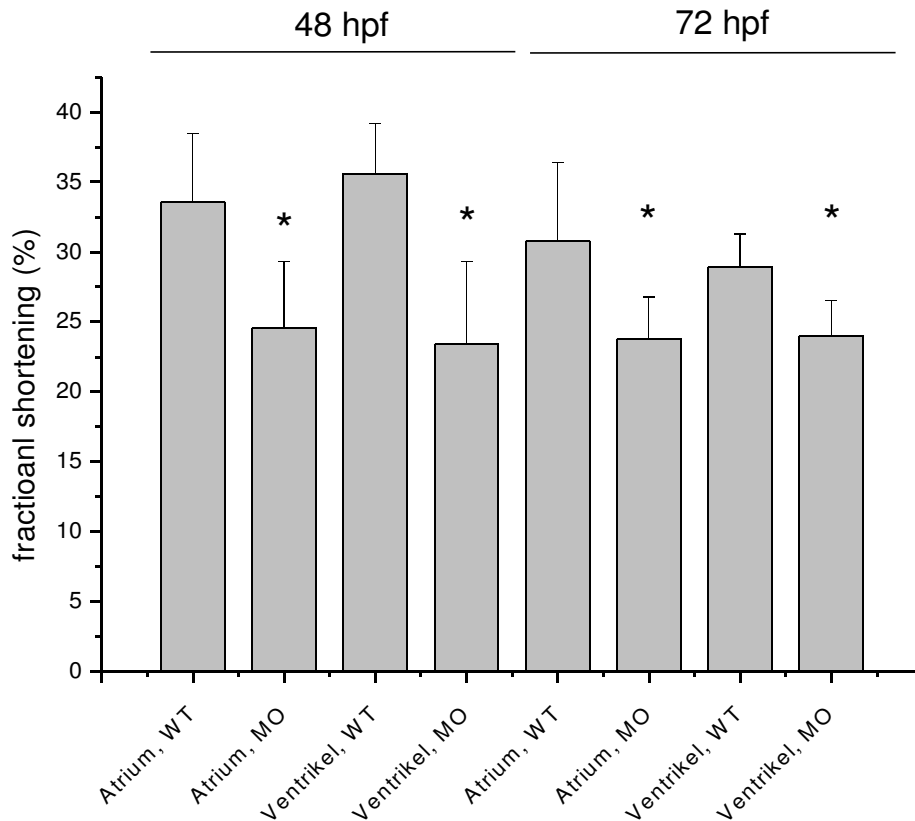


Abb. 22: Verringerte Kontraktilität nach ZFH3-Knock-Down

Ein Knock-Down von ZFH3 im Zebrafisch verursacht eine Abnahme des fractional shortening, was als Maß für die Kontraktilität des Herzens zu sehen ist. Sowohl die Atrien als auch die Ventrikel lassen 48 bzw. 72 hpf eine verminderte Kontraktilität sehen. WT: Wildtyp; MO: Morpholino Knock Down; n=5-14

3.3.4 Auswirkung des ZFH3 Knock-Downs auf die Expression struktureller Marker

Neben den funktionellen Untersuchungen sollten auch strukturelle Analysen durchgeführt werden. Dazu wurde die Expression wichtiger struktureller Marker mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen (ISHs) visualisiert. Diese dienen dazu eine spezifische RNA mittels einer antisense RNA-Sonde sichtbar zu machen. So kann man die zeitliche und räumliche Expression eines Gens untersuchen. Es wurden folgende Marker verwendet, um zu untersuchen, ob grundlegende strukturelle Veränderungen zu sehen sind: aMHC (atrial myosin heavy chain), vMHC (ventricular myosin heavy chain), ANP (atriales natriuretisches Peptid) und Bmp4 (bone morphogenetic protein 4). Bei Bmp4 war ein deutlicher Unterschied in der Expression zu sehen (Abb. 23 G, H). Dieses ist im Wildtypfisch nur im AV-Kanal exprimiert (Abb. 23 G). Im Gegensatz dazu ist es nach dem ZFH3-Knock-Down auch im Ventrikel exprimiert (Abb. 23 H). Auch die Expression von ANP ist abhängig von ZFH3. Dieses ist nach dem Knock-Down etwas stärker exprimiert als im Wildtyp (Abb. 23 I, J).

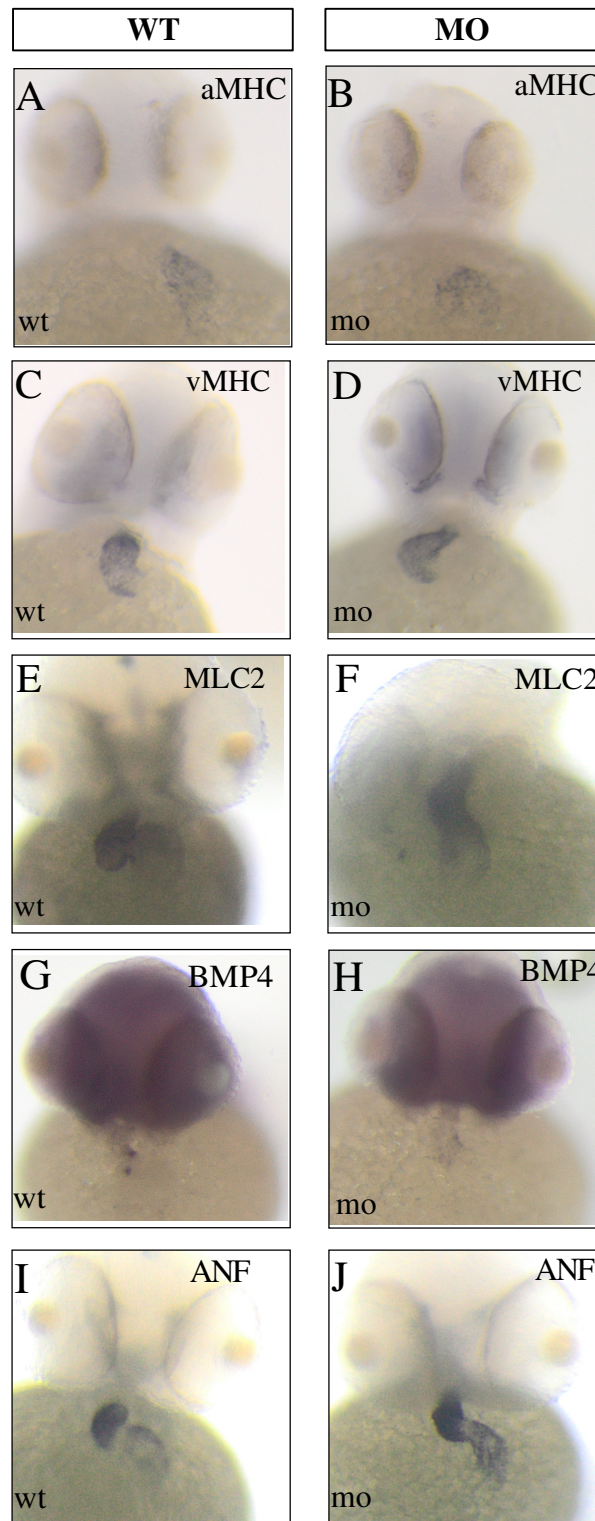


Abb. 23: In situ Hybridisierungen mit strukturellen kardialen Markern

Vergleich zwischen Wildtyp (linke Spalte) und ZFH3-Morpholino injizierten Embryonen (rechte Spalte); Die Embryonen waren alle 48 Stunden alt.

Die Expression von aMHC (**A, B**), vMHC (**C, D**) und MLC2 (**E, F**) unterscheidet sich nicht zwischen Wildtypzebrafischen und Fischen nach ZFH3-Knock-Down.

In (**G**) sieht man die Expression von BMP4 als Marker des A-V-Kanals in Wildtypfischen. Nach Knock-Down von ZFH3 ist die Expression von BMP4 deutlich verändert (**H**). BMP4 ist hier auch im Ventrikel sichtbar.

(**I**) zeigt die Expression von ANF im Wildtypfisch. Nach ZFH3-Knock-Down sieht man eine etwas stärkere Expression von ANF (**J**).

3.3.5 Knock-Down von ZFH3 im Zebrafisch führt zu fehlerhaftem kardialen Looping

Das kardiale Looping ist ein entscheidender Schritt in der Entwicklung eines normalen Herzens. Es ist das erste Zeichen der Rechts-Links Symmetrie des Körpers. Im Zebrafisch beginnt das Looping im 36 hpf-Stadium. Es zeigt sich eine Verschiebung des Ventrikels in Richtung der Mittellinie, und der Bereich des AV Kanals verengt sich. Das Herzrohr entwickelt sich kontinuierlich weiter und bildet eine S-förmige Schleife.

Nach dem Knock-Down von ZFH3 zeigte sich ein gehäuftes fehlerhaftes Looping. Entweder es war keine Symmetrie des Herzschlauches zu sehen, d.h. der Ventrikel war in einer Linie über dem Atrium („mittig“, Abb. 24 B), oder das Herz war „falsch“ geloopt, d.h. Der Ventrikel war auf der linken Seite des Fisches, statt auf der rechten („falsch“, Abb. 24 C). Ersteres war bei 18,4 % der Fall, zweites bei 5,3 %. Bei 76 % der injizierten Fischen war das Looping richtig (Abb. 24 A), im Gegensatz zu 98,5 % bei den Wildtypfischen.

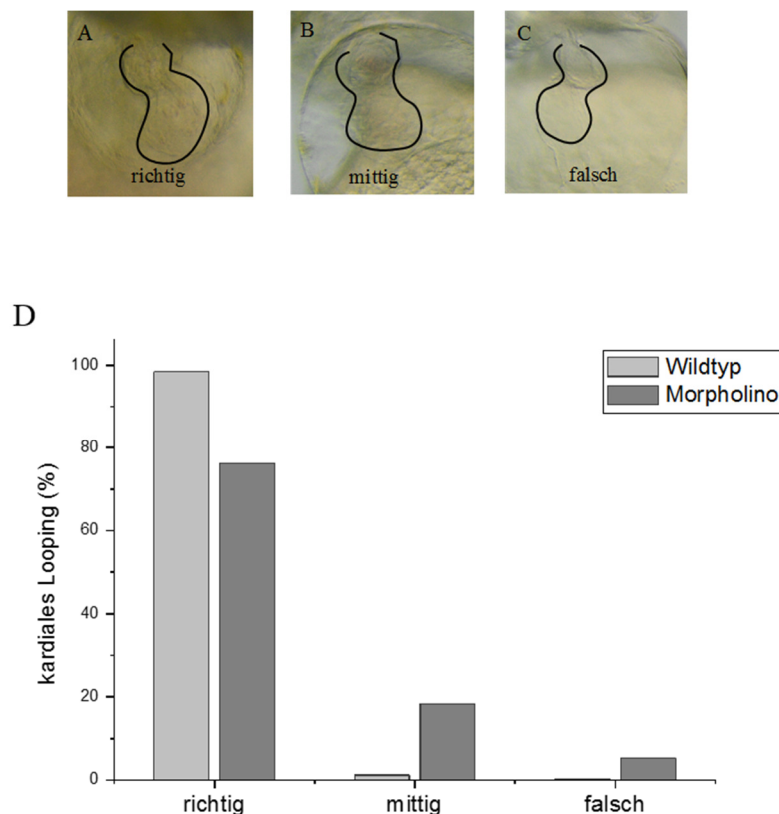


Abb. 24: Knock-Down von ZFH3 bewirkt ein fehlerhaftes Looping

(A; B; C) zeigen Herzen von 48 Stunden alten Zebrafischembryonen mit korrektem Looping ((A), Ventrikel links über dem Atrium), isomerem Looping ((B), Ventrikel mittig über dem Atrium) und falschem Looping ((C), Ventrikel rechts über dem Atrium). (D) fasst die Daten statistisch zusammen.

3.3.6 Knock-Down von ZFH3 verändert die Expression von linksspezifischen kardialen Markern

Um die Defekte des kardialen Loopings auch auf molekularer Ebene zu beleuchten wurden *in situ* Hybridisierungen (ISHs) mit Markern für die Rechts-Links-Symmetrie durchgeführt. Für diese ISHs wurden sehr junge Zebrafischembryonen genutzt, um frühauftretende Veränderungen in der Genexpression darstellen zu können (20 Somiten, ca. 19 hpf).

Als erstes wurde eine Sonde für *lefty1* verwendet. Dieses ist im Wildtyp auf der linken Seite des Hirns und des Herzfeldes zu sehen (Abb. 25 A). Bei 79 % der Morpholino injizierten Embryonen war *lefty1* jedoch nicht mehr nachweisbar (Abb. 25 B, C).

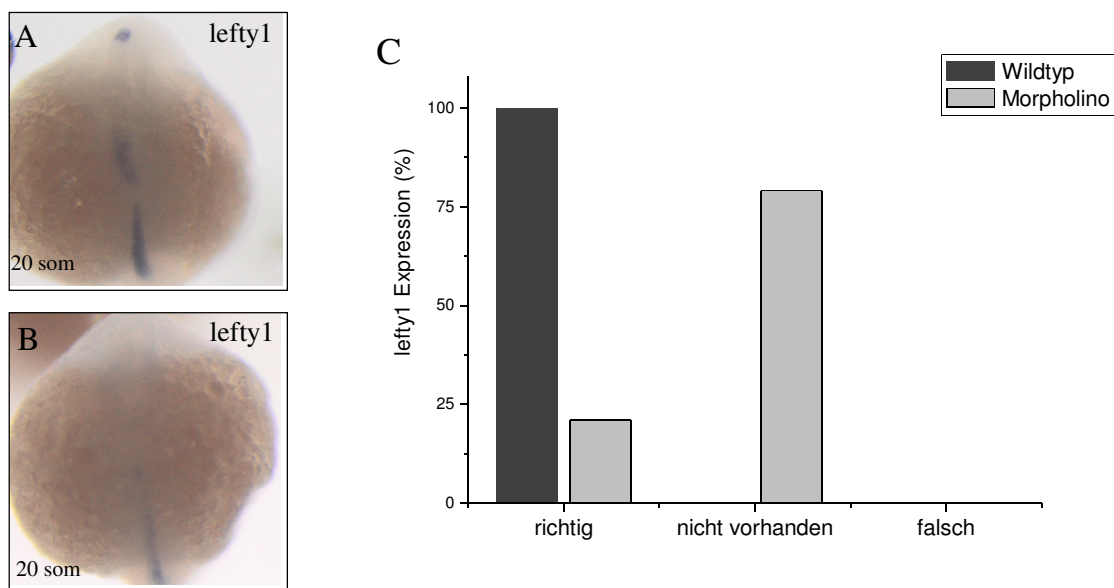


Abb. 25: Lefty1-Expression verändert sich nach ZFH3-Knock-Down

(A) und (B) zeigen Embryonen im 20 Somitenstadium. In (A) sieht man die linksseitige Expression von *lefty1* im Hirn und im Herzfeld, die in allen Wildtypfischen so zu sehen war (n=60-83); Bei 79 % der Morpholino injizierten Embryonen war diese Expression nicht zu sehen (B). (C) fasst die Daten statistisch zusammen.

Außerdem wurde eine *lefty2*-Sonde verwendet. *Lefty2* wird im Wildtyp bei 96,8 % auf der linken Seite des Herzfeldes exprimiert (Abb. 26 A, C). Bei einem ZFH3-Knock-Down ist jedoch bei 28,8 % der Embryonen *lefty2* auf der rechten Seite exprimiert (Abb. 26 B, C), und bei 4,1 % ist gar keine Färbung zu sehen (Abb. 26 C).

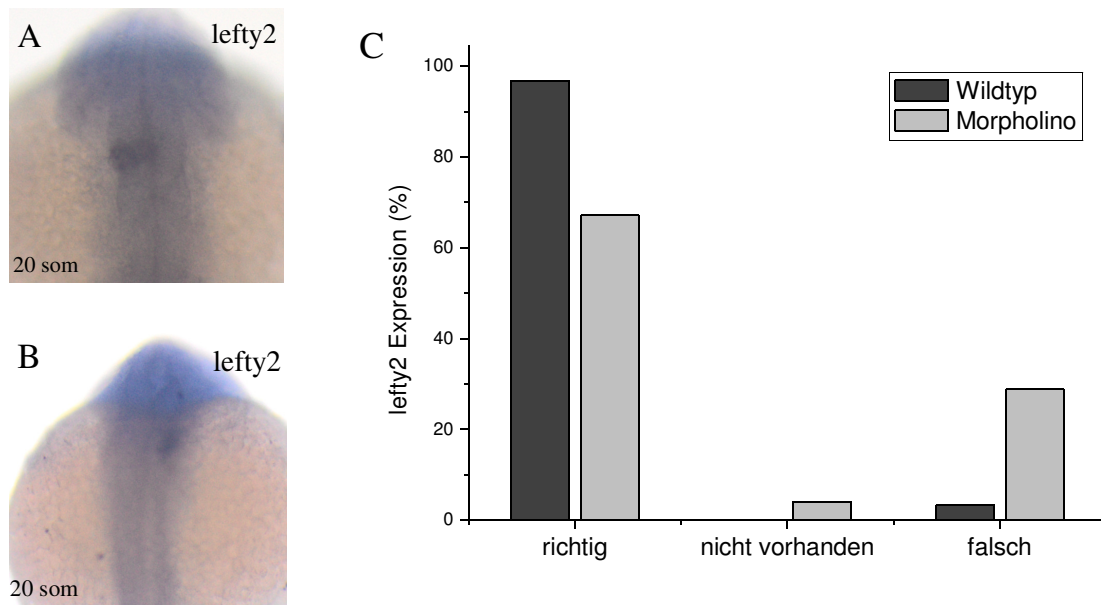


Abb. 26: Lefty2-Expression verändert sich nach ZFH3-Knock-Down

(A) und (B) zeigen Embryonen im 20 Somitenstadium. In (A) sieht man die linksseitige Expression von *lefty2* im Herzfeld, die in 96,8 % der Wildtypfische zu sehen war (n=67-74); Bei 28,8 % der Morpholino injizierten Embryonen war die Expression auf der rechten Seite zu sehen (B) und bei 4,1 % war keine *lefty1*-Expression sichtbar (C) fasst die Daten statistisch zusammen.

Wie in Abschnitt 3.3.4: („Auswirkung des ZFH3 Knock-Downs auf die Expression struktureller Marker“) beschrieben, zeigte sich eine veränderte Expression des AV-Kanal-Markers *Bmp4* nach einem Knock-Down von ZFH3. Da bekannt ist das *Bmp*-Signale wichtig in Hinblick auf die Rechts-Links-Symmetrie sind, sollten auch in den 20 Somiten-Stadien ISHs mit der *Bmp4*-Sonde durchgeführt werden. Es zeigte sich eine deutlich veränderte Genexpression in den Morpholino injizierten Embryonen (Abb. 27). Lediglich bei 9 % ist die *Bmp4*-Expression wie im Wildtyp auch auf der linken Seite stärker als auf der rechten Seite (Abb. 27 A, E, „richtig“). Bei 22 % ist die Expression dagegen rechts stärker (Abb. 27 B, E „falsch“). Bei 40,3% ist die Expression symmetrisch (Abb. 27 C, E, „gleichmäßig“) und bei 28,6 % ist eine symmetrische, aber verbreiterte Expression zu sehen (Abb. 27 D, E, „gestört“).

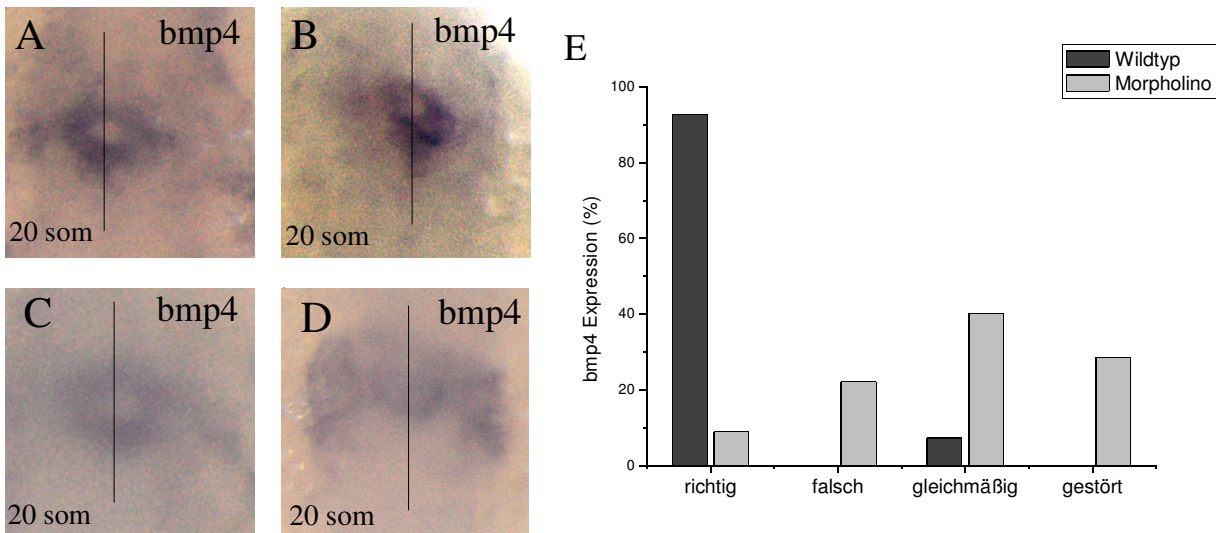


Abb. 27: Bmp4-Expression verändert sich nach ZFH3-Knock-Down

(A; B; C) und (D) zeigen Embryonen im 20 Somitenstadium. In (A) sieht man die linksseitige Expression von *bmp4* im Herzschlauch, die in 92,8 % der Wildtypfische zu sehen war ($n=64-85$); Bei 22 % der Morpholino injizierten Embryonen war die Expression auf der rechten Seite zu sehen (B), bei 40,3 % war die Expression symmetrisch (C) und bei 28,6 % ist die Expression symmetrisch, aber stark zur Seite hin verbreitert (D). (E) fasst die Daten statistisch zusammen.

3.4 Auswirkungen des ZFH3-Knock-Downs in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Um Informationen über die Aufgabe von ZFH3 zu erlangen, wurde ein Micro Array durchgeführt. Dabei können Differenzen in der Genexpression zwischen zwei Probenotypen aufgezeigt werden. Dazu wurde zunächst mit Hilfe einer spezifischen siRNA ein Knock-Down von ZFH3 in neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt. Bei einer Endkonzentration von 30 nM siRNA konnte die Expression von ZFH3 auf ca. 34 % im Vergleich zur Expression bei Applikation einer Negativ-siRNA erzielt werden. Es wurden jeweils drei RNA-Proben aus Zellen nach siRNA-Behandlung (anti-ZFH3-/Negativ-siRNA) gesammelt. Die Proben wurden an eine Core Facility in Mannheim übergeben und der Array mit Affymetrix-Chips angefertigt und die bioinformatischen Analysen durchgeführt. Nach einer statistischen Auswertung ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den Proben. Es wurde eine ANOVA Analyse und eine FDR-Korrektur durchgeführt, mit einem Schwellenwert von 0,5 für die Signifikanz. 3665 Gene waren dabei signifikant unterschiedlich zwischen den Kontrollproben und den siRNA-Proben. Bei einer Einteilung nach definierten biologischen Prozessen (Gene Ontology Biological Processes, GOBP) ergab sich eine Tabelle mit den Prozessen, die nach einem Knock-Down von ZFH3 verändert sind (Tabelle 4). Alle Unterschiede sind signifikant. Besonders zu erwähnen sind Veränderungen in Prozessen der Herzmuskelkontraktion, dem K^+ -Ionen Transport, der Muskelzellen Differenzierung und der Muskelkontraktion, da Störungen in diesen Prozessen zur Ausbildung einer Arrhythmie beitragen können.

Betroffener biologischer Prozess	Anzahl gelisteter Gene	Nom. p-Wert	FDR q-Wert
Herzmuskelkontraktion	61	0,0	0.0576081
K ⁺ -Ionen Transport	130	0,0	0.049640507
Neurotransmitter Sekretion	29	0,00573613	0.0404129
Neurotransmitter Transport	31	0,0	0.033287916
CAMP vermitteltes Signalling	86	0,0018018018018	0.05268273
G-Protein Signalling verbunden mit cAMP	74	0,0036630037	0.051686585
Muskelsystem	93	0,0	0.058508847
Synaptischer Vesikeltransport	40	0,008992806	0.065329455
G-Protein Signalling mit zykl. Nukleotiden	78	0,0	0.06007762
Innenohr Morphogenese	58	0,003502627	0.063291796
Signalling mit zykl. Nukleotiden	93	0,0037313432	0.07381304
Muskelzellen Differenzierung	108	0,0	0.07964445
Muskelkontraktion	82	0,007017544	0.07575986
Entwicklung quergestreifter Muskulatur	122	0,0017301039	0.0710888
Wnt-Rezeptor Signalling	81	0.0035149385	0.0731827

Tabelle 4: Liste der biologischen Prozesse, die in Folge des ZFH3-Knock-Downs verändert sind.

Im Folgenden wurde der Pathway der kardialen Muskelkontraktion im Detail beleuchtet. Dazu wurde die KEGG Database benutzt (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) und in den dort zur Verfügung gestellten Pathways die differentiell exprimierten Gene markiert. In Abb. 28 sieht man, dass die Gene NCX (Natrium-Calcium-Austauscher), ATP (Natriumpumpe), SERCA2a (Calciumpumpe des sarcoplasmatischen Reticulums), Troponin I, Troponin T, Troponin C und

Myosin nach einem Knock-Down von ZFH3 hochreguliert sind (grün hinterlegt). ZFH3 spielt also eine entscheidende Rolle bei der geordneten Herzmuskelkontraktion, sowohl über die Regulation der Calciumhomöostase, als auch über Strukturproteine des Muskelgewebes.

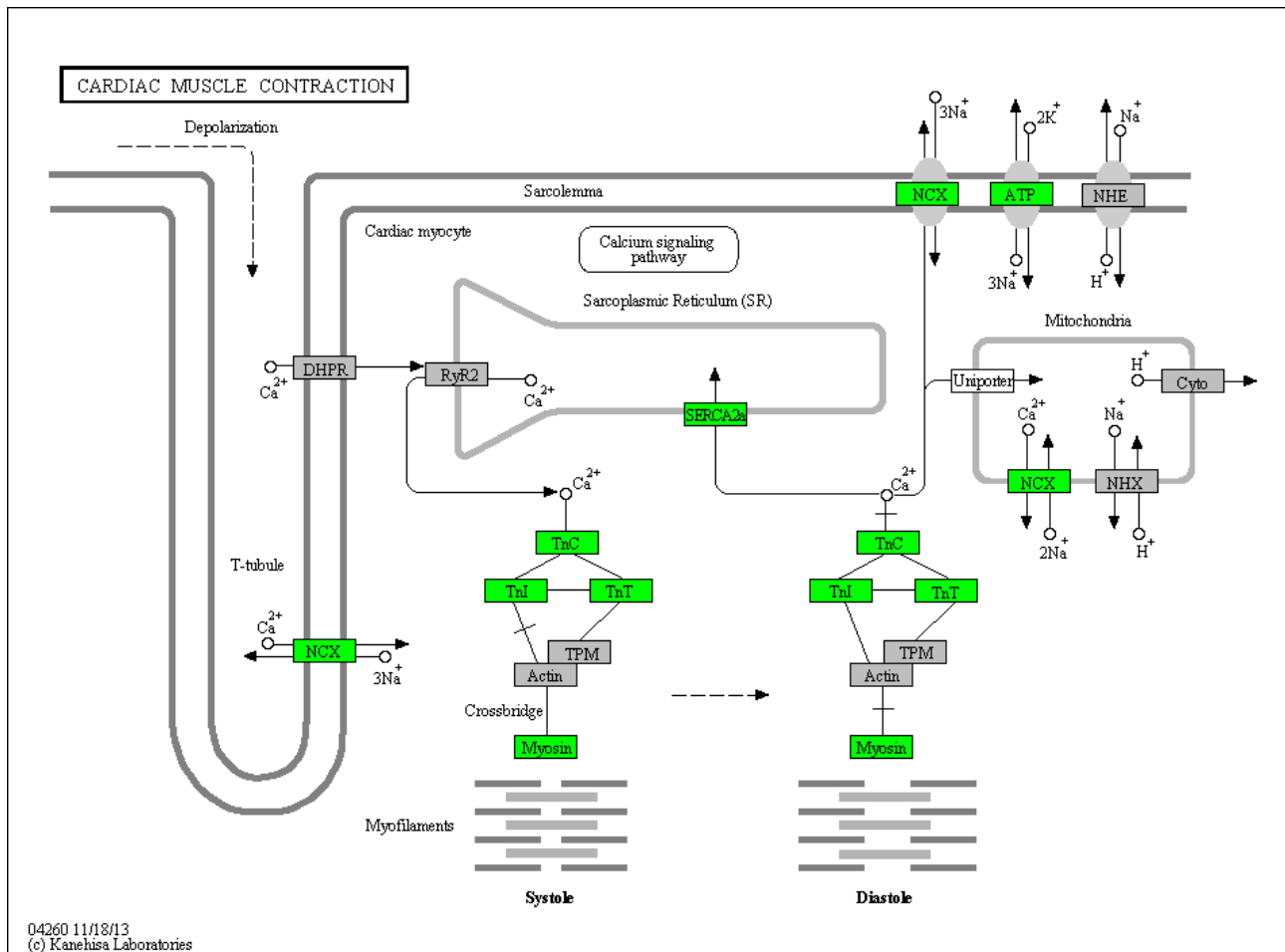


Abb. 28: Kardiale Muskelkontraktion

Die nach dem ZFH3-Knock-Down hochregulierten Gene sind grün hinterlegt.

Von besonderem Interesse waren natürlich Gene, die zur Entstehung von Vorhofflimmern beitragen könnten. Dazu wurde eine Heat Map mit den 21 mit Vorhofflimmern assoziierten Genen (siehe Tabelle 2) generiert (Abb. 29). Bei einem p-Wert < 0,05 wurde die Expression wieder als signifikant unterschiedlich angesehen. Es zeigte sich, dass folgende Gene nach dem ZFH3-Knock-Down herunterreguliert waren: Gja5 (Gap junction protein alpha 5) und Nup155 (Nucleoporin 155). Folgende Gene waren dagegen hochreguliert: Kcnj2 ($K_{ir}2.1$, Kaliumkanal), Kcnj5 ($K_{ir}3.4$, G-Protein aktivierter Kaliumkanal), Kcnq1 (K_vLQT1 , Kaliumkanal), Kcnh2 (hERG, Kaliumkanal), Abcc9 (SUR2, ATP-abhängiger Kaliumkanal), Scn1B (1B-Untereinheit des Natriumkanals $Na_v1.5$), Scn3B (3B-Untereinheit des Natriumkanals $Na_v1.5$), Gja1 (Gap junction protein alpha1). 10 der 21 Gene sind also von ZFH3 reguliert.

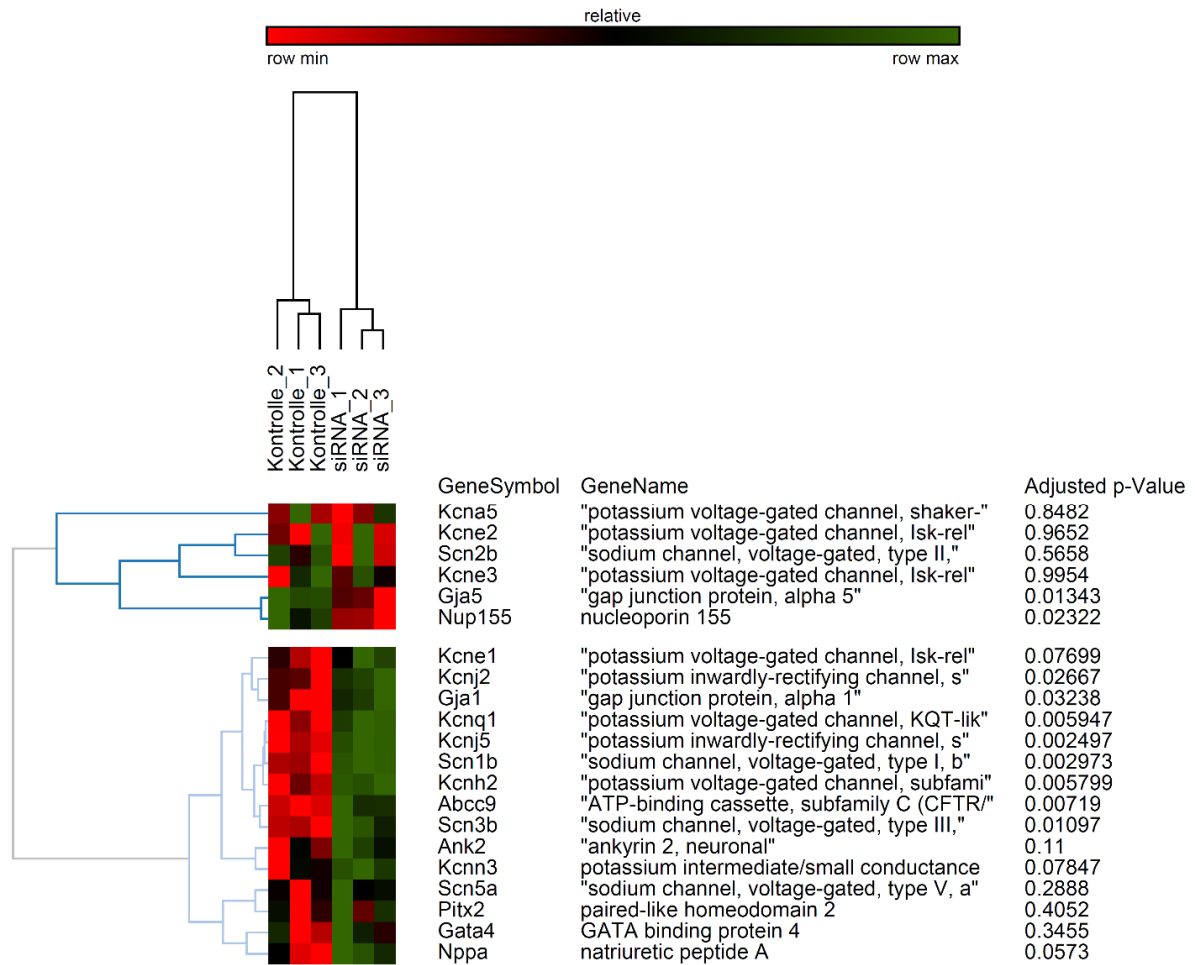


Abb. 29: Heat Map der 21 Gene, die mit Vorhofflimmern assoziiert sind

Die Heat Map wurde generiert indem die Daten der Genexpressionsanalyse geclustert und farbcodiert werden. Der Gencluster Baum ist links dargestellt und der Probencluster Baum oben. Die Triplikate sind untereinander konsistent und gegeneinander unterschiedlich. Das Expressionslevel ist farbcodiert von rot (niedrig) nach grün (hoch). Der angepasste p-Wert gibt die Signifikanz an ($p < 0,05$).

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Aspekte der Entstehung von VHF zu analysieren und somit einen besseren Einblick in die zugrundeliegenden Pathomechanismen zu erlangen. Dazu wurde die Bedeutung von Mutationen, die einerseits in Ionenkanälen ($K_v1.5$) und andererseits in dem Transkriptionsfaktor ZFH3 lokalisiert sind, untersucht. Der von $K_v1.5$ geleitete Ionenstrom I_{Kur} spielt eine wesentliche Rolle in der Repolarisation des Vorhofmyokards. Entsprechend wurden zahlreiche Mutationen in $K_v1.5$ beschrieben, die mit einem gehäuften Auftreten von VHF assoziiert sind (siehe Tabelle 2 in Abschnitt 1.2.3 „Hereditäres Vorhofflimmern“). Gleichzeitig stellt $K_v1.5$ aber auch eine interessante pharmakologische Zielstruktur für die Therapie von VHF dar. In dieser Arbeit wurden die elektrophysiologischen Effekte verschiedener $K_v1.5$ Mutationen mit Patch-Clamp Experimenten untersucht. Mit Hilfe anschließender Computersimulationen konnte die Auswirkung dieser Mutationen detailliert charakterisiert werden. In einem weiteren Teilprojekt wurde die Auswirkung einer pharmakologischen Inhibition von $K_v1.5$ untersucht. Hier konnte mit der Inhibition des $K_v1.5$ Kanals eine neue Seite des pharmakologischen Wirkprofils des Klasse-Ia-Antiarrhythmikums Ajmalin beschrieben werden.

Auf der anderen Seite wurden auch eine Mutation im Transkriptionsfaktor ZFH3 mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von VHF assoziiert. Die genauen Pathomechanismen sind jedoch unverstanden. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Knock-Down von ZFH3 im Zebrafisch zu einem ausgeprägten kardialen Phänotyp mit Bradykardie und reduzierter Kontraktilität führt. Interessanter Weise konnte mit Hilfe einer exakten Phänotypisierung, sowie molekularer Marker eine Störung der Rechts-Links-Symmetrie nachgewiesen werden. Ein Knock-Down in neonatalen Rattenkardiomyozyten mit anschließendem Microarray zeigte, dass ZFH3 wesentlich bei der Regulation von Genen der kardialen Muskelkontraktion, sowie von Ionenkanalproteinen beteiligt ist. Darunter fanden sich auch zahlreiche Gene, die mit der Entstehung von VHF assoziiert werden.

4.1 Der kardiale Ionenkanal $K_v1.5$ als Substrat für Vorhofflimmern

4.1.1 Mutationen im Kaliumkanal $K_v1.5$ können zu Vorhofflimmern führen

Computersimulationen sind hilfreich, um Einblicke in die elektrophysiologischen Eigenschaften des kardialen Gewebes zu erhalten. Man kann z.B. Veränderungen durch Mutationen in Ionenkanälen simulieren, um zu analysieren, wie die veränderten Ströme zu einer Störung der Herzfunktion führen. Solche Simulationen wurden bereits erfolgreich eingesetzt, um funktionelle Einflüsse verschiedener Mutationen auf die Arrhythmogenität des Gewebes zu untersuchen. So wurde z.B. eine neu entdeckte Mutation in KCNQ1 charakterisiert (Hasegawa *et al.*, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass diese Mutation zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer führen kann, was die Anfälligkeit für Vorhofflimmern (VHF) erhöht.

Mit Hilfe gerichteter Mutagenese wurden zunächst beschriebene Punktmutationen in Gene eingeführt, die für Ionenkanalproteine codieren. In CHO-Zellen, welche keine endogenen Kaliumströme besitzen, wurde der Kaliumkanal $K_v1.5$ und drei mit Vorhofflimmern assoziierte Mutationen in $K_v1.5$ (A576V, T527M, E610K) mittels Patch-Clamp elektrophysiologisch charakterisiert. Durch den Kooperationspartner am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) wurden die gemessenen Ströme verwendet, um für jede Mutation, also für jedes solitäre Vorhofflimmersyndrom eine Computersimulation des Vorhofes zu generieren. Ziel war es dabei, die funktionellen Zusammenhänge der elektrophysiologischen Veränderungen des Gewebes und der Entstehung von Vorhofflimmern aufzuklären. Dazu wurden die Daten in das Courtemanche Model integriert. Die Modelle konnten die gemessenen Daten durch kleinere Anpassungen der Parameter gut widerspiegeln. Zunächst wurden mit Hilfe der gemessenen Ströme Aktionspotentiale (APs) einzelner Kardiomyozyten simuliert. Es wurde deutlich, dass alle drei Mutationen die Transmembranspannung während der Plateauphase erhöhen, was zu einer ausgeprägteren „spike-and-dome“ Morphologie der APs führt. Aufgrund dessen war der APD_{50} Wert (Aktionspotentialdauer bei einer Repolarisation von 50 %) bei den Mutationen signifikant erhöht, während der APD_{90} Wert (Aktionspotentialdauer bei einer Repolarisation von 90 %) wegen der schnelleren Repolarisation (vermehrte Aktivierung der spannungsgesteuerten Kanäle hERG und KCNQ1) leicht niedriger lag. Es lässt sich sagen, dass der zugrundeliegende I_{Kur} durch die Mutationen abnimmt, lediglich bei T527M war die Peak Amplitude während des Aufstrichs des APs erhöht. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Kontrollbedingungen und den Mutationen war die Veränderung der effektiven Refraktärperiode (ERP). Der Unterschied lag bei bis zu 300 ms, abhängig von der Anzahl der Stimuli. Dass die ERP entscheidend für die Entstehung von VHF ist, konnte schon in zahlreichen Studien gezeigt werden ((Fareh *et al.*, 1998; Daoud *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1996). Wie in Kapitel 1.3.2 „Entstehung von Vorhofflimmern“ erläutert, kann durch eine verkürzte ERP ein Areal frühzeitig depolarisiert werden, wodurch ein re-entry Kreis entsteht. Bei einer Verlängerung der ERP kann ein

refraktäres Bündel umgangen werden und nach Ablauf der ERP von der anderen Seite erregt werden. Auch dies trägt zur Bildung von re-entry Kreisen bei. Die Tatsache, dass Mutationen in $K_v1.5$ die ERP beeinflussen, deutet also darauf hin, dass diese genetischen Veränderungen die Bildung von re-entry Kreisen begünstigen können. Um dies weiter zu untersuchen wurden 2D Simulationen eines Gewebestückes angefertigt und ein cross-field Protokoll appliziert. Unter Kontrollbedingungen konnte sich wie erwartet kein re-entry Kreis bilden. Im Falle der Mutationen konnte sich ein einzelner Rotor bilden. Dieser war jedoch über die Zeit nicht stabil, da sich eben im Gewebe je nach vorausgehendem diastolischem Intervall Bereiche mit längerer oder kürzerer ERP befanden. Daraus ergeben sich chaotische Muster der Erregungsausbreitung, besonders bei der Mutation E610K. Dies könnte zur Ausbildung von Vorhofflimmern führen, besonders wenn man die Heterogenitäten des normalen Vorhofgewebes berücksichtigt, die eine zusätzliche Grundlage für die Bildung von re-entry Kreisen darstellen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass Mutationen in $K_v1.5$ proarrhythmogene Eigenschaften besitzen und deshalb ein Substrat für Vorhofflimmern darstellen. Dies konnte unter Zuhilfenahme von detaillierten Multiskalen-Modellierungen, die auf gemessenen Patch-Clamp Daten basieren, gezeigt werden. In weiterführenden Untersuchungen könnte man die Daten auch nutzen, um die Bildung von Vorhofflimmern in einem adäquaten anatomischen 3D Modell des menschlichen Atriums zu simulieren. Damit könnte man die chaotischen Muster der Erregungsausbreitung besser verstehen, bzw. den Weg der Arrhythmogenese weiter beleuchten. Damit könnte man auch therapeutische Interventionen bestimmen. Evtl. wäre ein durch die Mutation hervorgerufener Rotor im realistischeren 3D-Modell auch stabiler als in der 2D-Struktur. Insgesamt helfen die Ergebnisse dieser Arbeit die grundlegenden Mechanismen der Initiation von Vorhofflimmern besser zu verstehen und durch Tests am simulierten Gewebe bestehende Therapien weiterzuentwickeln bzw. Patientenspezifisch anzupassen.

4.1.2 Charakterisierung der Ajmalin vermittelten Blockade des $K_v1.5$ -Kanals

Das Klasse-I-a-Antiarrhythmikum Ajmalin inhibiert zahlreiche Ionenkanäle (u.a. $K_v1.5$, $K_v4.3$ und hERG). Diese Tatsache weist Ajmalin als Multi-Kanal-Inhibitor aus. Es konnte gezeigt werden, dass Multi-Kanal-Inhibitoren effektiv die ERP verlängern und die Weiterleitung verlangsamen. Sie stellen daher eine gute Behandlungsmöglichkeit von Vorhofflimmern dar (Wettwer *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2013). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ajmalin ein typischer „open channel inhibitor“ ist, d.h. die Substanz bindet nur im offenen Zustand an die Kanalpore. Dieses pharmakologische Verhalten ist typisch für zahlreiche Inhibitoren des I_{kur} (Tamargo *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wird zum ersten Mal die Kinetik der Ajmalin vermittelten Kanal-Blockade im Detail analysiert, was zu einem besseren Verständnis des pharmakologischen Wirkprofils von Ajmalin beiträgt.

4.1.2.1 Dosis-Wirkungs Beziehung der K_v1.5 Blockade

Die Inhibition von K_v1.5 (ebenso wie von K_v4.3) durch Ajmalin ist dosisabhängig, mit einem IC₅₀ im niederen mikromolaren Bereich, bei Messungen in Säugerzellen (chinese hamster ovary cells; CHO-Zellen). Diese Beobachtung passt zu bisherigen Studien mit Ajmalin: Bei Messungen mit dem hERG-Kanal ergab sich z.B. ein IC₅₀ von 1 µM (Kiesecker *et al.*, 2004). In der Literatur werden Plasmaspiegel von bis zu 2 µg/l (6,1 µM) beschrieben (Koppel *et al.*, 1989). Wenn man davon ausgeht dass 77 % der Plasmaproteine gebunden werden, kann man von einem Plasmaspiegel von 1,4 µM an ungebundenem Ajmalin ausgehen (Koppel *et al.*, 1989). Die Relevanz der K_v1.5-Inhibition ist also unter therapeutischen Konzentrationen gegeben.

Um die Ajmalin vermittelte K_v1.5-Inhibition im Detail zu analysieren, wurden Voltage-Clamp-Messungen in *Xenopus* Oozyten durchgeführt. In diesem Expressionssystem sind Konzentrationen nötig, die im Vergleich zu Säugerzellen um den Faktor 30 höher liegen (Madeja *et al.*, 1997). Das liegt v.a. an störenden Membranen und Follikulargewebe, welche als Diffusionsbarriere dienen.

4.1.2.2 Pharmakologische Eigenschaften der K_v1.5 Blockade

Es zeigte sich, dass Ajmalin eine sehr schnelle Blockade, innerhalb weniger Millisekunden nach der Kanalaktivierung vermittelt. Aus diesem Verhalten lässt sich schließen, dass die Inhibition nicht im geschlossenen Zustand stattfinden kann. Ein schnelles Zustandekommen des Blocks ist positiv zu bewerten, da dadurch eine ausreichende Kanalinhhibition auch im Fall einer Tachykardie gegeben ist. Nach einer Analyse der Effekte von Ajmalin auf die Kanalaktivierung zeigte sich eine leichte Linksverschiebung der Aktivierung von K_v1.5 durch Ajmalin. Da diese minimal war, ist eine physiologische Relevanz fraglich. Die Inaktivierungseigenschaften von K_v1.5 wurden durch Ajmalin nicht beeinflusst. Auch die Zeitkonstanten der „recovery from inactivation“ und der Deaktivierung blieben unbeeinflusst. Viele Antiarrhythmika vermitteln eine frequenzabhängige Inhibition („Use-Dependence“). Dadurch ergibt sich eine stärkere inhibitorische Wirkung bei kürzeren diastolischen Intervallen, was zu einer erfolgreichen Behandlung tachykarder Herzrhythmusstörungen beitragen kann. Im Gegensatz dazu wurde bei Substanzen mit proarrhythmischem Potential öfter eine umgekehrte Frequenzabhängigkeit gefunden („Reverse- Use- Dependence“) (Hondegheem und Hoffmann, 2003). Andere Medikamente die nachweislich proarrhythmisch wirken, weisen dagegen keine Frequenzabhängigkeit auf. Dies ist z.B. bei Fluoxetin der Fall (Thomas *et al.*, 2002). Im Falle von Ajmalin war keine Frequenzabhängigkeit der Kanalblockade festzustellen. Diese Tatsache könnte auf eine proarrhythmische Potenz der Substanz hinweisen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Ajmalin ein typischer „open-channel inhibitor“ ist, der keinen Einfluss auf die Kinetik des Kanals besitzt.

4.1.2.3 Klinische Relevanz

Der ermittelte IC_{50} zeigt, dass die in den Versuchen erhaltenen Ergebnisse eine physiologische Relevanz besitzen. In aktuellen Studien wird festgestellt, dass ein Sicherheitsabstand vom Faktor 30 zwischen Plasmakonzentration proarrhythmisch wirkender Substanzen und IC_{50} (gemessen in menschlichen Zellen) für den hERG-Kanal eingehalten werden sollte, um Torsade de points (TdP-) Arrhythmien infolge einer gestörten Repolarisation zu vermeiden (Redfern *et al.*, 2003). Dies könnte für andere Kanäle in einem ähnlichen Bereich liegen. Bei einer Therapie mit den Antiarrhythmika Amiodaron, d-Sotalol, Ajmalin, Dofetilid, Propafenon und Chinidin wurden TdP-Arrhythmien beobachtet (Haverkamp *et al.*, 2000). Die Verlängerung der QT- Zeit ist bei antiarrhythmisch wirkenden Medikamenten zunächst natürlich ein gewollter Effekt, der über eine leichte Verlängerung der Aktionspotentialdauer eine Entstehung von re-entry-Kreisen verhindern und dadurch Vorhofflimmern terminieren soll (Singh und Nademanee, 1985). Vermutlich wird dabei nur in einem kleinen Patientenkollektiv von unter 5 % eine proarrhythmische Wirkung entfaltet. Es ist bekannt, dass die molekulare Grundlage des nativen I_{Kur} aus mehreren α - und β -Untereinheiten besteht (Williams *et al.*, 2002; Uebele *et al.*, 1998), deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass solche regulatorischen Untereinheiten die pharmakologischen Eigenschaften von Ajmalin *in vivo* beeinflussen könnten. Dennoch hilft die durchgeführte Arbeit, die pharmakologischen Eigenschaften des Antiarrhythmikums Ajmalin besser zu verstehen und dieses dadurch bei der Behandlung von Vorhofflimmern gezielter einsetzen zu können. Sie dient außerdem einem besseren Verständnis der Funktionsweise und Regulation kardialer Ionenkanäle.

4.2 ZFHX3 als Transkriptionsfaktor der Herzentwicklung und dessen möglicher Beitrag zur Entstehung von Vorhofflimmern

Bereits 2007 konnte der Transkriptionsfaktor Pitx2 mit Vorhofflimmern (VHF) in Verbindung gebracht werden (Gudbjartsson *et al.*, 2007). Dabei wurde lediglich eine genetische Variante (SNP, „single Nukleotid polymorphism“) in einem nicht-codierenden Bereich auf Chromosom 4q25 gefunden. Das proximalste Gen war dabei Pitx2. Es ist nach wie vor nicht bekannt, ob die beschriebene genetische Variante im Zusammenhang mit einer veränderten Expression oder Funktion von Pitx2 steht. Es wurden jedoch zahlreiche Untersuchungen zur Funktion von Pitx2 im Herzen durchgeführt, die die Funktion des Transkriptionsfaktors bei der Entstehung von VHF aufklären sollten. Es war schon bekannt, dass Pitx2 eine Rolle bei der Entwicklung von Pulmonalvenen und dem Sinusknoten spielt, was einen ersten Hinweis auf eine zentrale Rolle von Pitx2 bei der Etablierung der normalen kardialen Funktion darstellt (Mommersteeg *et al.*, 2007a; Mommersteeg *et al.*, 2007b). 2011 haben Kahr und Kirchhof gezeigt, dass Pitx2 fast ausschließlich im linken Atrium exprimiert ist, dass heterozygote pitx2-Knock-Out Mäuse induzierbares VHF und eine kürzere Aktionspotentialdauer

haben und dass die Expression von Gap und tight junction Proteinen sowie verschiedener Kaliumkanäle gestört ist (Kahr *et al.*, 2011; Kirchof *et al.*, 2011). 2012 konnte gezeigt werden, dass Pitx2 eine Rolle im Rechts-Links-Patterning spielt und das Genprogramm für den Sinusknoten im linken Atrium unterdrückt. Wenn die Pitx2-Funktion gestört ist, könnte das zu einer ektopten Bildung von Erregungsbildungszentren führen. Diese Tatsache stellt eine Erklärung für die Entstehung von Vorhofflimmern dar (Franco *et al.*, 2012).

2009 wurde in einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) ein weiterer Transkriptionsfaktor mit VHF assoziiert: ZFHX3 (Benjamin *et al.*, 2009). Zum jetzigen Kenntnisstand gab es jedoch keinerlei Untersuchungen über die Verbindung von ZFHX3 und der Entstehung einer Arrhythmie. Diese Wissenslücke zu schließen war Ziel dieser Arbeit.

4.2.1 Kardiale Defekte nach einem Knock-Down von ZFHX3 im Zebrafisch

Um zu evaluieren, ob der Transkriptionsfaktor ZFHX3 eine herzspezifische Funktion besitzt, wurden Antisense-Morpholinos hergestellt, welche die Expression des Proteins im Zebrafisch herunter regulieren. Nach einer Injektion in Zebrafisch Embryonen wurden nach zwei bzw. drei Tagen strukturelle Analysen des entstandenen Phänotyps durchgeführt. Dabei ergaben sich reproduzierbar sowohl morphologische, als auch funktionelle Effekte. Die Fische zeigten einen spezifischen kardialen Phänotyp, während sie in ihrer restlichen Anatomie dem Wildtyp glichen. Nach der Injektion von ZFHX3-Antisense-Morpholinos in Zebrafisch Embryonen im 1-4-Zellstadium konnte man 48 Stunden nach der Befruchtung (48 hours post fertilization, 48 hpf) schon die Entwicklung eines Perikardödems, als Hinweis auf eine kardiale Funktionsstörung beobachten. 72 hpf hat sich der Phänotyp weiter manifestiert. In beiden Stadien konnten typische Veränderungen in der Morphologie des Herzens gesehen werden. Die Atrien wiesen eine Vergrößerung auf, während sich die Ventrikel stark verkleinerten. Mit den 48 hpf und 72 hpf Embryonen wurden im Anschluss funktionelle Analysen durchgeführt. Einerseits konnte eine Abnahme der Herzfrequenzen um 13 % (48 hpf) bzw. 11 % (72 hpf) im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Bradykardie). Andererseits zeigte sich eine signifikante Verringerung der Kontraktilität der Herzen in inzierten Fischen. Des Weiteren konnte 48 hpf mittels *in situ* Hybridisierungen (ISH) eine Veränderung der Expression von Bmp4 (AV-Kanal-Marker), sowie von ANF beobachtet werden. Andere strukturelle Marker blieben dagegen in ihrer Expression unverändert (αMHC, vMHC und MLC2).

4.2.2 ZFH3 spielt eine Rolle im kardialen Looping

Eine weitere sehr interessante Beobachtung bestand darin, dass in den injizierten Embryonen häufiger eine Umkehr der Rechts-Links Symmetrie des Herzens zu sehen war. Durch eine genaue Quantifizierung wurde deutlich, dass nach einer Morpholino-Injektion bei 23,7% der Fische das Looping des Herzens verändert war. Nach ISHs mit Rechts-Links-Markern in 20 Somiten-Stadien (ca. 19 hpf) konnte festgestellt werden, dass der normalerweise auf der linken Seite des Herzfeldes und des Hirns exprimierte Marker *lefty1* bei einem Knock-Down von ZFH3 bei 79 % der Fische nicht mehr exprimiert wurde. Lediglich die Expression in der Mittellinie war noch vorhanden. Durch eine ISH mit *lefty2*, welches im Wildtyp nur auf der linken Seite des Herzfeldes exprimiert ist, wurde auch hier eine stark veränderte Expression nach ZFH3-Knock-Down festgestellt: Bei 28,5 % war *lefty2* rechts exprimiert und bei 4,1 % war gar keine Expression zu sehen. Die Funktion von *lefty1* ist es, über die Expression in der Mittellinie die rechtsseitige Expression von *nodal* zu verhindern (Meno *et al.*, 1998). Diese Funktion sollte auch nach dem ZFH3-Knock-Down noch zustande kommen, da lediglich die linksseitige Expression im Herzfeld beeinträchtigt war, nicht jedoch die Expression in der Mittellinie. Die Aufgabe von *lefty2* ist ebenfalls die Restriktion von *nodal* auf die linke Seite des lateralen Plattenmesoderms. Es verhindert eine Diffusion von *nodal* über längere Strecken in anteriorer Richtung (Meno *et al.*, 2001). Dadurch, dass bei 28,5 % der Embryonen eine rechtsseitige Expression von *lefty2* zu sehen war, könnte in diesen Embryonen eine Diffusion von *nodal* auf die rechte Seite stattgefunden haben. Eine ektopische Expression von *nodal* führt wiederum zu einer Störung des Loopings (Capdevila und Izpisua Belmonte, 2000). Außerdem sorgt eine Störung des Rechts-Links-Patterning im *nodal/lefty*-Signalweg zu einer gestörten (bilateralen oder rechtsseitigen) Expression von *Pitx2* (Bamforth *et al.*, 2004). Dies wiederum ist ein möglicher Link zu der Entstehung von Vorhofflimmern, wie oben in diesem Abschnitt erläutert. Es könnte also sein, dass ein ZFH3-Knock-Down die Expression von *lefty1* und *lefty2* direkt oder indirekt beeinflusst und dann über eine Beeinträchtigung der *nodal*-Expression das Looping sowie die Expression der letzten Effektoren im Rechts-Links-Patterning, wie z.B. *Pitx2*, stört und dadurch kardiale Fehlfunktionen auslöst.

Eine ISH mit einer *bmp4*-Sonde in 20 Somiten-Stadien zeigte einen starken Unterschied zwischen Wildtypfischen mit linksseitiger Expression, und Fischen nach einem ZFH3 Knock-Down. Nach der Morpholinoinjektion war bei 40,3 % der Fische eine symmetrische Expression zu sehen, bei 22,1 % der Fische eine rechtsseitige Expression und bei 28,6 % der Fische eine stark verbreiterte Expression. Lediglich bei 9 % ist die Expression vergleichbar mit dem Wildtyp. Es konnte bereits bewiesen werden, dass *Bmp4* notwendig für das korrekte Looping des Herzens ist (Chen *et al.*, 1997). In dieser Studie wurde gezeigt, dass eine Expression von *Bmp4* auf der „falschen“ rechten Seite ein fehlerhaftes Looping bewirkt, während eine diffuse *Bmp4*-Expression bewirkt, dass das Herz nicht loopt. Die Ergebnisse dieser Dissertation weisen darauf hin, dass die rechtsseitige Expression von *Bmp4* normalerweise ZFH3-abhängig unterdrückt werden könnte. Wenn diese

„Inhibition“ durch den Knock-Down von ZFH3 jedoch entfällt wird Bmp4 ektopt exprimiert und sorgt für ein fehlerhaftes Looping. ZFH3 selbst ist jedoch nicht asymmetrisch verteilt. Es muss also indirekt, über zwischengeschaltete Faktoren, auf die Expression der Rechts/Links-Effektoren wirken. Die durchgeführten Studien im Zebrafisch konnten eindeutig zeigen, dass ZFH3 eine essentielle Rolle in der Entwicklung des normalen Herzens spielt, und sowohl für dessen Morphologie und Funktion als auch die richtige symmetrische Anordnung unverzichtbar ist. Die geordnete Rechts-Links symmetrische Verteilung von Signalmolekülen ist essentiell für die korrekte Herzentwicklung. Wie zu Beginn des Abschnitts erwähnt, ist der Transkriptionsfaktor Pitx2 asymmetrisch verteilt (stärkste Expression im linken Atrium) um eine Ausbildung des Sinusknotengenprogramms an falscher Stelle zu unterdrücken. Dass ZFH3 an der Ausbildung der Rechts-Links-Symmetrie beteiligt ist, könnte auch den Zusammenhang zur Entstehung von Vorhofflimmern erklären. Pitx2 selbst ist nicht notwendig für ein korrektes Looping (Ai *et al.*, 2006). Es ist vielmehr einer der Effektoren, die helfen die korrekten Strukturen auf der linken Seite auszubilden. Es könnte also sein, dass ZFH3 erst die linksseitige Expression von Pitx2 ermöglicht und eine Mutation in ZFH3 über eine fehlerhafte Pitx2-Expression arrhythmogen wirkt.

4.2.3 Auswirkungen des ZFH3-Knock Downs in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Der nächste Schritt war die Durchführung eines siRNA-Knock-Downs in neonatalen Rattenkardiomyozyten mit anschließendem Microarray. Dadurch konnten die von ZFH3 abhängigen Pathways im Detail analysiert werden. Es waren bei der Durchführung des Arrays deutliche transkriptionelle Unterschiede nach dem Knock-Down zu sehen. 3665 Gene waren differentiell exprimiert. Nach einer Einordnung in biologische Prozesse nach GOBP (Gene Ontology of biological processes) wurde deutlich, dass ZFH3 Einfluss auf verschiedene Pathways hat, u.a. im Nerven- und Muskelsystem. Dies bestätigt die Aussage, dass ZFH3 ein Transkriptionsfaktor der myogenen und neuronalen Entwicklung ist (Berry *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2005). Zusätzlich konnte nun auch zum ersten Mal gezeigt werden, dass ZFH3 eine Rolle bei der kardialen Muskelkontraktion und dem Transport von Kaliumionen spielt. Bei einer genaueren Betrachtung des Pathways der kardialen Kontraktion war zu sehen, dass die Gene NCX (Natrium-Calcium-Austauscher), ATP (Natriumpumpe), SERCA2a (Calciumpumpe des sarcoplasmatischen Reticulums), Troponin I, Troponin T, Troponin C und Myosin nach einem Knock-Down von ZFH3 hochreguliert sind. Diese Beobachtung passt auch zum Phänotyp der Zebrafische nach einem Morpholino-Knock-Down von ZFH3. Die Embryonen zeigten eine signifikant verringerte Kontraktilität von Atrium und Ventrikel. Der Natrium-Calcium-Austauscher NCX beispielsweise ist bekannt dafür, dass er mit der Ausbildung von frühen oder verspäteten Nachdepolarisationen verbunden ist, wenn durch eine vorhandene Fehlfunktion die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht ist. Dadurch kann eine Störung in NCX zur Ausbildung einer Arrhythmie beitragen (Pogwizd

und Bers, 2002). 2004 wurde demonstriert, dass die Inhibition von NCX durch SEA-0400 das arrhythmogene Potential senkt (Nagy *et al.*, 2004). Auch die Natrium-Kalium-Pumpe ist entscheidend für die Erhaltung des Ruhemembranpotentials und für das Aktionspotential. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Aktivität zu einer gesteigerten Kalium-Plasmakonzentration führt, die wiederum die Entstehung von VHF begünstigen kann (Tran *et al.*, 2009). In einem Computermodell des Vorhofs konnte auch SERCA2a mit VHF in Verbindung gebracht werden. Dabei sorgte eine erhöhte Aktivität zu einem verstärkten sarcoplasmatischen Kalzium-Verlust, was die Entstehung von verspäteten Nachdepolarisationen und damit VHF begünstigt (Voigt *et al.*, 2014). Ein erhöhtes Level an Troponin I konnte in Patienten mit VHF detektiert werden und wird als Marker für ein erhöhtes Schlaganfallrisiko angesehen (Providencia *et al.*, 2013). Ein Zusammenhang zwischen Myosin und VHF konnte dagegen bisher nicht festgestellt werden (Hunlich *et al.*, 2010). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beobachteten Veränderungen der Genexpression nach dem ZFH3-Knock-Down eine Arrhythmogenese sehr gut begründen können. Zusätzlich wurden alle in Tabelle 2 gesammelten Gene, die mit hereditärem VHF verbunden sind, auf transkriptionelle Unterschiede untersucht. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied in 10 der 21 Gene. Darunter waren hauptsächlich Ionenkanäle, wie z.B. hERG und Kir2.1, die maßgeblich an der korrekten Ausbildung des Aktionspotentials beteiligt sind. Auch β -Untereinheiten des Natriumkanals $Na_v1.5$, der für die Depolarisation der Schrittmacherzellen verantwortlich ist, sind nach dem Knock-Down hochreguliert. ZFH3 ist also essentiell für die elektrische Stabilität des kardialen Gewebes und eine Mutation in ZFH3 kann die Arrhythmogenität erhöhen.

Durch die Ergebnisse der durchgeführten Arbeiten kann die Verbindung von einer Mutation in einem Transkriptionsfaktor und der Entstehung einer kardialen Arrhythmie zum ersten Mal hergestellt und erläutert werden.

4.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Entstehung und Therapie von Vorhofflimmern untersucht. Zunächst konnte mit Hilfe von 2D-Computersimulationen gezeigt werden, dass Mutationen in $K_v1.5$ ein Substrat für VHF darstellen. Zusätzlich zu den bereits durchgeführten Analysen wäre es hilfreich, weitere Mutationen in anderen Ionenkanälen zu charakterisieren. Hierzu wurde die Grundlage gelegt, indem bereits 24 weitere Mutationen in Mutagenese-PCRs hergestellt und die DNA in Vektoren kloniert wurde, die für die Expression in Zellkultur nutzbar sind. In weiteren Projekten kann mit der biophysikalischen Charakterisierung dieser Mutationen fortgefahren werden und die Ergebnisse erneut genutzt werden, um Simulationen des atrialen Gewebes zu erzeugen. Perspektivisch wäre es denkbar, bei Patienten mit idiopathischem VHF einen Gentest durchzuführen, um zu erfahren ob eine der bekannten Mutationen vorhanden ist. Ein besseres Verständnis der individuellen Pathomechanismen würde eine personalisierte Therapie erlauben. Zusätzlich können die Modelle genutzt werden, um die Wirkung bekannter Pharmaka zu testen. Eine weitere Weiterentwicklungsmöglichkeit des Projekts ist die Simulation der Erregungsausbreitung in realistischen dreidimensionalen Modellen.

In einem zweiten Teilprojekt konnte das Wirkprofil des Klasse-Ia-Aniarrhythmikums Ajmalin auf den $K_v1.5$ - Kanal charakterisiert werden. Ajmalin ist ein typischer „open channel inhibitor“ und eine Relevanz unter physiologischen Bedingungen ist mit einem IC_{50} im mikromolekularen Bereich gegeben. Die Ergebnisse der durchgeführten Arbeiten beleuchten die inhibitorische Wirkung von Ajmalin auf den I_{kur} , der maßgeblich zur Repolarisation im Atrium beiträgt. Dies trägt zu einem besseren Verständnis der Wirkung von Ajmalin bei der Termination von VHF bei. Hilfreich wären zusätzliche Experimente an isolierten humanen Kardiomyozyten, um den Summeneffekt des „mulichannel“ Inhibitors Ajmalin auf das Aktionspotential besser untersuchen zu können.

Für den Transkriptionsfaktor ZFH3 konnten wir erstmals zeigen, dass dieser im Zebrafisch notwendig für die normale Funktion des Herzens (Herzrate, Kontraktilität), aber auch für ein korrektes Rechts-Links-Patterning ist. In einem Microarray mit neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass nach einem Knock-Down von ZFH3 es transkriptionelle Unterschiede in verschiedenen Pathways gab. Besonders interessant sind dabei Veränderungen im Bereich kardialer Muskelkontraktion und Transport durch Ionenkanäle. Diese Veränderungen zeigen eine Verbindung zwischen einer Mutation in ZFH3 und der Entstehung von Vorhofflimmern auf.

Ein wichtiger Grundstein zum Verständnis der Bedeutung von ZFH3 für die kardiale Funktion und Entwicklung wurde im Rahmen dieser Arbeit gelegt. Um weiter zu erfahren, wie genau ZFH3 auf die Expression nachgeschalteter Gene (deren Expression im Microarray verändert war) wirkt, könnte man eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) durchführen. Dadurch könnte man erfahren an

welche Promotoren ZFH3 tatsächlich bindet, d.h. welche Faktoren direkt von ZFH3 beeinflusst werden und welche nur über die veränderte Expression anderer Transkriptionsfaktoren. So könnte man eine Wirkkaskade erstellen, die den funktionellen Zusammenhang der Mutation in ZFH3 und der Krankheitsentstehung aufzeigen kann. Zusätzlich müsste man funktionelle Untersuchungen in Kardiomyozyten durchführen, um den Zusammenhang der differentiellen Genexpression nach dem Knock-Down und dem möglicherweise arrhythmogenen Phänotyp zu klären. Dazu könnte man z.B. das Calcium-Handling weiter untersuchen, da zahlreiche Gene der Calcium-Homöostase nach der siRNA-Behandlung hochreguliert waren (z.B. NCX, SERCA2a). Möglich wäre hier die Färbung mit Indo-1, einem Fluoreszenzfarbstoff, der mit intrazellulärem Calcium reagiert. Die Fluoreszenzintensität könnte dann beispielsweise in Wildtyp Zellen und in Zellen nach einem siRNA Knock-Down von ZFH3 gemessen und verglichen werden. Längerfristig wäre es außerdem sehr sinnvoll mit einer konditionellen Knock-Out Maus zu arbeiten. Hier könnte man z.B. Aktionspotentiale ableiten und anhand deren Form und Dauer die Anfälligkeit für Vorhofflimmern analysieren.

Um zu erfahren, ob ZFH3 tatsächlich relevant für die Entstehung bzw. Aufrechterhaltung von VHF ist, könnte man mit Proben von VHF-Patienten arbeiten. Gerade Material von jungen Patienten mit idiopathischem VHF wäre dabei interessant. Man könnte z.B. die RNA aus diesen Proben isolieren und mit Hilfe einer qPCR das Expressionslevel von ZFH3 im Vergleich zu „gesunden“ Proben ermitteln.

4.4 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Entstehung und Therapie von Vorhofflimmern untersucht. Einerseits wurde die Rolle des Ionenkanals Kv1.5 für die Elektrophysiologie des Gewebes analysiert, andererseits wurde die Funktion des Transkriptionsfaktors ZFH3 untersucht. Es wurde deutlich, dass die Entstehung von VHF – selbst bei monogenetischen Formen - ein komplexer Prozess ist. Der Ionenkanal Kv1.5 scheint eine wichtige Rolle zu spielen, da er wesentlich an der atrialen Repolarisation beteiligt ist. Die Bedeutung des Kanals für mögliche pro- und antiarrhythmische Effekte auf das atriale Gewebe konnte im Rahmen dieser Dissertation besser verstanden werden. Die Bedeutung von ZFH3 für die Entwicklung und Funktion des Herzens war bislang nicht untersucht. Die hier gewonnenen Ergebnisse bieten wichtige neue Einblicke und legen den Grundstein für eine detaillierte Charakterisierung der zahlreichen durch ZFH3 regulierten Gene.

5. Literatur

ABBOTT, G. W., SESTI, F., SPLAWSKI, I., BUCK, M. E., LEHMANN, M. H., TIMOTHY, K. W., KEATING, M. T., und GOLDSTEIN, S. A. (1999). MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **97**, 175-187.

AI, D., LIU, W., MA, L., DONG, F., LU, M. F., WANG, D., VERZI, M. P., CAI, C., GAGE, P. J., EVANS, S., et al. (2006). Pitx2 regulates cardiac left-right asymmetry by patterning second cardiac lineage-derived myocardium. *Dev Biol* **296**, 437-449.

ARORA, R. B., und MADAN, B. R. (1956). Antiarrhythmics. VI. Ajmaline and serpentine in experimental cardiac arrhythmias. *J Pharmacol Exp Ther* **117**, 62-67.

AUSMA, J., WIJFFELS, M., THONE, F., WOUTERS, L., ALLESSIE, M., und BORGERS, M. (1997). Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* **96**, 3157-3163.

BAMFORTH, S. D., BRAGANCA, J., FARTHING, C. R., SCHNEIDER, J. E., BROADBENT, C., MICHELL, A. C., CLARKE, K., NEUBAUER, S., NORRIS, D., BROWN, N. A., et al. (2004). Cited2 controls left-right patterning and heart development through a Nodal-Pitx2c pathway. *Nat Genet* **36**, 1189-1196.

BARHANIN, J., LESAGE, F., GUILLEMARE, E., FINK, M., LAZDUNSKI, M., und ROMÉY, G. (1996). K(V)LQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* **384**, 78-80.

BEECH, D. J., BERNHEIM, L., MATHIE, A., und HILLE, B. (1991). Intracellular Ca²⁺ buffers disrupt muscarinic suppression of Ca²⁺ current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 652-656.

BENJAMIN, E. J., RICE, K. M., ARKING, D. E., PFEUFER, A., VAN NOORD, C., SMITH, A. V., SCHNABEL, R. B., BIS, J. C., BOERWINKLE, E., SINNER, M. F., et al. (2009). Variants in ZFH3 are associated with atrial fibrillation in individuals of European ancestry. *Nat Genet* **41**, 879-881.

BERRY, F. B., MIURA, Y., MIHARA, K., KASPAR, P., SAKATA, N., HASHIMOTO-TAMAOKI, T., und TAMAOKI, T. (2001). Positive and negative regulation of myogenic differentiation of C2C12 cells by isoforms of the multiple homeodomain zinc finger transcription factor ATBF1. *J Biol Chem* **276**, 25057-25065.

BERS, D. M., und GRANDI, E. (2011). Human atrial fibrillation: insights from computational electrophysiological models. *Trends Cardiovasc Med* **21**, 145-150.

- BREMBILLA-PERROT, B.** (2010). Pharmacological testing in the diagnosis of arrhythmias. *Minerva Cardioangiol* **58**, 505-517.
- CAPDEVILA, I., und IZPISUA BELMONTE, J. C.** (2000). Knowing left from right: the molecular basis of laterality defects. *Mol Med Today* **6**, 112-118.
- CARMELIET, E.** (1992). Voltage- and time-dependent block of the delayed K⁺ current in cardiac myocytes by dofetilide. *J Pharmacol Exp Ther* **262**, 809-817.
- CHANG, S. H., CHANG, S. N., HWANG, J. J., CHIANG, F. T., TSENG, C. D., LEE, J. K., LAI, L. P., LIN, J. L., WU, C. K., und TSAI, C. T.** (2012). Significant association of rs13376333 in KCNN3 on chromosome 1q21 with atrial fibrillation in a Taiwanese population. *Circ J* **76**, 184-188.
- CHEN, J. N., VAN EEDEN, F. J., WARREN, K. S., CHIN, A., NUSSLEIN-VOLHARD, C., HAFFTER, P., und FISHMAN, M. C.** (1997). Left-right pattern of cardiac BMP4 may drive asymmetry of the heart in zebrafish. *Development* **124**, 4373-4382.
- CHIEN, A. J., ZHAO, X., SHIROKOV, R. E., PURI, T. S., CHANG, C. F., SUN, D., RIOS, E., und HOSEY, M. M.** (1995). Roles of a membrane-localized beta subunit in the formation and targeting of functional L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* **270**, 30036-30044.
- CHRISTOPHERSEN, I. E., OLESEN, M. S., LIANG, B., ANDERSEN, M. N., LARSEN, A. P., NIELSEN, J. B., HAUNSO, S., OLESEN, S. P., TVEIT, A., SVENDSEN, J. H., und SCHMITT, N.** (2013). Genetic variation in KCNA5: impact on the atrial-specific potassium current I_{Kur} in patients with lone atrial fibrillation. *Eur Heart J* **34**, 1517-1525.
- CORDEIRO, J. M., BRUGADA, R., WU, Y. S., HONG, K., und DUMAINE, R.** (2005). Modulation of I(Kr) inactivation by mutation N588K in KCNH2: a link to arrhythmogenesis in short QT syndrome. *Cardiovasc Res* **67**, 498-509.
- COURTEMANCHE, M., RAMIREZ, R. J., und NATTEL, S.** (1999). Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation-induced electrical remodeling: insights from a mathematical model. *Cardiovasc Res* **42**, 477-489.
- DAOUD, E. G., BOGUN, F., GOYAL, R., HARVEY, M., MAN, K. C., STRICKBERGER, S. A., und MORADY, F.** (1996). Effect of atrial fibrillation on atrial refractoriness in humans. *Circulation* **94**, 1600-1606.
- DAS, S., MAKINO, S., MELMAN, Y. F., SHEA, M. A., GOYAL, S. B., ROSENZWEIG, A., MACRAE, C. A., und ELLINOR, P. T.** (2009). Mutation in the S3 segment of KCNQ1 results in familial lone atrial fibrillation. *Heart Rhythm* **6**, 1146-1153.

- DE JONGH, K. S., WARNER, C., und CATTERALL, W. A.** (1990). Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *J Biol Chem* **265**, 14738-14741.
- DECHER, N., PIRARD, B., BUNDIS, F., PEUKERT, S., BARINGHAUS, K. H., BUSCH, A. E., STEINMEYER, K., und SANGUINETTI, M. C.** (2004). Molecular basis for Kv1.5 channel block: conservation of drug binding sites among voltage-gated K⁺ channels. *J Biol Chem* **279**, 394-400.
- DHEIN, S., MULLER, A., GERWIN, R., und KLAUS, W.** (1993). Comparative study on the proarrhythmic effects of some antiarrhythmic agents. *Circulation* **87**, 617-630.
- EL HARCHI, A., ZHANG, H., und HANCOX, J. C.** (2010). The S140G KCNQ1 atrial fibrillation mutation affects 'I(KS)' profile during both atrial and ventricular action potentials. *J Physiol Pharmacol* **61**, 759-764.
- EVANS, W., und SWANN, P.** (1954). Lone auricular fibrillation. *Br Heart J* **16**, 189-194.
- FAREH, S., VILLEMAIRE, C., und NATTEL, S.** (1998). Importance of refractoriness heterogeneity in the enhanced vulnerability to atrial fibrillation induction caused by tachycardia-induced atrial electrical remodeling. *Circulation* **98**, 2202-2209.
- FEDIDA, D., WIBLE, B., WANG, Z., FERMINI, B., FAUST, F., NATTEL, S., und BROWN, A. M.** (1993). Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K⁺ channel current. *Circ Res* **73**, 210-216.
- FENG, J., WIBLE, B., LI, G. R., WANG, Z., und NATTEL, S.** (1997). Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res* **80**, 572-579.
- FISCHER, F., VONDERLIN, N., ZITRON, E., SEYLER, C., SCHERER, D., BECKER, R., KATUS, H. A., und SCHOLZ, E. P.** (2013). Inhibition of cardiac Kv1.5 and Kv4.3 potassium channels by the class Ia antiarrhythmic ajmaline: mode of action. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **386**, 991-999.
- FORD, J. W., und MILNES, J. T.** (2008). New drugs targeting the cardiac ultra-rapid delayed-rectifier current (I_{Kur}): rationale, pharmacology and evidence for potential therapeutic value. *J Cardiovasc Pharmacol* **52**, 105-120.
- FRANCO, D., CHINCHILLA, A., und ARANEGA, A. E.** (2012). Transgenic insights linking pitx2 and atrial arrhythmias. *Front Physiol* **3**, 206.
- FRIDLYAND, L. E., JACOBSON, D. A., und PHILIPSON, L. H.** (2013). Ion channels and regulation of insulin secretion in human beta-cells: a computational systems analysis. *Islets* **5**, 1-15.

- FRIEDRICH, O., F, V. W., WINK, M., und FINK, R. H. (2007). Na^{+} - and K^{+} -channels as molecular targets of the alkaloid ajmaline in skeletal muscle fibres. *Br J Pharmacol* **151**, 82-93.
- GO, A. S., MOZAFFARIAN, D., ROGER, V. L., BENJAMIN, E. J., BERRY, J. D., BORDEN, W. B., BRAVATA, D. M., DAI, S., FORD, E. S., FOX, C. S., *et al.* (2013a). Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **127**, 143-152.
- GO, A. S., MOZAFFARIAN, D., ROGER, V. L., BENJAMIN, E. J., BERRY, J. D., BORDEN, W. B., BRAVATA, D. M., DAI, S., FORD, E. S., FOX, C. S., *et al.* (2013b). Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **127**, e6-e245.
- GOGELIN, H., BRENDDEL, J., STEINMEYER, K., STRUBING, C., PICARD, N., RAMPE, D., KOPP, K., BUSCH, A. E., und BLEICH, M. (2004). Effects of the atrial antiarrhythmic drug AVE0118 on cardiac ion channels. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **370**, 183-192.
- GRANDI, E., PANDIT, S. V., VOIGT, N., WORKMAN, A. J., DOBREV, D., JALIFE, J., und BERS, D. M. (2011). Human atrial action potential and Ca^{2+} model: sinus rhythm and chronic atrial fibrillation. *Circ Res* **109**, 1055-1066.
- GUDBJARTSSON, D. F., ARNAR, D. O., HELGADOTTIR, A., GRETARSDOTTIR, S., HOLM, H., SIGURDSSON, A., JONASDOTTIR, A., BAKER, A., THORLEIFSSON, G., KRISTJANSSON, K., *et al.* (2007). Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Nature* **448**, 353-357.
- GUDBJARTSSON, D. F., HOLM, H., GRETARSDOTTIR, S., THORLEIFSSON, G., WALTERS, G. B., THORGEIRSSON, G., GULCHER, J., MATHIESEN, E. B., NJOLSTAD, I., NYRNES, A., *et al.* (2009). A sequence variant in ZFX3 on 16q22 associates with atrial fibrillation and ischemic stroke. *Nat Genet* **41**, 876-878.
- HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B., und 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.
- HART, R. G., und HALPERIN, J. L. (2001). Atrial fibrillation and stroke : concepts and controversies. *Stroke* **32**, 803-808.
- HASEGAWA, K., OHNO, S., ASHIHARA, T., ITOH, H., DING, W. G., TOYODA, F., MAKIYAMA, T., AOKI, H., NAKAMURA, Y., DELISLE, B. P., *et al.* (2013). A novel KCNQ1 missense mutation identified in a patient with juvenile-onset atrial fibrillation causes constitutively open I channels. *Heart Rhythm*.

- HASEGAWA, K., OHNO, S., ASHIHARA, T., ITOH, H., DING, W. G., TOYODA, F., MAKIYAMA, T., AOKI, H., NAKAMURA, Y., DELISLE, B. P., *et al.* (2014). A novel KCNQ1 missense mutation identified in a patient with juvenile-onset atrial fibrillation causes constitutively open IKs channels. *Heart Rhythm* **11**, 67-75.
- HAVERKAMP, W., BREITHARDT, G., CAMM, A. J., JANSE, M. J., ROSEN, M. R., ANTZELEVITCH, C., ESCANDE, D., FRANZ, M., MALIK, M., MOSS, A., und SHAH, R. (2000). The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* **47**, 219-233.
- HENRION, U., ZUMHAGEN, S., STEINKE, K., STRUTZ-SEEBOHM, N., STALLMEYER, B., LANG, F., SCHULZE-BAHR, E., und SEEBOHM, G. (2012). Overlapping cardiac phenotype associated with a familial mutation in the voltage sensor of the KCNQ1 channel. *Cell Physiol Biochem* **29**, 809-818.
- HONDEGHEM, L. M., und HOFFMANN, P. (2003). Blinded test in isolated female rabbit heart reliably identifies action potential duration prolongation and proarrhythmic drugs: importance of triangulation, reverse use dependence, and instability. *J Cardiovasc Pharmacol* **41**, 14-24.
- HUNLICH, M., TREMBLE, S. M., BEGIN, K. J., LEAVITT, B. J., ITTLEMAN, F. P., und VANBUREN, P. (2010). Atrial contractile protein content and function are preserved in patients with coronary artery disease and atrial fibrillation. *Coron Artery Dis* **21**, 357-362.
- ISOM, L. L., DE JONGH, K. S., und CATTERALL, W. A. (1994). Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron* **12**, 1183-1194.
- ISOM, L. L., DE JONGH, K. S., PATTON, D. E., REBER, B. F., OFFORD, J., CHARBONNEAU, H., WALSH, K., GOLDIN, A. L., und CATTERALL, W. A. (1992). Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* **256**, 839-842.
- JABBARI, J., OLESEN, M. S., HOLST, A. G., NIELSEN, J. B., HAUNSO, S., und SVENDSEN, J. H. (2011). Common polymorphisms in KCNJ5 [corrected] are associated with early-onset lone atrial fibrillation in Caucasians. *Cardiology* **118**, 116-120.
- JIANG, J. Q., SHEN, F. F., FANG, W. Y., LIU, X., und YANG, Y. Q. (2011). Novel GATA4 mutations in lone atrial fibrillation. *Int J Mol Med* **28**, 1025-1032.
- JOHNSTON, J., FORSYTHE, I. D., und KOPP-SCHEINPFLUG, C. (2010). Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability. *J Physiol* **588**, 3187-3200.
- JUNG, C. G., KIM, H. J., KAWAGUCHI, M., KHANNA, K. K., HIDA, H., ASAI, K., NISHINO, H., und MIURA, Y. (2005). Homeotic factor ATBF1 induces the cell cycle arrest associated with neuronal differentiation. *Development* **132**, 5137-5145.

- KAHR, P. C., PICCINI, I., FABRITZ, L., GREBER, B., SCHOLER, H., SCHELD, H. H., HOFFMEIER, A., BROWN, N. A., und KIRCHHOF, P.** (2011). Systematic analysis of gene expression differences between left and right atria in different mouse strains and in human atrial tissue. *PLoS One* **6**, e26389.
- KASPAR, P., DVORAKOVA, M., KRALOVA, J., PAJER, P., KOZMIK, Z., und DVORAK, M.** (1999). Myb-interacting protein, ATBF1, represses transcriptional activity of Myb oncoprotein. *J Biol Chem* **274**, 14422-14428.
- KEATING, M. T., und SANGUINETTI, M. C.** (2001). Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* **104**, 569-580.
- KHARCHE, S., GARRATT, C. J., BOYETT, M. R., INADA, S., HOLDEN, A. V., HANCOX, J. C., und ZHANG, H.** (2008). Atrial proarrhythmia due to increased inward rectifier current (I(K1)) arising from KCNJ2 mutation--a simulation study. *Prog Biophys Mol Biol* **98**, 186-197.
- KHODOROV, B. I., und ZABOROVSKAYA, L. D.** (1986). Use-dependent blockade of sodium channels by local anaesthetics and antiarrhythmic drugs. Effects of chloramine-T and calcium ions. *Drugs Exp Clin Res* **12**, 743-752.
- KIEHN, J., LACERDA, A. E., und BROWN, A. M.** (1999). Pathways of HERG inactivation. *Am J Physiol* **277**, H199-210.
- KIESECKER, C., ZITRON, E., LUCK, S., BLOEHS, R., SCHOLZ, E. P., KATHOFER, S., THOMAS, D., KREYE, V. A., KATUS, H. A., SCHOELS, W., et al.** (2004). Class Ia anti-arrhythmic drug ajmaline blocks HERG potassium channels: mode of action. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **370**, 423-435.
- KIM, K. B., RODEFELD, M. D., SCHUESSLER, R. B., COX, J. L., und BOINEAU, J. P.** (1996). Relationship between local atrial fibrillation interval and refractory period in the isolated canine atrium. *Circulation* **94**, 2961-2967.
- KIRCHHOF, P., KAHR, P. C., KAESE, S., PICCINI, I., VOKSHI, I., SCHELD, H. H., ROTERING, H., FORTMUELLER, L., LAAKMANN, S., VERHEULE, S., et al.** (2011). PITX2c is expressed in the adult left atrium, and reducing Pitx2c expression promotes atrial fibrillation inducibility and complex changes in gene expression. *Circ Cardiovasc Genet* **4**, 123-133.
- KOHLHARDT, M., FICHTNER, H., FROBE, U., und HERZIG, J. W.** (1989). On the mechanism of drug-induced blockade of Na⁺ currents: interaction of antiarrhythmic compounds with DPI-modified single cardiac Na⁺ channels. *Circ Res* **64**, 867-881.

- KOIVUMAKI, J. T., KORHONEN, T., und TAVI, P.** (2011). Impact of sarcoplasmic reticulum calcium release on calcium dynamics and action potential morphology in human atrial myocytes: a computational study. *PLoS Comput Biol* **7**, e1001067.
- KOPECKY, S. L., GERSH, B. J., MCGOON, M. D., WHISNANT, J. P., HOLMES, D. R., JR., ILSTRUP, D. M., und FRYE, R. L.** (1987). The natural history of lone atrial fibrillation. A population-based study over three decades. *N Engl J Med* **317**, 669-674.
- KOPPEL, C., WAGEMANN, A., und MARTENS, F.** (1989). Pharmacokinetics and antiarrhythmic efficacy of intravenous ajmaline in ventricular arrhythmia of acute onset. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **14**, 161-167.
- KRUMMEN, D. E., BAYER, J. D., HO, J., HO, G., SMETAK, M. R., CLOPTON, P., TRAYANOVA, N. A., und NARAYAN, S. M.** (2012). Mechanisms of human atrial fibrillation initiation: clinical and computational studies of repolarization restitution and activation latency. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **5**, 1149-1159.
- LEVY, S., MAAREK, M., COUMEL, P., GUIZE, L., LEKIEFFRE, J., MEDVEDOWSKY, J. L., und SEBAOUN, A.** (1999). Characterization of different subsets of atrial fibrillation in general practice in France: the ALFA study. The College of French Cardiologists. *Circulation* **99**, 3028-3035.
- LI, C., WANG, F., YANG, Y., FU, F., XU, C., SHI, L., LI, S., XIA, Y., WU, G., CHENG, X., et al.** (2011). Significant association of SNP rs2106261 in the ZFH3 gene with atrial fibrillation in a Chinese Han GeneID population. *Hum Genet* **129**, 239-246.
- LIANG, C., LI, X., XU, Y., CHEN, Q., WU, Y., WANG, W., LI, W., und QIU, M.** (2013). KCNE1 rs1805127 polymorphism increases the risk of atrial fibrillation: a meta-analysis of 10 studies. *PLoS One* **8**, e68690.
- LOEWE, A., WILHELMS, M., FISCHER, F., SCHOLZ, E. P., und DOSSEL, O.** (2013). Impact of hERG Mutations on Simulated Human Atrial Action Potentials. *Biomed Tech (Berl)*.
- LOEWE, A., WILHELMS, M., FISCHER, F., SCHOLZ, E. P., DOSSEL, O., und SEEMANN, G.** (2014). Arrhythmic potency of human ether-a-go-go-related gene mutations L532P and N588K in a computational model of human atrial myocytes. *Europace* **16**, 435-443.
- LUNDBY, A., RAVN, L. S., SVENDSEN, J. H., HAUNS, S., OLESEN, S. P., und SCHMITT, N.** (2008). KCNE3 mutation V17M identified in a patient with lone atrial fibrillation. *Cell Physiol Biochem* **21**, 47-54.
- MADEJA, M., MUSSHOF, U., und SPECKMANN, E. J.** (1997). Follicular tissues reduce drug effects on ion channels in oocytes of *Xenopus laevis*. *Eur J Neurosci* **9**, 599-604.

- MALECKAR, M. M., GREENSTEIN, J. L., GILES, W. R., und TRAYANOVA, N. A.** (2009). K⁺ current changes account for the rate dependence of the action potential in the human atrial myocyte. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**, H1398-1410.
- MAYS, D. J., FOOSE, J. M., PHILIPSON, L. H., und TAMKUN, M. M.** (1995). Localization of the Kv1.5 K⁺ channel protein in explanted cardiac tissue. *J Clin Invest* **96**, 282-292.
- MCDONALD, T. V., YU, Z., MING, Z., PALMA, E., MEYERS, M. B., WANG, K. W., GOLDSTEIN, S. A., und FISHMAN, G. I.** (1997). A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr). *Nature* **388**, 289-292.
- MENO, C., SHIMONO, A., SAIJOH, Y., YASHIRO, K., MOCHIDA, K., OHISHI, S., NOJI, S., KONDOH, H., und HAMADA, H.** (1998). lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal. *Cell* **94**, 287-297.
- MENO, C., TAKEUCHI, J., SAKUMA, R., KOSHIBA-TAKEUCHI, K., OHISHI, S., SAIJOH, Y., MIYAZAKI, J., TEN DIJKE, P., OGURA, T., und HAMADA, H.** (2001). Diffusion of nodal signaling activity in the absence of the feedback inhibitor Lefty2. *Dev Cell* **1**, 127-138.
- MOE, G. K., RHEINBOLDT, W. C., und ABILDSKOV, J. A.** (1964). A Computer Model of Atrial Fibrillation. *Am Heart J* **67**, 200-220.
- MOHLER, P. J., SPLAWSKI, I., NAPOLITANO, C., BOTTELLI, G., SHARPE, L., TIMOTHY, K., PRIORI, S. G., KEATING, M. T., und BENNETT, V.** (2004). A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9137-9142.
- MOMMERSTEEG, M. T., BROWN, N. A., PRALL, O. W., DE GIER-DE VRIES, C., HARVEY, R. P., MOORMAN, A. F., und CHRISTOFFELS, V. M.** (2007a). Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium. *Circ Res* **101**, 902-909.
- MOMMERSTEEG, M. T., HOOGAARS, W. M., PRALL, O. W., DE GIER-DE VRIES, C., WIESE, C., CLOUT, D. E., PAPAIOANNOU, V. E., BROWN, N. A., HARVEY, R. P., MOORMAN, A. F., und CHRISTOFFELS, V. M.** (2007b). Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res* **100**, 354-362.
- MORINAGA, T., YASUDA, H., HASHIMOTO, T., HIGASHIO, K., und TAMAOKI, T.** (1991). A human alpha-fetoprotein enhancer-binding protein, ATBF1, contains four homeodomains and seventeen zinc fingers. *Mol Cell Biol* **11**, 6041-6049.
- NABAUER, M., BEUCKELMANN, D. J., UBERFUHR, P., und 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.

- NAGY, Z. A., VIRAG, L., TOTH, A., BILICZKI, P., ACSAI, K., BANYASZ, T., NANASI, P., PAPP, J. G., und VARRO, A.** (2004). Selective inhibition of sodium-calcium exchanger by SEA-0400 decreases early and delayed after depolarization in canine heart. *Br J Pharmacol* **143**, 827-831.
- NATTEL, S.** (2002). New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* **415**, 219-226.
- NATTEL, S., DUKER, G., und CARLSSON, L.** (2008). Model systems for the discovery and development of antiarrhythmic drugs. *Prog Biophys Mol Biol* **98**, 328-339.
- NERBONNE, J. M.** (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* **525 Pt 2**, 285-298.
- NICHOLS, C. G., MAKHINA, E. N., PEARSON, W. L., SHA, Q., und LOPATIN, A. N.** (1996). Inward rectification and implications for cardiac excitability. *Circ Res* **78**, 1-7.
- NIELSEN, N. H., WINKEL, B. G., KANTERS, J. K., SCHMITT, N., HOFMAN-BANG, J., JENSEN, H. S., BENTZEN, B. H., SIGURD, B., LARSEN, L. A., ANDERSEN, P. S., et al.** (2007). Mutations in the Kv1.5 channel gene KCNA5 in cardiac arrest patients. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 776-782.
- OLESEN, M. S., HOLST, A. G., JABBARI, J., NIELSEN, J. B., CHRISTOPHERSEN, I. E., SAJADIEH, A., HAUNSO, S., und SVENDSEN, J. H.** (2012). Genetic loci on chromosomes 4q25, 7p31, and 12p12 are associated with onset of lone atrial fibrillation before the age of 40 years. *Can J Cardiol* **28**, 191-195.
- OLESEN, M. S., JESPERSEN, T., NIELSEN, J. B., LIANG, B., MOLLER, D. V., HEDLEY, P., CHRISTIANSEN, M., VARRO, A., OLESEN, S. P., HAUNSO, S., et al.** (2011). Mutations in sodium channel beta-subunit SCN3B are associated with early-onset lone atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* **89**, 786-793.
- OLSON, T. M., ALEKSEEV, A. E., LIU, X. K., PARK, S., ZINGMAN, L. V., BIENENGRABER, M., SATTIRAJU, S., BALLEW, J. D., JAHANGIR, A., und TERZIC, A.** (2006). Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. *Hum Mol Genet* **15**, 2185-2191.
- OLSON, T. M., ALEKSEEV, A. E., MOREAU, C., LIU, X. K., ZINGMAN, L. V., MIKI, T., SEINO, S., ASIRVATHAM, S. J., JAHANGIR, A., und TERZIC, A.** (2007). KATP channel mutation confers risk for vein of Marshall adrenergic atrial fibrillation. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **4**, 110-116.
- PEREZ-REYES, E., CRIBBS, L. L., DAUD, A., LACERDA, A. E., BARCLAY, J., WILLIAMSON, M. P., FOX, M., REES, M., und LEE, J. H.** (1998). Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **391**, 896-900.
- PERNEY, T. M., und KACZMAREK, L. K.** (1991). The molecular biology of K⁺ channels. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 663-670.

- PLASTER, N. M., TAWIL, R., TRISTANI-FIROUZI, M., CANUN, S., BENDAHOU, S., TSUNODA, A., DONALDSON, M. R., IANNACCONE, S. T., BRUNT, E., BAROHN, R., et al.** (2001). Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* **105**, 511-519.
- POGWIZD, S. M., und BERS, D. M.** (2002). Na/Ca exchange in heart failure: contractile dysfunction and arrhythmogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **976**, 454-465.
- POSCH, M. G., BOLDT, L. H., POLOTZKI, M., RICHTER, S., ROLF, S., PERROT, A., DIETZ, R., OZCELIK, C., und HAVERKAMP, W.** (2010). Mutations in the cardiac transcription factor GATA4 in patients with lone atrial fibrillation. *Eur J Med Genet* **53**, 201-203.
- PROVIDENCIA, R., PAIVA, L., BARRA, S., und FAUSTINO, A.** (2013). Troponin rise in patients with atrial fibrillation: a marker of adverse prognosis and increased thromboembolic risk. *Int J Cardiol* **168**, 4889.
- PRYSTUPA, A., DZIDA, G., MYSLINSKI, W., MALAJ, G., und LORENC, T.** (2006). Mink gene polymorphism in the pathogenesis of lone atrial fibrillation. *Kardiol Pol* **64**, 1205-1211; discussion 1212-1203.
- RAVENS, U.** (2010). Antiarrhythmic therapy in atrial fibrillation. *Pharmacol Ther* **128**, 129-145.
- RAVN, L. S., AIZAWA, Y., POLLEVICK, G. D., HOFMAN-BANG, J., CORDEIRO, J. M., DIXEN, U., JENSEN, G., WU, Y., BURASHNIKOV, E., HAUNSO, S., et al.** (2008). Gain of function in IKs secondary to a mutation in KCNE5 associated with atrial fibrillation. *Heart Rhythm* **5**, 427-435.
- REDFERN, W. S., CARLSSON, L., DAVIS, A. S., LYNCH, W. G., MACKENZIE, I., PALETHORPE, S., SIEGL, P. K., STRANG, I., SULLIVAN, A. T., WALLIS, R., et al.** (2003). Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res* **58**, 32-45.
- REN, X., XU, C., ZHAN, C., YANG, Y., SHI, L., WANG, F., WANG, C., XIA, Y., YANG, B., WU, G., et al.** (2010). Identification of NPPA variants associated with atrial fibrillation in a Chinese GenelD population. *Clin Chim Acta* **411**, 481-485.
- RENSMA, P. L., ALLESSIE, M. A., LAMMERS, W. J., BONKE, F. I., und SCHALIJ, M. J.** (1988). Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. *Circ Res* **62**, 395-410.

- RESTIER, L., CHENG, L., und SANGUINETTI, M. C.** (2008). Mechanisms by which atrial fibrillation-associated mutations in the S1 domain of KCNQ1 slow deactivation of IKs channels. *J Physiol* **586**, 4179-4191.
- RODEN, D. M., BALSER, J. R., GEORGE, A. L., JR., und ANDERSON, M. E.** (2002). Cardiac ion channels. *Annu Rev Physiol* **64**, 431-475.
- ROLF, S., HAVERKAMP, W., BORGGREFE, M., MUSSHOF, U., ECKARDT, L., MERGENTHALER, J., SNYDERS, D. J., PONGS, O., SPECKMANN, E. J., BREITHARDT, G., und MADEJA, M.** (2000). Effects of antiarrhythmic drugs on cloned cardiac voltage-gated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**, 22-31.
- RUTZEN-LOPEZ, H., KHANNA, V., und REYNOLDS, M. R.** (2011). Atrial fibrillation: epidemiology, prognosis and therapy. *Minerva Med* **102**, 187-207.
- SAKUTA, H., OKAMOTO, K., und WATANABE, Y.** (1992). Blockade by antiarrhythmic drugs of glibenclamide-sensitive K⁺ channels in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol* **107**, 1061-1067.
- SANGUINETTI, M. C., CURRAN, M. E., ZOU, A., SHEN, J., SPECTOR, P. S., ATKINSON, D. L., und KEATING, M. T.** (1996). Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* **384**, 80-83.
- SANGUINETTI, M. C., und JURKIEWICZ, N. K.** (1990). Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* **96**, 195-215.
- SANSOM, M. S.** (2000). Potassium channels: watching a voltage-sensor tilt and twist. *Curr Biol* **10**, R206-209.
- SCHOLZ, E. P., CARRILLO-BUSTAMANTE, P., FISCHER, F., WILHELMS, M., ZITRON, E., DOSSEL, O., KATUS, H. A., und SEEMANN, G.** (2013). Rotor termination is critically dependent on kinetic properties of I_{Kur} inhibitors in an in silico model of chronic atrial fibrillation. *PLoS One* **8**, e83179.
- SCHOLZ, E. P., KONRAD, F. M., WEISS, D. L., ZITRON, E., KIESECKER, C., BLOEHS, R., KULZER, M., THOMAS, D., KATHOFER, S., BAUER, A., et al.** (2007). Anticholinergic antiparkinson drug orphenadrine inhibits HERG channels: block attenuation by mutations of the pore residues Y652 or F656. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **376**, 275-284.
- SCHULTZ, D., MIKALA, G., YATANI, A., ENGLE, D. B., ILES, D. E., SEGERS, B., SINKE, R. J., WEGHUIS, D. O., KLOCKNER, U., WAKAMORI, M., und ET AL.** (1993). Cloning, chromosomal localization, and functional expression of the alpha 1 subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6228-6232.

- SHIMONI, Y., CLARK, R. B., und GILES, W. R.** (1992). Role of an inwardly rectifying potassium current in rabbit ventricular action potential. *J Physiol* **448**, 709-727.
- SIGWORTH, F. J., und NEHER, E.** (1980). Single Na⁺ channel currents observed in cultured rat muscle cells. *Nature* **287**, 447-449.
- SINGH, B. N., und NADEMANEE, K.** (1985). Control of cardiac arrhythmias by selective lengthening of repolarization: theoretic considerations and clinical observations. *Am Heart J* **109**, 421-430.
- SINNER, M. F., PFEUFER, A., AKYOL, M., BECKMANN, B. M., HINTERSEER, M., WACKER, A., PERZ, S., SAUTER, W., ILLIG, T., NABAUER, M., et al.** (2008). The non-synonymous coding IKr-channel variant KCNH2-K897T is associated with atrial fibrillation: results from a systematic candidate gene-based analysis of KCNH2 (HERG). *Eur Heart J* **29**, 907-914.
- SUN, X., FRIERSON, H. F., CHEN, C., LI, C., RAN, Q., OTTO, K. B., CANTAREL, B. L., VESSELLA, R. L., GAO, A. C., PETROS, J., et al.** (2005). Frequent somatic mutations of the transcription factor ATBF1 in human prostate cancer. *Nat Genet* **37**, 407-412.
- SUZUKI, T., MORISHIMA, M., KATO, S., UEDA, N., HONJO, H., und KAMIYA, K.** (2013). Atrial selectivity in Na⁺channel blockade by acute amiodarone. *Cardiovasc Res* **98**, 136-144.
- TAMARGO, J., CABALLERO, R., GOMEZ, R., VALENZUELA, C., und DELPON, E.** (2004). Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* **62**, 9-33.
- THOMAS, D., GUT, B., WENDT-NORDAHL, G., und KIEHN, J.** (2002). The antidepressant drug fluoxetine is an inhibitor of human ether-a-go-go-related gene (HERG) potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther* **300**, 543-548.
- TRAN, C. T., SCHMIDT, T. A., CHRISTENSEN, J. B., und KJELDSSEN, K.** (2009). Atrial Na,K-ATPase increase and potassium dysregulation accentuate the risk of postoperative atrial fibrillation. *Cardiology* **114**, 1-7.
- UEBELE, V. N., ENGLAND, S. K., GALLAGHER, D. J., SNYDERS, D. J., BENNETT, P. B., und TAMKUN, M. M.** (1998). Distinct domains of the voltage-gated K⁺ channel Kv beta 1.3 beta-subunit affect voltage-dependent gating. *Am J Physiol* **274**, C1485-1495.
- VOIGT, N., HEIJMAN, J., WANG, Q., CHIANG, D. Y., LI, N., KARCK, M., WEHRENS, X. H., NATTEL, S., und DOBREV, D.** (2014). Cellular and molecular mechanisms of atrial arrhythmogenesis in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation* **129**, 145-156.

- VOIGT, N., ROZMARITSA, N., TRAUSSCH, A., ZIMNIAC, T., CHRIST, T., WETTWER, E., MATSCHKE, K., DOBREV, D., und RAVENS, U.** (2010). Inhibition of IK,ACh current may contribute to clinical efficacy of class I and class III antiarrhythmic drugs in patients with atrial fibrillation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **381**, 251-259.
- WARMKE, J. W., und GANETZKY, B.** (1994). A family of potassium channel genes related to eag in Drosophila and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3438-3442.
- WATANABE, H., DARBAR, D., KAISER, D. W., JIRAMONGKOLCHAI, K., CHOPRA, S., DONAHUE, B. S., KANNANKERIL, P. J., und RODEN, D. M.** (2009). Mutations in sodium channel beta1- and beta2-subunits associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **2**, 268-275.
- WETTWER, E., CHRIST, T., ENDIG, S., ROZMARITSA, N., MATSCHKE, K., LYNCH, J. J., POURRIER, M., GIBSON, J. K., FEDIDA, D., KNAUT, M., und RAVENS, U.** (2013). The new antiarrhythmic drug vernakalant: ex vivo study of human atrial tissue from sinus rhythm and chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* **98**, 145-154.
- WIBLE, B. A., DE BIASI, M., MAJUMDER, K., TAGLIALATELA, M., und BROWN, A. M.** (1995). Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K⁺ channel from human atrium. *Circ Res* **76**, 343-350.
- WIESFELD, A. C., HEMELS, M. E., VAN TINTELEN, J. P., VAN DEN BERG, M. P., VAN VELDHUISEN, D. J., und VAN GELDER, I. C.** (2005). Genetic aspects of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* **67**, 414-418.
- WIJFFELS, M. C., KIRCHHOF, C. J., DORLAND, R., und ALLESSIE, M. A.** (1995). Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* **92**, 1954-1968.
- WILLIAMS, C. P., HU, N., SHEN, W., MASHBURN, A. B., und MURRAY, K. T.** (2002). Modulation of the human Kv1.5 channel by protein kinase C activation: role of the Kvbeta1.2 subunit. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 545-550.
- WIRKA, R. C., GORE, S., VAN WAGONER, D. R., ARKING, D. E., LUBITZ, S. A., LUNETTA, K. L., BENJAMIN, E. J., ALONSO, A., ELLINOR, P. T., BARNARD, J., et al.** (2011). A common connexin-40 gene promoter variant affects connexin-40 expression in human atria and is associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **4**, 87-93.
- WOLPERT, C., ECHTERNACH, C., VELTMANN, C., ANTZELEVITCH, C., THOMAS, G. P., SPEHL, S., STREITNER, F., KUSCHYK, J., SCHIMPF, R., HAASE, K. K., und BORGGREFE, M.** (2005). Intravenous drug challenge using flecainide and ajmaline in patients with Brugada syndrome. *Heart Rhythm* **2**, 254-260.

YANG, Y., LI, J., LIN, X., YANG, Y., HONG, K., WANG, L., LIU, J., LI, L., YAN, D., LIANG, D., et al. (2009). Novel KCNA5 loss-of-function mutations responsible for atrial fibrillation. *J Hum Genet* **54**, 277-283.

YANG, Y., XIA, M., JIN, Q., BENDAHOU, S., SHI, J., CHEN, Y., LIANG, B., LIN, J., LIU, Y., LIU, B., et al. (2004). Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am J Hum Genet* **75**, 899-905.

ZHANG, D. F., LIANG, B., LIN, J., LIU, B., ZHOU, Q. S., und YANG, Y. Q. (2005). [KCNE3 R53H substitution in familial atrial fibrillation]. *Chin Med J (Engl)* **118**, 1735-1738.

ZHANG, X., CHEN, S., YOO, S., CHAKRABARTI, S., ZHANG, T., KE, T., OBERTI, C., YONG, S. L., FANG, F., LI, L., et al. (2008). Mutation in nuclear pore component NUP155 leads to atrial fibrillation and early sudden cardiac death. *Cell* **135**, 1017-1027.

6. Publikationen

Fischer, F., N. Vonderlin, C. Seyler, E. Zitron, B. Schernus, H. Katus and E. Scholz (2013). "Acute and subacute effects of the selective serotonin-noradrenaline reuptake inhibitor duloxetine on cardiac hERG channels." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **386**(9): 795-804.

Fischer, F., N. Vonderlin, E. Zitron, C. Seyler, D. Scherer, R. Becker, H. A. Katus and E. P. Scholz (2013). "Inhibition of cardiac Kv1.5 and Kv4.3 potassium channels by the class Ia anti-arrhythmic ajmaline: mode of action." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **386**(11): 991-999.

Fischer, F., Vonderlin N, Seyler C, Zitron E, Korkmaz S, Szabó G, Thomas D, Katus HA, Scholz EP (2014). „Isoenzyme-specific regulation of cardiac Kv1.5/Kvβ1.2 ion channel complex by protein kinase C: central role of **PKCβII**." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*.

Loewe, A., M. Wilhelms, **F. Fischer**, E. P. Scholz and O. Dossel (2013). "Impact of hERG Mutations on Simulated Human Atrial Action Potentials." *Biomed Tech (Berl)*.

Scholz, E. P., P. Carrillo-Bustamante, **F. Fischer**, M. Wilhelms, E. Zitron, O. Dossel, H. A. Katus and G. Seemann (2013). "Rotor termination is critically dependent on kinetic properties of I_{kur} inhibitors in an in silico model of chronic atrial fibrillation." *PLoS One* **8**(12): e83179.

Loewe, A., M. Wilhelms, **F. Fischer**, E. P. Scholz, O. Dossel and G. Seemann (2014). "Arrhythmic potency of human ether-a-go-go-related gene mutations L532P and N588K in a computational model of human atrial myocytes." *Europace* **16**(3): 435-443.

In Revision

7. Danksagung

Ich möchte ganz besonders Herrn PD Dr. med. Eberhard Scholz für die Bereitstellung des interessanten Themas und der guten Anleitung in allen Belangen danken.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. Nat. Thomas Wieland und Prof. Dr. med. Patrick Most für die produktive Hilfe und guten Tipps in den TAC-Meetings und die Begutachtung meiner Arbeit.

Danken möchte ich auch meinen Kooperationspartnern: Herrn Prof. Dr. rer. nat. David Hassel, Herrn Dr.-Ing. Gunnar Seemann und Herrn Dr.-Ing. Matthias Wilhelms. Die Zusammenarbeit war spannend, lehrreich und fruchtbar!

Für die andauernde Hilfe in allen Bereichen, die guten Gespräche in den Pausen und die super Stimmung im Labor danke ich Frau PD Dr. sc. Hum. Claudia Seyler, Frau Christine Jeckel und Herrn Kai Sona.

Ein besonderer Dank geht an meine Mutter, meine Schwester und meine Freunde, die mir das Leben neben der Arbeit schöner gemacht haben und mir dadurch Kraft geben konnten. Auch Herrn Sebastian Hassinger möchte ich für seine Unterstützung, Geduld und stetige Zuversicht danken.