

**Einfluss des β_3 -adrenergen Rezeptors auf die langsame
Komponente des Delayed Rectifier-Kaliumstroms in
ventrikulären Kardiomyozyten des Meerschweinchens**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von

Alexander Christian Schneck

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2003

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Kühlkamp

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Drews

Meinen Eltern gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde an der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen, Abteilung Kardiologie, unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Kühlkamp angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. V. Kühlkamp für die interessante Themenstellung, die uneingeschränkte Hilfe und hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Die Möglichkeit der Teilnahme an deutschen und internationalen Kongressen hat meine Begeisterung auf den Gebieten der Elektrophysiologie und Kardiologie sehr gefördert. Dafür danke ich Ihm herzlich.

Frau Prof. Dr. G. Drews, Pharmazeutisches Institut Tübingen, danke ich besonders für die Übernahme des Referates der Dissertation und Ihre freundschaftliche Unterstützung.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. R.F. Bosch für die intensive Betreuung der praktischen Arbeit, insbesondere bei der Einarbeitung in die Grundlagen der Elektrophysiologie und Zellisolationen sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft. Seine Hilfe beim Verfassen von Kongressbeiträgen und Veröffentlichungen war für mich äußerst wertvoll.

Herrn Dr. A.T. Bachmann sei herzlichst für seine allseitige, kompetente Hilfsbereitschaft bei Problemen und für eine gute Einarbeitung in verschiedene Arbeitstechniken und „wissenschaftliche Skills“ gedankt.

Frau J. Gogel danke ich für die tatkräftige Hilfe und kollegiale Atmosphäre im Labor.

Für die Diskussionen und freundschaftliche Zusammenarbeit mit Herrn Apotheker S. Wöhrle möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Frau Dr. A. Hambrock danke ich für Ihre Gesprächsbereitschaft und Unterstützung bei der Arbeit an unserer Publikation.

Ferner gilt mein Dank folgenden Personen, die für ein sehr angenehmes und motivierendes Arbeitsklima im elektrophysiologischen Labor der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen beitrugen:

J. Davydova, B.W. Eigenberger, J. Grammer, A. Joos, R. Laszlo, E. Malenke, S. Rilling, N. Rüb, und R. Suchalla.

Der Pinguin-Stiftung der Henkel AG, Düsseldorf, danke ich für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Frau Birgit Eisele und meiner Familie für die entgegengebrachte Geduld und Zuneigung sowie für den nötigen Rückhalt, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglichten, herzlich bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis *VI*

Abkürzungsverzeichnis *IX*

1 Einleitung **1**

1.1 Das Aktionspotential der Herzmuskelzellen **1**

1.1.1 Phase 0 2

1.1.2 Phase 1 3

1.1.3 Phase 2 3

1.1.4 Phase 3 4

1.1.5 Phase 4 4

1.2 Kardiale Kaliumkanäle **5**

1.2.1 Allgemeines 5

1.2.2 Molekulare Struktur und Funktion 5

1.2.3 Einteilung 6

1.2.3.1 6TDM-1P: spannungsabhängige (Kv-) Kanäle 7

1.2.3.2 2TDM-1P: Inward Rectifier (Kir-) Kanäle 9

1.2.3.3 4TDM-2P: Tandem (TWIK)-Kanäle 10

1.3 Der Delayed Rectifier-Kaliumstrom I_K **11**

1.3.1 Allgemeines 11

1.3.2 Die schnell aktivierende Komponente des Delayed Rectifiers I_{Kr} 12

1.3.2.1 Physiologische Rolle 12

1.3.2.2 Molekulare Struktur 14

1.3.2.3 Biophysikalische Eigenschaften 14

1.3.2.4 I_{Kr} -Blocker 15

1.3.3 Die langsam aktivierende Komponente des Delayed Rectifiers I_{Ks} 16

1.3.3.1 Physiologische Rolle 16

1.3.3.2 Molekulare Struktur 17

1.3.3.3 Biophysikalische Eigenschaften 20

1.3.3.4 I_{Ks} -Blocker 21

1.3.4 Neurohormonale Modulation von I_K -Strömen 22

1.3.4.1 I_{Kur} 22

1.3.4.2 I_{Kr} 23

1.3.4.3 I_{Ks} 23

1.3.5 Pathologische Veränderungen des KvLQT1/minK-Kanals 25

1.3.5.1 Das „Lange QT-Syndrom“ 25

1.3.5.2 Andere pathophysiologische Veränderungen 27

1.4 Der β_3 -adrenerge Rezeptor **28**

1.4.1 Molekulare Struktur 29

1.4.2 Physiologie 30

1.4.3 Einfluss auf Ionenkanäle 31

1.5 Isolierte Meerschweinchen-Kardiomyozyten als Modell zur Forschung an kardialen Ionenkanälen **32**

1.6 Fragestellung **33**

2	Material.....	35
2.1	Versuchstiere	35
2.2	Geräte.....	35
2.2.1	Langendorff-Perifusionsapparatur	35
2.2.2	Patch-Clamp-Messplatz.....	35
2.2.3	Elektroden.....	36
2.2.4	Sonstige Laborgeräte und Zubehör.....	36
2.3	Chemikalien	37
2.4	Lösungen	38
2.4.1	Lösungen zur Zellisolation	38
2.4.2	Lösungen für Patch-Clamp-Messungen.....	39
2.4.2.1	Messungen von Aktionspotentialen	39
2.4.2.2	Messungen des I_{Ks} -Kaliumstroms	40
2.4.3	Pipettenlösungen.....	40
2.4.3.1	Pipettenlösung für die Standard-Whole-Cell-Konfiguration.....	40
2.4.3.2	Pipettenlösung für Perforated-Patch-Versuche	40
2.4.4	Agarbrücke	41
3	Methoden	42
3.1	Isolation von Herzmuskelzellen: Die Langendorff-Präparation	42
3.1.1	Prinzip	42
3.1.2	Charakterisierung des Collagenase-Isolationsenzym.....	44
3.1.3	Die Langendorff-Apparatur	44
3.1.4	Ablauf der Zellpräparation	46
3.2	Patch-Clamp-Technik.....	47
3.2.1	Definition.....	47
3.2.2	Prinzip der Spannungsklemme	47
3.2.3	Die Whole-Cell-Konfiguration	49
3.2.4	Aufbau des Patch-Clamp-Messstands	50
3.2.5	Ablauf der elektrophysiologischen Messungen.....	52
3.2.6	Verwendete Pulsprotokolle.....	53
3.2.6.1	Kaliumstrom I_{Ks}	53
3.2.6.2	Aktionspotentiale	53
3.3	Datenauswertung und Statistik.....	54
4	Versuche und Ergebnisse.....	56
4.1	Messung der Zellgröße	56
4.2	Der „Rundown-Effekt“ des I_{Ks}-Kaliumstroms	57
4.3	Einfluss β-adrenerger Stimulation auf den I_{Ks}-Kaliumstrom	59
4.3.1	Stimulation des β -adrenergen Systems durch Isoproterenol.....	59
4.3.2	Aktivierung der Proteinkinase A durch Forskolin und 8-CPT-cAMP	61
4.4	Aktivierung des β_3-AR's durch Isoproterenol und Nor-adrenalin	64
4.4.1	Konzentrations-Wirkungs-Beziehung	64
4.4.2	Zeitverlauf der I_{Ks} -Strominhibierung.....	66
4.5	Selektive β_3-AR-Stimulation durch BRL 37344 und CL 316,243.....	67
4.5.1	Konzentrations-Wirkungs-Beziehung	68
4.5.2	Zeitverlauf der I_{Ks} -Strominhibierung am Beispiel von BRL 37344	71
4.5.3	Wirkung von BRL 37344 im Perforated-Patch	72
4.5.4	Charakterisierung der I_{Ks} -Strominhibierung	73

4.5.4.1	Spannungsabhängigkeit der Aktivierung	73
4.5.4.2	Stromkinetik	75
4.5.5	Wirkung von BRL 37344 unter Blockade des β_3 -AR's durch Bupranolol.....	76
4.5.6	Effekte von BRL 37344 auf das ventrikuläre Aktionspotential	78
4.6	Untersuchungen zur Signaltransduktion der β_3-adrenergen Modulation von I_{Ks}..	81
4.6.1	Einfluss einer cAMP-Erhöhung durch Forskolin und 8-CPT-cAMP	81
4.6.2	Einfluss der PKA und der PKC	86
4.6.3	Einfluss des NO/cGMP-Systems.....	89
4.6.4	Einfluss von Protein-Tyrosinkinasen	91
4.6.4.1	Unselektive Hemmung der PTK durch Genistein und Lavendustin A	92
4.6.4.2	Selektive Hemmung der nichtrezeptorgebundenen Src-Kinase.....	95
5	<i>Diskussion</i>	98
5.1	Einfluss des β_1-adrenergen Signalweges auf den I_{Ks}-Kaliumstrom.....	98
5.2	Effekte einer β_3-AR-Stimulation	100
5.2.1	Hemmung von I_{Ks} nach Aktivierung durch Isoproterenol und Noradrenalin bei gleichzeitiger Inhibierung der β_1/β_2 -AR	100
5.2.2	Hemmung von I_{Ks} nach selektiver Aktivierung durch BRL 37344 und CL 316,243	101
5.2.3	Zeitverlauf der β_3 -AR-induzierten I_{Ks} -Hemmung	103
5.2.4	β_3 -adrenerge Effekte auf das ventrikuläre AP	104
5.3	Mechanismus der β_3-AR-vermittelten I_{Ks}-Inhibierung	105
5.3.1	Einfluss der PKA- und PKC-abhängigen Signaltransduktion	105
5.3.2	Einfluss von NO	106
5.3.3	Einfluss von Protein-Tyrosinkinasen	106
5.4	Schlussfolgerung und klinische Relevanz.....	109
6	<i>Zusammenfassung</i>	111
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	113

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
Ach	Acetylcholin
α -UE	alpha-Untereinheit
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
APD _{30,50,90}	Aktionspotentialdauer bei 30 %, 50 % und 90 % der Repolarisation
AS	Aminosäure(n)
AT _{1/2} -R.	Angiotensin _{1/2} -Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
β -AR	beta-adrenerger Rezeptor
β -ARK	beta-adrenerge Rezeptorkinase
β -UE	beta-Untereinheit
BSA	bovines Serumalbumin
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calcium-Konzentration
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CFTR-Kanal	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Kanal
CHO-Zellen	Chinese Hamster Ovary-Zellen
8-CPT-cAMP	8-Chlorphenylthio-cAMP
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamino-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-tetraessigsäure
E _k	Gleichgewichts (Nernst-) potential
G _{i/o} -Protein	inhibitorisches G-Protein
G _s -Protein	stimulierendes G-Protein
GRK	G-Protein-Rezeptorkinase

h	Hillkoeffizient
HEK 293-Zellen	Human Embryonic Kidney-Zellen
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethyl-piperazin-ethan-sulfonsäure
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC ₅₀	halb-maximale inhibitorische Wirkkonzentration
I _K	verzögerter Gleichrichter-Kaliumstrom (Delayed Rectifier)
I _{Kr}	schnell (rapid) aktivierende Komponente von I _K
I _{Ks}	langsam (slow) aktivierende Komponente von I _K
I _{Kur}	sehr schnell (ultra-rapid) aktivierende Komponente von I _K
[K ⁺] _{out}	extrazelluläre Kalium-Konzentration
Kir-Kanäle	Inward Rectifier-Kaliumkanäle
Kv-Kanäle	spannungsgesteuerte (voltage-gated) Kaliumkanäle
L-NAME	<i>N</i> -Nitro-L-Arginin-methylester
L-NMMA	<i>N</i> -Monomethyl-L-Arginin-monoacetat
M _r	Molekulargewicht
NOS	NO-Synthase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PP2	4-amino-5-(4-chlorphenyl)-7-(<i>t</i> - butyl)pyrazolol[3,4- <i>D</i>]pyrimidin
PTK	Protein-Tyrosinkinase
PTX	Pertussis-Toxin
RT	Raumtemperatur
U	Unit, Einheit für die Enzymmenge, welche die Umwandlung von 1 μmol Substrat in einer Sekunde katalysiert
V _h	Haltepotential

1 Einleitung

1.1 Das Aktionspotential der Herzmuskelzellen

Die elektrische Aktivität des Säugetierherzens ist das Ergebnis eines komplizierten Zusammenspiels einer großen Anzahl von transmembranären Ionenströmen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-), Ionenpumpen (Na^+/K^+) und Ionenaustauschmechanismen ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) (Coraboeuf, 1978; Rosen *et al.*, 1974). Aus diesen unterschiedlichen Prozessen resultiert in erregbaren Zellen, z. B. Nerven- und Muskelzellen, das Aktionspotential (AP).

Gemäß den spezifischen Aufgaben einzelner Myokardregionen im Erregungszyklus des Herzens ist auch eine intrakardiale Variabilität der AP zu beobachten. So ergeben sich charakteristische AP-Typen im Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem (Sinusknoten, Atrioventrikular(AV)-Knoten, His-Purkinjefasern) oder im Arbeitsmyokard (Atrium, Ventrikel). Gründe hierfür liegen hauptsächlich in der unterschiedlichen genetischen Expression von Ionenkanälen (Schram *et al.*, 2002b). Die Morphologie kardialer AP in den unterschiedlichen Herzregionen (Arbeitsmyokard, Schrittmacherzellen) und die Beteiligung der wichtigsten Ionenströme sind in Abbildung 1.1 gezeigt:

Das AP wird als Funktion einer Spannungsänderung entlang der kardialen Zellmembran in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Das transmembranäre Potential wird durch schnell veränderliche, spezifische Leitfähigkeiten der Membran für auswärtsgerichtete Kalium- und einwärtsgerichtete Natrium- und Calcium-Ionen bestimmt (Hille, 1992).

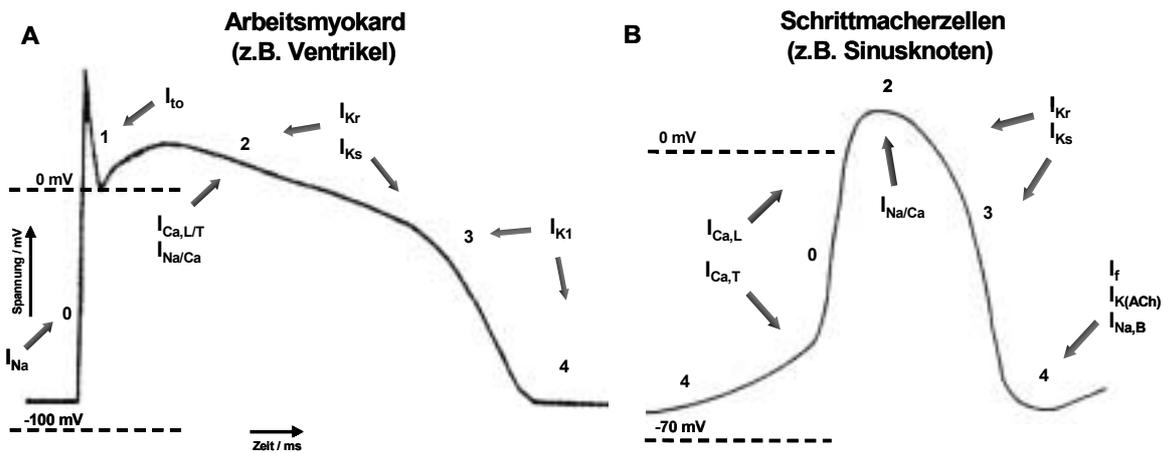


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung kardialer Aktionspotentiale am Beispiel von Ventrikel (A) und Sinusknoten (B)

Dargestellt sind die beteiligten depolarisierenden und repolarisierenden Ionenströme und der Zeitpunkt ihrer Hauptwirkung (Pfeile) innerhalb der Phasen 0-4 des AP's.

Das kardiale AP wird in fünf Phasen unterteilt (0, 1, 2, 3 und 4) und besitzt bei physiologischen Frequenzen eine Gesamtdauer von 200-400 ms. Es beginnt im Arbeitsmyokard (Abbildung 1.1.A) ausgehend von einem Ruhepotential (RP) von ca. -80 mV mit einer schnellen Depolarisation auf +20 mV bis +30 mV, gefolgt von einer langsamen Repolarisation mit einer charakteristischen Plateauphase (Coraboeuf, 1978).

1.1.1 Phase 0

Mit dem so genannten „Aufstrich“ beginnt die erste Phase des AP's. Nach einem überschwelligem Reiz reagiert das Herz gemäß dem „Alles-oder-nichts-Gesetz“ mit einer raschen Depolarisation. Das Zellmembranpotential wird hierbei umgeladen auf positive Bereiche von ca. +30 mV („Overshoot“).

Verantwortlich dafür sind zwei einwärtsgerichtete Ströme. Ein schneller Na^+ -Ionenstrom (I_{Na}) charakterisiert vor allem im Atrium und Ventrikel den Beginn des „fast response“-AP's.

Durch eine fortdauernde Erregung kommt es zu einer kurzzeitigen (<1-2 ms) Zunahme der Na⁺-Leitfähigkeit bedingt durch einen Anstieg der Öffnungswahrscheinlichkeit der schnellen Na⁺-Kanäle, wie von Weidmann bereits 1955 postuliert.

Im Bereich des Sinus- und AV-Knotens (Abbildung 1.1.B) verursacht ein langsamer Ca²⁺-Einwärtsstrom durch L-Typ- und T-Typ-Ca²⁺-Kanäle (I_{Ca,L/T}) den Aufstrich des „slow response“ AP's. Er hat ein deutlich niedrigeres Schwellenpotential von -30 mV bis -40 mV und verursacht eine maximale Depolarisation von ca. +10 mV.

I_{Ca} spielt gerade bei einer Inaktivierung des I_{Na} bei pathologischen Prozessen (Ischämie, Myokardinfarkt) für die elektrische Erregung eine entscheidende Rolle (Zipes *et al.*, 1975).

1.1.2 Phase 1

Die Phase 1 ist der erste Schritt der Repolarisation im Arbeitsmyokard („Kerbe“ des AP's). Sie entsteht durch eine spannungsabhängige Inaktivierung des I_{Na} und gleichzeitige Aktivierung eines transienten Kaliumstroms, I_{to}, bei positiven Potentialen. Dieser Strom, der sehr schnell aktiviert und inaktiviert wird, setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: einem spannungsabhängigen Kaliumstrom I_{to,1} und einem Ca²⁺-abhängigen Chloridstrom I_{to,2} (Kenyon & Gibbons, 1979). Die genaue Bedeutung einer weiteren Chloridleitfähigkeit, des cAMP-abhängigen CFTR-Chloridkanals, im physiologischen Ablauf des kardialen AP's, ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Levesque *et al.*, 1992).

Als Folge der Phase-1-Repolarisation geht das Membranpotential wieder auf Werte zwischen +10 mV und 0 mV zurück.

Im Sinus- und AV-Knoten ist diese kurze I_{to}-bedingte Phase nicht vorhanden.

1.1.3 Phase 2

Sie wird vor allem im Ventrikel als Plateauphase des Aktionspotentials bezeichnet. Ein feines Gleichgewicht zwischen Einwärts (Ca²⁺ und Na⁺)- und Auswärts (K⁺)-Strömen bestimmt diese lang anhaltende (ca. 100 ms) Depolarisationsphase. Es werden in dieser Zeit nur geringe Veränderungen im Membranpotential festgestellt.

Die Ionenbewegungen in das Zellinnere werden von dem L- und T-Typ der Ca^{2+} -Kanäle ($I_{\text{Ca,L/T}}$), dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ($I_{\text{Na/Ca}}$) und einem langsam inaktivierenden, „späten“ Na^+ -Strom getragen.

Die verzögert aktivierenden Delayed Rectifier-Kaliumströme I_{Kr} , I_{Ks} und I_{Kur} (vorhofspezifisch) sind hauptverantwortlich für den auswärtsgerichteten Ionentransport (siehe Kapitel 1.3).

1.1.4 Phase 3

Die letzte Phase der Repolarisation wird zunächst weiterhin vom Einfluss der drei I_{K} -Stromkomponenten bestimmt. Danach überwiegt ein einwärts-gleichrichtender (Inward Rectifier) Kaliumkanal. Der I_{K1} -Strom ist bei Depolarisation inaktiviert und wird bei fortschreitender Repolarisation aktiviert. Er alleine stellt vor allem im Ventrikel das ursprüngliche RP von ca. -80 mV wieder ein.

In Schrittmacherzellen ist er nur sehr schwach exprimiert, was das etwas positivere Ruhemembranpotential von ca. -50 mV bis -60 mV mitbegründet. Im Herzvorhof und in ischämischen Geweben sind mit $I_{\text{K(Ach)}}$ bzw. $I_{\text{K(ATP)}}$, $I_{\text{K(FA)}}$ und $I_{\text{K(Na)}}$ noch weitere Kaliumkanäle an der späten Repolarisation beteiligt (Carmeliet, 1993).

1.1.5 Phase 4

Während dieser Phase fließt im Arbeitsmyokard kein Strom, es herrscht das durch I_{K1} in der Phase 3 stabilisierte Ruhepotential. In Zellen mit spontaner Schrittmacheraktivität (Sinus-, AV-Knoten, His-Purkinje-System) nimmt in dieser Periode jedoch das Membranpotential spontan ab („langsame diastolische Depolarisation“). Auslöser ist zum einen der so genannte „funny“- oder „pacemaker“- Strom ($I_{\text{f}}/I_{\text{h}}$). Er wird durch Hyperpolarisation aktiviert und besitzt eine unspezifische Natrium- und Kaliumleitfähigkeit. Zum anderen tragen die Inaktivierung der I_{K} -Kanäle und die relativ hohe Hintergrundleitfähigkeit für Na^+ -Ionen ($I_{\text{Na,B}}$) zur Umpolarisation des RP's bei (DiFrancesco, 1993). Die Phase-4-Membrandepolarisation geht direkt in die Phase 0 des AP's über und sorgt somit für die autorhythmische Erregungsbildung kardialer Schrittmacherzellen.

1.2 Kardiale Kaliumkanäle

1.2.1 Allgemeines

Kaliumkanäle sind ubiquitäre transmembranäre Proteine in nahezu allen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen (Jan & Jan, 1997). Diese heterogene Gruppe von Ionenkanälen übernimmt essentielle Aufgaben in erregbaren und unerregbaren Zellen, z. B. die Kontrolle des Kaliumstroms und Regulation des Zellvolumens, den epithelialen Elektrolyttransport, oder die Freisetzung von Hormonen und Neurotransmittern (Hille, 1992).

Die Bedeutung der Kaliumkanäle ergibt sich vor allem aus ihrer Beteiligung an pathophysiologischen Prozessen bei hereditären Anomalien ihrer Gen- und Proteinstrukturen. Zu diesen „Ionenkanalerkrankungen“ zählen z. B. zerebellare Ataxie, Epilepsie, Muskelsteifigkeit oder Arrhythmien (Ashcroft, 2000).

Bedingt durch die unterschiedliche Zellverteilung und Spezialisierung der einzelnen Kaliumkanalfamilien spielt ferner auch die pharmakologische Beeinflussung der K^+ -Kanäle bei der Entwicklung neuer, selektiver Therapieansätze eine wichtige Rolle (Shieh *et al.*, 2000).

1.2.2 Molekulare Struktur und Funktion

Mit der Klonierung der ersten Na^+ - und K^+ -Kanalgene beim Aal bzw. bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* konnte eine einheitliche Grundform der Ionenkanäle definiert werden (Noda *et al.*, 1984; Papazian *et al.*, 1987).

K^+ -Kanäle repräsentieren eine große, heterogene Familie transmembranärer, glykosylierter Proteine, deren einzelne AS-Domänen spezifische Funktionen besitzen. Die Fähigkeit zu einer schnell wechselnden Durchlässigkeit für Ionen (ca. 10^8 Ionen/s) beruht auf drei Kanalstrukturen:

1. Einer zentrale Pore
2. Einem selektiven Ionenfilter
3. Einem Kontrollmechanismus zwischen geöffnetem und geschlossenem Konformationszustand („gating structure“).

Man bezeichnet den porenformenden Teil der Proteine auch als „ α -Untereinheit“ (α -UE). Inzwischen sind im Laufe des „*Caenorhabditis elegans*-Genomprojekts“ ca. 80 verschiedene Gene dieser Untereinheiten identifiziert worden (Salkoff *et al.*, 1999). Die Zusammenlagerung mehrerer α -UE und der Einfluss von funktionell-assoziierten β -UE bedingen schließlich die große Heterogenität in der Familie der Kaliumkanäle.

1.2.3 Einteilung

K ⁺ - Unterfamilie	A -UE	Modulierende β -UE	Nativer Strom
6TDM-1P Kv-Familie	Kv4.2 (KCND2) + Kv4.3 (KCND3) + Kv1.4 (KCNA4)	Kv β 1-3 (KCNA1-3) + KChAP + KChIP	I _{to,1}
	HERG / erg1 (KCNH2)	MiRP (KCNE2) + [minK / I _{sK} (KCNE1)]	I _{Kr}
	KvLQT1 (KCNQ1)	minK / I _{sK} (KCNE1) + [MiRP (KCNE2)] + [KCNE3]	I _{Ks}
	Kv1.5 (KCNA5)	Kv β 1 (KCNA1) + Kv β 2 (KCNA2)	I _{Kur}
2TDM-1P Kir-Familie	Kir2.1 - Kir2.4 (KCNJ2, KCNJ12, KCNJ4, KCNJ14)		I _{K1}
	Kir3.1 (KCNJ3) + Kir3.4 (KCNJ5)		I _{K(Ach)}
	[Kir6.1 (KCNJ8)] Kir6.2 (KCNJ11)	SUR2A (ABCC9)	I _{K(ATP)}
4TDM-2P TWIK- Familie	TWIK-1 (KCNK1) TASK-1 (KCNK3) TREK-1 (KCNK2)		I _{Kp} ? ?

Tabelle 1.1: Einteilung der kardialen Kaliumkanäle nach der Struktur ihrer α -UE (xTDM-xP)
In eckigen Klammern sind vermutete, noch nicht vollständig aufgeklärte Kanal-UE dargestellt.

Man kann die K⁺-Kanäle unter verschiedenen (molekularen, physiologischen, pharmakologischen) Gesichtspunkten gruppieren. Die Tabelle 1.1 zeigt die strukturelle Klassifizierung gemäß der Topologie der porenformenden α -UE (Snyders, 1999).

Die K⁺-Kanäle unterscheiden sich in der Anzahl der transmembranären Segmente, Domänen (TDM) und in den Porenschleifen (P). Dabei spielen die folgenden drei Unterfamilien (6TDM-1P, 2TDM-1P, 4TDM-2P) bei der Repolarisation des kardialen AP's eine Rolle.

Als Nomenklatur hierfür dient sowohl das etablierte „Kv-System“ zur Abgrenzung der einzelnen K⁺-Kanalfamilien als auch das später eingeführte „KCN-System“ zur Gliederung der klonierten Gene (Chandy, 1991; White *et al.*, 1997).

1.2.3.1 6TDM-1P: spannungsabhängige (Kv-) Kanäle

Die erste Klonierung und Expression eines spannungsabhängigen, voltage-gated (Kv1)- Kaliumkanals erfolgte 1987 aus der Drosophila Mutante *Shaker* (Kamb *et al.*, 1987; Papazian *et al.*, 1987). Ausgehend davon wurden noch drei weitere, homologe Unterfamilien identifiziert: *Shab* (Kv2), *Shaw* (Kv3) und *Shal* (Kv4) (Butler *et al.*, 1989; Covarrubias *et al.*, 1991).

Die spannungsabhängigen Kanäle stellen zusammen mit der Familie der Delayed Rectifier, KCNQ und eag (siehe Kapitel 1.3) die weitaus größte Gruppe der K⁺-Kanäle, dar (Nerbonne, 2000). Sie werden alle bei der Depolarisation der Zelle aktiviert und tragen in unterschiedlichen Phasen zur kardialen Repolarisation bei (siehe auch Kapitel 1.1). Genetische Grundlage des schnell inaktivierenden I_{to,1}-Stroms der Phase 1 des AP's bilden dabei die α -UE Kv4.2/Kv4.3 und Kv1.4 (KCND2/KCND3- und KCND4-Gene). Den Delayed Rectifier-Kaliumströmen I_{Kr}/I_{Ks}/I_{Kur}, der Phasen 2 und 3, unterliegen KvLQT1 (KCNQ1), HERG (KCNH2) und Kv1.5 (KCNA5) (Shieh *et al.*, 2000).

Den molekularen Aufbau der Kv-Kanäle zeigt Abbildung 1.2, A. Das Protein (ca. 70 kDa) wird aus sechs transmembranären α -Helix-Segmenten (S1-S6), mit intrazellulären N- und C-Termini und einer hydrophoben, porenbildenden Schleife (P/H5) zwischen S5 und S6, gebildet (Kamb *et al.*, 1987).

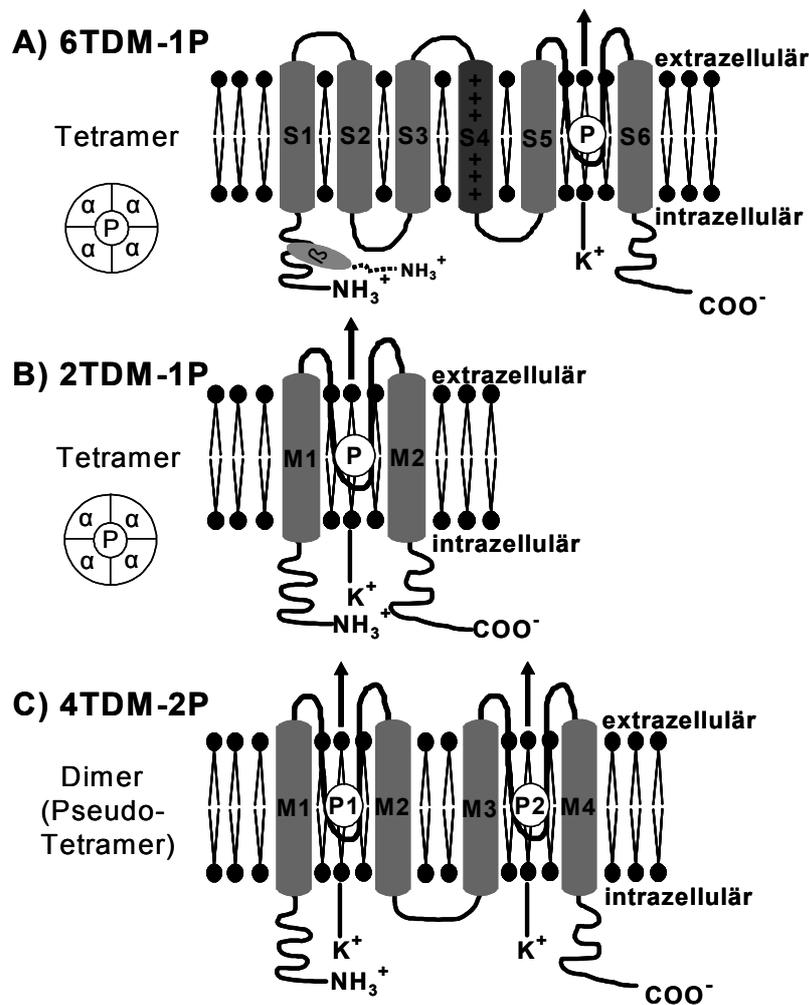


Abbildung 1.2: Molekulare Struktur der K⁺-Kanäl-α-Untereinheiten (verändert nach Shieh *et al.*, 2000)

A) spannungsabhängige Kv-Kanäle B) Inward Rectifier Kir-Kanäle
C) „Tandem“-Kanäle

Nahezu alle K⁺-selektiven Kanäle haben in der Porenregion ein gemeinsames Tripeptid-Sequenzmotiv (GYG, GFG, GIG) (Heginbotham *et al.*, 1994), welches die molekulare Basis des Selektivitätsfilters darstellt. Der Spannungssensor befindet sich im Segment S4. Es enthält vermehrt die positiv geladenen AS Lysin und Arginin (Papazian *et al.*, 1991). Vier dieser porenformenden α-UE bilden zusammen ein Tetramer, welches für die Funktionalität des Kanals notwendig ist (MacKinnon, 1991).

Die Eigenschaften der Kv-Kanäle werden zusätzlich durch assoziierte, nichtporenbildende β -UE geprägt. Beispielsweise verändern zytoplasmatische Kv β_1 -Kv β_4 -UE die Inaktivierungskinetik des $I_{to,1}$ -Ionenstroms (Rettig *et al.*, 1994). Neuere Analysen, z. B. der „Yeast-two-hybrid-assay“, beschreiben zwei weitere I_{to} -interagierende Proteine: KChAP und KChIP. Sie binden ähnlich wie die β -UE an den Kv-NH₂-Terminus der α -UE und beeinflussen ebenso die Stromdichte und Kinetik des $I_{to,1}$ im Herzen (Decher *et al.*, 2001; Wible *et al.*, 1998).

Die Familie der transmembranären, „minK“-verwandten Proteine (1TDM-0P) formen als β -UE die Delayed Rectifier Ströme I_{KS} (minK/KCNE1) und I_{Kr} (MiRP/KCNE2) (Abbott *et al.*, 1999; Barhanin *et al.*, 1996; Wible *et al.*, 1998). Aus dem Zusammenschluss von unterschiedlichen α -UE und assoziierten β -UE wird die große Vielfalt der nativen spannungsabhängigen Kaliumkanäle deutlich.

1.2.3.2 2TDM-1P: Inward Rectifier (Kir-) Kanäle

Eine zweite Gruppe von K⁺-Kanälen wird aus vier α -UE mit jeweils zwei transmembranären Segmenten M1 und M2 und einer Porenschleife (siehe Abbildung 1.2, B) gebildet.

Doyle *et al.* und Wible *et al.* konnten 1998 erstmals die kristalline Struktur eines 2-TDM-1P-Kanals in *Streptomyces lividans* (KcSA-K⁺-Kanal) aufklären. Sie ist homolog der S5-P-S6 Anordnung der Kv-*shaker*-Kanäle.

Die Kir-Kanäle besitzen keinen S4-Spannungssensor und sind deshalb bei allen Spannungen geöffnet. Sie zeigen aber eine so genannte Einwärts-Gleichrichtung („Inward Rectification“), dabei wird die Leitfähigkeit des K⁺-Ausstroms bei positiven Potentialen ($>E_K$ von ca. -95 mV) geringer wird.

Die Ursache ist eine Blockierung der Kanalpore durch zytoplasmatisches Mg²⁺ und Polyamine (Spermin, Spermidin) (Fakler *et al.*, 1995; Matsuda *et al.*, 1987). Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, tragen diese Kanäle zur kardialen Repolarisation und Erhaltung eines stabilen Ruhepotentials bei.

Innerhalb der Kir-Kanäle können drei Unterfamilien unterschieden werden. Der I_{K1} wird durch die Kir2.x-Proteinfamilie (KCNJx) gebildet. Im humanen Herzen ist bisher die Beteiligung der Kir2.1-Kir2.4-Familie an der Funktion des I_{K1} bekannt (Schram *et al.*, 2002a).

Der G-Protein-gekoppelte $I_{K(Ach)}$ im Atrium und Sinusknoten wird durch Vagus-Stimulation aktiviert und verändert dadurch die Herzfrequenz. Er setzt sich aus dem heteromeren Komplex der α -UE Kir3.1 und Kir3.4 (Krapivinsky *et al.*, 1995) zusammen.

Ein dritter Inward Rectifier Kaliumstrom, der $I_{K(ATP)}$, ist vom metabolischen Zustand der Zelle abhängig und spielt als physiologischer Schutz des Herzens während ischämischen und arrhythmischen Zuständen eine wichtige Rolle (Noma, 1983). In der pankreatischen β -Zelle kontrollieren $I_{K(ATP)}$ -Kanäle die Insulinfreisetzung (Ashcroft, 1988). Dieser durch ATP-inhibierbare Kanal wird von Kir6.1 und Kir6.2 kodiert. Ähnlich wie bei vielen Kv-Kanälen setzt sich der native $I_{K(ATP)}$ -Kanal aus einer porenformenden α -UE und einer regulatorischen β -UE zusammen. Der periphere Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR1/2), ein Vertreter der „ABC“- (ATP-Binding-Cassette) Protein-Superfamilie, bildet als β -UE mit vier α -UE eine oktamerische Struktur (Clement *et al.*, 1997; Inagaki *et al.*, 1995).

1.2.3.3 4TDM-2P: Tandem (TWIK)-Kanäle

Die TWIK-Kanäle wurden früher als kaum relevante Hintergrund- oder „leak“-Ströme betrachtet, inzwischen hat jedoch ein Vertreter dieser Gruppe Bedeutung für die kardiale Repolarisation erlangt:

Der Plateaustrom I_{Kp} ist ein zeitunabhängiger, schwach einwärts-gleichrichtender Strom, dessen molekulare Proteinstruktur (TWIK-1) im Meerschweinchen erstmals identifiziert wurde (Lesage *et al.*, 1996; Yue & Marban, 1988). Der Twin-Pore-K⁺-Kanal besitzt vier transmembranäre Segmente mit zwei Porenregionen. Es sind zwei Kir α -UE als eine Art „Tandem“ miteinander verbunden (siehe Abbildung 1.2, C).

Weitere K⁺-Kanalgene dieser Familie, z.B. TASK, TREK und TALK, wurden in den letzten Jahren aus neuronalen und kardialen Geweben unterschiedlicher Spezies kloniert (Lesage & Lazdunski, 2000).

1.3 Der Delayed Rectifier-Kaliumstrom I_K

1.3.1 Allgemeines

Das wichtigste Merkmal eines kardialen Aktionspotentials ist die lang anhaltende Plateauphase über mehrere Hundert Millisekunden (Phase 2, siehe Kapitel 1.1.3). Hauptverantwortlich hierfür sind die Delayed Rectifier-Ionenströme, I_K .

Der Begriff des „verzögerten Gleichrichter“- oder Delayed Rectifier-Kaliumstroms wurde schon Anfang der fünfziger Jahre nach Versuchen an Axonen von Hodgkin und Huxley geprägt. Im Gegensatz zu den schnell aktivierenden Na^+ - und Ca^{2+} -Kanälen zeigen die Delayed Rectifier nach einer Depolarisation eine verzögerte Öffnungswahrscheinlichkeit und fast keine Inaktivierung. Die Auswärts-Gleichrichtung entsteht durch die Öffnung der Kanäle bei Potentialen positiver als -50 mV (Hodgkin & Huxley, 1952).

1969 untersuchten Noble und Tsien erstmals mit der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemme einen kardialen Delayed Rectifier („ I_x “) in Purkinjefasern des Schafes (Noble & Tsien, 1969).

Der I_K -Strom besteht aus drei Komponenten, die aufgrund ihrer biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften unterschieden werden können (Roden *et al.*, 2002). Sanguinetti und Jurkiewicz beschrieben 1990 bzw. 1991 einen schnell aktivierenden (rapid) I_{Kr} - und einen langsam aktivierenden (slow) I_{Ks} -Kaliumstrom. Diese beiden Hauptkomponenten konnten inzwischen bei unterschiedlichen Säugetierspezies, z. B. beim Menschen, Hund, Meerschweinchen und Kaninchen, nachgewiesen werden (Apkon & Nerbonne, 1991; Li *et al.*, 1996; Liu & Antzelevitch, 1995; Salata *et al.*, 1996). Die Auftrennung der Stromkomponenten erfolgte dabei durch spezifische Spannungsprotokolle oder durch Inhibitoren von I_{Kr} (z. B. D-Sotalol, E-4031) bzw. von I_{Ks} (z. B. Thiopentan, Propofol) (Chinn, 1993; Heath & Terrar, 1996; Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990).

Ein dritter, sehr schnell aktivierender und kaum inaktivierender Delayed Rectifier, der I_{Kur} (ultra-rapid) bzw. I_{sus} (sustained), ist in atrialem Gewebe der Ratte, des Hundes und des Menschen vorhanden (Nattel *et al.*, 1999).

Im Meerschweinchen wurde dieser Strom hingegen nicht nachgewiesen, allerdings könnte der Plateaustrom I_{Kp} (siehe Kapitel 1.2.3.3) aufgrund seines „ I_{Kur} -ähnlichen“ Spannungsverlaufes und seiner Ba^{2+} -Abhängigkeit als dritte Komponente des I_K im Meerschweinchenherzen angesehen werden (Lesage *et al.*, 1996; Yue & Marban, 1988).

Eine selektive Inhibition des atrialen I_{Kur} -Stroms und somit eine Verlängerung des AP's und der Refraktärzeit wird als neuartiges Konzept in der Therapie von Arrhythmien, v. a. Vorhofflimmern, angesehen (Courtemanche *et al.*, 1999). Die Entwicklung von vorhofspezifischen, I_{Kur} -selektiven Blockern steht jedoch noch am Anfang (Bachmann *et al.*, 2001). Der Vorteil gegenüber anderen Vertretern der Klasse-III-Antiarrhythmika besteht im Ausbleiben von ventrikulären, proarrhythmischen Effekten (Hohnloser, 1997).

In den nun folgenden Abschnitten dieser Arbeit sollen die beiden ventrikulären Komponenten des I_K -Stroms, I_{Kr} und I_{Ks} , näher vorgestellt werden.

1.3.2 Die schnell aktivierende Komponente des Delayed Rectifiers I_{Kr}

1.3.2.1 Physiologische Rolle

Der I_{Kr} -Kaliumstrom wurde zuerst im Meerschweinchenventrikel elektrophysiologisch identifiziert (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990). Er trägt auch bei zahlreichen anderen Spezies wesentlich zur Phase 2 und Phase 3 des AP's bei (siehe Kapitel 1.1.3 und 1.1.4).

Wie in Abbildung 1.3 veranschaulicht, werden I_{Kr} -Kaliumströme durch Depolarisation der Zelle aktiviert und erreichen eine maximale Amplitude bei Spannungen von 0 mV bis +10 mV. Bei positiven Potentialen setzt ein schneller Inaktivierungsprozess des I_{Kr} ein, der einen schwächeren K^+ -Auswärtsstrom zur Folge hat (Einwärts-Gleichrichter) (Smith *et al.*, 1996). Diese geringere Leitfähigkeit trägt zur Aufrechterhaltung der lang anhaltenden Plateauphase des AP's bei (Hancox *et al.*, 1998).

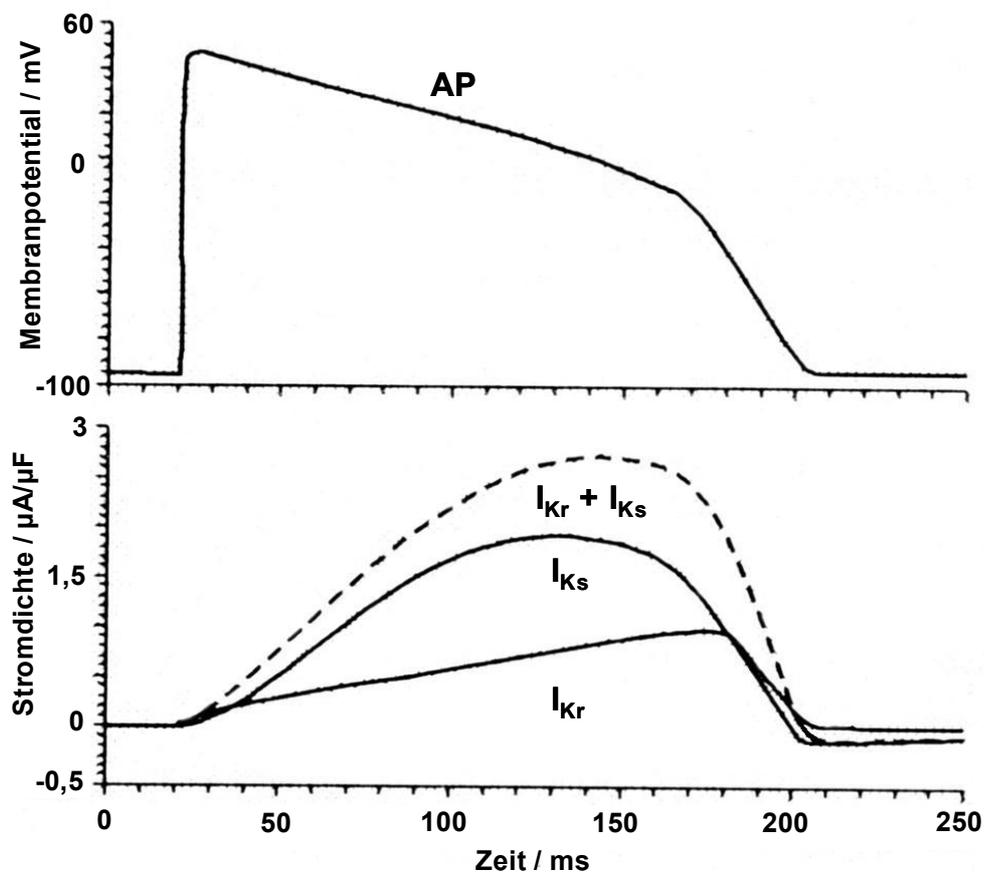


Abbildung 1.3: Theoretisches Modell des Verlaufs der Aktivierung der I_K -Ströme während des kardialen Aktionspotentials (verändert nach Zeng *et al.*, 1995)

Der I_{Kr} -Strom steigt während der Phase-2-Repolarisation an und erreicht sein Maximum bei ca. 0 mV. Der I_{Ks} -Strom zeigt höhere Stromdichten und befindet sich während der gesamten Plateauphase des AP's (> 0 mV) in einem maximalen Gleichgewichtszustand.

Ein entscheidender Faktor für die Morphologie der AP im Säugetierherz ist die spezifische, regionale Verteilungsdichte der Ionenströme. Eine derartige Heterogenität ist auch für I_{Kr} zutreffend, z. B. ist die I_{Kr} -Stromdichte im Meerschweinchen in atrialen Myozyten zweifach höher als in ventrikulären Herzmuskelzellen (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1991). Im humanen Herzen ist hingegen der umgekehrte Fall beschrieben (Pond *et al.*, 2000).

Zudem sind Unterschiede innerhalb der einzelnen Muskelschichten vorhanden. So ist z. B. ein höherer I_{Kr} -Strom in subendokardialen Myozyten des Meerschweinchens zu beobachten. Dies erklärt die unterschiedliche Länge und Form der AP in den einzelnen Herzregionen (Main *et al.*, 1998).

1.3.2.2 Molekulare Struktur

HERG („human ether-a-go-go“) ist die porenformende α -UE des nativen I_{Kr} -Kaliumstroms. In Northern-Blot-Analysen konnte hauptsächlich eine Verteilung im Herzen und im Hippokampus nachgewiesen werden (Curran *et al.*, 1995; Warmke & Ganetzky, 1994). HERG, auch als „erg1“ (KCNH2) bezeichnet, ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert und gehört zur Familie der eag („Drosophila ether-a-go-go“)-Kanäle, einer Untergruppe der spannungsabhängigen Kv-Kanäle (Warmke *et al.*, 1991). Obwohl nur eine AS-Übereinstimmung von 10-15 % besteht, hat HERG die gleiche tetramere 6TDM-1P-Membranstruktur wie die *shaker*-verwandten Kv-Kanäle (Warmke *et al.*, 1991). Inzwischen wurden auch kardiale Isoformen (Splice-Varianten in N- bzw. C-Termini) im Menschen- und Mäuseherzen kloniert (Kupershmidt *et al.*, 1998; Lees-Miller *et al.*, 1997).

Eine heterologe Expression der cDNA von HERG in *Xenopus laevis*-Oozyten oder in einer HEK-293 Zelllinie führt zu einem K^+ -Strom, der dem nativen, kardialen I_{Kr} sehr ähnelt (Sanguinetti *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998). Vergleichbar mit anderen Kv-Kanälen, z. B. Kv4.3, spielen aber auch modulatorische β -UE eine wichtige Rolle in den biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften von I_{Kr} .

Als gesichert gelten die Interaktionen mit den so genannten *mink*-verwandten Peptiden: MiRP1 und MiRP2 (KCNE2 und KCNE3) und mit der I_{KS} -formenden β -UE minK (KCNE1) (Abbott *et al.*, 1999; Anantharam *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 1997).

Genetische Mutationen in HERG oder minK bzw. MiRP verursachen das „Lange QT-Syndrom“ (LQTS-2, LQTS-5 und LQTS-6) (Chiang & Roden, 2000). Dabei handelt es sich um eine gestörte ventrikuläre Repolarisation, die lebensbedrohliche Arrhythmien zur Folge haben kann (siehe Kapitel 1.3.5.1).

1.3.2.3 Biophysikalische Eigenschaften

Ein charakteristisches Merkmal von I_{Kr} sind die Inward Rectifier Eigenschaften, d. h. die Verringerung der K^+ -Leitfähigkeit des Kanals bei positiven Potentialen. Grund dafür ist die schnelle Inaktivierung des offenen Kanals bei Depolarisation.

Die größeren Auswärtsströme (= Tail-Ströme) bei negativen Spannungen resultieren aus einer schnellen Beendigung dieser Inaktivierung und langsameren Deaktivierung des Kanals in den geschlossenen Zustand (Smith *et al.*, 1996).

Ein weiterer Unterschied zu „klassischen“ Kv-Kanälen ist die paradoxe Erhöhung des I_{Kr} -Auswärtsstroms bei einem Anstieg der extrazellulären K^+ -Konzentration. Bei erhöhtem $[K^+]_{out}$ verlangsamt sich die Inaktivierung und die Einwärts-Gleichrichtung nimmt ab. Zudem erhöht sich die Einzelkanalleitfähigkeit, die im Grundzustand relativ niedrig ist (10-13 pS) (Yang *et al.*, 1997).

1.3.2.4 I_{Kr} -Blocker

Abbildung 1.4 zeigt einige typische Inhibitoren des I_{Kr} -Kaliumstroms ausgehend von der Methansulfoanilid-Struktur (Shieh *et al.*, 2000). Sie stellen, zusammen mit den I_{Ks} - und I_{Kur} -Blockern, neue Vertreter der Klasse-III-Antiarrhythmika dar (Sager, 2000).

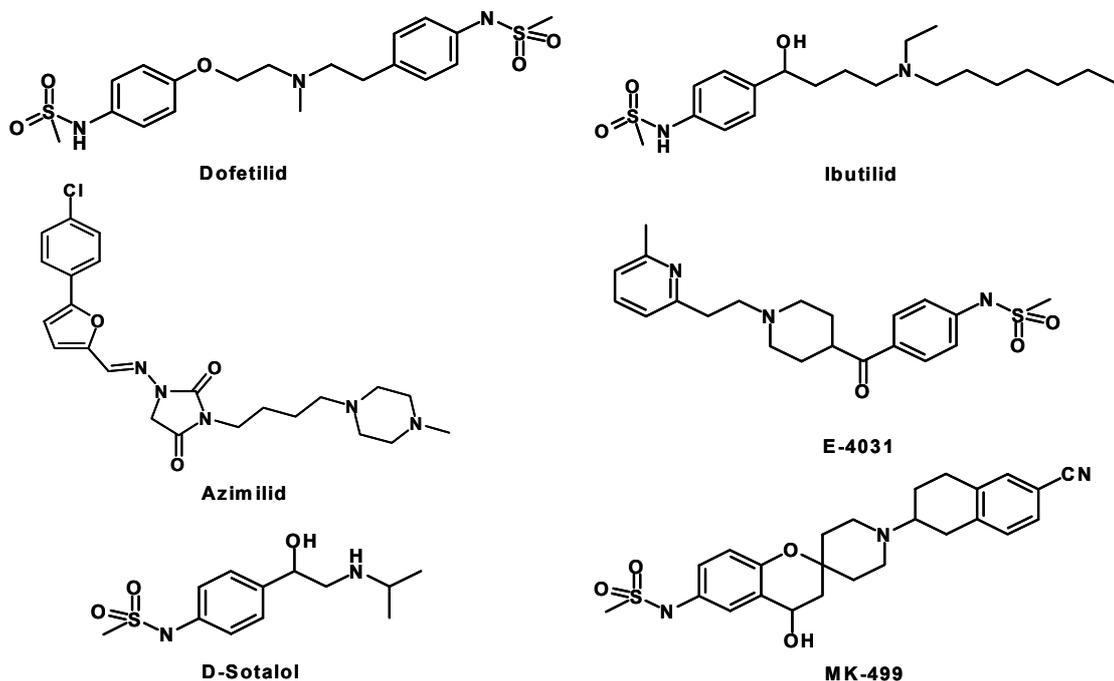


Abbildung 1.4: I_{Kr} / HERG-Blocker

Grundstruktur (mit den Ausnahmen D-Sotalol und Azimilid) ist ein Methansulfoanilid-Gerüst.

Unselektive Inhibitoren: Azimilid, Ibutilid und D-Sotalol

Selektive Inhibitoren: Dofetilid, E-4031 und MK-499

Durch selektive Blockade von I_{Kr} wird die APD und somit die absolute Refraktärzeit in Atrium und Ventrikel verlängert, ohne Leitungsverzögerungen oder weitere pharmakologische Wirkungen zu verursachen.

Nachteil dieser Substanzen ist eine inverse Frequenzabhängigkeit („reverse rate-dependence“) ihrer AP-verlängerung, d. h. bei zunehmender Herzfrequenz und erhöhtem β -adrenergen Tonus nimmt die Wirkung der I_{Kr} -Inhibition und somit der antiarrhythmische Effekt ab. Die exzessive Verlängerung des AP's unter Bradykardie kann auch von proarrhythmischen Effekten, z. B. frühe Nachdepolarisationen und Torsade de pointes-Tachykardien, begleitet sein (Nattel & Singh, 1999). Diese negativen Aspekte waren in den Ergebnissen grosser klinischer Studien, wie z. B. der SWORD-Studie (D-Sotalol) und der DIAMOND-Studie (Dofetilid) deutlich sichtbar (Torp-Pedersen *et al.*, 1999; Waldo *et al.*, 1996).

1.3.3 Die langsam aktivierende Komponente des Delayed Rectifiers I_{Ks}

1.3.3.1 Physiologische Rolle

I_{Ks} ist ein sehr langsam aktivierender Kaliumstrom der Phase-2-Repolarisation. Die Leitfähigkeit des Kanals steigt bei Membrandepolarisation auf Potentiale über -30 mV verzögert an und bleibt während der gesamten Plateauphase in einem Gleichgewichtszustand (Steady-State). Die Größe des resultierenden I_{Ks} -Stroms ist im Vergleich zu der schnellen Komponente des Delayed Rectifiers, I_{Kr} , fünf- bis zehnfach höher (Gintant, 1996; Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990). Physiologisch bedeutsam wird der I_{Ks} besonders bei Steigerung der Herzfrequenz, z. B. bei Aktivierung des sympathischen Nervensystems. Wegen einer langsamen und unvollständigen Kanaldeaktivierung bleiben die KvLQT1/minK-Kanäle bei hohen Frequenzen akkumulativ geöffnet und lösen einen verstärkten I_{Ks} -Ionenstrom aus. Dieser Vorgang wird noch durch die β -adrenerge Stimulation des I_{Ks} -Stroms über den cAMP-abhängigen Proteinkinase A-Signaltransduktionsweg verstärkt (Jurkiewicz & Sanguinetti, 1993).

Ähnlich wie bei I_{Kr} ist die Expression des langsam aktivierenden Delayed Rectifier-Kanals ebenfalls einer regionalen Heterogenität unterworfen. Dies ist der Grund für die unterschiedlichen AP-Konfigurationen entlang der Muskelschichten des Ventrikels. Liu und Antzelevitch beschrieben beispielsweise ein sehr verlängertes AP in so genannten „M-Zellen“ des Hundeventrikels. In diesem Bereich (mittleres Myokard) konnte nur ein sehr schwacher I_{Ks} -Strom nachgewiesen werden (Liu & Antzelevitch, 1995).

Beim Meerschweinchen sind die Stromdichten des I_{Ks} in endokardialen Ventrikelschichten verringert (Bryant *et al.*, 1998). Diese besondere Spezies- und Gewebecharakteristik der I_K -Kaliumströme erklärt auch die unterschiedliche Spezifität und Effektivität der Klasse-III-Antiarrhythmika (Lu *et al.*, 2001).

I_{Ks} spielt ferner eine Rolle im Kaliumhaushalt des Innenohrs und in der Aktivierung einer cAMP-gesteuerten Chloridsekretion im Kolon (Robbins, 2001).

1.3.3.2 Molekulare Struktur

Der funktionelle Kanal ist aus dem Komplex der α -UE: KvLQT1 (KCNQ1) und der modulierenden β -UE: minK/ I_{sK} (KCNE1) zusammengesetzt (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996). Die Interaktion und Stöchiometrie dieser Einheit ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Yeast-two-hybrid- und affinitätschromatographische Analysen dokumentierten, dass das C-terminale Ende der minK-Einheit direkt mit der Porenregion von KvLQT1 assoziiert ist (siehe Abbildung 1.5) und dadurch die Leitfähigkeit, Ionenselektivität, Kinetik und Pharmakologie von I_{Ks} beeinflusst wird (Busch & Suessbrich, 1997; Romey *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998). Jede der vier spannungsabhängigen, porenformenden α -UE, KvLQT1, könnte dabei ein minK-Protein binden (Barhanin *et al.*, 1999).

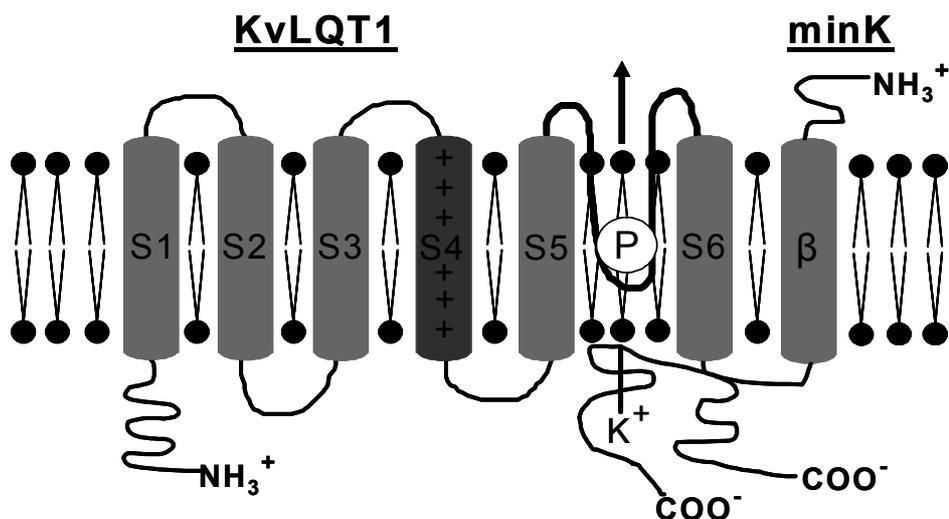


Abbildung 1.5: Molekulare Struktur des I_{Ks} -Kanals (verändert nach Barhanin et al., 1999)

Das C-terminale Ende der β -UE, minK, ragt in die Porenregion (S5-S6) der α -UE, KvLQT1, hinein.

Neben der KCNQ1/KCNE1-Fusion beschreiben jüngste Veröffentlichungen auch eine mögliche Interaktion von MiRP1 (KCNE2) und MiRP2 (KCNE3) mit KCNQ1-Kanälen (Schröder et al., 2000; Tinel et al., 2000).

a) Die α -UE KvLQT1

Im Laufe einer Untersuchung von Patienten mit angeborenem „Langen QT-Syndrom“ entdeckten 1996 Wang et al. durch Positionsklonierung erstmals das KvLQT1 (KCNQ1)-Gen auf Chromosom 11. KCNQ1 ist ein Vertreter der spannungsabhängigen, *shaker*-verwandten Kv-Kanäle mit einer ähnlichen Membranstruktur: sechs Transmembransegmente (S1-S6), eine typische S4-Domäne, eine S5 und S6 verbindende Porenschleife und intrazellulär lokalisierte N- und C-Termini. KCNQ1 induziert nach heterologer Expression einen kleinen, schnell aktivierenden und schwach inaktivierenden Kaliumstrom (Sanguinetti et al., 1996).

Inzwischen sind vier weitere KCNQ-Kanäle kloniert worden, wobei KCNQ1 beim Menschen bisher in folgenden Geweben identifiziert wurde: Herz, Pankreas, Niere, Lunge, Uterus und Innenohr (Nachweis der m-RNA im Northern-Blot) (Chouabe et al., 1997). KCNQ2-KCNQ5 stellen neuronale Kanäle dar (Jentsch, 2000).

Interessanterweise kann KCNQ1 als einzige KCNQ-Kanaluntereinheit mit anderen Mitgliedern der KCNQ-Familie keine Heteromeren bilden (Robbins, 2001).

Gemäß der Bezeichnung „KvLQT1“ ist eine Mutation dieses Gens Ursache des LQT1-Syndroms (Wang *et al.*, 1996).

Die Bedeutung von N-terminalen Splice-Varianten des KCNQ1-Gens in der funktionellen Expression von I_{Ks} ist bislang unklar (Pereon *et al.*, 2000).

b) Die β -UE minK/ I_{sK}

MinK gehört zur Familie der KCNE-Proteine, deren physiologische Bedeutung nur teilweise bekannt ist (Melman *et al.*, 2001). Das Gen wurde erstmals 1988 und 1990 aus der Niere bzw. aus dem Herzen der Ratte kloniert und kodiert ein kleines transmembranäres Polypeptidsegment (1TDM-0P) mit 123 bis 130 AS (Folander *et al.*, 1990; Takumi *et al.*, 1988).

Das KCNE1-Protein beim Meerschweinchen besteht aus 125 AS und ist der humanen Variante zu ca. 78 Prozent identisch (Zhang *et al.*, 1994).

Zunächst wurde das I_{sK} -Protein als ein eigenständiger, „kleiner“ Kaliumkanal angesehen (minK = minimaler K^+ -Kanal), da die Expression der cRNA von I_{sK} in Oozyten einen sehr langsam aktivierenden Strom induzierte (Hausdorff *et al.*, 1991; Takumi *et al.*, 1988). Dieser Strom konnte jedoch in eukaryotischen Expressionssystemen (z. B. CHO-, COS- oder HEK 293-Zellen) nicht nachgewiesen werden.

1996 wurde dann der Beweis einer KCNQ1/KCNE1-Interaktion erbracht. KCNQ1 ist auch endogen in *Xenopus laevis*-Oozyten vorhanden und formt diesen Komplex nach Injektion von KCNE1 (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996).

KCNE1 moduliert die α -UE KCNQ1 in ihrer Stromgröße und -kinetik. Es resultiert ein Strom mit einer höheren Aktivierungsschwelle von ca. -20 mV und fehlender Inaktivierung. I_{Ks} hat dadurch bei positiven Potentialen über einige Sekunden eine hohe, konstante Stromamplitude (Sanguinetti *et al.*, 1996; Tristani-Firouzi & Sanguinetti, 1998). Im Gegensatz zu anderen $Kv\beta$ -UE entsteht diese Stromveränderung durch direkte Beeinflussung der Porenregion der α -UE (Romey *et al.*, 1997).

KCNE1 spielt auch in der Pharmakologie von I_{Ks} eine wichtige Rolle, indem die Sensitivität des nativen I_{Ks} gegenüber Inhibitoren und Aktivatoren stark erhöht wird (Busch *et al.*, 1997).

Mutationen des humanen KCNE1-Gens auf Chromosom 21 können das angeborene LQT-Syndrom hervorrufen (siehe Kapitel 1.3.5.1).

1.3.3.3 Biophysikalische Eigenschaften

KvLQT1/minK ist ein „untypischer“ spannungsabhängiger Kv-Ionenkanal. Die Aktivierungszeitkonstanten des Delayed Rectifiers können einige Sekunden betragen und sind somit fast tausendfach höher als die der klassischen Kv-Familie. Weitere Unterschiede sind die fehlende Inaktivierung und die langsame Deaktivierung von ca. einer Sekunde bei -80 mV (Mitcheson & Sanguinetti, 1999). Das späte Schließen des Kanals bewirkt eine Akkumulation und Erhöhung des I_{Ks} -Stroms bei höheren Frequenzen (Jurkiewicz & Sanguinetti, 1993).

In Abbildung 1.6 ist eine typische Aufzeichnung des Kaliumstroms durch den in CHO-Zellen exprimierten KvLQT1/minK-Kanal dargestellt.

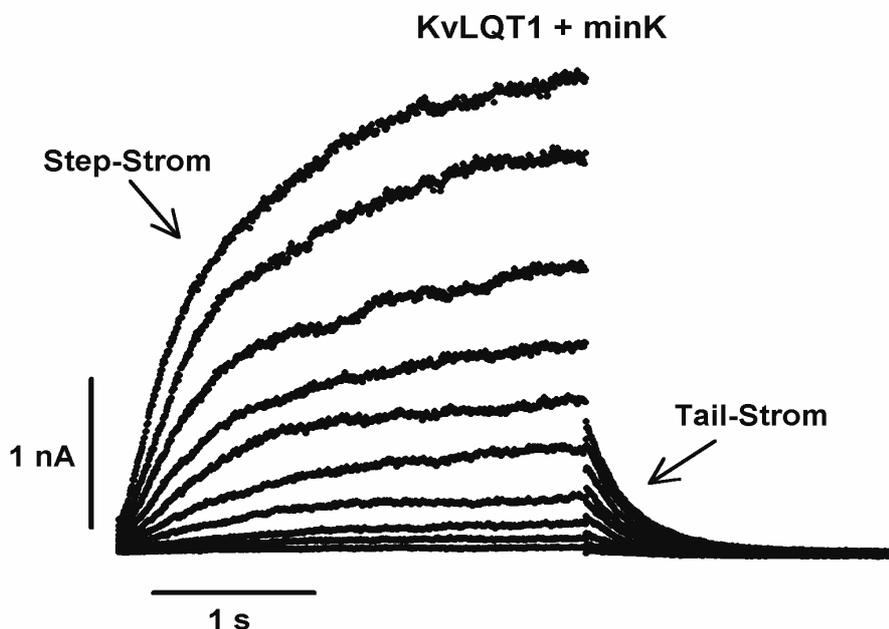


Abbildung 1.6: Typische Aufzeichnung des I_{Ks} -Kaliumstroms in CHO-Zellen nach Transfektion mit den beiden Untereinheiten KvLQT1 und minK.

Dargestellt sind aktivierende „Schritt-Ströme“ (= Step-Ströme) und deaktivierende „Schwanz-Ströme“ (= Tail-Ströme), hervorgerufen durch 3 s lange Spannungssprünge auf Potentiale von -20 mV bis +70 mV und eine nachfolgende Repolarisationsphase auf -40 mV für 2 s, ausgehend von einem Haltepotential von -50 mV.

Charakteristisch für den I_{Ks} -Kaliumstrom ist auch seine Regulation durch Ca^{2+} - und Temperaturunterschiede. Bei Erhöhung der Ca^{2+} -Pufferung, z. B. durch EGTA oder bei Erniedrigung der Messtemperatur von ca. 36 °C auf ca. 21 °C (RT), verlangsamt sich die Kanalaktivierung drastisch und die Stromamplitude von I_{Ks} sinkt (Busch & Maylie, 1994).

Die Einzelkanalleitfähigkeit der KvLQT1/minK-Kanäle ist sehr gering (<5 pS) (Yang & Sigworth, 1998).

1.3.3.4 I_{Ks} -Blocker

Verschiedene unspezifische Antiarrhythmika, z. B. Clofilium, Quinidin, Amiodaron oder Azimilid, üben einen Teil ihrer Wirkung durch Hemmung des I_{Ks} -Stroms aus (Nattel & Singh, 1999).

Um die in Kapitel 1.3.2.4 beschriebenen Nachteile der I_{Kr} -Blocker zu vermeiden, wurden in den letzten Jahren verstärkt Substanzen entwickelt, die selektiv die langsam aktivierende I_K -Stromkomponente hemmen (Gerlach *et al.*, 2001). Somit kann gerade bei erhöhter Herzfrequenz (Akkumulation des I_{Ks} -Stroms) eine effektive AP-verlängerung und Terminierung von tachykarden Herzrhythmusstörungen erreicht werden.

Derivate der Benzodiazepine, Chromanole und Benzamide (siehe Abb. 1.7) zeigten bei unterschiedlichen Spezies eine potente Inhibierung des I_{Ks} -Stroms (Bosch *et al.*, 1998; Gögelein *et al.*, 2000; Lloyd *et al.*, 2001; Selnick *et al.*, 1997).

Proarrhythmische Ereignisse traten mit diesen Substanzen signifikant seltener auf und waren zumeist Ergebnis eines Defekts der I_{Ks} -kodierenden Gene (LQT-Syndrom) (Chiang & Roden, 2000) oder einer gleichzeitigen, starken β -adrenergen Stimulation (Burashnikov & Antzelevitch, 2000). Eine kombinierte Hemmung des I_{Ks} -Stroms und β_1 -adrenergen Rezeptoren wurde kürzlich als neue pharmakologische Strategie bei ventrikulären Arrhythmien postuliert (Lynch, Jr. *et al.*, 2002).

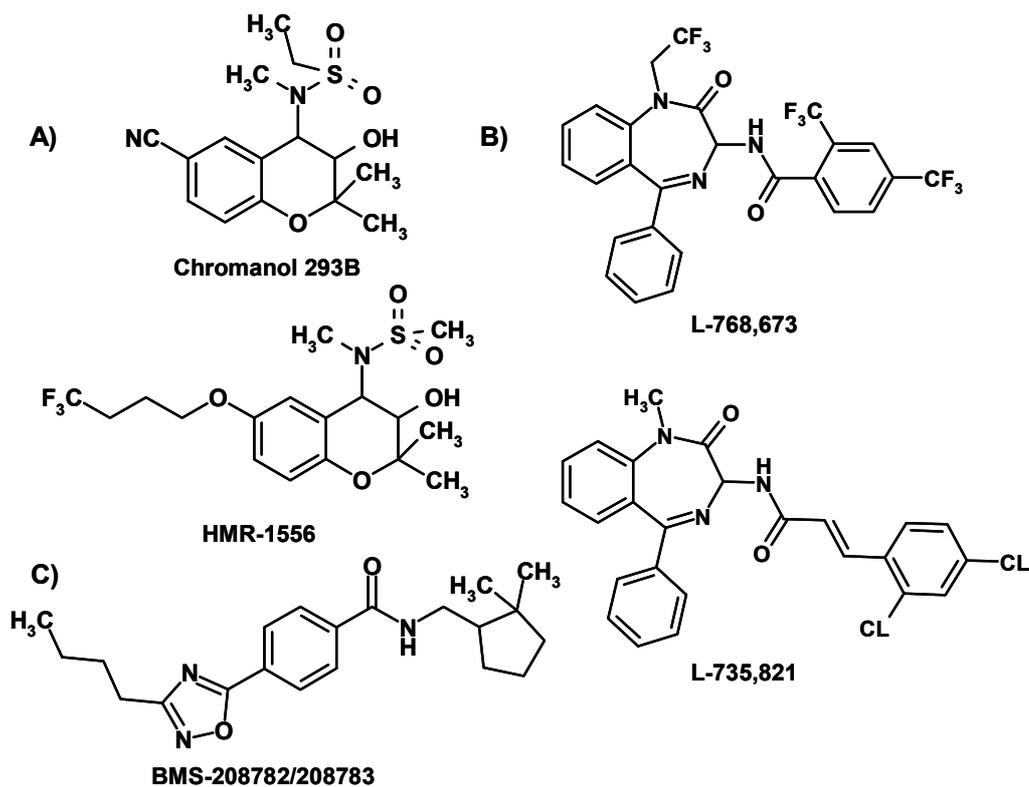


Abbildung 1.7: I_{Ks} / KCNQ1-Blocker
Chemische Strukturen: A) Chromanol B) Benzodiazepin C) Benzamidin

1.3.4 Neurohormonale Modulation von I_K -Strömen

Das neuroendokrine System spielt eine wichtige Rolle in der elektrischen und mechanischen Aktivität des Herzens. Veränderungen der Herzfrequenz äußern sich in Unterschieden der Ionenstromdichten und somit in der AP-Dauer (Kass & Wiegers, 1982). Alle drei Komponenten des Delayed Rectifier- K^+ -Kanals unterliegen diesem adrenergen oder cholinergen Einfluss und möglicherweise auch einer Regulation durch weitere Second Messenger.

1.3.4.1 I_{Kur}

Der I_{Kur} wird auf unterschiedliche Weise durch das adrenerge System beeinflusst. In atrialen Zellen von Mensch, Hund und Ratte konnte nach β -adrenerger Aktivierung eine ca. 40%ige Stromerhöhung festgestellt werden. Eine Stimulation der α -Adrenorezeptoren führte hingegen zu einer Stromverringern (Nattel *et al.*, 1999).

Versuche am Kv1.5-Kanal in *Xenopus*-Oozyten ergaben eine Stromerhöhung durch Aktivierung der endogenen Proteinkinase A (PKA) oder Protein-Tyrosinkinase (PTK) (Mason *et al.*, 2002).

1.3.4.2 I_{Kr}

Über die adrenerge Stimulation des I_{Kr} in nativem Gewebe ist bislang nur wenig bekannt. 1991 konnten Sanguinetti *et al.* keinen Effekt von Isoproterenol an den I_{Kr} -Stromamplituden in kardialen Meerschweinchenmyozyten nachweisen, während Karle *et al.* in neuesten Versuchen eine β_1 -Rezeptor-vermittelte Inhibierung des I_{Kr} in dieser Spezies beobachteten (Karle *et al.*, 2002). Versuche an Oozyten und Säugetierzelllinien ergaben eine komplexe, adrenerge Modulation des klonierten HERG-Kanals. Dabei wirkte sich eine β -adrenerge Aktivierung sowohl steigernd über direkte cAMP Bindung, als auch hemmend über PKA-Phosphorylierung auf HERG aus. Bei Koexpression von HERG und den β -UE MiRP oder mink überwog die cAMP-Stimulation (Cui *et al.*, 2000).

Ähnlich wie bei den Kv1.5-Kanälen, führte eine Tyrosinphosphorylierung des erg1-Kanals der Ratte zu einer Erhöhung des Kaliumstroms (Cayabyab & Schlichter, 2002).

1.3.4.3 I_{Ks}

Die langsame Komponente des Delayed Rectifiers, I_{Ks} , unterliegt der stärksten Modulation über Hormone, Neurotransmitter oder Second Messenger (Suessbrich & Busch, 1999):

- Eine Stimulation der β -adrenergen Signalkaskade führt zu einem temperaturabhängigen, vier- bis sechsfachen Anstieg der I_{Ks} -Stromdichten in Kardiomyozyten. So steigern z. B. folgende Substanzen I_{Ks} im Ventrikel des Meerschweinchens: Isoprenalin (β -Agonist), 8-Br-cAMP (cAMP-Analogon), Forskolin (AC-Aktivator) (Walsh *et al.*, 1988; Yazawa & Kameyama, 1990). Diese β -Adrenorezeptor-Aktivierung hat eine Phosphorylierung des KCNQ1/KCNE1-Komplexes zur Folge, an dem auch so genannte „PKA-Ankerproteine“ (AKAP's) beteiligt sind (Potet *et al.*, 2001).

Marx *et al.* identifizierten kürzlich einen „makromolekularen Signalkomplex“ mit der Bindung von PKA und Proteinphosphatase 1 an der KCNQ1- α -UE über das AKAP-Protein „yotiao“ (Marx *et al.*, 2002).

Die Frage, welcher β -Rezeptorsubtyp in der adrenergen Stimulation des I_{Ks} beteiligt ist, bleibt bislang unbeantwortet. Kathöfer *et al.* beschrieben eine Erhöhung des KvLQT1/minK-Stroms nach Koexpression der beiden humanen Kanalproteinen mit dem β_3 -AR in Oozyten (Kathöfer *et al.*, 2000). In einer neueren Studie an kultivierten Kardiomyozyten konnte allerdings ein β_1 -AR-cAMP-vermittelter Effekt gezeigt werden. Längere β_1 -adrenerge Stimulation (48 h) durch Isoproterenol führte dabei zu einer allmählichen I_{Ks} -Stromverringerng (Zhang *et al.*, 2002). Außerdem konnten in einem Herzinsuffizienzmodell (Desensitivierung des β_1 -AR's) reduzierte I_{Ks} - Stromdichten im Vorhof beobachtet werden (Li *et al.*, 2000a).

- Die PKC moduliert ebenfalls den I_{Ks} -Kanal. Verantwortlich dafür ist eine Phosphorylierungsstelle in der KCNE1- β -UE (N102) (Varnum *et al.*, 1993). Im Gegensatz zur Maus und Ratte wird der I_{Ks} in Meerschweinchen-Herzmuskelzellen durch den α -adrenergen PKC-Signalweg aktiviert (Walsh & Kass, 1988).
- Ferner hat neben den Proteinkinasen A und C die cGMP-aktivierte PKG eine Bedeutung in der Regulation von I_{Ks} . In Zellen des Meerschweinchen-Sinusknotens konnte gezeigt werden, dass sowohl eine direkte cGMP-Stimulation (Dialyse der Zelle mit 8-Br-cGMP) als auch ein cGMP-Agonist (ANP) eine 50-100%ige Erhöhung der I_{Ks} -Stromdichten verursacht (Shimizu *et al.*, 2002).
- Eine Stimulation der muskarinischen M_2 -Rezeptoren durch Acetylcholin oder Carbachol hat einen geringen Einfluss auf die basale I_{Ks} -Aktivität. Es wird dem cholinergen System jedoch ein antagonistischer Effekt nach vorausgegangener β -adrenerger I_{Ks} -Stromerhöhung zugesprochen (Yazawa & Kameyama, 1990).

In CHO-Zellen wurde kürzlich eine Stromerniedrigung von KCNQ1-KCNQ4-Kanälen durch Aktivierung cholinerg, $G_{i/o}$ -Protein-gekoppelter M_1 -Rezeptoren nachgewiesen (Selyanko *et al.*, 2000).

- Die I_{Ks} -hemmenden Eigenschaften des Peptidhormons Endothelin-1 wurden in Kardiomyozyten des Meerschweinchens ebenfalls über ein Pertussistoxin-sensitives $G_{i/o}$ -Protein vermittelt (Washizuka *et al.*, 1997).

1.3.5 Pathologische Veränderungen des KvLQT1/minK-Kanals

1.3.5.1 Das „Lange QT-Syndrom“

Typ	Chromosom	Gen	Nativer Strom
<u>autosomal-dominant</u> <u>(Romano-Ward-Syndrom)</u>			
LQTS1	11p15.5	KCNQ1	↓ I_{Ks}
LQTS2	7q35-36	HERG	↓ I_{Kr}
LQTS3	3p21-24	SCN5A	↑ I_{Na}
LQTS4	4q25-27	?	?
LQTS5	21q22.1-22.2	KCNE1	↓ I_{Ks}
LQTS6	21q22.1-22.2	KCNE2	↓ I_{Kr}
<u>autosomal-rezessiv</u> <u>(Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom)</u>			
JLNS1	11p15.5	KCNQ1	↓↓ I_{Ks}
JLNS2	21q22.1-22.2	KCNE1	↓↓ I_{Ks}

Tabelle 1.2: Einteilung der angeborenen LQT-Syndrome (verändert nach Chiang & Roden, 2000)

Die Pfeilrichtung deutet auf eine entstehende Ionenstromerhöhung oder -verringern.

Mutationen innerhalb der beiden Gene KCNQ1 und KCNE1 können das angeborene „Lange QT (LQT)-Syndrom“ hervorrufen.

Man unterscheidet eine autosomal-dominante Form, das Romano-Ward-Syndrom (Romano, 1965; Ward, 1964) und eine weitaus seltenere autosomal-rezessive Variante, das Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom. Diese Erkrankung geht mit angeborener Innenohrschwerhörigkeit einher (Jervell & Lange-Nielsen, 1965).

Inzwischen sind sechs unterschiedliche Genotypen des Romano-Ward LQT-Syndroms (LQTS1-LQTS6) molekularbiologisch identifiziert worden (siehe Tabelle 1.2).

Die Veränderungen des KCNQ1-Gens (LQTS1) sind neben den HERG-Mutationen (LQTS2) die häufigsten Ursachen dieser Herzrhythmusstörungen (Splawski *et al.*, 2000). Dabei führen Defekte in den Kaliumkanälen zu einer Verminderung der I_{Ks} - bzw. I_{Kr} -Ströme und somit zu einer AP-Verlängerung, die im EKG als verlängerte QT-Zeit deutlich wird. Die Folgen sind lebensbedrohliche ventrikuläre Tachykardien vom Typ Torsade de pointes, Synkopen oder plötzlicher Herzstillstand (Chiang & Roden, 2000).

Die kardialen Ereignisse werden vor allem beim LQTS1-Typ durch Aktivierung des Sympathikus bei physischem oder emotionalem Stress ausgelöst.

Eine Verbesserung der Symptomatik kann durch Gabe von β -Blockern (z. B. Propranolol oder Nadolol) erreicht werden (Moss *et al.*, 2000).

Die Entstehung des Jervell-Lange-Nielsen-Syndroms ist auf Mutationen in KCNQ1 (JLNS1) oder KCNE1 (JLNS2) zurückzuführen. Der Defekt oder Verlust der I_{Ks} -Funktion in der Stria vaskularis des Innenohrs hat eine Taubheit zur Folge (Neyroud *et al.*, 1997; Schulze-Bahr *et al.*, 1997).

Die pathologischen Veränderungen des QT-Intervalls im EKG können auch als Nebenwirkung von vielen Arzneistoffen beobachtet werden. Das erworbene LQT-Syndrom ist wesentlich häufiger verbreitet und ist auf einer spezifischen Hemmung des I_{Kr} -Stroms und Repolarisationsverlängerung durch unterschiedliche Medikamentenklassen, wie z. B. Antiarrhythmika (D-Sotalol, Amiodaron), Neuroleptika (Phenothiazine), Antibiotika (Erythromycin) usw., begründet (Roden, 1998).

Es wird inzwischen auch eine genetische Prädisposition, eine so genannte „stille Form“ des kongenitalen LQT-Syndroms, als Ursache der proarrhythmischen Effekte diskutiert (Makita *et al.*, 2002; Sesti *et al.*, 2000).

Die Gründe für eine höhere Inzidenz des LQT-Syndroms bei Frauen sind noch unklar (Makkar *et al.*, 1993). Man vermutet eine K⁺-Strom-Inhibierung (vor allem I_{Kr} und I_{Ks}) und eine Verlängerung der QT-Zeit durch Östrogeneinfluss (Drici *et al.*, 1996). Testosteron wirkte hingegen protektiv gegenüber proarrhythmischen Nebenwirkungen von Dofetilid im Kaninchenmodell (Pham *et al.*, 2001).

1.3.5.2 Andere pathophysiologische Veränderungen

Neben den genetischen Veränderungen des KCNQ1-Gens sind auch Mutationen der neuronalen KCNQ2- und KCNQ3-Gene (= „M-Strom“) beschrieben worden. Sie können eine bestimmte Form der Epilepsie, so genannte „benigne, familiäre Neugeborenenkrämpfe“, verursachen (Rogawski, 2000).

Das KCNQ4-Gen spielt ebenso wie KCNQ1 in der autosomal-dominant vererbten Form der Taubheit, die progredient über Jahre verläuft, eine Rolle (Kubisch *et al.*, 1999).

Lee *et al.* konnten 1999 eine weitere Erbkrankheit auf dem Chromosom 11 mit Veränderungen des KCNQ1-Gens in Zusammenhang bringen. Dieses „Wiedemann-Beckwith-Syndrom“ führt zu Entwicklungsstörungen und erhöhter Malignomdisposition.

1.4 Der β_3 -adrenerge Rezeptor

Der β -adrenerge Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Herzfunktion. Die Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren (β -AR) durch das sympathische Nervensystem führt zu einer Erhöhung der Herzfrequenz (positiv chronotrop), Schlagkraft (positiv inotrop) und Relaxationsgeschwindigkeit der Herzmuskulatur (positiv lusitrop) (Post *et al.*, 1999).

Bislang sind drei Subtypen der β -AR molekularbiologisch und pharmakologisch identifiziert worden (Bylund *et al.*, 1994). Sie sind Vertreter der großen Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Post *et al.*, 1999).

Ein postulierter β_4 -AR wurde inzwischen als „atypischer (Propranolol-insensitiver)“ Konformationszustand des β_1 -AR dargestellt (Kaumann *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2002).

Eine Übersicht der Eigenschaften der einzelnen β -Rezeptoren gibt Tabelle 1.3.

	β_1 -AR	β_2 -AR	β_3 -AR
Chromosom	10q24-q26	5q31-q32	8p11.1-8p12
G-Protein	G _s	G _s / G _i	G _s / G _i
Kardiologischer Effekt	Stimulation	Stimulation	Inhibition
Katecholamin-Spezifität	Noradrenalin	Adrenalin	Noradrenalin
Agonist	Xamoterol	Procaterol	BRL 37344 / L-755,507
Antagonist	Atenolol / CGP 20712A	ICI 118,551	Bupranolol / L-748,328

Tabelle 1.3: Eigenschaften der humanen β -adrenergen Rezeptor-Subtypen (verändert nach Strosberg, 1997)

1.4.1 Molekulare Struktur

Das Protein besteht aus einer einzigen 400-408 AS langen Polypeptidkette und ist den Sequenzen der beiden anderen β -AR zu etwa 50 % ähnlich.

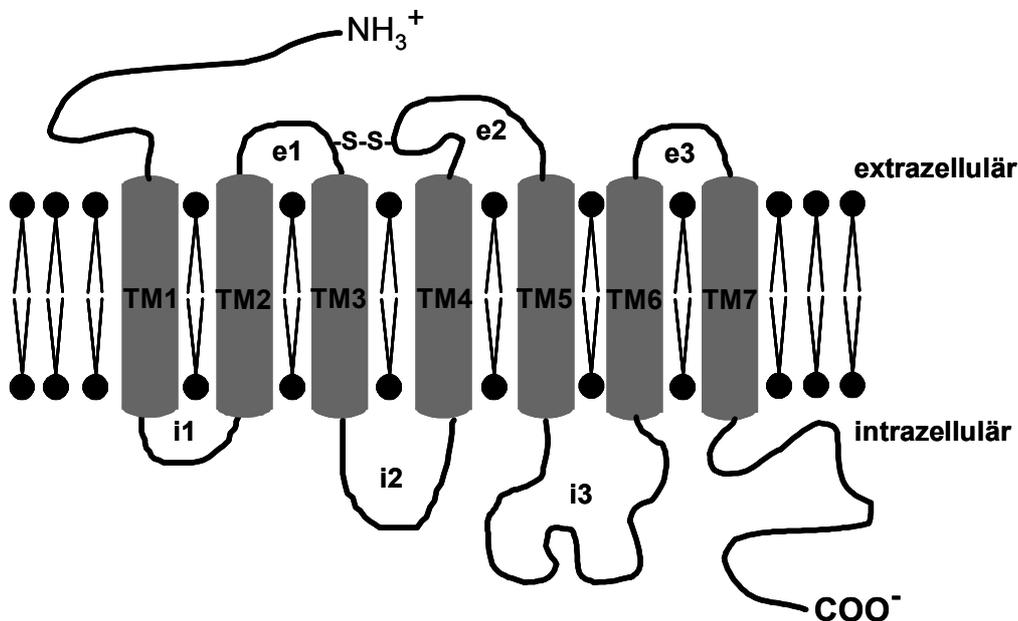


Abbildung 1.8: Allgemeine Struktur der G-Protein-gekoppelten, β -adrenergen Rezeptoren (verändert nach Mizobe *et al.*, 1998)

TM1 - TM7: transmembranäre Segmente

e1 - e3: extrazelluläre Schleifen; i1 - i3: intrazelluläre Schleifen

Der β_3 -AR wurde 1989 erstmals kloniert (Emorine *et al.*, 1989) und konnte daraufhin in zahlreichen Spezies und Geweben nachgewiesen werden (Strosberg, 1997). Beim Menschen befindet sich die höchste Expressionsdichte im Fettgewebe und im Gastrointestinaltrakt (Krief *et al.*, 1993; Berkowitz *et al.*, 1995; Chamberlain *et al.*, 1999).

Der β_3 -AR gehört zur großen Gruppe der membranständigen, G (GTP-bindenden)-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie sind durch sieben hydrophobe, transmembranäre Segmente (TM1-TM7) mit drei extrazellulären (e1-e3) und drei intrazellulären (i1-i3) Schleifen charakterisiert. Eine dreidimensionale Betrachtung der Liganden-Bindungsstelle der β -AR ergab eine runde „Korb- oder Taschenstruktur“, mit einer unmittelbaren Annäherung der TM1/2- und TM6/7- Bereiche. Dort können die spezifischen Substanzen über Wasserstoffbrücken an die Aminosäurereste der jeweiligen Segmente (vor allem TM3-6) gebunden werden (Mizobe *et al.*, 1998).

Die Speziesunterschiede in der Struktur des β_3 -AR's liegen in den Bereichen e1-3 und i1-3 begründet (Strosberg, 1997).

Im Gegensatz zu β_1 - und β_2 -AR fehlen dem β_3 -AR spezifische Phosphorylierungsstellen (PKA, GRK) am Carboxy-terminalen Ende im Zellinneren, die eine Desensitivierung („Down-Regulation“) des Rezeptors bedingen können (Nantel *et al.*, 1993).

Eine wichtige pathophysiologische Konsequenz ergibt sich aus einem Polymorphismus des β_3 -AR-Gens, denn 1995 konnten Walston *et al.* und Clement *et al.* erstmals einen Zusammenhang zwischen dem Austausch einer AS im β_3 -AR-Gen (T→W in Position 64) und einer erhöhten Inzidenz von Adipositas und Diabetes in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen herstellen.

1.4.2 Physiologie

Der β_3 -AR wird auch als „lipolytischer, thermogener Rezeptor“ bezeichnet, denn er hat besonders in Nagetieren eine antiadipöse und antidiabetische Wirkung (Langin *et al.*, 1991). Im Fettgewebe des Menschen ist der lipolytische Effekt schwächer ausgeprägt und überwiegend von der Wahl selektiver, potenter β_3 -Agonisten abhängig (Carruba *et al.*, 1998).

Eine Aktivierung des β_3 -AR's kann ferner eine Relaxation der glatten Intestinal- und Bronchialmuskulatur oder eine Stimulation der Insulinfreisetzung aus pankreatischen β -Zellen bewirken (Manara *et al.*, 1995; Martin & Advenier, 1995; Perfetti *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 1991).

In der Gefäßmuskulatur wurde bei unterschiedlichen Spezies eine vasodilatierende Wirkung beschrieben, die eine Reflextachykardie im Herzen auslösen konnte (Donckier *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 1994).

Die Rolle des kardialen β_3 -AR ist im Moment noch nicht eindeutig geklärt. Versuche in humanen endomyokardialen Biopsien, in ventrikulären Kardiomyozyten vom Hund oder am isolierten Meerschweinchenherz ergaben negativ inotrope Effekte, die durch β_3 -Antagonisten (Bupranolol, SR 59230A) inhibierbar waren (Cheng *et al.*, 2001; Gauthier *et al.*, 1996; Gauthier *et al.*, 1999; Kitamura *et al.*, 2000). Die Verringerung der Kontraktilität wurde dabei über einen $G_{i/o\alpha}$ -Protein/NO/cGMP-Signalweg vermittelt. Diese Ergebnisse konnten von anderen Forschungsgruppen jedoch nicht bestätigt werden.

So beobachteten z. B. Harding (1997) und Gong *et al.* (2001) sowie Pott *et al.* (2003) nach Gabe von selektiven β_3 -Agonisten keine Veränderungen in der Kontraktilität von ventrikulären bzw. atrialen Kardiomyozyten des Menschen. In einem ähnlichen Experiment konnte kein Einfluss β_2 - und β_3 -adrenerger Rezeptoren auf die Chronotropie im Mäuseventrikel nachgewiesen werden (Heubach *et al.*, 2002).

Die Gründe für diese Diskrepanz liegen vor allem in der Wahl der geeigneten, selektiven β_3 -Agonisten und in den experimentellen Gegebenheiten (in vitro-versus in vivo-Versuche, Zusammensetzung der Perifusionslösungen usw.). Als weitere Ursache der differierenden Effekte konnten Gauthier *et al.* 1999 deutliche Speziesunterschiede β_3 -aktiver Substanzen, wie z. B. BRL 37344 oder CL 316,243, aufzeigen.

1.4.3 Einfluss auf Ionenkanäle

Eine direkte Interaktion des β_3 -AR mit Ionenkanälen ergaben Versuche von Horinouchi *et al.* an der glatten, gastrointestinalen Muskulatur im Meerschweinchen. Sie konnten eine signifikante Aktivierung des Ca^{2+} -sensitiven, spannungsabhängigen $\text{BK}_{\text{Ca}}\text{-K}^+$ -Kanals als Ursache der β_3 -AR-vermittelten, cAMP-unabhängigen Relaxation der Muskelzellen feststellen (Horinouchi *et al.*, 2003). Ein vergleichbarer Effekt konnte auch in Gefäßmuskelzellen der Ratte gezeigt werden. Die Vasorelaxation wurde über eine Stimulation von drei unterschiedlichen K^+ -Kanaltypen (BK_{Ca} , K_{ATP} , Kv) ausgelöst (Rautureau *et al.*, 2002).

Über eine β_3 -adrenerge Regulation kardialer Ionenkanäle sind bislang nur wenige Daten vorhanden. Gauthier *et al.* erklärten die negative Inotropie und Verkürzung der APD mit einer Hemmung des L-Typ- Ca^{2+} -Stroms und Aktivierung eines repolarisierenden CFTR- Cl^- -Stroms (Gauthier *et al.*, 1996; Leblais *et al.*, 1999). Eine Verringerung des $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ konnte auch in Kardiomyozyten des Hundes, der Ratte und des Meerschweinchen nachgewiesen werden (Cheng *et al.*, 2001; Kitamura *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1998). Kathöfer *et al.* beschrieben nach Koexpression von KvLQT1/minK mit dem humanen β_3 -AR und Superfusion des β -Agonisten Isoproterenol eine G_s -Protein-vermittelte Erhöhung des I_{Ks} -Stroms (Kathöfer *et al.*, 2000). Diese β_3 -AR-vermittelte Steigerung von I_{Ks} könnte somit zur beschleunigten Repolarisation im menschlichen Herzen beitragen.

1.5 Isolierte Meerschweinchen-Kardiomyozyten als Modell zur Forschung an kardialen Ionenkanälen

Patch-Clamp-Experimente an isolierten kardialen Myozyten sind schon seit über zwei Jahrzehnten ein etabliertes System für elektrophysiologische Untersuchungen der Herzfunktion oder der Effekte von kardiovaskulären Arzneistoffen (Dow *et al.*, 1981; Fozzard & Beeler, Jr., 1975; Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990). Dabei ist das Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) ein gängiges Versuchstier (Varro *et al.*, 1993):

In ventrikulären Myozyten ist der kurzzeitig geöffnete, repolarisierende I_{to} -Strom und somit die schnelle Phase-1-Repolarisation (siehe Kapitel 1.1.2) nicht vorhanden. Neuere Veröffentlichungen beschreiben einen „ I_{to} -ähnlichen“ Strom ($I_{to,ir}$, „ir“: inward rectifying) bei unphysiologischen Bedingungen (Li *et al.*, 2000).

Ferner ist das AP aufgrund des sehr ausgeprägten repolarisierenden Delayed Rectifier-Kaliumstroms I_K durch eine lang anhaltende Plateauphase gekennzeichnet (siehe Kapitel 1.1.3), (Freeman & Kass, 1993). Deshalb ist der Meerschweinchenventrikel sowohl für präzise physiologische Betrachtungen des I_{Ks} -Stroms als auch für die Entwicklung selektiver I_{Ks} -Blocker (Klasse-III-Antiarrhythmika) besonders geeignet, wie z. B. die Patch-Clamp-Untersuchungen der Chromanol-Derivate (Chromanol 293B und HMR 1556) bestätigten (Bosch *et al.*, 1999; Gögelein *et al.*, 2000; Bosch *et al.*, 2003).

1.6 Fragestellung

Beta-adrenerge Rezeptoren besitzen wichtige Aufgaben in der elektrischen Aktivität der Herzmuskelzelle. Obwohl der β_1 -AR den vorherrschenden Rezeptor-subtyp im Herzen darstellt (65-80 %), ist inzwischen auch ein Einfluss des β_3 -AR's bestätigt worden (Gauthier et al., 2000). Eine β -adrenerge Stimulation bewirkt sowohl eine Veränderung der Herzfrequenz und Kontraktilität als auch eine Modulation kardialer Ionenkanäle. Gerade die Steigerung der langsamen Komponente des repolarisierenden Delayed Rectifier- K^+ -Stroms, I_{KS} , durch β_1 -adrenerge Stimulation, wurde bislang mehrfach beschrieben (Walsh et al., 1988; Yazawa & Kameyama, 1990). Sie ist jedoch von experimentellen Faktoren, wie z. B. Spezies- bzw. Expressionssystem, Perifusionslösungen, Temperatur, Patch-Clamp-Konfiguration usw., abhängig (Busch & Maylie, 1994; Walsh et al., 1989). Die Bedeutung des β_3 -Rezeptorsubtyps in der adrenergen Regulation des nativen, kardialen I_{KS} -Stroms ist bislang noch nicht untersucht.

- Als erste Aufgabe in der vorliegenden Arbeit galt es zunächst, die bekannte β_1 -adrenerge Steigerung der langsamen Komponente des Delayed Rectifiers in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten des Meerschweinchens zu bestätigen.
- In *Xenopus*-Oozyten wurde kürzlich eine β_3 -adrenerge I_{KS} -Stromerhöhung beobachtet (Kathöfer et al., 2000). Im Vergleich zum nativen Gewebe sind jedoch in diesem heterologen Expressionssystem I_{KS} -spezifische Interaktionen (β -UE, AKAP-Proteine) und Second Messenger möglicherweise nicht funktionell vorhanden.

Im Folgenden sollte deshalb der Einfluss des β_3 -AR auf den nativen I_{KS} -Strom und auf den Verlauf des ventrikulären Aktionspotentials geklärt werden.

Wichtig war auch der Vergleich der Effekte eines endogenen Agonisten (Noradrenalin) mit denen der selektiveren β_3 -Agonisten (BRL 37344, CL 316,243) auf I_{KS} .

- Einen weiteren Schwerpunkt dieser Dissertation stellte die Beschreibung der möglichen β_3 -Signalkaskade dar. Ähnlich wie der β_2 -AR, kann der β_3 -AR steigernde und inhibierende Wirkungen über G_s - bzw. G_i -Protein-Signalkaskaden auslösen. Dies ist vor allem im Fettgewebe und Gastrointestinaltrakt beschrieben (Strosberg, 1997). In isolierten Kardiomyozyten liegen hingegen bislang nur wenige Daten vor (Cheng *et al.*, 2001; Leblais *et al.*, 1999).

Die geplanten Versuche erfolgten an ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens, die zuvor mit Hilfe einer Langendorff-Perifusionsapparatur isoliert wurden. Zur Messung des I_{Ks} -Ionenstroms und der Aktionspotentiale sollte der Whole-Cell-Modus der Patch-Clamp-Technik bei physiologischen Temperaturen dienen.

2 Material

2.1 Versuchstiere

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche an ventrikulären Herzmuskelzellen wurden adulte, männliche Meerschweinchen der Rasse Hartley Albino (Charles River, Kisslegg, D bzw. Harlan-Winkelman, Borchon, D) verwendet. Das Körpergewicht der einzelnen Tiere zum Zeitpunkt der Isolation betrug zwischen 400 g und 500 g.

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere mindestens 3-4 Tage in Makrolon-Käfigen unter artgerechten Bedingungen in einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Sie erhielten standardisiertes, pelletiertes Tiertrockenfutter Altromin 1324 (Altromin, Lage/Lippe, D) und Trinkwasser ad libitum.

2.2 Geräte

2.2.1 Langendorff-Perifusionsapparatur

Bubble Trap	Radnofi, Monrovia, USA
Herzkammer	Schott, Mainz, D
Kühler	Brand, Wertheim, D
Thermostat	Haake DC30, Gebrüder Haake, Karlsruhe, D

2.2.2 Patch-Clamp-Messplatz

A/D-Wandler	Digidata 1200, Axon Instruments, Foster City, USA
Faraday-Käfig	Eigenanfertigung
Mikromanipulator (hydraulisch)	Narishige Scientific Instruments, Tokyo, J
Mikroskop (invers)	Axiovert 100, Zeiss, Oberkochen, D
Perifusionsleitungssystem	Braun, Melsungen, D

Probenkammer	Cell Micro Controls, Virginia Beach, USA
Pumpe	Peristaltikpumpe P-1, Amersham, Freiburg, D
Schwingungsdämpfender Tisch	TMC, Peabody, USA
Software	pclamp 6.0, Axon Instruments, Foster City, USA
Temperiereinheit	TC ² bip. Controller, Cell Micro Controls, Virginia Beach, USA
Verstärker	Axopatch 200B, Axon Instruments, Foster City, USA

2.2.3 Elektroden

Elektrodenziehgerät	DMZ-Universalpuller, Zeitz-Instrumente, Augsburg, D
Elektroden Glas	Borosilikatglaskapillaren GC150TF-7.5, 1,5 mm OD x 1,17 mm ID, mit Innen- filament, Harvard Apparatus, Kent, UK
Silberdraht	Typ AG 99,9%, 0,3 mm Dicke, Neolab, Heidelberg, D

2.2.4 Sonstige Laborgeräte und Zubehör

Fixierfaden	PermaHand Seidenfaden, Johnson-Johnson, Brüssel, B
Kanülen	B. Braun, Melsungen, D
Magnetrührer	Martin und Michael Crist, Osterode, D
pH-Meter	Migge & Glock, Leonberg, D
Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Sterilfilter	Millex GS, Milipore, Bedford, USA
Wasserbad mit Schüttler	Köttermann, Hänigsen, D
Präparierscheren und -pinzetten	Aesculap / B. Braun, Melsungen, D

2.3 Chemikalien

Alle verwendeten Testsubstanzen wurden als Stammlösungen (1mM) angesetzt. DMSO, DMSO/Ethanol (1:1) oder Aqua bidest. dienten dabei als Lösungsmittel. Dieser Anteil in den Versuchslösungen hatte keine Auswirkungen auf die elektrophysiologischen Messungen der Ströme.

BRL 37344	Biotrend, Köln, D
Bupranolol	Schwarz Pharma, Monheim, D*
Collagenase	Typ II, Biochrom, Berlin, D bzw. Cell Systems, St. Katharinen, D
Dofetilide	Aventis Pharma, Frankfurt/M, D*
Forskolin	Aventis Pharma, Frankfurt/M, D*
HMR 1556	Aventis Pharma, Frankfurt/M, D*
ICI 118,551	Biotrend, Köln, D
L-(-)-Isoproterenol	ICN Biomedicals, Eschwege, D
L-NAME	Biotrend, Köln, D
L-NMMA	Biotrend, Köln, D
Nisoldipin	Aventis Pharma, Frankfurt/M, D*

* wurden freundlicher Weise von den jeweiligen Firmen zur Verfügung gestellt.

Alle übrigen, nicht aufgeführten Substanzen wurden in analysenreiner Qualität bei den Firmen Sigma, Deisenhofen, D, oder Calbiochem/ Novabiochem, Bad Soden, D, bezogen.

2.4 Lösungen

Zur Herstellung der unterschiedlichen Lösungen wurden Stammlösungen angesetzt, aliquotiert und entsprechend ihren chemischen Eigenschaften gelagert, um Abbaureaktionen der Substanzen zu minimieren. Am Versuchstag wurden die Lösungen dann frisch angesetzt.

2.4.1 Lösungen zur Zellisolation

a. Calciumhaltige Tyrode-Lösung

D(+)- Glucose	10 mM
NaCl	136 mM
KCl	5,4 mM
MgCl ₂	1,0 mM
HEPES	5 mM
NaH ₂ PO ₄	0,33 mM
CaCl ₂	2,0 mM

Der pH-Wert der Lösung wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt

b. Calciumfreie Tyrode-Lösung

Die Zusammensetzung der verwendeten Lösung entspricht der Tyrodelösung in a. mit Ausnahme des CaCl₂ (0 mM).

c. Calciumfreie, enzymhaltige Tyrode-Lösung

Das Medium in b. wurde mit 30-50 mg/ml (80-100 U) Collagenase Typ II und 0,1 % BSA zum Verdau des Gewebes versetzt. Beide Substanzen wurden unmittelbar vor Beginn der Superfusion in der Tyrode gelöst, um Veränderungen in der Aktivität der Collagenase zu minimieren.

d. KB-Lösung („Kraftbrühe“)

D(+)- Glucose	25 mM
KCl	20 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM
L-Glutaminsäure	70 mM
Mannitol	40 mM
Taurin	20 mM
EGTA	10 mM
β-Hydroxybutyrat	10 mM
BSA	0,1 %

Der pH-Wert der Lösung wurde mit KOH auf 7,4 eingestellt.

2.4.2 Lösungen für Patch-Clamp-Messungen

2.4.2.1 Messungen von Aktionspotentialen

Standard calciumhaltige Tyrode-Lösung

D(+)- Glucose	10 mM
NaCl	136 mM
KCl	5,4 mM
MgCl ₂	1,0 mM
HEPES	5 mM
NaH ₂ PO ₄	0,33 mM
CaCl ₂	2,0 mM

Der pH-Wert der Lösung wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

2.4.2.2 Messungen des I_{Ks} -Kaliumstroms

Standard Tyrode-Lösung (siehe Kapitel 2.4.2.1) mit Zusatz von 1 μ M Nisoldipin und 1 μ M Dofetilide zur Inhibierung des Ca^{2+} -Stroms bzw. des I_{Kr} -Stroms.

2.4.3 Pipettenlösungen

2.4.3.1 Pipettenlösung für die Standard-Whole-Cell-Konfiguration

K ₂ -phosphokreatin	5 mM
Li-GTP	0,1 mM
Mg-ATP	5 mM
K-aspartat	110 mM
KCl	20 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	10 mM
EGTA	5 mM

Der pH-Wert der Lösung wurde mit KOH auf 7,2 eingestellt.

2.4.3.2 Pipettenlösung für Perforated-Patch-Versuche

KCl	150 mM
MgCl ₂	5 mM
K-ATP	5 mM
HEPES	3 mM
Amphotericin B	250 μ g/ml

Der pH-Wert der Lösung wurde mit KOH auf 7,2 eingestellt.

Wegen der Instabilität und Lichtempfindlichkeit des Amphotericin B zur Perforation der Zellmembran erfolgte die Zugabe immer am jeweiligen Versuchstag. Nach Vorversuchen zeigte sich eine optimale Substanzkonzentration von 250 µg/ml für das Durchbrechen der Zellmembran.

2.4.4 Agarbrücke

Zur Vermeidung von toxischen Effekten der Silberionen oder Potentialverschiebungen durch die Chloridionen der Ag/AgCl-Badelektrode wurde eine Agar-Salzbrücke als leitende Verbindung verwendet.

Zur Herstellung einer 3 %igen Agar-Suspension wurden 1,5 g Agar in 50 ml KCl-Lösung (150 mmol/l) unter ständigem Rühren erhitzt.

Eine Pipettenspitze wurde mit dem Agar zu $\frac{3}{4}$ luftblasenfrei befüllt und mit der KCl-Lösung aufgefüllt. Die chlorierte Silberelektrode konnte nun von hinten in den Agar eingeführt und mit Parafilm abgedichtet werden.

3 Methoden

3.1 Isolation von Herzmuskelzellen: Die Langendorff-Präparation

3.1.1 Prinzip

Untersuchungen an einzelnen Herzmuskelzellen öffneten einen neuen Horizont im Verständnis therapeutischer und toxischer Mechanismen von kardiovaskulären Arzneistoffen.

Erste Versuche zur Darstellung isolierter Kardiomyozyten wurden schon Anfang der 60er Jahre beschrieben. Yokoyama und Muir konnten erstmals mit Hilfe einer mechanischen Spaltung unter Calcium-Komplexbildung intakte Zellen aus Hunde- bzw. Rattenherzen isolieren (Muir, 1965; Yokoyama *et al.*, 1961).

Ein wichtiger Schritt in der Technik der Zellpräparation war der Einsatz von proteolytischen und hydrolytischen Enzymen, z.B. Collagenase, Hyaluronidase oder Trypsin. Die Qualität der Herzmuskelzellen konnte durch diese „enzymatische Dissoziation“ wesentlich verbessert werden (Berry *et al.*, 1970; Bustamante *et al.*, 1981).

Das Prinzip der Isolation von Herzmuskelzellen besteht in der Aufspaltung interzellulärer Verbindungen innerhalb des Myokards. Die quergestreiften Herzmuskelzellen bilden einen engen, funktionellen Verband (Synzytium), der durch dichte Membrankontakte von ca. 2 nm, den „Glanzstreifen“, gekennzeichnet ist (Van Breemen, 1953). Die wichtige, rhythmisch-synchrone elektrische Aktivität des Herzens entsteht dabei durch kanalartige Verbindungen (Konnexone) in definierten Bereichen angrenzender Zellen, den Gap Junctions (McNutt, 1975).

Durch eine Glanzstreifenauftrennung können somit individuelle Myozyten aus dem Gewebe isoliert werden. Entscheidende Faktoren für eine erfolgreiche Zellpräparation sind, wie bereits erwähnt, Ca^{2+} -Entzug, z.B. durch Komplexbildner wie EGTA oder EDTA, sowie ein enzymatischer Verdauungsprozeß. Beide Prozesse bewirken eine Lockerung und Spaltung der Kollagenfasern des Muskelgewebes und eine Auftrennung der Ca^{2+} -abhängigen Interzellularkontakte.

Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, besitzen die gewonnenen Kardiomyozyten eine regelmäßige Querstreifung (helle und dunkle Zonen im Lichtmikroskop erkennbar = I-Band bzw. A-Band) und eine gestreckte, längliche Form.

Ein wichtiges Problem in Bezug auf die Zellqualität stellte das 1966 von Zimmerman und Hülsmann beschriebene „Ca-Paradoxon“ dar (Zimmerman & Hülsmann, 1966). Sie beobachteten an ihren Zellisolaten eine extreme Sensitivität gegenüber Calciumionen. Bei Versuchslösungen mit einer Ca^{2+} -Konzentration im millimolaren Bereich, reagierten die isolierten Zellen mit einer Hyperkontraktur, welche zu einer schnellen Degeneration mit Abrundung der Zellen führte. Die Ursache dieses irreversiblen Zellstrukturverlustes liegt in Sarkolemmveränderungen bei Isolationen in einem Ca^{2+} -freien Medium. Der Calciumentzug bewirkt eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran. Die erneute Zugabe des Calciums ($>0,1$ nmol/l) führt zu einer Ca^{2+} -Überladung in den Mitochondrien und zur Bildung von Zellgranula („Blebs“) unter ATP-Verlust. Um die Toleranz der Zellen gegenüber Calcium zu erhöhen und damit die Zellqualität zu erhalten, wurden verschiedene Möglichkeiten beschrieben. Wichtig erscheint hier vor allem eine schnelle, homogene Perfusion des Herzens, ein enzymatischer Verdau bei geringer freier Ca^{2+} -Aktivität (ca. $5-10 \mu\text{mol/l}$) und ein stabilisierendes Medium zur Aufbewahrung der Zellen (Isenberg & Klockner, 1982).

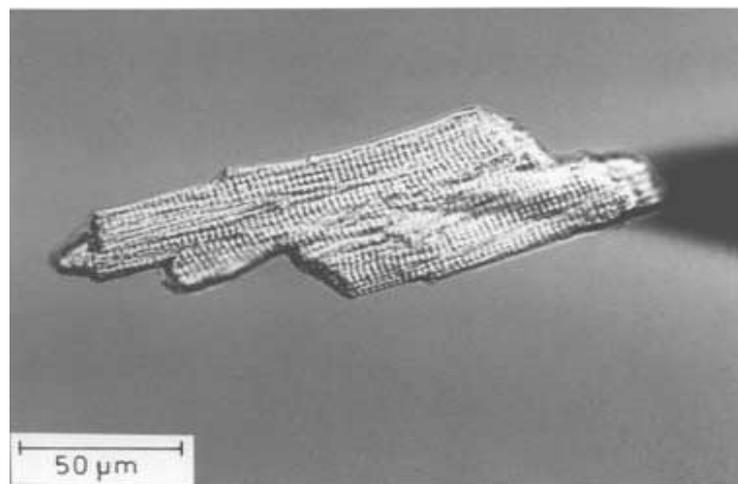


Abbildung 3.1: Beispiel einer isolierten, ventrikulären Herzmuskelzelle des Meerschweinchens mit Patch-Pipette (Schatten)

3.1.2 Charakterisierung des Collagenase-Isolationsenzym

Kono und Vahouny führten 1969 bzw. 1970 die enzymatische Isolation von Herzmuskelzellen ein (Kono, 1969; Vahouny *et al.*, 1970). Der Einsatz spezifischer Enzyme bei den Zellpräparationen ist dabei sehr stark gewebe- und speziesabhängig, z.B. wird Trypsin zur Frosch- und Hundeherzisolierung verwendet (Jacob *et al.*, 1987). Collagenase eignet sich besonders gut für die Isolierung von Säugerherzmuskelzellen. Dies ergibt sich aus ihrer Fähigkeit, kollagenhaltige Fasern in Bindegeweben hydrolytisch und proteolytisch abzubauen (Harris, Jr. & Krane, 1974).

Das Enzym wird aus dem Kulturfiltrat des Bakterienstammes *Clostridium histolyticum* gewonnen und enthält zusätzliche Mengen an Proteinasen (Clostripain, Aminopeptidasen usw.) (Bond & Van Wart, 1984).

Die Firma Worthington Biochemical Corp. entwickelte infolgedessen vier „Collagenase Profile“ (CLS 1-4) zur Zellisolierung aus unterschiedlichen Ursprungsgeweben. Der Typ 2 (CLS 2) wird für Versuche an Knochen, Muskeln oder am Herzen empfohlen und hat aufgrund seiner hohen Clostripainkonzentration eine größere proteolytische Aktivität (Worthington tissue dissociation guide, 1999). Die notwendige katalytische Aktivierung des Enzyms durch Calcium wird durch eine endogene Verunreinigung mit Ca^{2+} -Ionen bei der Aufbereitung der Collagenase aus dem Bakterium gewährleistet (Bond & Van Wart, 1984).

3.1.3 Die Langendorff-Apparatur

Der Aufbau orientiert sich an der von Langendorff 1895 entwickelten Methodik zur „Untersuchung am überlebenden Säugethierherzen“ (Langendorff, 1895). Das Prinzip besteht in einer retrograden Perifusion des isolierten Herzens unter konstanten Druckverhältnissen.

Abbildung 3.2 zeigt schematisch die Anordnung dieser Langendorff-Apparatur:

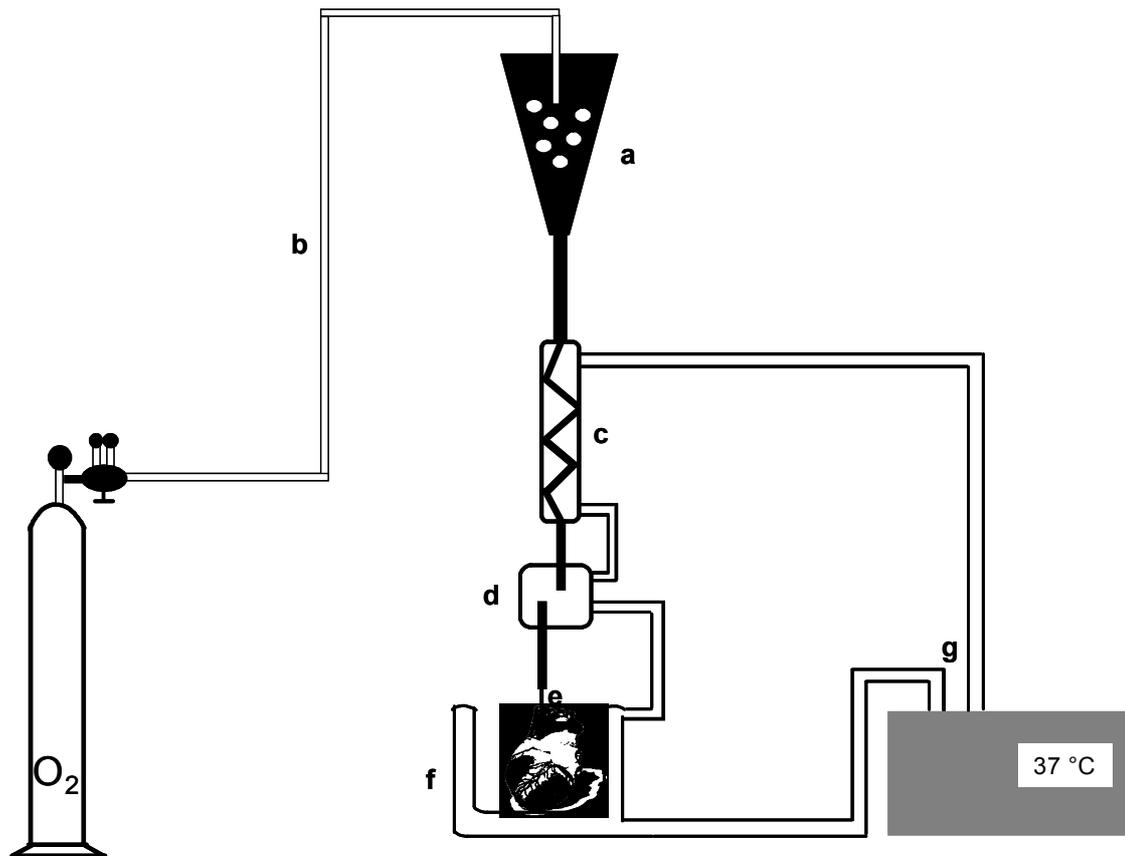


Abbildung 3.2: Schema der Langendorff-Apparatur zur Isolation von Herzmuskelzellen

Die Langendorffssäule wird an einem Stativ mit einer Höhe von ca. 100 cm befestigt, um einen konstanten Perifusionsdruck von 800-1000 mmH₂O (58-73 mmHg) auf das Herz zu erzeugen. Dies entspricht annähernd der Höhe des mittleren arteriellen Blutdrucks des Versuchstieres.

Die Perifusionslösung wird in das Vorratsgefäß (a) eingefüllt und über eine Schlauchverbindung (b) mit 100% O₂ begast. Über einen beheizbaren Schlangenkühler (c) gelangt die Lösung in das sogenannte „Luftblasenauffanggefäß“, Bubble Trap (d). Dadurch können Mikroembolien vermieden werden, falls sich Luftblasen in der Perifusionslösung befinden. Die Bubble Trap mündet in eine kurze Röhre, an deren Ende eine Kanüle (e) angebracht ist. Das kanülierte Herz befindet sich in einer Wärmekammer (f), die das Perfusat aufnimmt. Das gesamte System wird über ein zirkulierendes Wasserbad (g) auf einer konstanten (Körper-) Temperatur von 36-37 °C gehalten.

3.1.4 Ablauf der Zellpräparation

Die Isolierung der ventrikulären Kardiomyozyten erfolgte nach der von Bosch *et al.* (1998) beschriebenen Methode.

Die Tiere wurden, unter Vermeidung adrenerger Stimulation, durch zervikale Dislokation getötet. Nach einem medianen Bauchschnitt und Öffnen des Thorax, konnte das Herz schnell entnommen werden. In einer Petrischale mit Ca^{2+} -haltiger Tyrodelösung wurden zunächst letzte Gewebereste entfernt und die Aorta ascendens freipräpariert. Diese wurde dann mit zwei Pinzetten gefaßt und sofort über die Kanüle der Langendorff-Apparatur gezogen. Mit einem Seidenfaden fixiert konnte so der erste Perifusionsschritt des Herzens begonnen werden. Dabei wurde nach Erwärmung und Oxygenierung der Apparatur das Organ 5 Minuten mit der Tyrodelösung von Blutresten freigewaschen. Es ließ sich eine deutliche Herzkontraktion erkennen.

Von der Aorta durchströmte das Perfusat die Koronararterien, das myokardiale Kapillarbett und verließ das Herz durch die Vena cava am rechten Vorhof.

Danach erfolgte eine 3- bis 5-minütige Phase der Perifusion mit nominell Ca^{2+} -freier Tyrode, bis das Herz keine Eigenrhythmik mehr aufwies. Mit dieser Lösung wurde auch der anschließende enzymatische Verdau durchgeführt. Das Ende der Zellisolation (5 bis 10 Minuten) zeigte sich deutlich durch ein Erweichen des Ventrikels und durch eine schnellere Tropfgeschwindigkeit der Perifusionslösung. Zur Verbesserung des Isolationsergebnisses wurden dann jeweils im Abstand von zwei Minuten kleine Ventrikelstücke entnommen, in die kardioplege KB-Lösung („Kraftbrühe“) überführt und mit einer Pasteurpipette weiter homogenisiert. Durch Entzug von Natrium- und Calciumionen sowie einer hohen Kaliumkonzentration in diesem Aufbewahrungsmedium, stabilisierten sich die freien Herzmuskelzellen und konnten in den nächsten 12 Stunden elektrophysiologisch untersucht werden.

3.2 Patch-Clamp-Technik

3.2.1 Definition

Die Spannungsklemme (Voltage-Clamp) ist eine empfindliche und vielseitige Methode zur Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften von biologischen Membranen (Cole & Curtis, 1939). 1976 wurde sie von den deutschen Wissenschaftlern Erwin Neher und Bert Sakmann zu der Membranfleckklemme (Patch-Clamp) weiterentwickelt. Sie gestattet, durch Unterdrückung des von dem biologischen Präparat verursachten Hintergrundrauschens, sogar die hochauflösende Darstellung von Einzelkanal-Ionenströmen im pA-Bereich (Neher & Sakmann, 1976).

Das Prinzip dieses Messverfahrens basiert auf der elektrischen Isolierung eines 1-3 μm^2 kleinen Zellmembranabschnittes (Patch) von seiner Umgebung. Dies gelingt, indem man die Spitze einer fein ausgezogenen Glasmikropipette vorsichtig auf die Membranoberfläche aufsetzt. Die vollständige Abdichtung wird nach leichtem Ansaugen der Zellmembran erreicht. Neher stellte zufällig fest, dass der Abdichtungswiderstand zwischen Glaswand und Zellmembran durch diesen Unterdruck (20-30 mbar) um mehrere Zehnerpotenzen in den Gigaohm-Bereich steigt (Giga-Seal) (Hamill *et al.*, 1981). Somit können auch winzige Einzelkanalströme aus dem Hintergrundrauschen der Zelloberfläche herausgelöst werden.

3.2.2 Prinzip der Spannungsklemme

Das elektrophysiologische Patch-Clamp-Verfahren basiert auf der Technik der Spannungsklemme. Potentialänderungen der Zellmembran durch Vorgabe einer definierten Klemmspannung führen dabei zu messbaren, entgegengesetzten Ausgleichsströmen. Sie entsprechen dem transmembranären Ionenfluss der Zelle.

Abbildung 3.3 veranschaulicht den Schaltkreis eines Whole-Cell Patch-Clamp-Experimentes. Das Herzstück dieses so genannten Strom-Spannungs-Wandlers stellt der Operationsverstärker (OPA) dar. Er erfüllt zwei wichtige Funktionen. Zum einen dient er als „Klemm-Batterie“, indem er die Spannung des negativen (Pipettenpotential, U_{pip}) und positiven (Kommando- oder Klemmspannung, U_{soll}) Eingangs auf gleichen Werten hält. Andererseits misst er indirekt einen Kompensationsstrom I_f , über den dabei entstehenden Spannungsabfall an einem Rückkopplungswiderstand R_f .

Bei Veränderungen zwischen U_{pip} und U_{soll} entsteht eine verstärkte Spannung am Ausgang des OPAs. Dies induziert einen Kompensationsstrom (I_f) durch den Rückkopplungswiderstand R_f in die Zelle hinein. Infolge seines sehr hohen Eigenwiderstandes ($500 \text{ M}\Omega - 1 \text{ G}\Omega$) ist ein Stromfluss in den OPA selbst nicht möglich ($I_{\text{ein}} = 0$). Der in die Zelle injizierte Strom ist proportional zu U_{aus} . Diese Spannung wird von der Steuereinheit des Verstärkers elektronisch erfasst und erzeugt dort das eigentliche Messsignal I_f . I_f entspricht den Membranströmen der zu untersuchenden Kanäle.

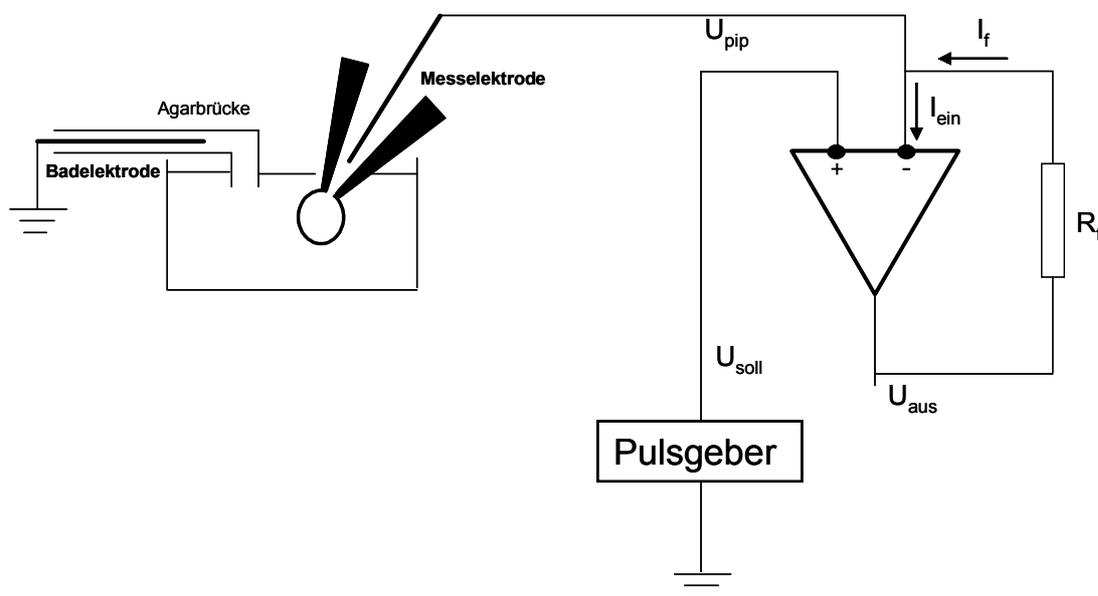


Abbildung 3.3: Schaltkreis eines Patch-Clamp-Experimentes im Whole-Cell-Modus (verändert nach Sigworth, 1995)

3.2.3 Die Whole-Cell-Konfiguration

Mit Erreichen des dichten Membranverschlusses lassen sich verschiedene Messkonfigurationen darstellen (siehe Abbildung 3.4). Zunächst erlaubt die Cell-Attached-Ausgangssituation (1) Messungen von Einzelkanal-Aktivitäten. Trotz einer geringen Deformation der Zellmembran bleibt die Zelle dabei intakt.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode ist die „Ganzzelleableitung“ (Whole-Cell-Modus). Die Standardkonfiguration entsteht durch kurze, kräftige Saug- oder Spannungsimpulse nach der Bildung eines Giga-Seals (2). Das isolierte Membranstück bricht auf, ohne die Dichtung zwischen Pipette und Membran zu verändern.

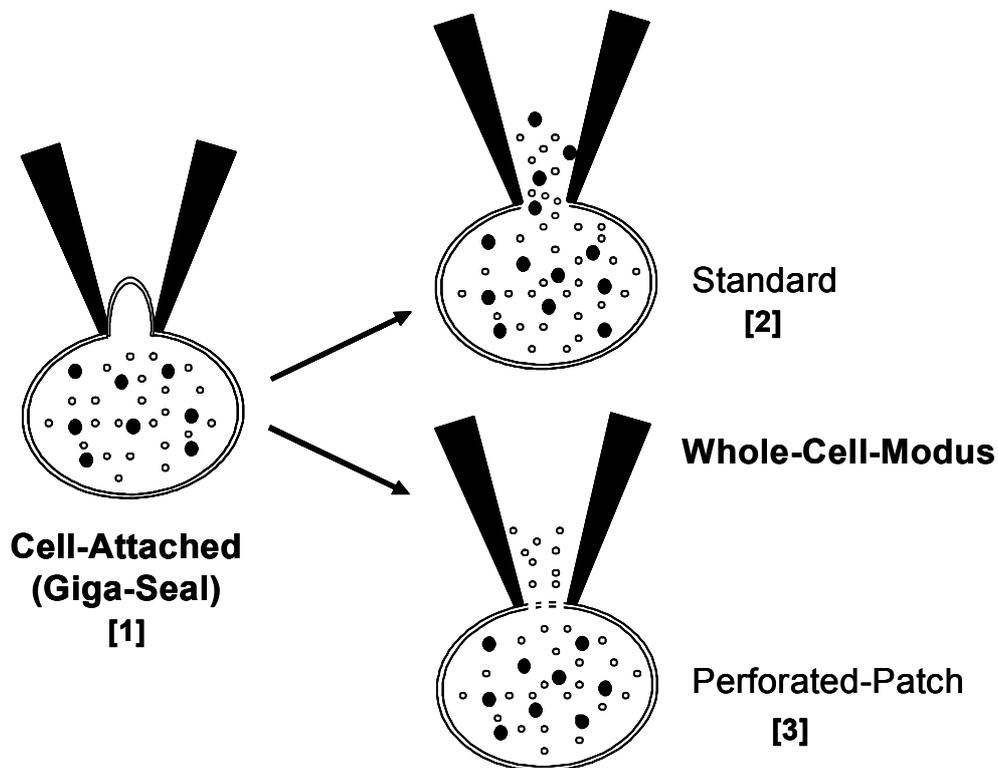


Abbildung 3.4: Die Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik (verändert nach Hamill *et al.*, 1981)

Nach Aufsetzen einer sauberen Pipette und Anlegen eines leichten Unterdrucks bildet sich die Cell-Attached-Konfiguration [1]. Durch einen weiteren Saugimpuls kann ein kleiner Membranfleck unter der Pipette aufgerissen werden und man erreicht den Standard-Whole-Cell-Modus [2]. Ein Perforated-Patch [3] entsteht durch kleine Poren in der Zellmembran nach Gabe von Polyen-Antibiotika.

Durch den Zugang zum Zytosol kann man die gesamte Membran der Zelle und somit auch den Stromfluss durch alle Ionenkanäle erfassen. Es ergeben sich auch zwei Möglichkeiten der elektrophysiologischen Messung: man misst entweder die Größe der Ionenströme unter experimenteller Kontrolle der Membranspannung (=Voltage-Clamp) oder man erfasst die Membranspannungen, z. B. Aktionspotentiale, nach definierter Strominduzierung (= Current-Clamp).

Ein Nachteil ist jedoch die Dialyse der Zelle mit der Pipettenlösung, da die Zelle infolgedessen von regulatorischen Komponenten ihres Zytoplasmas (Enzyme, Second Messenger, ATP usw.) ausgewaschen wird (Pusch & Neher, 1988). Das Ergebnis dieses Diffusionsprozesses ist beispielsweise die Inaktivierung von Ionenkanälen (siehe auch: „ I_{Ks} -Rundown“ in Kap. 4.2).

Um die Zusammensetzung des Zytoplasmas zu erhalten, wurde die Technik des „Perforated-Patch“ entwickelt (3). Dabei formen Polyenantibiotika, z. B. Nystatin oder Amphotericin B, in der Pipettenlösung ionenselektiv-permeable Poren (\emptyset : ca. 0,8 nm) in die Zellmembran. Sie sind undurchlässig für Moleküle mit Molmassen über 300 g/mol. Nur kleine, einwertige Ionen können hindurch diffundieren (Horn & Marty, 1988; Rae *et al.*, 1991).

3.2.4 Aufbau des Patch-Clamp-Messstands

Die Abbildung 3.5 zeigt den Aufbau eines elektrophysiologischen Messplatzes.

Um die hochempfindlichen Aufzeichnungen erschütterungsarm durchführen zu können, steht das inverse Mikroskop (a) mit der temperierbaren Probenkammer auf einem schwingungsgedämpften, mit Pressluft gelagerten Tisch (b). Der Zulauf der Perifusionslösungen erfolgt über ein einfaches Spritzen-Schlauchsystem, welches an einem Stativ befestigt ist (c). Der Pipettenhalter mit der Messelektrode ist fest mit dem Vorverstärker (d) verbunden und kann über den hydraulischen Mikromanipulator (e) fein und präzise bewegt werden.

Als Hauptverstärker dient der Axopatch 200B, der die verarbeiteten Messsignale zu einem Oszilloskop und über einen A/D-Wandler an das Computersystem weiterleitet.

Sämtliche Metallobjekte auf dem Experimentiertisch sind geerdet und zur elektrischen Abschirmung („50-Hz-Brummen“ elektrischer Geräte) von einem Faraday-Käfig (f) umgeben.

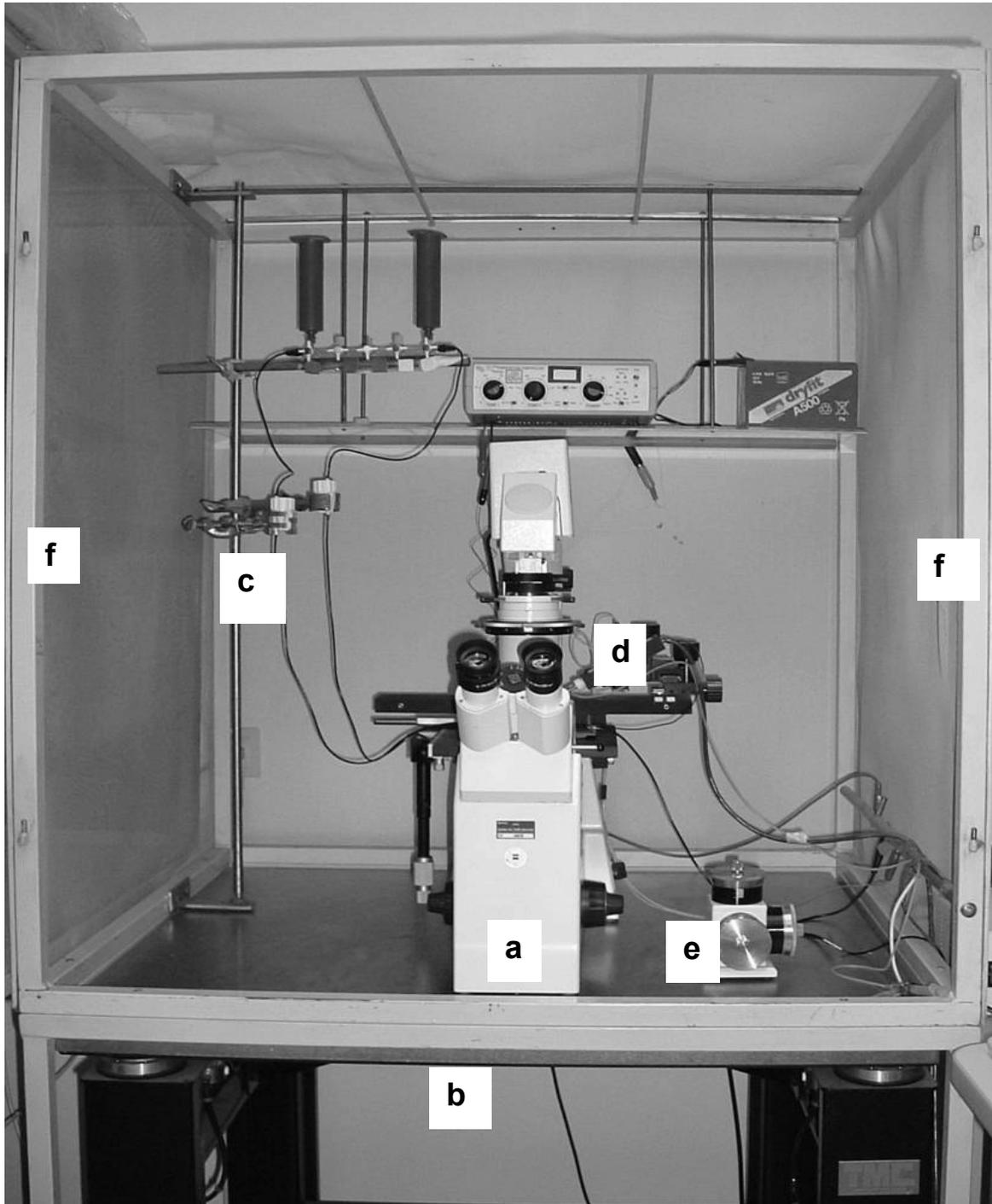


Abbildung 3.5: Der Patch-Clamp-Messstand

a) Mikroskop b) schwingungsgedämpfter Tisch c) Stativ für das Perifusionssystem
d) Vorverstärker e) Mikromanipulator f) Faraday-Käfig

3.2.5 Ablauf der elektrophysiologischen Messungen

Zunächst wurden ein bis zwei Tropfen aus der vorsichtig homogenisierten Zellsuspension des KB-Aufbewahrungsmediums in die Messkammer eingebracht. Nach ca. 3-5 Minuten, in denen sich die Kardiomyozyten durch Adhäsionskräfte am Boden der Messkammer anheften konnten, wurde die kontinuierliche Perfusion mit Tyrodelösung begonnen. Dadurch wurden die Zellen von noch vorhandenen Fremdbestandteilen freigespült. Nach Aktivierung des Heizfilamentes am Boden der Probenkammer erfolgte ein langsames Aufheizen auf 36-37 °C. Dieser physiologische Temperaturbereich gewährleistete exaktere Aussagen über die Kinetik der Ionenströme und deren intrazelluläre Signalkaskaden.

Die Referenzelektrode wurde über eine Agarbrücke in die Badlösung getaucht und an den Vorverstärker angeschlossen. Die Messelektroden selbst wurden unmittelbar vor dem Versuch gezogen und hatten nach Befüllen mit Pipettenlösung Eigenwiderstände von 2,5-5 MΩ. Um einen hohen Abdichtungswiderstand zu erreichen, wurde vor dem Eintauchen ein leichter Überdruck an die mit gefilterter Elektrolytlösung gefüllte Glaspipette angelegt. Nach Heranführen der Pipettenspitze an die Zellmembran mit Hilfe des hydraulischen Mikromanipulators, konnte durch Ablassen des Überdruckes und leichtes Saugen, der stabile Giga-Seal gebildet werden. Dabei wurde bei einem applizierten Kommandospaltungspuls (5 mV) praktisch keine Stromamplitude auf dem Oszilloskop registriert, d. h. der gemessene Widerstand stieg in den GΩ-Bereich.

Das Aufbrechen der Zellmembran gelang dann entweder durch einen weiteren, kurzen Saugimpuls (Standard-Whole-Cell-Modus) oder durch Zugabe von 250 µg/ml Amphotericin B zur Pipettenlösung (Perforated-Patch-Modus).

Die erforderliche Kompensation der Zellkapazität und des seriellen Widerstandes erfolgte mit Hilfe des Axopatch 200B Verstärkers. Aufzeichnungen wurden bei 2 kHz gefiltert und mit dem 12-bit Digidata 1200 A/D-Wandler bei 0,4 kHz digitalisiert. Als Signalbearbeitungsprogramm diente die pclamp 6.0 Software von Axon Instruments.

3.2.6 Verwendete Pulsprotokolle

3.2.6.1 Kaliumstrom I_{Ks}

Zur Aufzeichnung des langsam aktivierenden Step- und des deaktivierenden Tail-Stroms des Delayed Rectifiers I_{Ks} im Voltage-Clamp-Modus, wurden folgende Pulsprotokolle verwendet (Abbildung 3. 6, A und B):

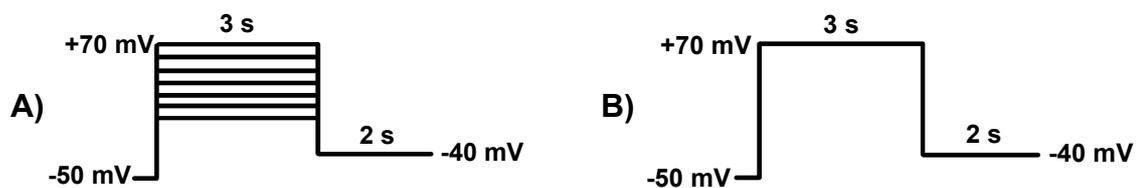


Abbildung 3.6: Pulsprotokolle zur Aufzeichnung des I_{Ks} -Kaliumstroms

Ausgehend von einem Haltepotential von -50 mV erfolgten entweder: A) jeweils in 10 mV Schritten, drei Sekunden dauernde Depolarisationspulse auf +10 mV bis +70 mV oder B) ein einzelner Puls auf +70 mV (Stimulationsfrequenz: 0,1 Hz). Darauf folgte eine Repolarisationsphase von zwei Sekunden auf -40 mV.

Um störende Einflüsse des L-Typ-Calciumstroms und des I_{Kr} -Kaliumstroms in den Messungen zu unterdrücken, befanden sich die beiden selektiven Inhibitoren Nisoldipin (Kass, 1982) und Dofetilid (Jurkiewicz & Sanguinetti, 1993; Kiehn *et al.*, 1994) in Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 100 nmol/l in der Tyrodelösung.

3.2.6.2 Aktionspotentiale

Die Aufzeichnung der Aktionspotentiale erfolgte im „Current-Clamp-Modus“. Dabei wurde ein Strom mit Stimulationsfrequenzen von 1 Hz in die Zelle injiziert und der resultierende Spannungsverlauf registriert.

Messpunkte der Aktionspotentialdauer (APD) waren 20, 50 und 90 Prozent der Repolarisation (APD_{20} , APD_{50} , APD_{90}).

3.3 Datenauswertung und Statistik

Zur eindeutigen Beurteilung der Versuchsergebnisse wurden Zellen aus mindestens drei unabhängigen Ventrikelisolationen ausgewertet. Die Gesamtzahl (n) der untersuchten Kardiomyozyten betrug im Mittel zwischen 4 und 8 und wird bei den Abbildungen in Klammern angegeben.

Die Darstellung der Messpunkte erfolgt als Mittelwerte \pm SEM (Standard Error of the Mean). Statistische Signifikanzen wurden durch einen gepaarten Student-t-Test ermittelt. Die Unterschiede zweier Mittelwerte wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant angenommen.

Für eine Kurvenanalyse („Kurven-Fit“) bzw. graphische Anpassung der einzelnen Datenpunkte dienten die Programme Clampfit 6.0 (Axon Software, Axon Instruments, Foster City, USA) und SigmaPlot 2000 (Statistical Product & Service Solutions Inc., Chicago, USA).

Folgende Formeln wurden zur Auswertung der Messergebnisse herangezogen:

- Zellmembrankapazität:

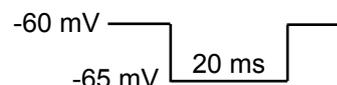
$$C_m = I_{\max} \cdot \tau / U$$

C_m = Kapazität der Zellmembran

I_{\max} = kapazitiver Ladestrom

τ = exponentielle Zeitkonstante

U = Spannungspuls



Der kapazitive Ladestrom wurde durch 20 ms lange hyperpolarisierende Spannungspulse (-5 mV) von einem Haltepotential von -60 mV (= „rechteckförmiger Kommando-Spannungspuls“) ausgelöst.

- Konzentrations-Wirkungskurven: Hill-Gleichung

$$y = a / (1 + [IC_{50} / x]^h)$$

a = maximale Inhibition der Substanz

h = Hill-Koeffizient

x = Konzentration der Substanz

IC₅₀ = Konzentration, bei der ein halb-maximaler Blockeffekt eintritt

- Spannungsabhängige Aktivierung des I_{Ks}-Stroms: Boltzmann-Verteilung

$$A = 1 / (1 + \exp[(V_m - V_{1/2}) / k])$$

A = Aktivierungs-Variable (I_{KTail} / I_{KTail,max})

V_m = Testpotential

V_{1/2} = halb-maximale Aktivierungsspannung

k = Steigung

- Die Aktivierungs- bzw. Deaktivierungskinetik des I_{Ks}-Stroms wurde mit einer zweifach-exponentiellen Funktion des Clampfit 6.0-Programmes folgender Form beschrieben:

$$y = A_0 + A_1 \cdot \exp(t_1 / \tau_1) + A_2 \cdot \exp(t_2 / \tau_2)$$

4 Versuche und Ergebnisse

4.1 Messung der Zellgröße

Die Ganzzelleableitung (Whole-Cell) der Patch-Clamp-Technik kann auch zur Bestimmung der Membrankapazität der Herzmuskelzellen verwendet werden. Die Kapazität liefert indirekt eine Aussage über die Zellgröße, da sie proportional zur Fläche der Zellmembran ($1 \text{ pF} \approx 1 \text{ } \mu\text{m}^2$) ist. Im Methodenteil wurde bereits die Berechnung der Zellmembrankapazität (C_m) erläutert (siehe Kapitel 3.3).

Wie die Abbildung 4.1 zeigt, ergab die Auswertung von 40 ventrikulären Kardiomyozyten eine große Streuung der Einzelwerte (von 61,4 pF bis 225,3 pF). Dies könnte in der Verteilung der Zellen in unterschiedlichen Muskelschichten des Ventrikels begründet sein.

Die durchschnittliche Membrankapazität betrug $122,3 \pm 6,7 \text{ pF}$ und entsprach somit einer Membranoberfläche von ungefähr $122 \text{ } \mu\text{m}^2$.

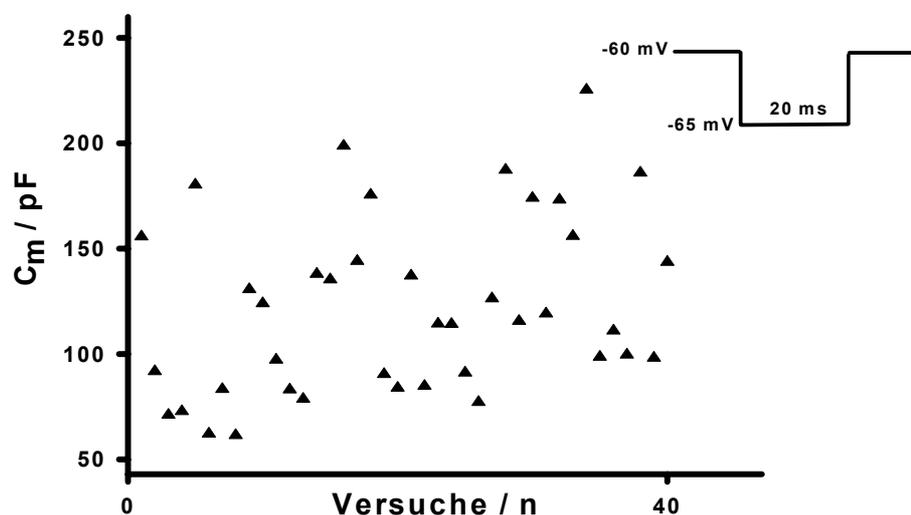


Abbildung 4.1: Versuche zur Messung der Zellmembrankapazitäten (C_m)

Der kapazitive Ladestrom zur Messung von C_m wurde gemäß dem Spannungsprotokoll am rechten Rand der Abbildung ausgelöst:

20 ms lange hyperpolarisierende Spannungspulse (-5 mV) von einem Haltepotential von -60 mV (= „rechteckförmiger Kommando-Spannungspuls“).

Berechnung nach der Formel: $C_m = I_{\max} \cdot \tau / U$ (siehe Methodenteil, Kapitel 3.3).

4.2 Der „Rundown-Effekt“ des I_{Ks} -Kaliumstroms

Zur Auslösung des Spannungsprotokolls wurden die Kardiomyozyten auf ein Haltepotential (V_h) von -50 mV geklemmt. Um gleich bleibende Strombedingungen zu garantieren, wurden vor der Superfusion der verschiedenen Substanzen depolarisierende Spannungspulse auf +70 mV, in 30 s Intervallen für mindestens 3-5 Minuten, appliziert. In dieser Zeit verringerten sich die I_{Ks} -Step- und Tail-Stromamplituden aufgrund des Auswaschens von zytosolischen Regulatorproteinen in der „Standard-rupturierenden“ Ganzzelleableitung („Rundown-Effekt“ von Ionenströmen). Der durchschnittliche Rundown des I_{Ks} Step-Stroms betrug $16,8 \pm 4,0$ %. Ein Gleichgewichtszustand wurde nach ca. 5 Minuten erreicht (Abbildung 4.2, b).

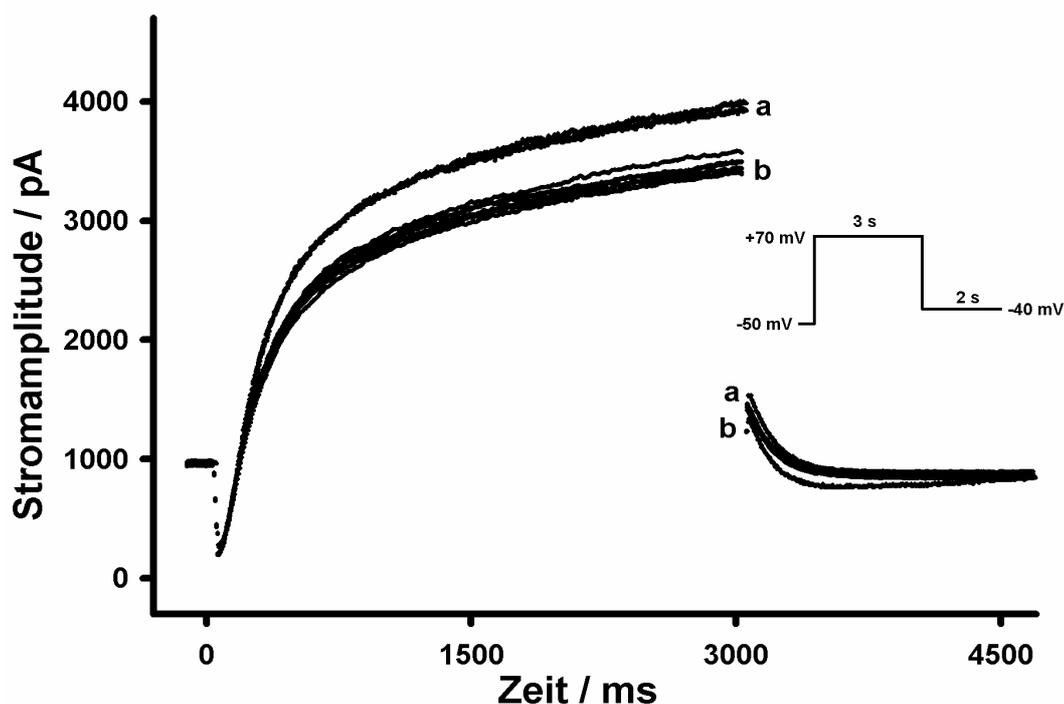


Abbildung 4.2: Original-Stromaufnahme eines Versuches zur Feststellung des I_{Ks} -Rundown-Effektes in ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens

Ströme wurden gemäß dem Spannungsprotokoll am rechten Rand der Abbildung ausgelöst:

Spannungssprung von -50 mV auf +70 mV für 3 s (Step-Strom) und Repolarisation auf -40 mV (Tail-Strom) für 2 s. Die Stromamplituden zu Beginn des Versuchs (a) wurden allmählich geringer und näherten sich einem Gleichgewichtszustand (b) an.

In der folgenden Abbildung (4.3) ist der zeitliche Verlauf dieses Patch-Clamp-Experiments dargestellt. Nach einer Reduktion der Step-Stromamplitude von 3700 pA auf 3300 pA (= 10,8 %) in 3 Minuten wurde über einen längeren Zeitraum ein konstanter Zustand erreicht, indem das Einwaschen I_{Ks} -modulierender Substanzen stattfinden konnte.

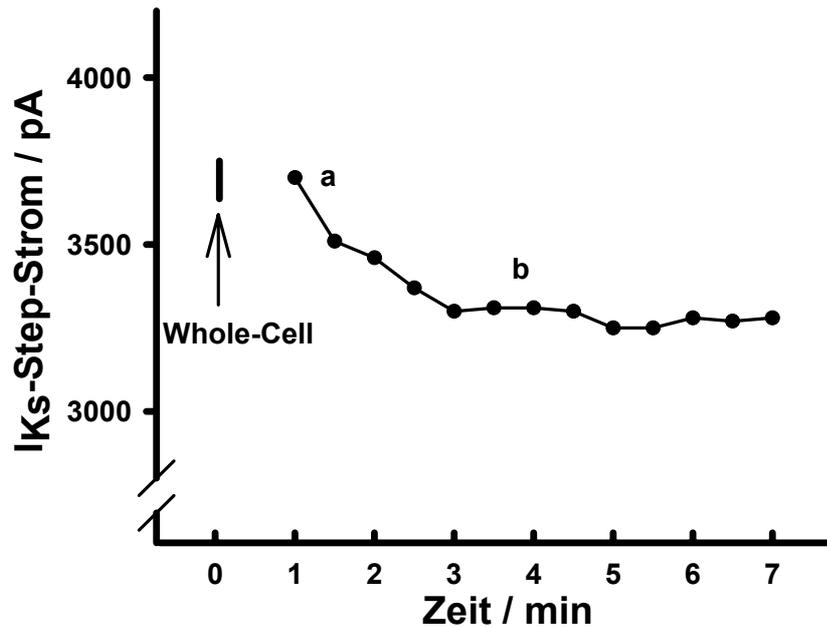


Abbildung 4.3.: „Rundown-Effekt“ des I_{Ks} -Kaliumstroms

Dargestellt ist der Verlauf der I_{Ks} -Step-Stromamplitude des Experiments in Abb. 4.2 über 7 Minuten. Bei „0 Minuten“ wurde der Whole-Cell-Zustand nach Saugimpulsen etabliert. Alle 30 s wurde dann das Spannungsprotokoll, ausgehend von -50 mV, auf + 70 mV abgefahren.

a) schnelle Verringerung der Step-Stromamplitude

b) Gleichgewichtszustand

4.3 Einfluss β -adrenerger Stimulation auf den I_{Ks} -Kaliumstrom

Das sympathische Nervensystem spielt eine große Rolle in der Regulation des kardialen Aktionspotentials. Durch Stimulation des β -adrenergen Systems und der nachgeschalteten Second Messenger kommt es zu einer starken Erhöhung des I_{Ks} -Stroms und zu einer Verkürzung des AP's. In Meerschweinchenventrikelzellen wurde dieser Signalweg schon detailliert beschrieben (Walsh *et al.*, 1989; Yazawa & Kameyama, 1990): β -adrenerge Aktivierung der Adenylatzyklase, die ATP zu cAMP umwandelt, bewirkt eine cAMP-abhängige Phosphorylierung des KvLQT1/minK-Kanalproteins durch die PKA, was deutlich größere I_{Ks} -Amplituden zur Folge hat.

Diese Befunde sollten in den folgenden Patch-Clamp-Versuchen unter den in Kapitel 2 und 3 beschriebenen Laborbedingungen bestätigt werden. Die Experimente wurden im Whole-Cell-Modus bei 36 ± 1 °C durchgeführt.

4.3.1 Stimulation des β -adrenergen Systems durch Isoproterenol

Isoproterenol und Isoprenalin sind Strukturanaloga der endogenen Katecholamine (Phenylethanolamine) Noradrenalin und Adrenalin. Sie rufen eine effektive Stimulation β -adrenerger Rezeptoren hervor.

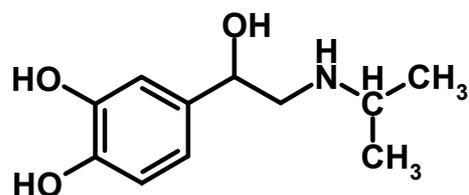


Abbildung 4.4: Isoproterenol

Der I_{Ks} -Strom wird von diesen Substanzen mit einer EC_{50} von ca. 10^{-8} mol/l gesteigert (Yazawa & Kameyama, 1990).

Wie aus den Originalaufnahmen in Abbildung 4.5 ersichtlich ist, führte die Applikation von 100 nmol/l Isoproterenol zu einem sichtbaren Anstieg der Stromkurven von I_{Ks} . Das I_{Ks} -Spannungsprogramm (Abbildungsmitte, siehe auch Methodenteil, Kapitel 3.2.6) wurde nach dem Erreichen gleich bleibender Stromamplituden angewandt und mit einer Frequenz von 0,1 Hz von +10 mV bis +70 mV in 10 mV Schritten gepulst (= Step-Stromkomponente). Die Tail-Ströme wurden nach einer Repolarisation auf -40 mV ermittelt. Die Stromamplituden wurden nach zehnmütigem Einwaschen des β -Agonisten gemessen.

Die maximalen Stromamplituden wurden bei +70 mV ausgewertet. Der aktivierende Step-Strom wurde um $108,5 \pm 12,7$ % erhöht. Der deaktivierende Tail-Strom zeigte eine Steigerung von $81,3 \pm 8,0$ % ($n = 5$, $p < 0,05$).

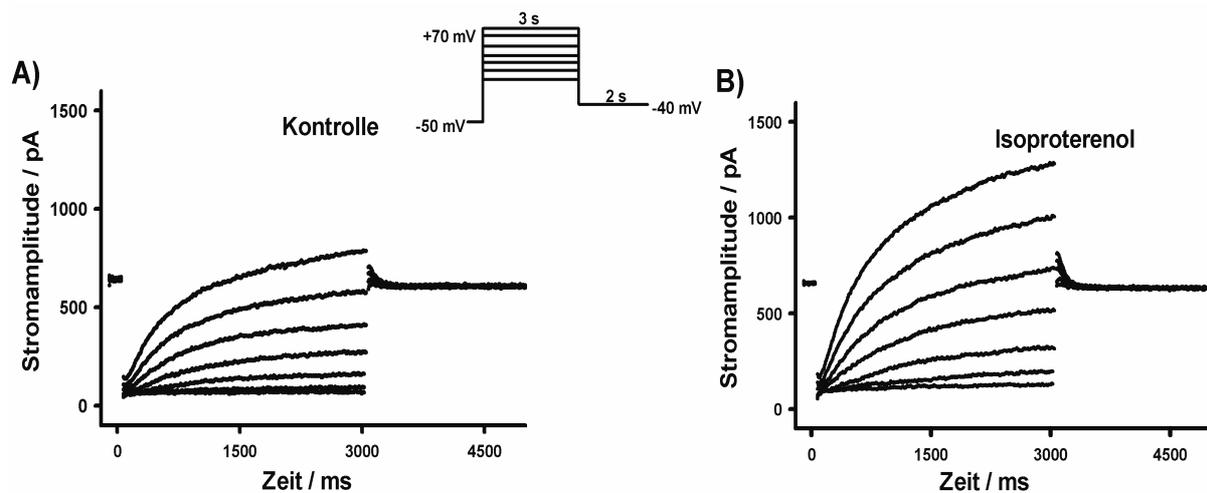


Abbildung 4.5: Einfluss des β -Agonisten Isoproterenol (100 nmol/l) auf die langsame Komponente des Delayed Rectifier- K^+ -Stroms I_{Ks} in ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens

Stromaufzeichnungen im Standard-Whole-Cell-Modus bei 36 ± 1 °C. $V_h = -50$ mV. Mit einer Frequenz von 0,1 Hz wurden die Zellen zunächst auf positive Potentiale von +10 mV bis +70 mV in 10 mV-Stufen mit 3 s Länge geklemmt. Darauf folgte eine Repolarisationsphase auf -40 mV für 2 s (siehe Pulsprotokoll in der Abbildungsmitte). Zur Unterdrückung des $I_{Ca,L}$ - und I_{Kr} -Stroms, befanden sich 1 μ mol/l Nisoldipin bzw. 1 μ mol/l Dofetilid in der Tyrode-Badlösung.

A): Kontrollstrom

B): Strom nach 10minütiger Superfusion von 10^{-7} mol/l Isoproterenol.

4.3.2 Aktivierung der Proteinkinase A durch Forskolin und 8-CPT-cAMP

Um den bekannten Einfluss der cAMP-abhängigen PKA auf I_{Ks} in unserem System zu evaluieren, wurde der intrazelluläre cAMP-Spiegel in den Herzmuskelzellen gesteigert.

Abbildung 4.6 zeigt das Ergebnis der Versuche in Gegenwart von 1 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin, einem pflanzlichen Diterpenalkaloid mit Adenylatzyklase(AC)-aktivierenden Eigenschaften (Seamon & Daly, 1986). Durch die erhöhte AC-Tätigkeit in der Zelle wird vermehrt ATP in cAMP umgewandelt. Vergleichbar mit dem β -Agonisten Isoproterenol stimulierte auch diese Substanz den I_{Ks} signifikant. Die maximale Amplitude des Step-Stroms bei +70 mV wurde um $62,0 \pm 7,9 \%$ erhöht. Der Tail-Strom stieg um $81,4 \pm 15,0 \%$ ($n = 7$, $p < 0,05$).

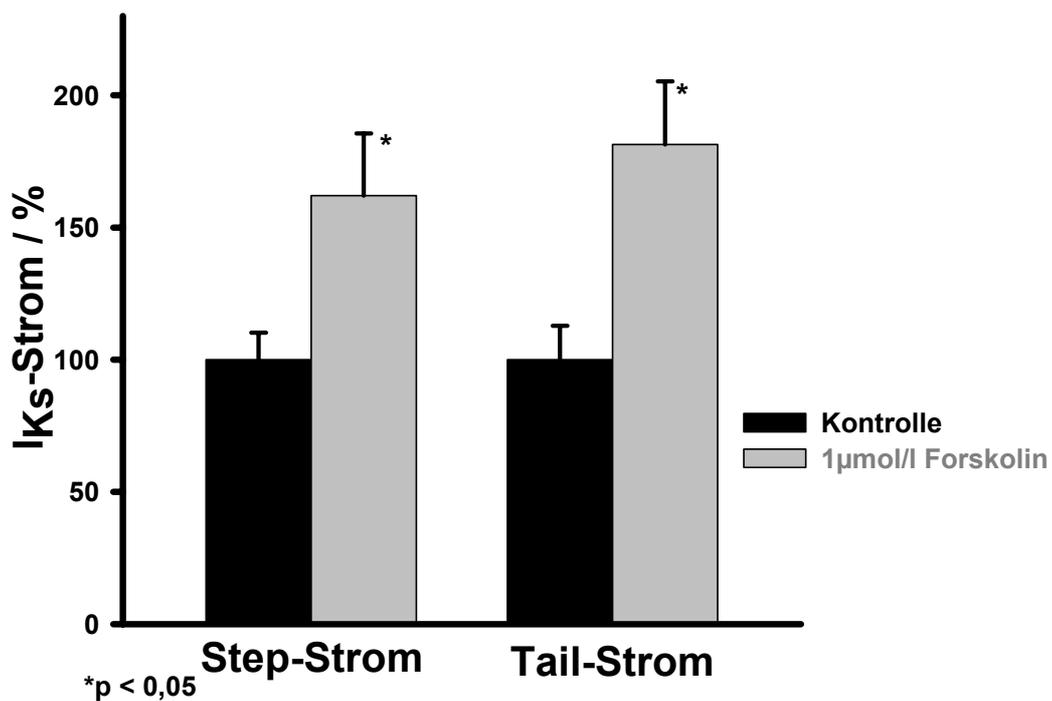


Abbildung 4.6: Steigerung des I_{Ks} -Stroms durch Applikation von 1 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin
Die Kardiomyozyten wurden 10 Minuten mit der Substanz umspült. Danach wurden die Stromamplituden bei +70 mV (Step-Strom) bzw. -40 mV (Tail-Strom) ausgewertet, $n = 7$.

Eine weitere Methode, um die intrazelluläre cAMP-Konzentration zu erhöhen, ist die Dialyse der Herzmuskelzellen mit einem membrangängigen cAMP-Analogon. In Anlehnung an die Versuche von Walsh *et al.*, 1989, wurden 50 $\mu\text{mol/l}$ 8-CPT-cAMP verwendet. Es wurde direkt zur Pipettenlösung (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.4.3.1) zugesetzt und diffundierte nach Rupturierung der Membran langsam in die Zelle. Man nimmt an, dass 90 % der Substanz ($M_r = 400\text{-}500$ D, Diffusionskoeffizient = $5 \cdot 10^{-6}$ cm^2/s) nach ca. 5 Minuten in das Zellinnere gelangt ist (Kameyama *et al.*, 1985). Die Stromaufnahmen der Abbildung 4.7 belegen diesen Zeitverlauf. Die Stromspur (b) wurde nach 5 Minuten aufgezeichnet und zeigte eine deutliche Erhöhung der Stromamplituden nach der Rupturierung der Zellmembran (a). Deshalb wurden die I_{Ks} -Ströme der Patch-Clamp-Versuche nach dieser Periode ausgewertet.

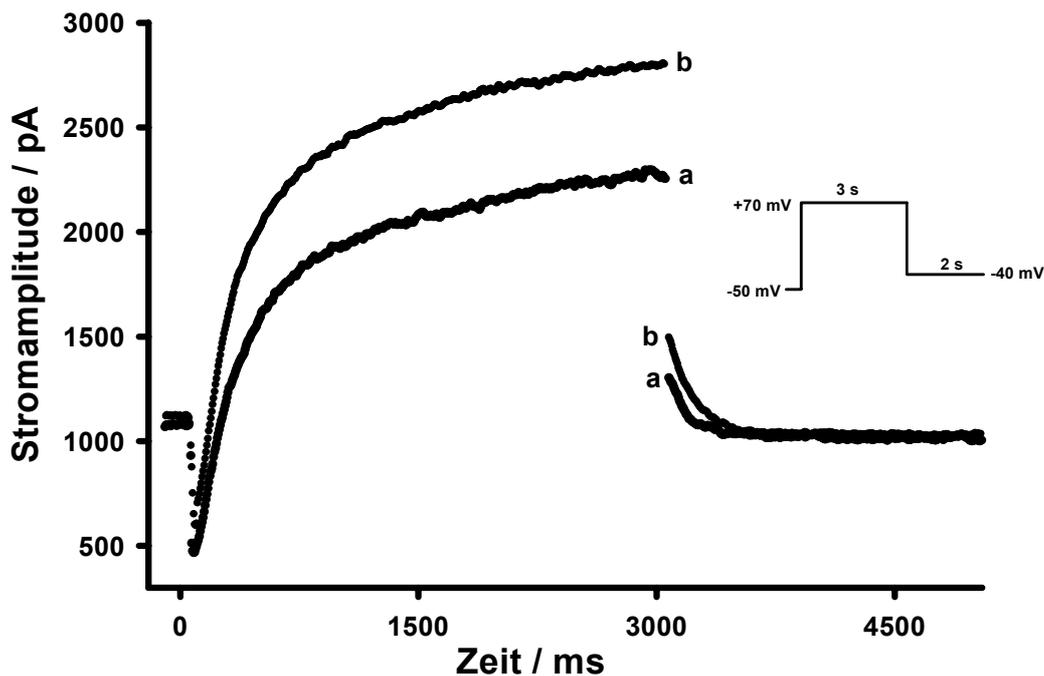


Abbildung 4.7: Effekt von 50 $\mu\text{mol/l}$ 8-CPT-cAMP auf die I_{Ks} -Stromamplituden

Ströme wurden gemäß dem Spannungsprotokoll am rechten Rand der Abbildung ausgelöst:

Spannungssprung von -50 mV auf $+70$ mV für 3 s (Step-Strom) und Repolarisation auf -40 mV (Tail-Strom) für 2 s. Die Stromamplituden unter Kontrollbedingungen (a) wurden allmählich durch Einwirkung des cAMP-Analogons gesteigert und waren nach ca. 5 Minuten (b) maximal.

Im Vergleich zu einer Gruppe von Zellen mit „normaler“ Pipettenlösung (schwarze Balken in Abbildung 4.8), waren die relativen Stromdichten von I_{Ks} , d.h. die Stromamplitude (pA) in Bezug auf die Zellgröße (pF), in der Gruppe von Zellen mit cAMP-haltiger Pipettenlösung um ein Vielfaches gesteigert: die Step-Komponente um $177,6 \pm 15,1 \%$ und die Tail-Komponente um $304,8 \pm 48,5 \%$ bei +70 mV (graue Balken in Abbildung 4.8).

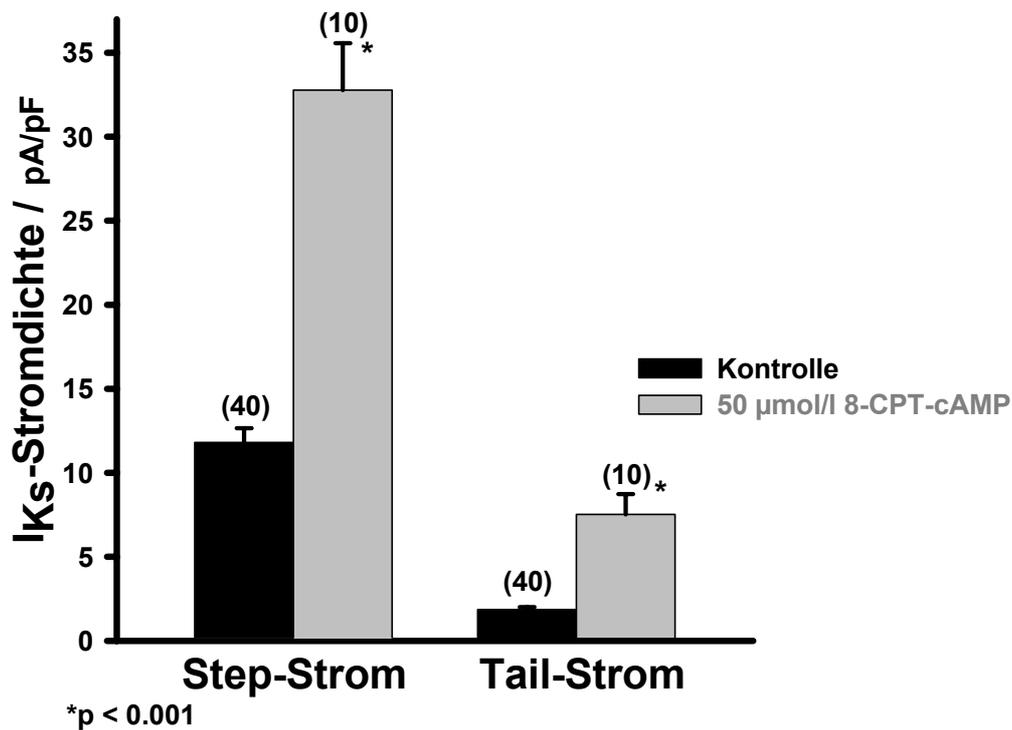


Abbildung 4.8: Stimulation des I_{Ks} durch Zugabe von 50 $\mu\text{mol/l}$ 8-CPT-cAMP zur Pipettenlösung

Gemessen wurden die Step- und Tail-Ströme nach Depolarisation auf +70 mV und Rückkehr auf -40 mV und mit den jeweiligen Zellgrößen (= „Stromdichten“) verrechnet. Die Anzahl der Zellversuche ist in Klammern dargestellt.

4.4 Aktivierung des β_3 -AR's durch Isoproterenol und Noradrenalin

Bereits Gauthier et al. konnten in humanen Ventrikelproben zeigen, dass die beiden Katecholamine Isoproterenol und Noradrenalin bei gleichzeitiger Hemmung der β_1 - und β_2 -Rezeptoren eine Affinität für den β_3 -AR aufwiesen. Die Wirkung war negativ inotrop und somit dem β_1 -AR entgegengesetzt (Gauthier *et al.*, 1996; 1998). Im Meerschweinchenventrikel wurde später ebenso ein pharmakologischer Nachweis des β_3 -AR's erbracht (Gauthier *et al.*, 1999; Kitamura *et al.*, 2000).

Die folgenden Patch-Clamp-Experimente mit Isoproterenol und Noradrenalin wurden deshalb unter selektiver β_1 - und β_2 -Inhibierung (1 $\mu\text{mol/l}$ Atenolol bzw. 1 $\mu\text{mol/l}$ ICI 118,551) durchgeführt.

4.4.1 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung

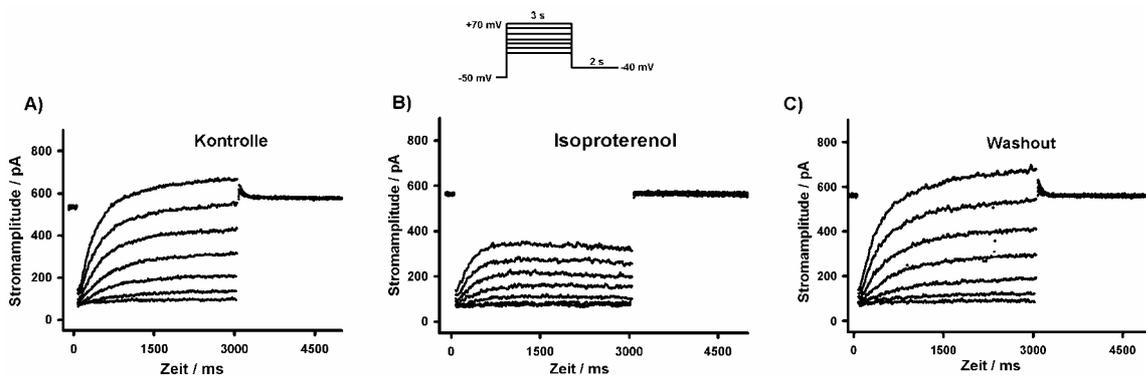


Abbildung 4.9: Einfluss des β -Agonisten Isoproterenol (10^{-6} mol/l) auf den I_{K_S} -Strom nach Inhibition der β_1 - und β_2 -Rezeptoren

Stromaufzeichnungen im Standard-Whole-Cell-Modus bei 36 ± 1 °C, gemäss Pulsprotokoll in der Abbildungsmittle. Zur Hemmung der β_1 - und β_2 -Rezeptoren befanden sich 1 $\mu\text{mol/l}$ Atenolol und ICI 118,551 in der Badlösung.

A): Kontrollstrom **B):** Strom nach 10minütiger Superfusion von 10^{-6} mol/l Isoproterenol **C):** Strom nach dem Auswaschen der Substanz („Washout“)

Die Superfusion von 1 $\mu\text{mol/l}$ Isoproterenol führte zu signifikanten Verringerungen der I_{Ks} -Stromdichten (siehe Abbildung 4.9, **B**: $42,1 \pm 2,7 \%$ und $44,2 \pm 3,3 \%$ Hemmung der Step- bzw. der Tail-Komponente von I_{Ks}). Wie in Abbildung 4.9, **C** zu sehen ist, war der hemmende Effekt einer β_3 -AR-Stimulation nach Auswaschen der Substanz nahezu reversibel ($87,7 \pm 4,3 \%$ der Kontrolle).

Eine dem Isoproterenol vergleichbare Potenz am β_3 -AR besitzt das körpereigene Hormon Noradrenalin (Bylund, 1994). Auch mit dieser Substanz ist eine Verringerung von I_{Ks} bei einer Spannung von +70 mV festzustellen. Bei gleichzeitiger Inhibierung der β_1 - und β_2 -AR wurde mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Noradrenalin eine Abnahme des Step-Stroms von $31,6 \pm 2,0 \%$ und des Tail-Stroms von $35,0 \pm 3,4 \%$ erreicht.

In Abbildung 4.10 sind die eingesetzten Konzentrationen von Isoproterenol (**A**) und Noradrenalin (**B**) und die zu beobachteten Inhibierungen des Step-Stroms bei +70 mV dargestellt. Aufgrund der deutlich größeren Amplituden der aktivierenden Step-Ströme wurde hier und im weiteren Verlauf der Versuchsreihen nur diese I_{Ks} -Komponente analysiert.

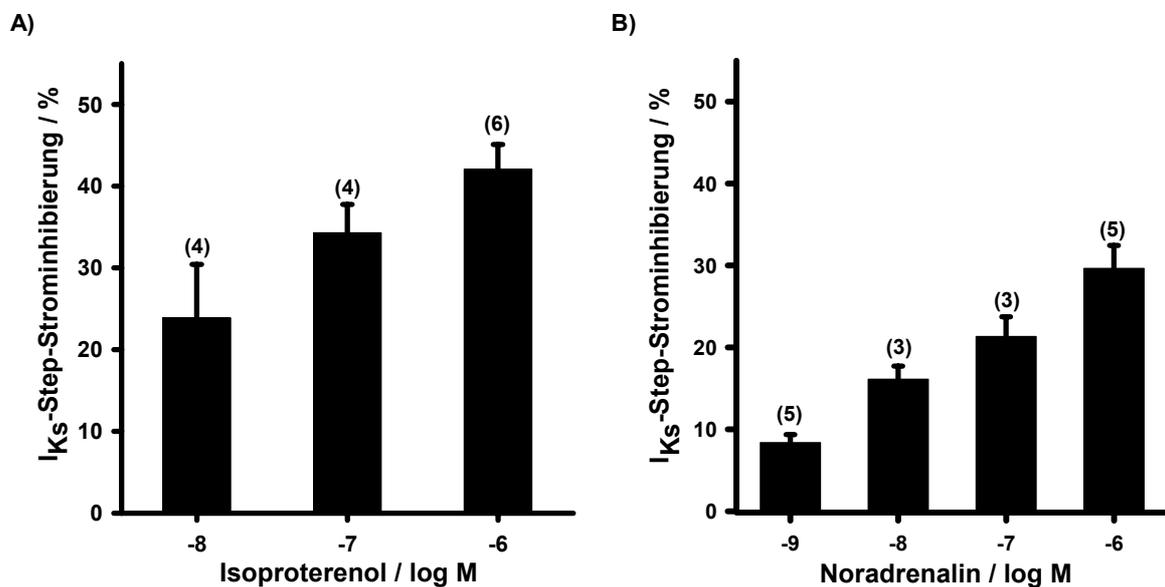


Abbildung 4.10: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der beiden β -Agonisten Isoproterenol und Noradrenalin auf den I_{Ks} Step-Strom bei +70 mV, unter Blockade der β_1 - und β_2 -AR. Ausgewertet wurde der Step-Strom bei +70 mV. Die Anzahl der Versuche (n) der einzelnen Konzentrationen ist in Klammern dargestellt.

4.4.2 Zeitverlauf der I_{Ks} -Strominhibierung

Die zeitlichen Verläufe der I_{Ks} -Stromverringering wurden mit dem „Ein-Puls-Protokoll“, ausgehend von einem Haltepotential von -50 mV auf +70 mV und Repolarisierung auf -40 mV (siehe Kapitel 4.2), registriert. Isoproterenol und Noradrenalin wiesen eine sehr ähnliche Charakteristik in ihrer I_{Ks} -Hemmung auf.

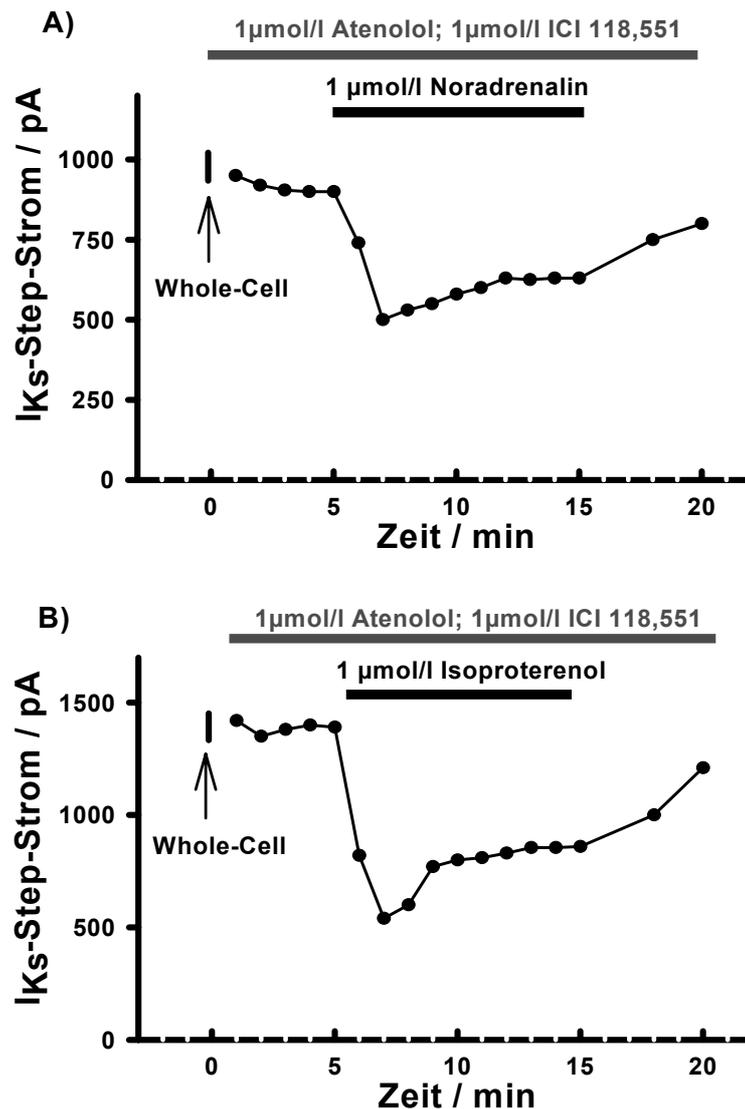


Abbildung 4.11: Zeitverläufe der I_{Ks} -Step-Strom-Verringerung durch Noradrenalin (A) bzw. Isoproterenol (B), bei β_1 -/ β_2 -AR-Blockade

Es ist der Verlauf der I_{Ks} -Step-Stromamplitude über 20 Minuten dargestellt. Bei „0 Minuten“ wurde nach Saugimpulsen der Whole-Cell-Zustand etabliert.

Wie in Abbildung 4.11 (**A** und **B**) ersichtlich, konnte nach ca. 2-minütigem Einwaschen der Substanz ein sehr schneller Effekt beobachtet werden (60-70 % Inhibierung des I_{K_S} Step-Stroms), der im Laufe der Superfusion schwächer wurde und nach ca. 8-10 Minuten ein Gleichgewicht (Steady-State) erreichte. Die gemessenen Ergebnisse der β_3 -AR-vermittelten I_{K_S} -Veränderungen bezogen sich immer auf diesen Steady-State-Zustand.

4.5 Selektive β_3 -AR-Stimulation durch BRL 37344 und CL 316,243

Um den Einfluss des β_3 -AR's in der adrenergen Regulation des I_{K_S} -Kanals näher charakterisieren zu können, wurden im folgenden die spezifischen β_3 -Agonisten BRL 37344 und CL 316,243 (Abbildung 4.12, **A** und **B**) verwendet. Beide haben eine Aryl-substituierte Phenylethanolamin-Struktur, die den Substanzen eine hohe Affinität für den β_3 -AR verleiht (Dolan *et al.*, 1994; El Hadri *et al.*, 2001). Im Meerschweinchenventrikel konnte sowohl für BRL 37344 als auch für CL 316,243 ein β_3 -adrenerger Effekt nachgewiesen werden (Gauthier *et al.*, 1999; Kitamura *et al.*, 2000).

Um geringfügig vorhandene β_1 - und β_2 -Einflüsse auszuschließen, befanden sich wiederum 1 $\mu\text{mol/l}$ Atenolol und 1 $\mu\text{mol/l}$ ICI 118,551 in der Tyrode-Badlösung.

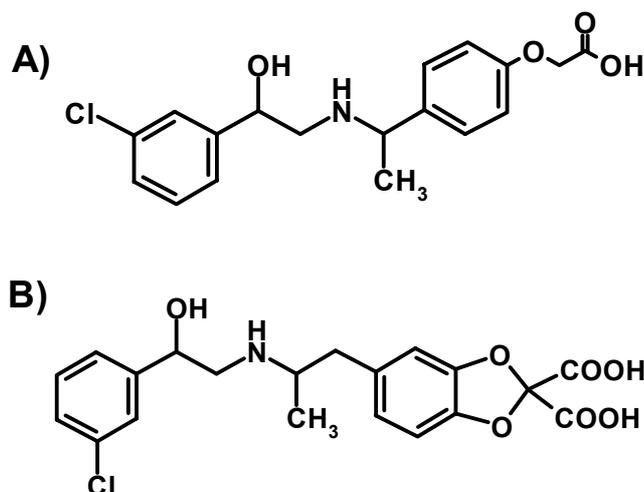


Abbildung 4.12: Strukturformeln der β_3 -Agonisten BRL 37344 (A) und CL 316,243 (B)

4.5.1 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung

Die Originalstromaufnahmen von I_{Ks} in Abbildung 4.13 ergaben eine Bestätigung der bisherigen Befunde. 1 $\mu\text{mol/l}$ des β_3 -Agonisten BRL 37344 verringerte die maximalen Stromamplituden bei +70 mV um $39,2 \pm 5,9 \%$ (Step) bzw. $39,6 \pm 7,0 \%$ (Tail) ($n = 6$, $p < 0,05$). Der Effekt war nach 10 Minuten „Washout“ teilweise reversibel ($77,7 \pm 5,5 \%$).

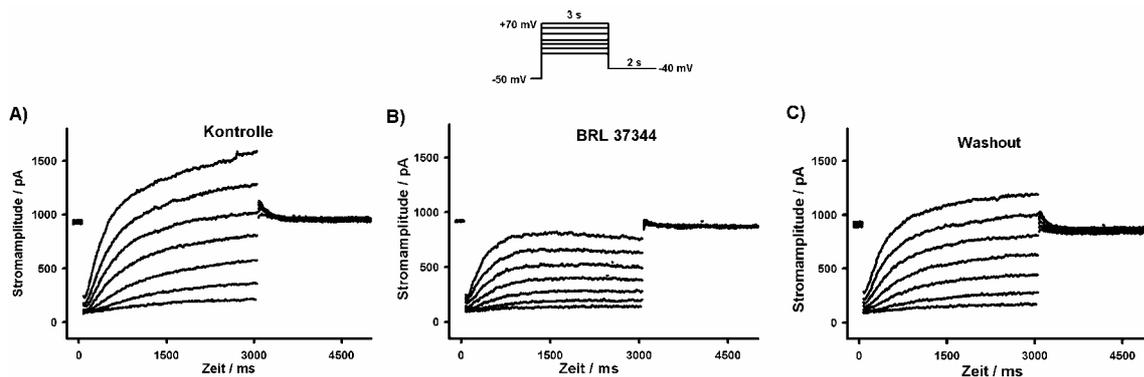


Abbildung 4.13: Einfluss des β -Agonisten BRL 37344 (10^{-6} mol/l) auf den I_{Ks} -Strom nach Inhibition der β_1 - und β_2 -Rezeptoren

Stromaufzeichnungen im Standard-Whole-Cell-Modus bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$, gemäss Pulsprotokoll in der Abbildungsmittle. Zur Hemmung der β_1 - und β_2 -Rezeptoren befanden sich 1 $\mu\text{mol/l}$ Atenolol und ICI 118,551 in der Badlösung.

A): Kontrollstrom

B): Strom nach 10minütiger Superfusion von 10^{-6} mol/l BRL 37344

C): Strom nach dem Auswaschen der Substanz

Wie die nachfolgende Abbildung 4.14 zeigt, waren die Veränderungen des I_{Ks} -Stroms durch 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 nicht spannungsabhängig. Im Spannungsbereich von +10 mV bis +70 mV betrug die durchschnittliche Verringerung des I_{Ks} -Step-Stroms $41,6 \pm 1,5 \%$.

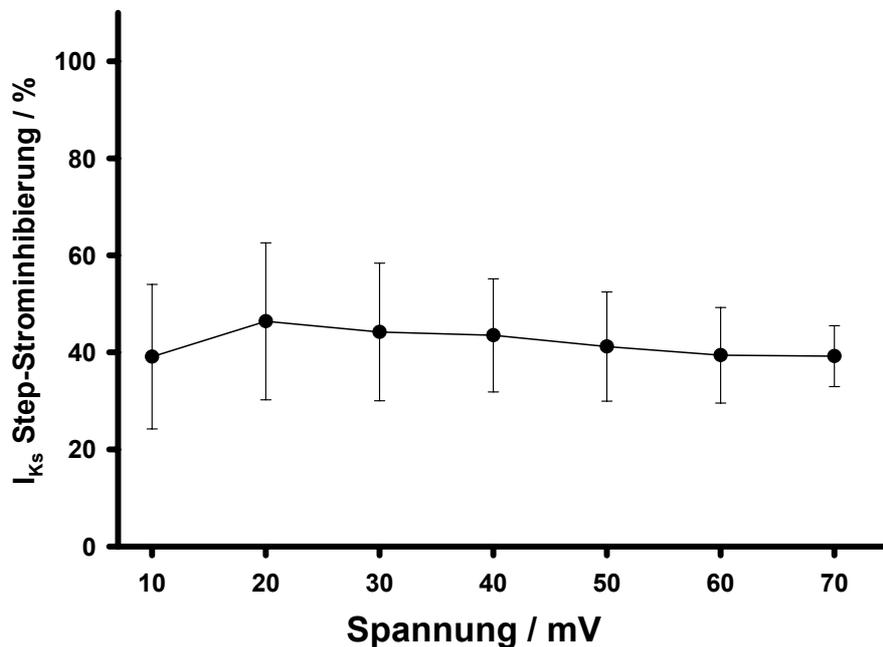
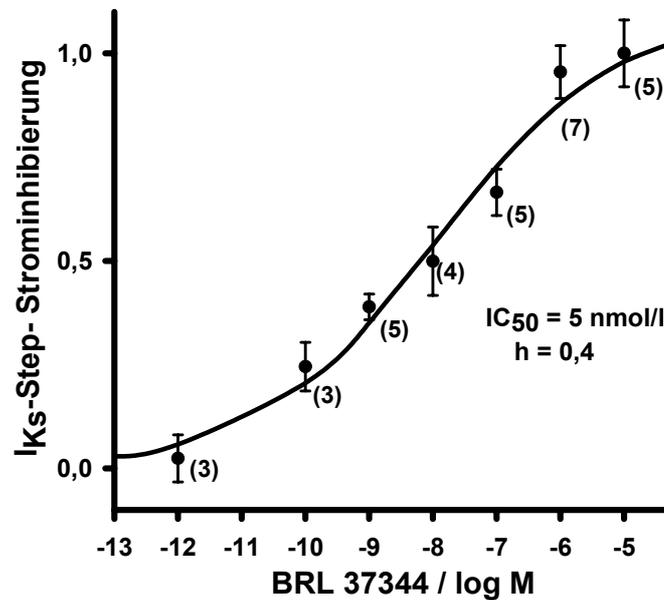


Abbildung 4.14: Spannungsbereich der Hemmung der I_{Ks} -Step-Stromamplituden durch 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344.

Es wird das Ergebnis aus sieben Versuchen mit dem Pulsprotokoll aus Abbildung 4.13 gezeigt. Die Verringerung der Stromgröße blieb im gesamten Spannungsbereich (+10 bis +70 mV) konstant, $n = 7$.

CL 316,243 ist ein β_3 -Agonist mit β_1/β_2 -antagonistischen Eigenschaften. Die Konzentrations-Wirkungskurven von BRL 37344 und CL 316,243, bezogen auf die Inhibition der Step-Amplitude bei +70 mV, sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Die maximale Hemmung von $41,0 \pm 8,1$ % bzw. $48,7 \pm 1,0$ % war jeweils bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ zu sehen und wurde als 1 (100 %) gesetzt. Alle anderen Konzentrationen bezogen sich auf diesen Maximalwert. Die halbmaximalen Hemmkonzentrationen (IC_{50}) betragen 5 nmol/l für BRL 37344 und 32 nmol/l für CL 316,243.

A)



B)

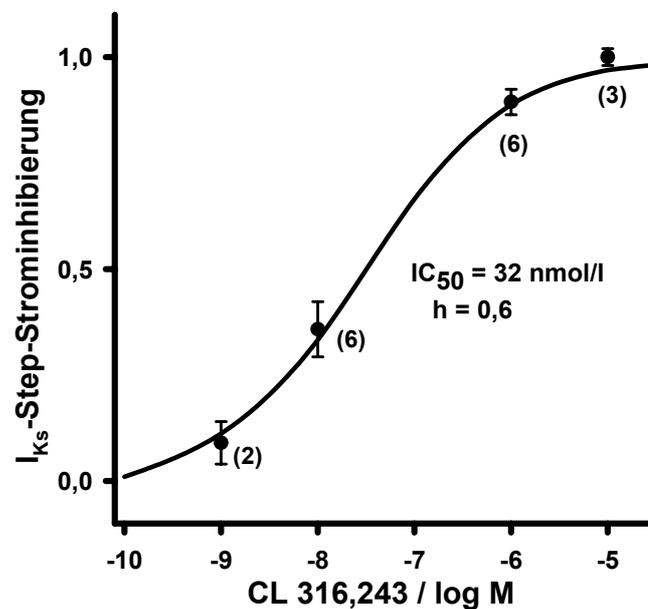


Abbildung 4.15: Dosis-Wirkungskurven von BRL 37344 und CL 316,243

Es wurde der Step-Strom bei +70 mV ausgewertet. Die maximale Hemmung wurde als 100 % (1,0) gesetzt und alle anderen darauf bezogen. Die Kurven wurden mit Hilfe der Hillgleichung: $y = a / (1 + [IC_{50} / x]^h)$, wie im Methodenteil (Kapitel 3.3) erläutert, angeglichen.

Aufgrund der vorhandenen β_3 -AR-Selektivität von BRL 37344 wurden die gleichen Versuche ohne β_1 -/ β_2 -AR-Blockade (Atenolol, ICI 118,551) durchgeführt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den vorangegangenen Versuchen (I_{K_S} -Step-Stromverringering: $42,3 \pm 5,1 \%$, $n = 5$ vs. $39,2 \pm 5,9 \%$, $n = 6$, unter β_1 -/ β_2 -AR-Blockade).

4.5.2 Zeitverlauf der I_{K_S} -Strominhibierung am Beispiel von BRL 37344

Der Effekt einer β_3 -adrenergen Inhibierung des I_{K_S} -Stroms durch BRL 37344 zeigte auch einen dem Isoproterenol vergleichbaren zeitlichen Ablauf (Abbildung 4.16): Initial eine starke Inhibierungsphase (bei $1 \mu\text{mol/l}$ BRL 37344: Verringerung des Step-Stroms um $55,8 \pm 4,5 \%$ nach 2 Minuten), gefolgt von einer langsamen „Erholungsphase“ bis hin zu einem Gleichgewichtszustand.

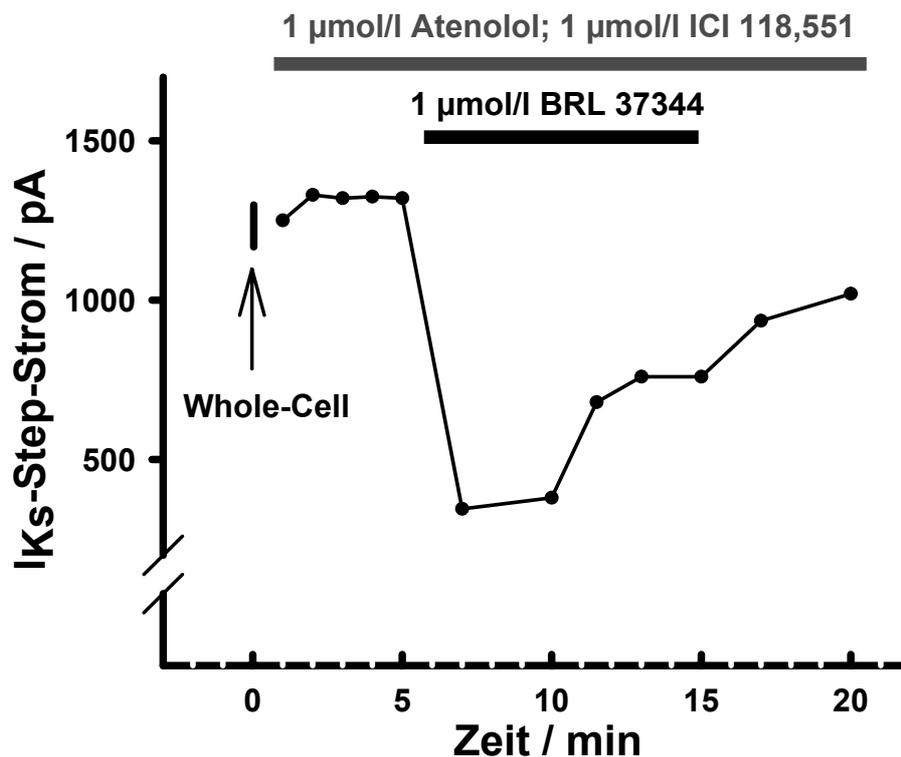


Abbildung 4.16: Zeitverlauf der I_{K_S} -Step-Strom-Inhibierung durch BRL 37344 unter Inhibierung der β_1 - und β_2 -AR

Es ist der Verlauf der I_{K_S} -Step-Stromamplitude über 20 Minuten dargestellt. Bei „0 Minuten“ wurde nach Saugimpulsen der Whole-Cell-Zustand etabliert.

4.5.3 Wirkung von BRL 37344 im Perforated-Patch

Wie in Kapitel 4.2 erwähnt, unterliegt der I_{Ks} -Strom in der Standard-Whole-Cell Methode der Patch-Clamp-Technik einem ausgeprägten Rundown-Effekt, da nach der Rupturierung der Zellmembran wichtige zytoplasmatische Substanzen (ATP, Second Messenger) durch Austausch mit der Pipettenlösung ausgewaschen werden. Dies hat eine fortschreitende Verringerung der I_{Ks} -Stromamplituden zur Folge.

Um den Effekt des β_3 -Agonisten BRL 37344 bei nahezu unverändertem intrazellulären Milieu zu untersuchen, wurde der perforierte (Perforated)-Patch mit Amphotericin B (250 $\mu\text{g/ml}$) etabliert. Durch den Einbau des Porenbildners erreicht man zwischen Pipette und Zellinneren eine elektrisch leitende Verbindung. In der Regel dauert die Formation der ca. 0,8 nm großen „Löcher“ in der Membran nach der Sealbildung etwa 5-10 Minuten. Jedoch wurde bei ca. 75 % der Herzmuskelzellen nach 20 Minuten (noch) kein Zugang zur Zelle erreicht.

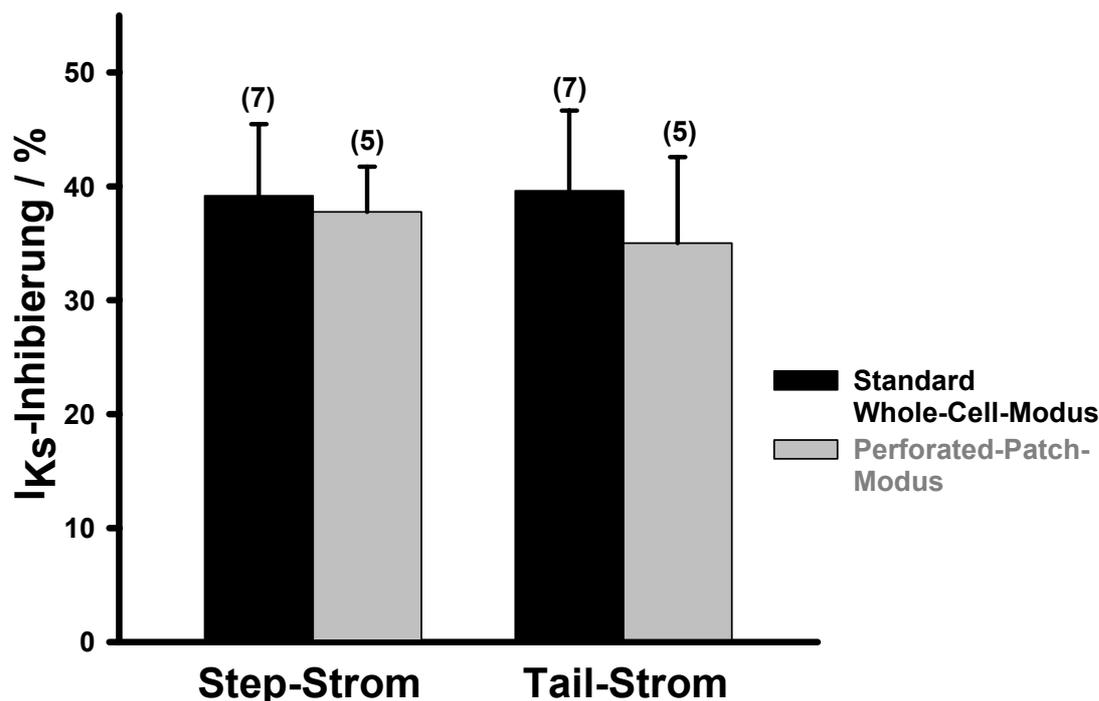


Abbildung 4.17: I_{Ks} -Stromverringierung durch 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 im Perforated-Patch-Modus der Patch-Clamp-Technik

Es ist ein Vergleich der Step- und Tail-Stromhemmungen von 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 bei +70 mV in der herkömmlichen, rupturierenden Ganzzelleableitung (schwarze Balken) und in der perforierenden Variante (graue Balken) dargestellt.

Bei den verwertbaren Versuchen konnte nach 5 Minuten der I_{Ks} -Strom aufgezeichnet werden. Der Rundown war sehr gering und betrug nach weiteren 5 Minuten $4,4 \pm 1,3 \%$ ($n = 4$) in der Maximalamplitude des Step-Stroms bei +70 mV.

Ferner erschwerte das Antibiotikum die Aufrechterhaltung eines stabilen Giga-Seals während der laufenden Experimente.

Das Ergebnis der Perforated-Patch-Versuche mit 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 veranschaulicht die vergleichende Abbildung 4.17. Es wurde wiederum ein Spannungspuls auf +70 mV (Step) mit Rückkehr auf -40 mV (Tail) appliziert. Die Unterschiede zum herkömmlichen Whole-Cell-Modus waren nicht signifikant.

4.5.4 Charakterisierung der I_{Ks} -Strominhibierung

Die Reduzierung der Stromamplituden von I_{Ks} kann in veränderten Kanaleigenschaften begründet sein. Es wurden daher die Kinetik der Aktivierung bzw. Deaktivierung und die spannungsabhängige Aktivierung des Kaliumkanals untersucht. Diese Parameter werden insbesondere zur Analyse des Blockademechanismus von Klasse-III-Antiarrhythmika, d. h. von direkten I_{Ks} -Kanal-Inhibitoren, verwendet (Bosch *et al.*, 1998; Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990).

4.5.4.1 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Um eine mögliche Veränderung der spannungsabhängigen Aktivierung des I_{Ks} -Kanals zu untersuchen, wurde ein erweitertes Spannungspulsprogramm angewandt. Es wurden nun Potentiale von -30 mV bis +70 mV in 10 mV Schritten ($V_h = -50$ mV) betrachtet. Damit konnte auch der Beginn einer I_{Ks} -Kanalaktivierung genauer erfasst werden.

Zur Auswertung der einzelnen Ergebnisse wurden „normalisierte Aktivierungskurven“ unter Kontrollbedingungen und nach Gabe von 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 erstellt. Man bezieht dabei die Stromamplituden der Tail-Ströme unterschiedlicher Spannungen ($I_{Ks, Tail}$) auf die maximale Amplitude bei +70 mV ($I_{Ks, Tail, max}$).

Die Datenpunkte wurden durch einen Boltzmann-Fit im Clampfit 6.0-Programm angeglichen und daraus die halb-maximale Aktivierung ($V_{1/2}$) und die Steigung (k) bestimmt (siehe Abbildung 4.18).

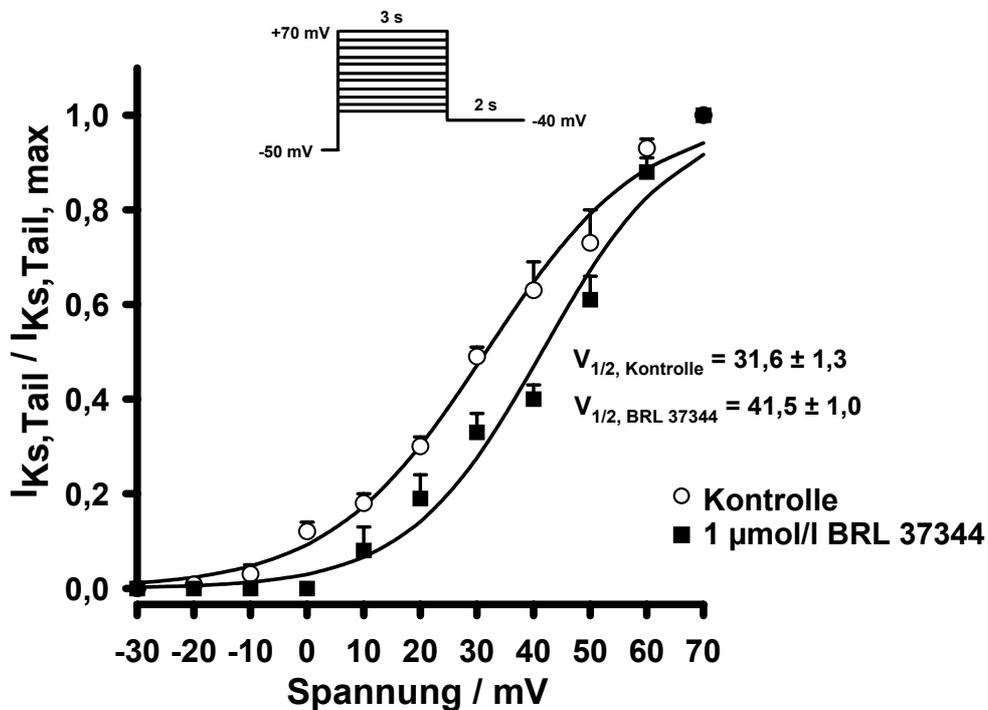


Abbildung 4.18: Wirkung von 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 auf die spannungsabhängige Aktivierung des I_{Ks} -Kaliumkanals

Die Aktivierungskurven wurden durch Auftragen der Tail-Stromamplituden gegen die Spannung ($n = 7$) ermittelt. Die Datenpunkte der einzelnen Spannungspulse ($I_{Ks,Tail}$) wurden auf den maximalen Tail-Strom bei +70 mV bezogen ($I_{Ks,Tail,max}$) und mit einem Boltzmann-Fit der Form: $A = 1 / (1 + \exp[V_m - V_{1/2}] / k)$ (siehe auch den Methodenteil, Kapitel 3.3) angepasst.

Der β_3 -Agonist verschob die Aktivierungskurve von I_{Ks} zu positiveren Spannungen ($V_{1/2,Kontrolle} = 31,6 \pm 1,3$ mV, $V_{1/2,BRL} = 41,5 \pm 1,0$ mV; $p < 0,001$). Die Steigung k wurde hingegen nicht signifikant verändert ($k_{Kontrolle} = 13,8 \pm 1,4$ mV, $k_{BRL} = 11,9 \pm 1,1$ mV; $p = 0,4$).

4.5.4.2 Stromkinetik

Es wurden die maximalen Stromspuren der Step- und Tail-Komponente bei einer Spannung von +70 mV analysiert. Der Zeitverlauf der Kurven konnte durch Anlegen einer Exponentialfunktion mit zwei Komponenten charakterisiert werden (siehe Methodenteil, Kapitel 3.3). Die Werte aus diesen „Fits“ des Clampfit 6.0-Programmes sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

	Aktivierung (+70 mV)		Deaktivierung (-40 mV)	
	τ_{schnell}	τ_{langsam}	τ_{schnell}	τ_{langsam}
Kontrolle (ms)	230,4 ± 10,3	2004,9 ± 278,8	107,4 ± 13,0	482,9 ± 90,7
1 µmol/l BRL 37344 (ms)	32,4 ± 0,3 [*]	254,3 ± 14,5 [*]	98,6 ± 36,4	533,0 ± 130,3

Tabelle 4.1: Übersicht der Kinetikparameter des aktivierenden (Step-) und deaktivierenden (Tail-) I_{Ks} -Stroms nach Superfusion von 1 µmol/l BRL 37344

Die Zeitkonstanten (τ) wurden durch Beschreibung der Step- und Tail-Stromkurven mit einer bi-exponentialen Funktion im Clampfit 6.0-Programm ermittelt. Signifikante Veränderungen sind durch ^{*} $p < 0,001$ angezeigt. Fehlerangaben sind SEM, $n = 7$.

Es wurde deutlich, dass unter dem Einfluss von BRL 37344 die beiden Zeitkonstanten des aktivierenden I_{Ks} -Stroms (τ_{schnell} und τ_{langsam}) deutlich erhöht wurden.

4.5.5 Wirkung von BRL 37344 unter Blockade des β_3 -AR's durch Bupranolol

Bupranolol ist ein $\beta_{1,2,3}$ -Antagonist (Arch & Kaumann, 1993) mit einer Aryloxypropanolamin-Grundstruktur. Kaumann konnte schon 1989 feststellen, dass diese Substanz in höheren Konzentrationen selektiv am β_3 -AR wirkt.

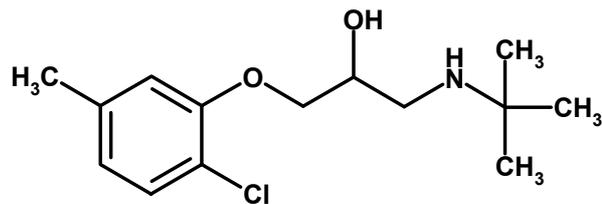


Abbildung 4.19: Bupranolol

Zur weiteren Evaluierung des β_3 -adrenergen Einflusses auf I_{Ks} wurde der Kontroll-Tyrodolösung 1 $\mu\text{mol/l}$ Bupranolol zugefügt. Die Patch-Clamp-Versuche mit BRL 37344 wurden dann, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, durchgeführt.

Die Auswertung der Stromkurven ergab, dass bei Anwesenheit des Antagonisten die β_3 -AR-induzierte I_{Ks} -Stromhemmung signifikant reduziert wurde. Die Abbildung 4.20 veranschaulicht dies am Beispiel eines Versuches mit 100 nmol/l BRL 37344. Die Stromamplituden von Kontrolle (**A**) und BRL 37344 (**B**) waren nahezu identisch.

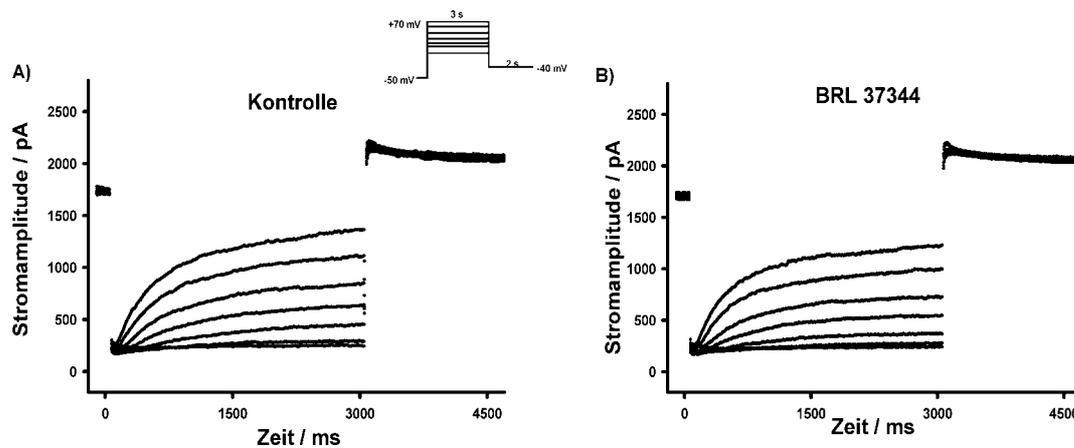


Abbildung 4.20: Effekt von BRL 37344 auf den I_{K_S} -Strom unter Blockade des β_3 -AR's durch 1 $\mu\text{mol/l}$ Bupranolol

Stromaufzeichnungen im Standard-Whole-Cell-Modus bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$, gemäss Pulsprotokoll in der Abbildungsmittle. Zur Inhibierung des β_3 -AR's befanden sich 1 $\mu\text{mol/l}$ Bupranolol in der Badlösung.

A): Kontrollstrom

B): Strom nach 10minütiger Superfusion von 100 nmol/l BRL 37344

Es wurden drei Konzentrationen von BRL 37344 (10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} mol/l) unter dem Einfluss von 1 $\mu\text{mol/l}$ Bupranolol untersucht. In der folgenden Abbildung ist ein Vergleich der veränderten I_{K_S} -Step-Ströme bei +70 mV mit den Kontrollexperimenten des Kapitels 4.5.1 zu sehen.

Die Inhibierung des Step-Stroms durch BRL 37344 war in Gegenwart von 1 $\mu\text{mol/l}$ Bupranolol in den beiden höchsten Konzentrationen signifikant verringert und bei 100 nmol/l BRL 37344 fast vollständig aufgehoben.

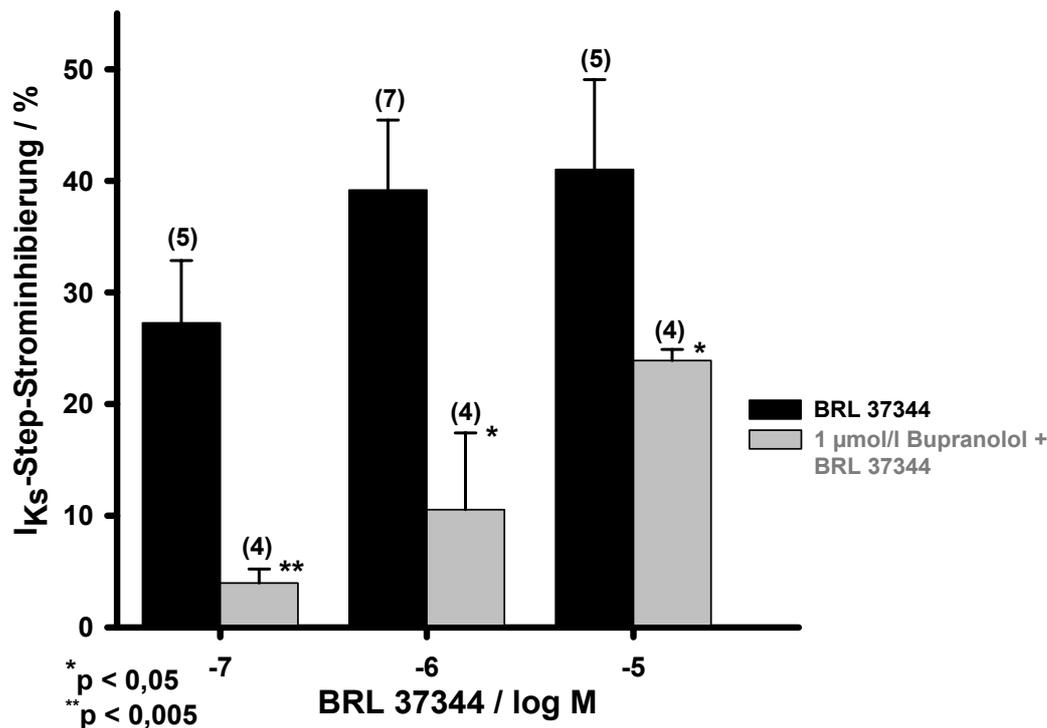


Abbildung 4.21: Einfluss des β_3 -Antagonisten Bupranolol (1 $\mu\text{mol/l}$) auf die I_{K_s} -Step-Strominhibierung unterschiedlicher Konzentrationen von BRL 37344 bei +70 mV.

Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von BRL 37344 in der Kontroll-Tyrodellösung (schwarze Balken, siehe Kapitel 4.5) und bei Anwesenheit von 1 $\mu\text{mol/l}$ Bupranolol (graue Balken).

4.5.6 Effekte von BRL 37344 auf das ventrikuläre Aktionspotential

Veränderungen des Aktionspotentials (AP's) isolierter ventrikulärer Meer-schweinchenmyozyten nach Superfusion von 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 wurden im Current-Clamp-Modus bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz aufgezeichnet. Ähnlich wie bei den I_{K_s} -Stromversuchen im Voltage-Clamp-Modus, dauerte es ca. 5 Minuten, bis stabile, gleich bleibende AP aufzuzeichnen waren. Nach 10-minütiger Einwaschphase der Substanz wurde die Aufzeichnung wiederholt.

Charakteristisch für das ventrikuläre AP im Meerschweinchen ist die fehlende Phase-1-Repolarisation und die lange Plateauphase (siehe Kapitel 1.5), die durch den stark ausgeprägten Delayed Rectifier- K^+ -Strom I_{Ks} verursacht wird.

In Abbildung 4.22 ist eine Originalaufzeichnung des AP's unter Einfluss von $1 \mu\text{mol/l}$ BRL 37344 dargestellt. Durch β_3 -adrenerge Stimulation wurde die Repolarisationsphase verlängert.

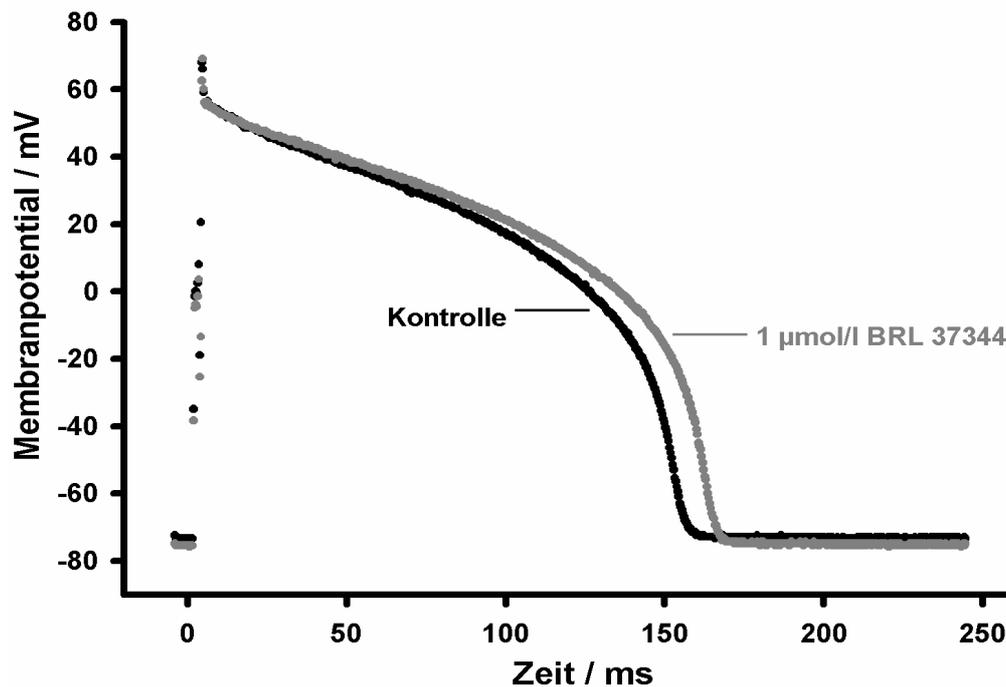


Abbildung 4.22: Einfluss von $1 \mu\text{mol/l}$ BRL 37344 auf das ventrikuläre Aktionspotential beim Meerschweinchen

Es ist eine repräsentative Aufzeichnung des AP's im Current-Clamp-Modus bei $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, vor (Kontrolle, schwarz) und nach der Superfusion des β_3 -Agonisten ($1 \mu\text{mol/l}$ BRL 37344, grau) dargestellt.

Messpunkte des AP's waren 20, 50 und 90 % der Repolarisationsdauer. Die Steigerung der AP-Dauer um ca. 10 % war in allen drei Phasen signifikant ($p < 0,05$, $n = 9$). Das Ruhepotential und die AP-Amplitude wurden hingegen nicht signifikant beeinflusst (siehe Tabelle 4.2).

	Kontrolle	1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344	Steigerung (%)	p
Ruhepotential (mV)[†]	-73,8 \pm 0,6	-74,6 \pm 0,8	1,1	ns
AP-Amplitude (mV)	130,4 \pm 0,9	131,3 \pm 0,9	0,7	ns
APD₂₀ (ms)	64,2 \pm 2,1	70,9 \pm 4,3	10,4	< 0,05
APD₅₀ (ms)	132,9 \pm 6,2	144,6 \pm 8,2	8,8	< 0,05
APD₉₀ (ms)	153,3 \pm 8,0	165,3 \pm 10,3	7,8	< 0,05

Tabelle 4.2: Einfluss von 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 auf die verschiedenen Phasen des Aktionspotentials (APD_{20,50,90}: 20,50,90 % der Repolarisationsdauer)

[†]ohne Einbeziehung des Pipettenpotentials („Liquid Junction Potential“)

Nach Abschluss der Untersuchungen über den Effekt einer Aktivierung des β_3 -adrenergen Rezeptors auf den kardialen I_{Ks} -Kaliumkanal wurden im Anschluss Versuche zur Charakterisierung möglicher Signalwege durchgeführt.

4.6 Untersuchungen zur Signaltransduktion der β_3 -adrenergen Modulation von I_{Ks}

Die Verringerung der I_{Ks} -Stromamplituden aufgrund einer β_3 -adrenergen Stimulation könnte in einer Interaktion der β_1 -cAMP-PKA-Signalkaskade begründet sein. Eine antagonistische Beeinflussung des I_{Ks} -steigernden Systems wurde z. B. nach Aktivierung der Endothelin_A- oder M_1 -Rezeptoren beschrieben (Yazawa & Kameyama, 1990; Washizuka *et al.*, 1997). Dabei führte eine Applikation von Endothelin-1 bzw. Acetylcholin oder Carbachol zu einer potenten Inhibierung des β_1 -stimulierten I_{Ks} -Stroms in Ventrikelzellen des Meerschweinchens. Der Effekt auf den basalen Kaliumstrom war jedoch nur sehr gering. Es wurde deshalb postuliert, dass der antagonistische Einfluss vor der cAMP-Produktion stattfindet, z. B. durch eine Blockade der Adenylatzyklase.

Da sich die β_3 -adrenerge Modulation von I_{Ks} auf aktivierende Step- und deaktivierende Tail-Ströme in gleichem Maße auswirkte, wurde in den nachfolgenden Experimenten nur der Effekt auf die Step-Ströme analysiert. Als Spannungsprotokoll diente immer das im Methodenteil (Kapitel 3.2.6.1) beschriebene „Ein-Puls-Protokoll“.

Zunächst wurde die Wirkung des β_3 -Agonisten BRL 37344 unter β_1 -adrenerger Aktivierung evaluiert.

4.6.1 Einfluss einer cAMP-Erhöhung durch Forskolin und 8-CPT-cAMP

Die Versuche mit Forskolin und 8-CPT-cAMP wurden mit dem in Kapitel 4.2 beschriebenen Spannungsprotokoll (ein Puls auf +70 mV) durchgeführt. Um die adrenerge Stimulation nicht zu beeinträchtigen, wurde auf Atenolol und ICI 118,551 verzichtet. Die Konzentration von BRL 37344 betrug jeweils 1 $\mu\text{mol/l}$.

Wie schon in Kapitel 4.3.2 dargestellt, führte die Superfusion von 1 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin zu einer effizienten Erhöhung der I_{Ks} -Stromamplituden nach ca. 5 Minuten (Abbildung 4.23, **b**). BRL 37344 löste auch unter diesen Bedingungen eine signifikante Reduzierung des I_{Ks} Step-Stromanteils aus (Abbildung 4.23, **c**). Die durchschnittliche Verringerung bei 4 Zellversuchen betrug: $35,7 \pm 5,1 \%$.

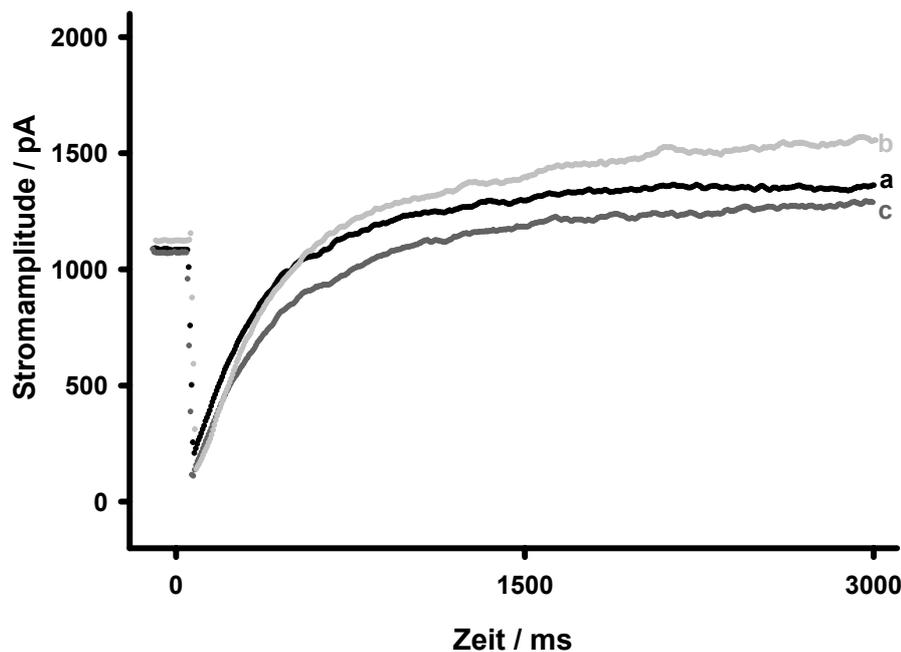


Abbildung 4.23: Effekt von 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 auf die I_{Ks} -Stromamplituden nach Gabe von 1 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin

Die Stromamplituden unter Kontrollbedingungen (**a**) wurden zunächst durch Einwirkung von Forskolin gesteigert (**b**). BRL 37344 verursachte dann wiederum eine Inhibierung von I_{Ks} (**c**).

Ein Beispiel des zeitlichen Verlaufes der Patch-Clamp-Experimente ist in Abbildung 4.24 gezeigt. Die Wirkung des β_3 -Agonisten setzte wiederum rasch ein (1-2 Minuten nach Gabe von BRL 37344), war jedoch weniger stark ausgeprägt als in den Kontrollexperimenten ohne adrenerge Stimulation und führte nach 5-8 Minuten zu einem gleich bleibenden Niveau. Die Einteilung in zwei charakteristische Phasen, wie bei Isoproterenol und BRL 37344 beschrieben (Kapitel 4.4.2 bzw. 4.5.2), wurde nicht beobachtet.

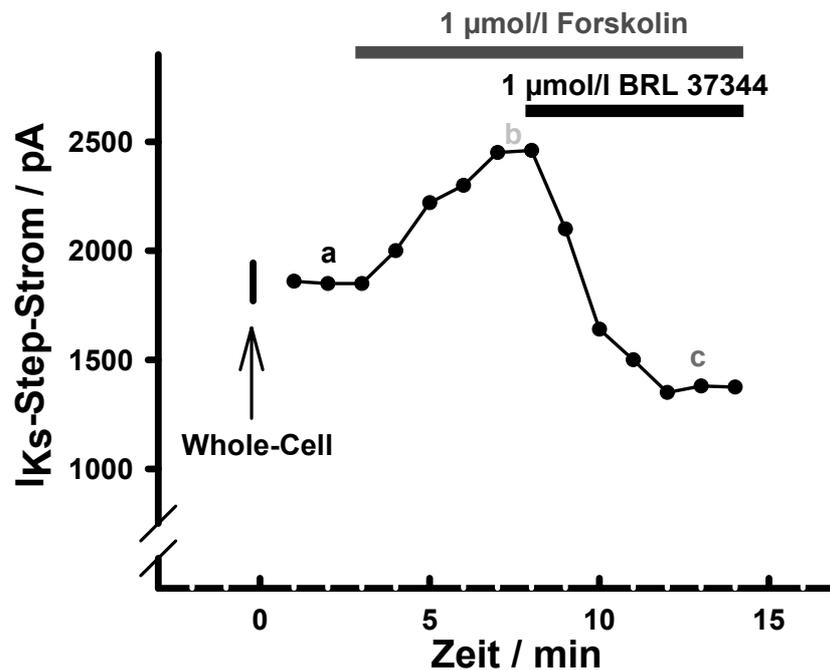


Abbildung 4.24: Zeitverlauf der I_{Ks}-Step-Stromreduktion durch BRL 37344 nach Adenylatzyklase-Stimulation mit Forskolin

Es ist der Verlauf der I_{Ks}-Step-Stromamplitude dargestellt. Bei „0 Minuten“ wurde der Whole-Cell-Zustand nach Saugimpulsen etabliert. Die Zeitpunkte: a, b und c beziehen sich auf die Stromspuren in Abbildung 4.23.

Anschließend wurden die Versuche mit 50 µmol/l 8-CPT-cAMP in der Pipettenlösung wiederholt. Nach einer Steigerung der I_{Ks}-Stromamplituden (Abbildung 4.25,b) wurde 1 µmol/l BRL 37344 eingewaschen. Der hemmende Effekt des β₃-Agonisten auf I_{Ks} war wiederum deutlich zu erkennen (Abbildung 4.25,c).

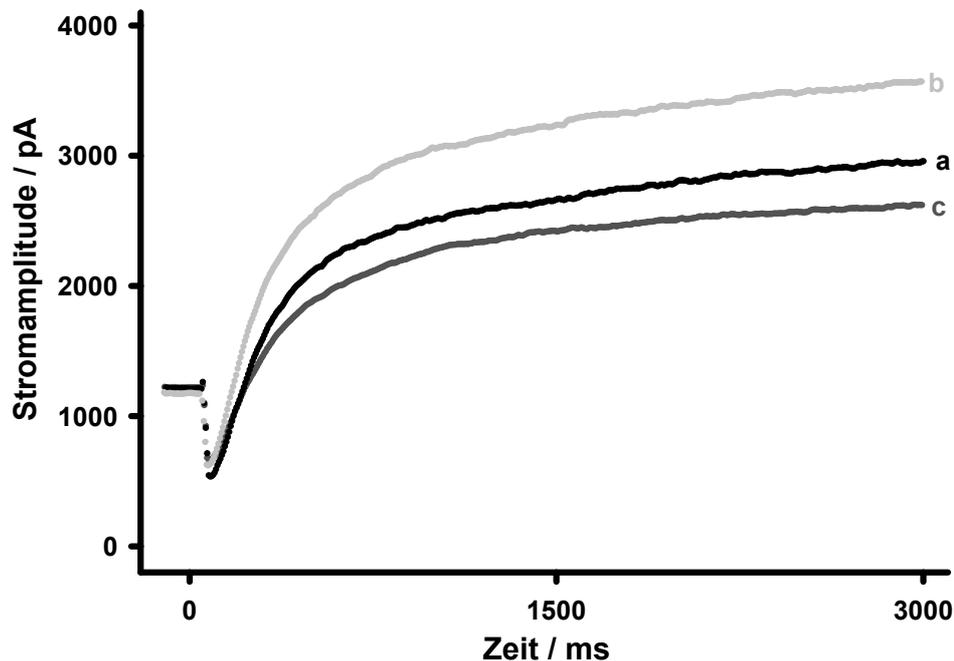


Abbildung 4.25: Effekt von 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 auf die I_{Ks} -Stromamplituden nach Gabe von 50 $\mu\text{mol/l}$ 8-CPT-cAMP

Die Stromamplituden unter Kontrollbedingungen (a) wurden nach Zelldiffusion des cAMP-Analogons gesteigert (b). Danach verursachte BRL 37344 wiederum eine Inhibierung von I_{Ks} (c).

Die signifikante Step-Stromverringerng bei +70 mV betrug $39,6 \pm 6,0 \%$, $n=9$. Wie Abbildung 4.26 zeigt, war der Zeitverlauf des I_{Ks} -Stroms mit den vorangegangenen Forskolin-Versuchen identisch. Eine zweite, „erholende“ Phase der Stromhemmung, die nach 2-3 Minuten Superfusion von z. B. BRL 37344 in der Kontrolllösung einsetzte, fehlte auch hier.

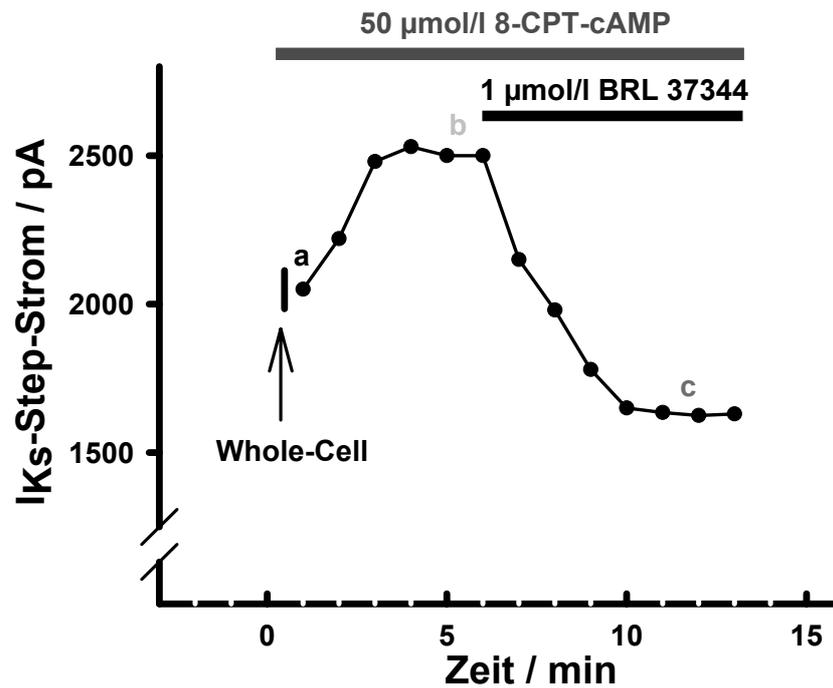


Abbildung 4.26: Zeitverlauf der I_{Ks} -Step-Stromreduktion durch BRL 37344 nach cAMP-Erhöhung

Es ist der Verlauf der I_{Ks} -Step-Stromamplitude dargestellt. Bei „0 Minuten“ wurde der Whole-Cell-Zustand nach Saugimpulsen etabliert. Die Zeitpunkte: a, b und c beziehen sich auf die Stromspuren in Abbildung 4.25.

In Abbildung 4.27 ist ein Vergleich der Effekte von BRL 37344 unter Kontrollbedingungen und nach Forskolin- bzw. cAMP-Applikation dargestellt. Sowohl der basale als auch der adrenerg-stimulierte I_{Ks} -Kaliumstrom wiesen eine vergleichbare Inhibierung auf. Eine direkte Interaktion des β_3 -adrenergen Systems mit dem cAMP-PKA-Signaltransduktionsweg ist daher unwahrscheinlich.

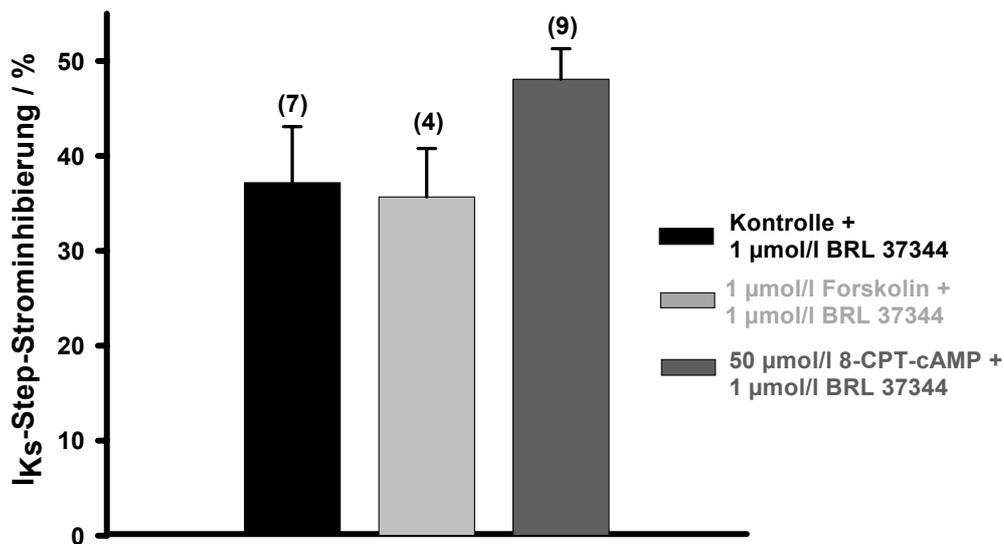


Abbildung 4.27: Einfluss einer cAMP-Erhöhung auf die I_{Ks}-Stromverringerng durch 1 µmol/l BRL 37344

Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von BRL 37344 in der Kontroll-Tyrodellösung (schwarze Balken, siehe Kapitel 4.5) und bei Anwesenheit von 1 µmol/l Forskolin (hellgraue Balken) bzw. 50 µmol/l 8-CPT-cAMP (dunkelgraue Balken). Es wurden die Step-Ströme bei +70 mV ausgewertet.

4.6.2 Einfluss der PKA und der PKC

Der letzte Schritt in einem rezeptorvermittelten Signaltransduktionsweg ist die Aktivierung von Proteinkinasen, die den Ionenkanal durch Phosphorylierungen gezielt modulieren können. Beim Meerschweinchen wird der Delayed Rectifier, I_{Ks}, durch die Serin/Threonin-Proteinkinasen A (β-adrenerges System) und C (α-adrenerges System) aktiviert (Walsh & Kass, 1988). Es stellte sich nun die Frage, ob eine Unterdrückung dieser beiden Systeme einen Einfluss auf die β₃-adrenergen Effekte von BRL 37344 haben könnte. Für diese Versuche befanden sich die membrangängigen Kinaseinhibitoren sowohl in der Tyrode-Badlösung als auch in der KB-Aufbewahrungslösung zur Präinkubation der Kardiomyozyten (> 1 h bei RT).

H 89 ist ein potenter PKA-Blocker mit einer IC_{50} von 135 nmol/l (Hidaka, 1991). Um eine komplette Inhibierung in den Ventrikelzellen zu gewährleisten, wurden 10 $\mu\text{mol/l}$ H 89 in der Tyrodelösung verwendet. Dies führte zunächst zu Verringerungen in den basalen Stromamplituden. Die Stromreduktion des I_{Ks} -Step-Stroms durch 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 blieb danach weiterhin unverändert (Abbildung 4.28).

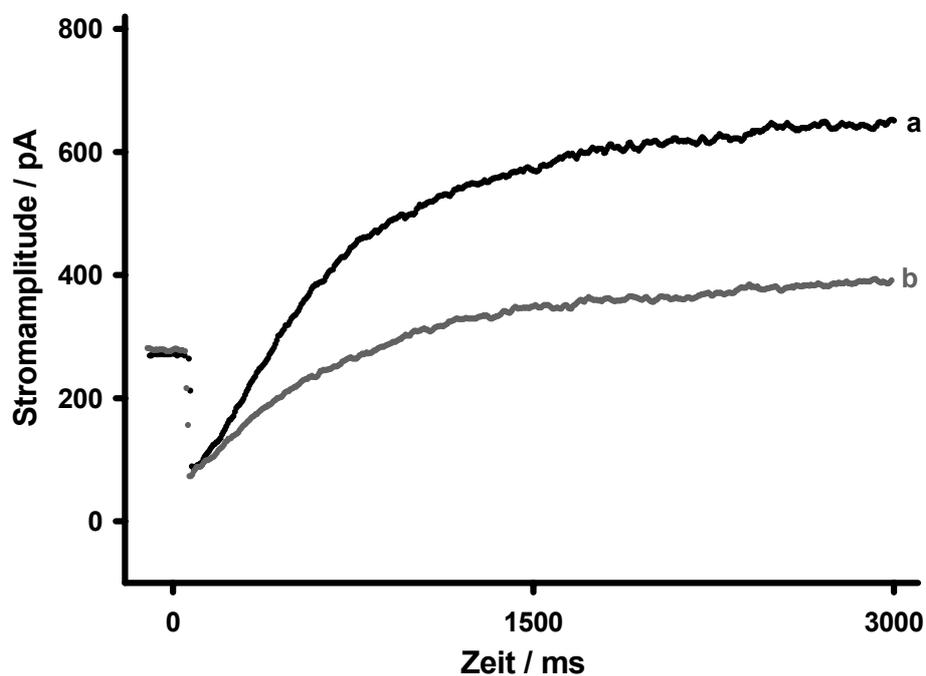


Abbildung 4.28: Effekt von 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 auf die I_{Ks} -Stromamplituden nach PKA-Inhibierung durch 10 $\mu\text{mol/l}$ H 89

Die basalen Stromamplituden (a) konnten trotz PKA-Inhibierung durch 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 weiter verringert werden (b).

Zur Inhibierung der PKC diente das pflanzliche Alkaloid Staurosporin in einer Konzentration von 100 nmol/l ($IC_{50} = 2,7$ nmol/l, Tamaoki *et al.*, 1986). Auch in dieser Versuchsanordnung hemmte 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 die Stromamplituden signifikant (Abbildung 4.29).

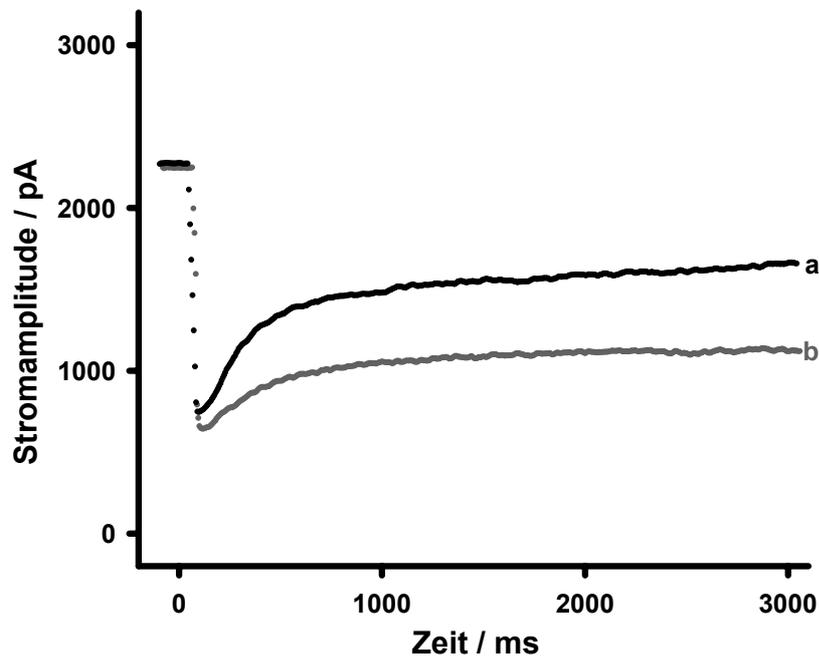


Abbildung 4.29: Effekt von 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 auf die I_{K_S} -Stromamplituden nach PKC-Inhibition durch 100 nmol/l Staurosporin

Die Stromamplituden unter Kontrollbedingungen (a) konnten trotz PKC-Inhibierung durch 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 wiederum verringert werden (b).

In Abbildung 4.30 sind die Ergebnisse der Versuche mit den spezifischen PK-Inhibitoren H 89 und Staurosporin dargestellt. Die Verringerung des I_{K_S} -Stroms blieb auch nach PKA- bzw. PKC-Blockade unverändert zwischen 30 % und 40 % .

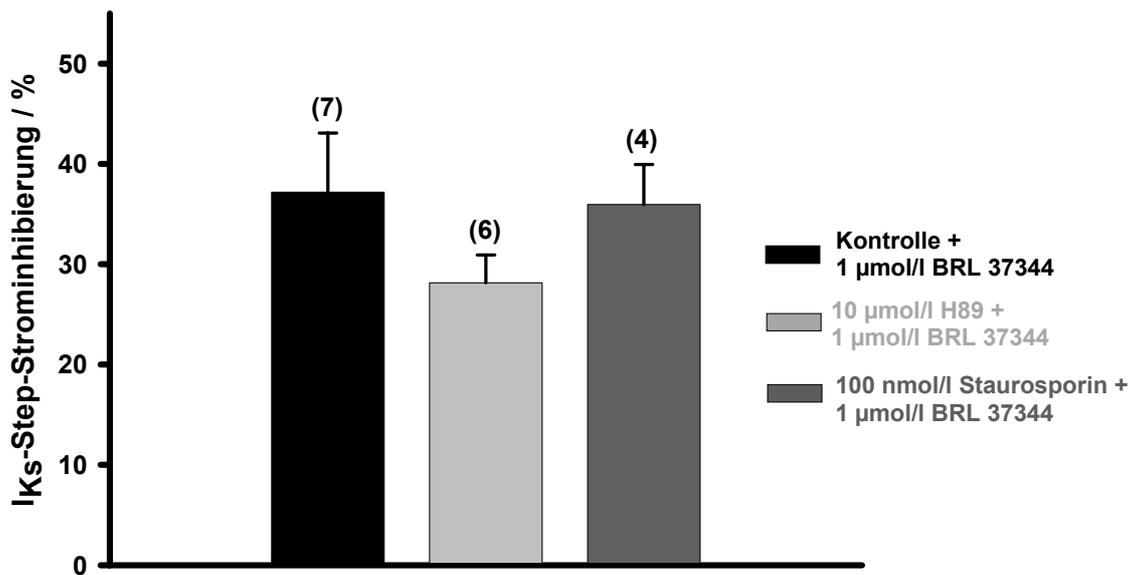


Abbildung 4.30: Einfluss einer PKA- und PKC-Inhibition auf die I_{Ks}-Stromverringerng durch 1 µmol/l BRL 37344

Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von 1 µmol/l BRL 37344 in der Kontroll-Tyrodolösung (schwarze Balken, siehe Kapitel 4.5.1) und bei Anwesenheit von 10 µmol/l H 89 (hellgraue Balken) bzw. 100 nmol/l Staurosporin (dunkelgraue Balken). Es wurden die Step-Ströme bei +70 mV ausgewertet.

4.6.3 Einfluss des NO/cGMP-Systems

In den Versuchen von Gauthier *et al.* (1998) in humanen Herzpräparaten und von Kitamura *et al.* (2000) im Meerschweinchenherzen konnte gezeigt werden, dass der negativ inotrope Effekt einer β_3 -adrenergen Stimulation durch einen NO-Synthase/cGMP-Signalweg vermittelt wird. Die Produktion von endogenem Stickstoffmonoxid spielt eine wichtige Rolle in der kardialen Aktivität. Bei Veränderungen des autonomen Nervensystems kann dieser Second Messenger ausgeschüttet werden und Mechanismen in Gang setzen, die zu einer negativen Inotropie führen: Aktivierung der Guanylatzyklase, Erhöhung des cGMP-Spiegels, Stimulation der Proteinkinase G usw. (Balligand, 1993).

NO wird von drei unterschiedliche NO-Synthasen (neuronal NOS, endotheliale NOS, induzierbare NOS) enzymatisch gebildet. Alle drei Isoformen sind im Myokard nachgewiesen. (Balligand & Cannon, 1997).

Zur Hemmung der NO-produzierenden Enzyme eignen sich die L-Arginin-Derivate L-NAME und L-NMMA (IC_{50} für iNOS, nNOS und eNOS: 0-3 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 3-6 $\mu\text{mol/l}$). Sie wurden in Konzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 200 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt.

Die Zellen wurden vor den Patch-Clamp-Experimenten mindestens eine Stunde bei RT mit den Substanzen inkubiert und mittels Tyrodelösung während des Experiments kontinuierlich superfundiert. Wie die folgenden Originalströme zeigen, hatten L-NAME und L-NMME keinen Einfluss auf die β_3 -adrenerg-vermittelte Stromverringernung.

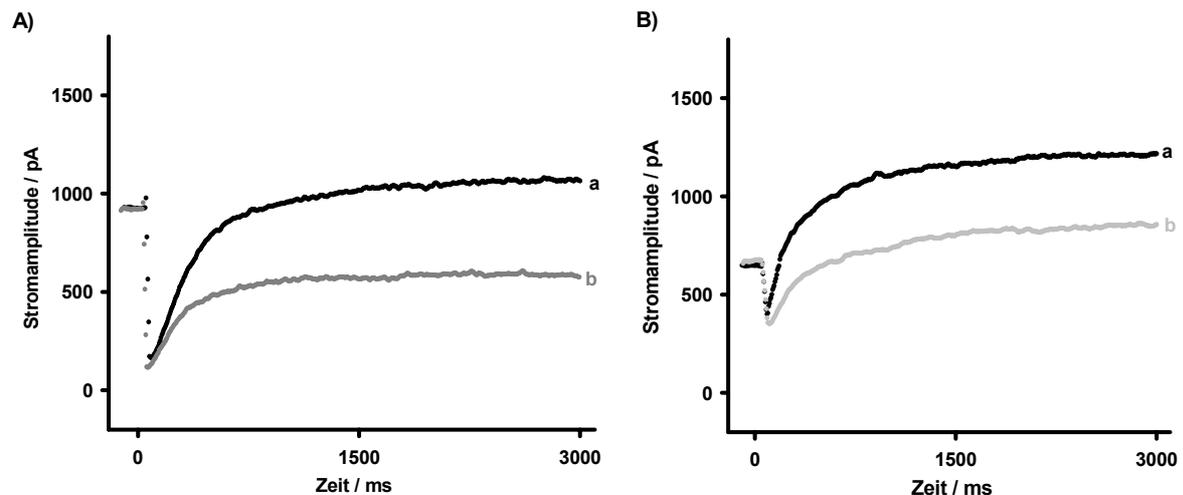


Abbildung 4.31: Effekt von 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 auf die I_{Ks} -Stromamplituden nach NOS-Inhibition durch L-NAME (A) bzw. L-NMMA (B)

A) Repräsentatives Beispiel der Versuche mit 100 $\mu\text{mol/l}$ L-NAME

B) Repräsentatives Beispiel der Versuche mit 200 $\mu\text{mol/l}$ L-NMMA

Stromspuren nach Superfusion des β_3 -Agonisten BRL 37344 (b) sind grau dargestellt. Sie unterscheiden sich signifikant von den Kontrollströmen (a).

Die Gesamtergebnisse der beiden Substanzen veranschaulicht Abbildung 4.32. Das Ausmaß der Stromreduktion durch BRL 37344 wurde nach Gabe der NOS-Inhibitoren L-NAME oder L-NMMA nicht signifikant verändert.

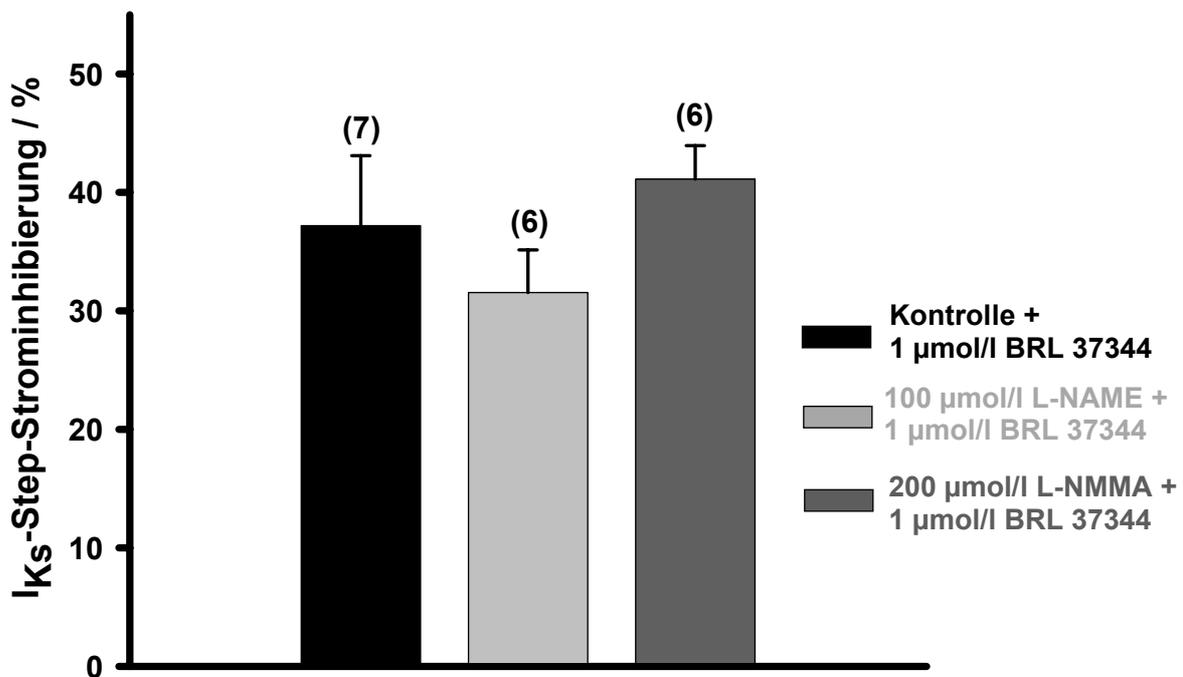


Abbildung 4.32: Einfluss einer NO-Synthaseinhibition auf die I_{Ks} -Stromverringerng durch 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344

Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 in der Kontroll-Tyrodellösung (schwarze Balken, siehe Kapitel 4.5.1) und bei Anwesenheit von 100 $\mu\text{mol/l}$ L-NAME (hellgraue Balken) bzw. 200 $\mu\text{mol/l}$ L-NMMA (dunkelgraue Balken). Es wurden die Step-Ströme bei +70 mV ausgewertet.

4.6.4 Einfluss von Protein-Tyrosinkinasen

Protein-Tyrosinkinasen (PTK) sind Enzyme, die Phosphatreste des ATP's auf OH-Gruppen Tyrosin-enthaltender Proteinsubstraten übertragen. Sie aktivieren zahlreiche intrazelluläre Prozesse, z. B. Zellproliferation und -differenzierung, Kontrolle des Zellzyklus, Apoptose oder metabolische Veränderungen, und sind darüber hinaus an der Entstehung von humanen Karzinomen beteiligt (Hubbard & Till, 2000).

Die PTK werden in zwei große Gruppen unterteilt:

- 1) Rezeptor-Tyrosinkinasen, z. B. das Insulin oder die Wachstumsfaktoren (EGF, NGF, PDGF)
- 2) Nicht-Rezeptor(zelluläre)-Tyrosinkinasen, z. B. die Src-, Fak- oder Janus-Kinasen

PTK spielen neben den Serin-/Threonin-Kinasen (PKA und PKC) auch eine wichtige Rolle in der Regulation von Ionenkanälen. Aufgrund von Tyrosinphosphorylierungen der Kanalproteine können sie Veränderungen der Stromamplituden und -kinetik hervorrufen (Siegelbaum, 1994; Jonas & Kaczmarek, 1996).

4.6.4.1 Unselektive Hemmung der PTK durch Genistein und Lavendustin A

In der ersten Versuchsreihe zur Beteiligung des PTK-Signalweges an der β_3 -AR-Regulation von I_{Ks} wurden die beiden unselektiven PTK-Inhibitoren Genistein und Lavendustin A verwendet (die isolierten Herzzellen wurden für mindestens 2 h bei RT mit den Substanzen in der KB-Lösung inkubiert). Sie hemmen sowohl Rezeptor- als auch zytosolische Protein-Tyrosinkinasen (Levitzki & Gazit, 1995).

Genistein konnte die inhibitorischen Eigenschaften von BRL 37344 aufheben. In Abbildung 4.33 ist ein Strombeispiel und sein zeitlicher Verlauf dargestellt. Die Stromkurven von Kontrolle (**a**) und 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 (**b**) unterschieden sich bei Anwesenheit des PTK-Blockers nicht wesentlich. Man stellte in diesem Versuch sogar eine leichte Erhöhung der Stromamplituden fest. (Step-Strom, Kontrolle: 1850 pA / Step-Strom, BRL 37344: 1950 pA;). Nach Auswaschen der Substanz blieb I_{Ks} konstant.

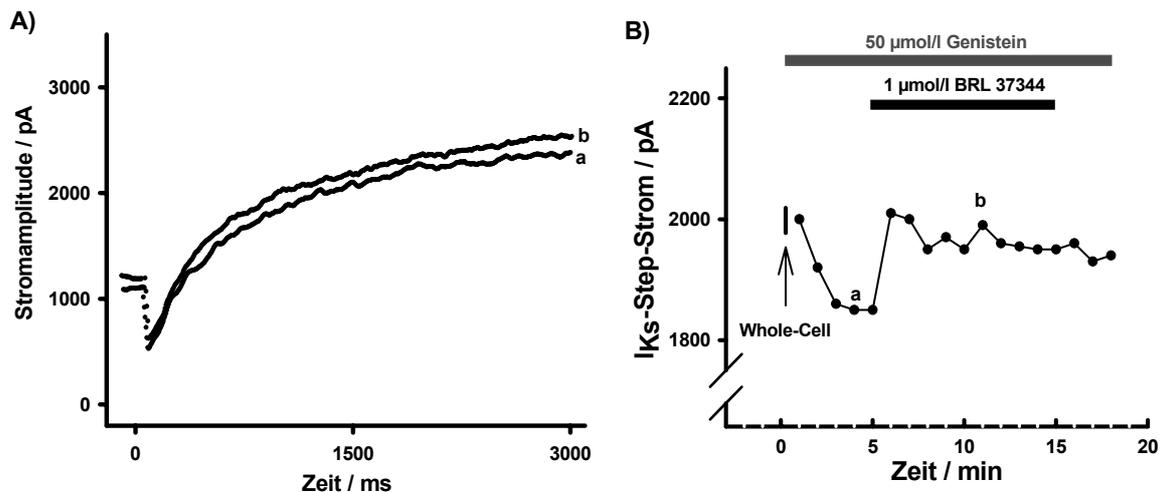


Abbildung 4.33: Einfluss einer PTK-Inhibition (als Beispiel: 50 µmol/l Genistein) auf die I_{Ks}-Stromverringerung durch 1 µmol/l BRL 37344

A) Der Kontrollstrom (a) blieb nach Superfusion von 1 µmol/l BRL 37344 (b) nahezu konstant.

B) Es ist der zeitliche Verlauf des I_{Ks}-Step-Stroms dargestellt. Bei „0 Minuten“ wurde nach Saugimpulsen der Whole-Cell-Zustand etabliert. Die Zeitpunkte: a und b beziehen sich auf die Stromspuren in Abbildung A).

Die Auswertung von sechs Zellversuchen ergab eine nicht signifikante Verringerung des Step-Stroms um $6,3 \pm 4,7$ %.

Da jedoch Genistein den Delayed Rectifier-Kaliumstrom I_{Ks} im Meerschweinchenherzen konzentrationsabhängig blockieren kann (Washizuka *et al.*, 1998), wurden die Patch-Clamp-Experimente in Gegenwart von 10 µmol/l Lavendustin A durchgeführt. Die Auswertung ergab nur eine geringe Reduzierung des Step-Stroms durch BRL 37344 ($4,4 \pm 3,8$ %). Der zeitliche Ablauf der I_{Ks}-Step-Stromveränderung in Abbildung 4.34 verdeutlicht dies. BRL 37344 wurde nach der Phase des Rundowns superfundiert. Nach einer kurzen und schwachen Reduktion der Amplitude war kein weiterer Effekt zu erkennen.

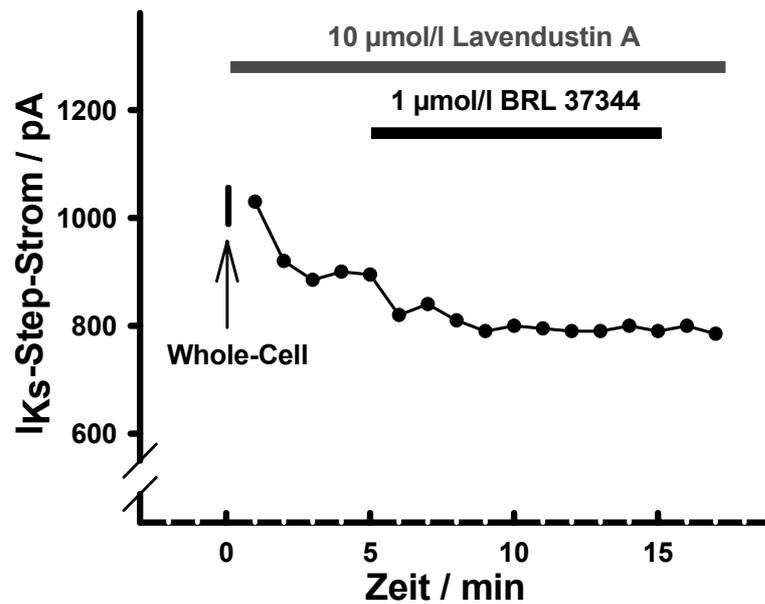


Abbildung 4.34: Einfluss von Lavendustin A auf den I_{Ks}-hemmenden Effekt von 1 µmol/l BRL 37344

Es ist der zeitliche Verlauf der I_{Ks} Step-Stromamplitude dargestellt. Bei „0 Minuten“ wurde der Whole-Cell-Zustand nach Saugimpulsen etabliert. Zur Hemmung der PTK befanden sich 10 µmol/l Lavendustin A in der KB-Aufbewahrungslösung und in der Tyrode-Lösung.

Abbildung 4.35 zeigt das Gesamtergebnis des Effektes von BRL 37344 unter PTK-Inhibierung im Vergleich zur Kontrolle des Kapitels 4.5. Die ca. 40 %ige Hemmung der I_{Ks}-Step-Stromamplituden durch 1 µmol/l BRL 37344 wurde nach Gabe von Genistein und Lavendustin A signifikant abgeschwächt.

Daraus kann geschlossen werden, dass die Interaktion zwischen dem β₃-AR und I_{Ks} über einen Tyrosinkinase-abhängigen Signalweg vermittelt wird.

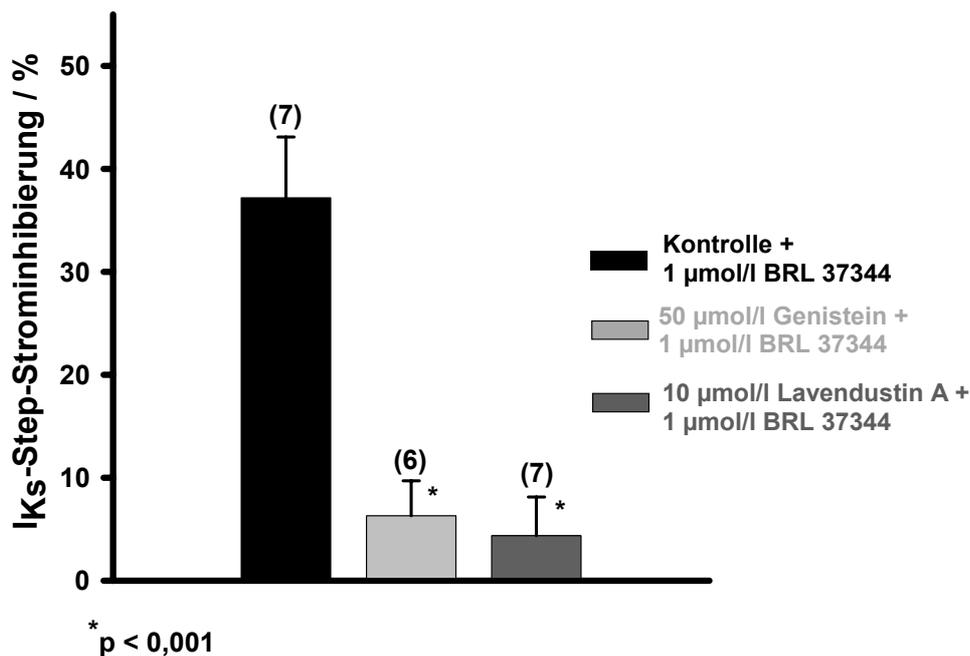


Abbildung 4.35: Einfluss der unspezifischen PTK-Inhibition auf die I_{Ks}-Stromverringern durch 1 µmol/l BRL 37344

Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von 1 µmol/l BRL 37344 in der Kontroll-Tyrode-Lösung (schwarze Balken, siehe Kapitel 4.5.1) und bei Anwesenheit von 50 µmol/l Genistein (hellgraue Balken) bzw. 10 µmol/l Lavendustin A (dunkelgraue Balken). Es wurden die Step-Ströme bei +70 mV ausgewertet.

4.6.4.2 Selektive Hemmung der nichtrezeptorgebundenen Src-Kinase

Um den Einfluss einer PTK noch weiter zu charakterisieren, wurde in den nächsten Versuchen der selektive Src-Kinaseinhibitor, PP2 (4-amino-5-(4-chlorphenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolol[3,4-*D*]pyrimidin), verwendet (Hanke *et al.*, 1996). Die Nicht-Rezeptor-PTK wurde als erstes Proto-Onkogenprotein identifiziert. Dieses Protein wird durch den onkogenen Retrovirus *Rous sarcoma* (Src) umgewandelt und reguliert die Zellteilung und das Zellwachstum (Ma & Huang, 2002). Ein Src-abhängiger Signaltransduktionsweg spielt z. B. auch in der Entstehung der kardialen Hypertrophie eine Rolle (Sadoshima & Izumo, 1997; Takeishi *et al.*, 2001). Da die Aktivität der Src-Kinase in humanen Tumorgewebe, wie z. B. Kolon, Brust und Skelettmuskel, fünf- bis siebenfach erhöht ist, sind Src-Inhibitoren bei der Entwicklung neuer Therapieansätze in der onkologischen Forschung besonders wichtig (Rosen *et al.*, 1996).

Ferner wurde eine direkte Interaktion der Src-Kinase mit den Delayed Rectifier-Kaliumkanälen, Kv1.5, r-ERG1 und KCNQ3-5, in heterogenen Expressionssystemen beschrieben (Cayabyab & Schlichter 2002; Gamper *et al.*, 2003; Holmes *et al.*, 1996; Mason *et al.*, 2002).

Vergleichbar mit den Ergebnissen der unselektiven PTK-Inhibitoren Genistein und Lavendustin A, konnte auch der potente Src-Kinaseinhibitor PP2 (100 nmol/l) die Wirkung von 1 μ mol/l BRL 37344 aufheben. Wie Abbildung 4.36 zeigt, waren die Step-Stromkurven in der Superfusionsphase der Experimente nahezu konstant ($98,8 \pm 2,2$ % der Kontrolle).

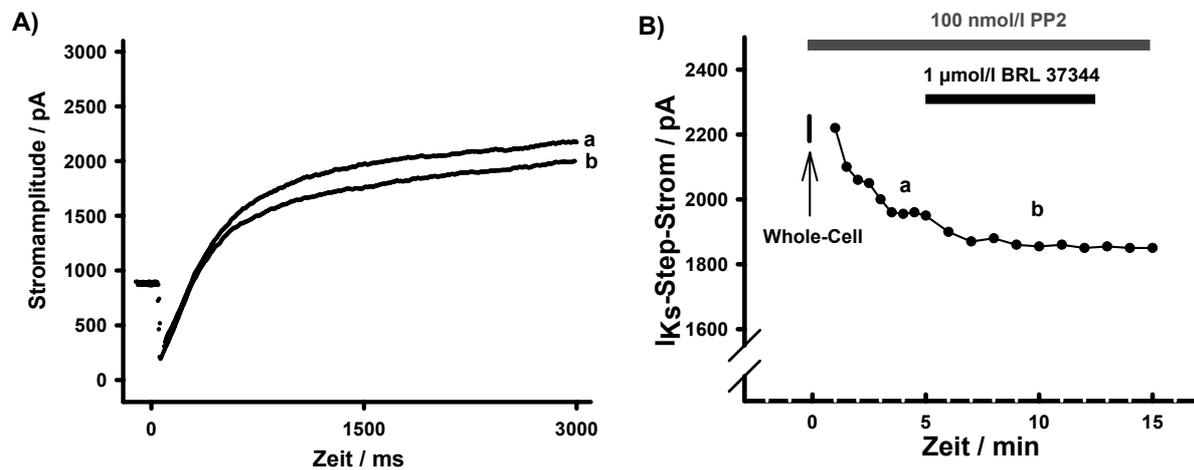


Abbildung 4.36: Einfluss von 100 nmol/l PP2 auf den I_{Ks}-hemmenden Effekt von 1 μ mol/l BRL 37344

A) Der Kontrollstrom (**a**) zeigte nach Superfusion von 1 μ mol/l BRL 37344 (**b**) nur eine schwache Verringerung.

B) Es ist der zeitliche Verlauf des I_{Ks} Step-Stroms dargestellt. Bei „0 Minuten“ wurde nach Saugimpulsen der Whole-Cell-Zustand etabliert. Die Zeitpunkte: a und b beziehen sich auf die Stromspuren in Abbildung **A**).

Die β_3 -AR-vermittelte I_{Ks} -Hemmung durch 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 war in fünf Versuchen im Vergleich zu den Kontrollexperimenten (Kapitel 4.5.1) nicht mehr nachzuweisen (siehe Abbildung 4.37).

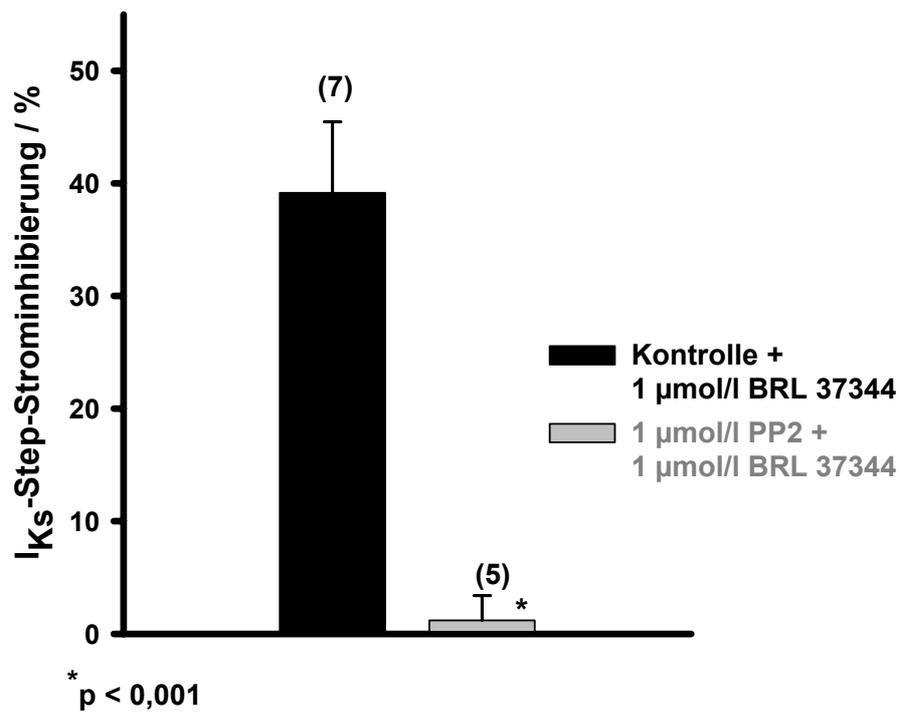


Abbildung 4.37: Einfluss der selektiven Src-Kinase-Inhibition auf die I_{Ks} -Stromverringerng durch 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344

Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von 1 $\mu\text{mol/l}$ BRL 37344 in der Kontroll-Tyrodellösung (schwarze Balken, siehe Kapitel 4.5) und bei Anwesenheit von 1 $\mu\text{mol/l}$ PP2 (graue Balken). Es wurden die Step-Ströme bei +70 mV ausgewertet.

5 Diskussion

Der Delayed Rectifier-Kaliumstrom I_K ist maßgeblich an der späten Repolarisation des Aktionspotentials in Kardiomyozyten beteiligt. Im Meerschweinchen ist die langsame Komponente, I_{Ks} (KvLQT1/minK-Proteinkomplex), besonders stark ausgeprägt und bestimmt die charakteristische Morphologie des kardialen AP's. I_{Ks} unterliegt einer deutlichen β -adrenergen Modulation, wobei die Bedeutung der unterschiedlichen Rezeptorsubtypen noch nicht untersucht wurde.

Die hier vorliegende Arbeit charakterisiert den β_3 -adrenergen Einfluss auf die langsame Komponente des Delayed Rectifier-Kaliumstroms I_{Ks} mit Hilfe elektrophysiologischer und pharmakologischer Untersuchungsmethoden in ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens.

5.1 Einfluss des β_1 -adrenergen Signalweges auf den I_{Ks} -Kaliumstrom

Die Ergebnisse der Versuche in Kapitel 4.3 bestätigten frühere Experimente, in denen eine Steigerung der Stromamplituden des repolarisierenden K^+ -Stroms I_{Ks} über die Aktivierung eines β_1 -adrenergen Signaltransduktionsweges beobachtet wurde (Walsh *et al.*, 1988; Yazawa & Kameyama, 1990). Wie bei *Xenopus* Oozyten oder Meerschweinchen-Kardiomyozyten gezeigt wurde, können β -Agonisten, z. B. Isoprenalin, oder unterschiedliche Second Messenger diese Erhöhung auslösen (Süssbrich & Busch, 1999).

Mit allen verwendeten Substanzen (Isoproterenol, Forskolin, 8-CPT-cAMP) konnten deutliche Stromveränderungen beobachtet werden, wobei der I_{Ks} -stimulierende Effekt nach Applikation des cAMP-Analogons besonders ausgeprägt war (2- bis 4-facher Stromanstieg). Dies hat eine direkte Aktivierung der PKA und damit eine Phosphorylierung des Kanalproteins zur Folge.

Marx *et al.* konnten kürzlich einen Serinrest (Ser²⁷) im humanen KCNQ1-Protein als Phosphorylierungsstelle des I_{Ks}-Kanals aufklären (Marx *et al.*, 2002). Es bleibt unklar, welcher β -Rezeptorsubtyp involviert ist. Kathöfer *et al.* beobachteten nach Koexpression des hKvLQT1/hminK-Kanals mit dem β_3 -AR in *Xenopus laevis*-Oozyten und nachfolgender Superfusion des $\beta_{1/2/3}$ -Agonisten Isoproterenol eine Steigerung der I_{Ks}-Stromamplituden (Kathöfer *et al.*, 2000).

Da die Fähigkeit, nach Isoproterenol-Stimulation eine AC/cAMP/PKA-Signalkaskade auszulösen, im Meerschweinchenventrikel vor allem dem β_1 -AR zugesprochen wird (Hool & Harvey, 1997; Zhang *et al.*, 2002), kann der folgende Signaltransduktionsweg angenommen werden:

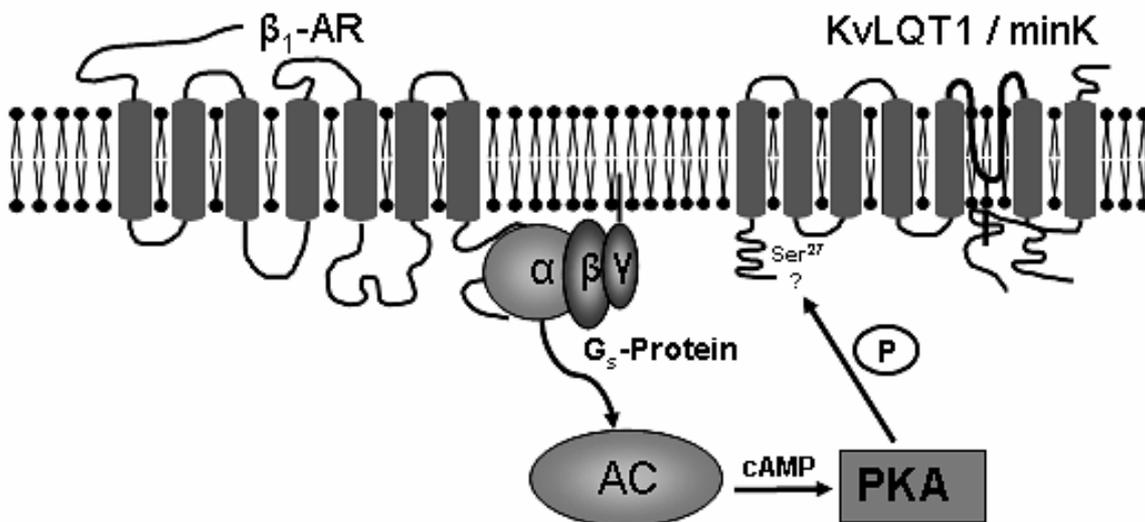


Abbildung 5.1: Vereinfachtes Modell der β_1 -adrenergen Modulation des I_{Ks}

Durch Aktivierung des β_1 -AR's wird die G_s -Protein/AC/cAMP/PKA-Signalkaskade, die zu einer Steigerung der I_{Ks}-Stromamplituden (KCNQ1/KCNE1-Kanal) führt, in Gang gesetzt. Die Daten von Marx *et al.* (2002) deuten auf eine PKA-Phosphorylierung von Ser²⁷ in der KCNQ1-Untereinheit des KvLQT1/minK-Kanals hin.

5.2 Effekte einer β_3 -AR-Stimulation

5.2.1 Hemmung von I_{Ks} nach Aktivierung durch Isoproterenol und Noradrenalin bei gleichzeitiger Inhibierung der β_1/β_2 -AR

Nach Blockade der β_1 - und β_2 -Rezeptoren mit Atenolol und ICI 118,551 konnte mit den beiden Katecholaminen Isoproterenol und Noradrenalin ein möglicher Einfluss des β_3 -AR's auf den I_{Ks} untersucht werden. Wie in Kapitel 4.4 beschrieben, war ein antagonistischer Effekt gegenüber der β_1 -adrenergen Stimulation des Stroms feststellbar. Beide Substanzen verringerten die Step-Stromkomponente mit einem Maximum von ca. 30 % (Noradrenalin) und ca. 40 % (Isoproterenol) bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$. Diese Beobachtung einer Umkehrung des adrenergen Effekts im Myokard wurde inzwischen bei unterschiedlichen Spezies berichtet (Gauthier, 2000). Nach β_1 - und β_2 -AR-Inhibition äußerte sich die Gabe von Isoproterenol oder Noradrenalin in einer negativen Inotropie. Eine β_3 -adrenerge Stimulation könnte somit als „negativer Feedbackmechanismus“ angesehen werden, der bei einer Desensitivierung der β_1 - und β_2 -AR, z. B. bei Herzinsuffizienz, noch stärker hervortreten könnte (Cheng *et al.*, 2001; Moniotte *et al.*, 2001).

Vergleichbar mit den ventrikulären Kontraktilitätsversuchen von Gauthier *et al.* (1996) fiel die β_3 -adrenerge Wirkung in unseren Versuchen relativ schwach aus. Im Unterschied zu einer potenten Steigerung des I_{Ks} -Stroms nach β_1 -Aktivierung durch 1 $\mu\text{mol/l}$ Isoproterenol (Yazawa & Kameyama, 1990), hatte die Stimulation des β_3 -AR's nur eine Verringerung von ca. 40 % zur Folge. Dies könnte in einer geringeren Expressionsdichte des Rezeptors im Meerschweinchenherzen begründet sein. Außerdem ist die Wirkung der unterschiedlichen β -Agonisten im Bezug auf Rezeptorselektivität und -sensitivität sehr spezies- und gewebeabhängig. So waren z. B. β_3 -AR-abhängige Effekte beim Hund nur in höheren Konzentrationen (> 10 $\mu\text{mol/l}$ Isoproterenol) festzustellen (Pelat *et al.*, 2003)

Die I_{Ks} -inhibierende Auswirkung der β_3 -Aktivierung im Herzmuskel des Meerschweinchens steht in Kontrast zu den Ergebnissen von Kathöfer *et al.* (2000), die eine β_3 -AR-vermittelte Steigerung der Stromamplituden des heterolog exprimierten hKvLQT1/hminK-Kanals in *Xenopus*-Oozyten beobachteten.

Ein möglicher Grund hierfür liegt in der abweichenden Struktur des β_3 -AR's beider Spezies. Unterschiede sind besonders in den Bereichen der transmembranären Segmente vorhanden, die für die Ligandbindung und G-Protein-Interaktion als essentiell betrachtet werden (Strosberg, 1997).

Eine weitere Ursache der Diskrepanz der Ergebnisse von Meerschweinchen und Oozyten könnte auf Unterschieden in den spezifischen Untersuchungsbedingungen beruhen. Im Gegensatz zum nativen Gewebe wurden die Versuche im heterologen Expressionssystem bei Raumtemperatur durchgeführt. Walsh *et al.* (1989) und Busch & Maylie (1994) konnten zeigen, dass die β -adrenerge Regulation des I_{Ks} -Kanals eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit aufweist. Eine Absenkung der Temperatur von 36-37 °C auf ca. 20 °C verringerte die Empfindlichkeit des I_{Ks} -Kanals gegenüber dem β -Agonisten Isoproterenol.

Ferner könnten Unterschiede in der Weiterleitung des β_3 -adrenergen Effektes über bestimmte Signaltransduktionswege bestehen. Bei *Xenopus*-Oozyten ist z. B. unklar, ob spezifische Signalproteine (Ankerproteine/„AKAP's“) oder andere Second Messenger in den Zellen vorhanden und funktionsfähig sind.

5.2.2 Hemmung von I_{Ks} nach selektiver Aktivierung durch BRL 37344 und CL 316,243

Auch mit den β_3 -Agonisten BRL 37344 und CL 316,243 wurde eine signifikante Reduzierung der I_{Ks} -Stromamplituden erzielt. Eine Affinität dieser Substanzen zum kardialen β_3 -AR konnte in mehreren pharmakologischen Untersuchungen nachgewiesen werden (Cheng *et al.*, 2001; Gauthier *et al.*, 1999; Kitamura *et al.*, 2000).

Charakteristisches Merkmal aller Ergebnisse einer β_3 -adrenergen Stimulation in den hier dargestellten Versuchen wie auch in den publizierten Studien ist eine „flache“ Konzentrations-Wirkungskurve der verwendeten Agonisten (die Hill-Koeffizienten betragen: $h_{\text{BRL37344}} = 0,4$ und $h_{\text{CL316,243}} = 0,7$, siehe Abbildung 4.15).

Die Verringerungen der I_{KS} -Step-Stromkomponente durch BRL 37344 und CL 316,243 reichten über mehrere Konzentrationspotenzen, mit einer IC_{50} von 5 nmol/l bzw. 32 nmol/l. Die maximale Hemmung lag unter 50 %, was wiederum den Experimenten der oben genannten Arbeitsgruppen ähnelt.

Dies weist darauf hin, dass der β_3 -AR sehr sensitiv auf agonistische Substanzen reagiert und auch bei geringen Konzentrationen noch „ansprechbar“ bleibt, aber nach erfolgter Aktivierung nur einen vergleichsweise schwachen Effekt auslösen kann.

Analysierung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von I_{KS} ergab eine Erhöhung der halb-maximalen Aktivierung ($V_{1/2}$) um 9,9 mV. Dies trägt zu einer Erniedrigung der Stromamplituden bei entsprechenden Spannungen bei. Eine Verschiebung der Aktivierung zu depolarisierenden Potentialen konnten z. B. auch Bosch *et al.* (1999) bei der Stromreduktion durch Hypothyreose im Meer-schweinchenventrikel beobachten. Im Gegensatz dazu ist der umgekehrte Fall bei I_{KS} -Stimulation durch Aktivierung des PKA-Signalweges beschrieben. Dabei wurde postuliert, dass Phosphorylierungsprozesse in der Nähe der Porenregion des Kanalproteins zu einer früheren Aktivierung (Verschiebung von $V_{1/2}$ um 9 mV zur negativeren Spannung) des Delayed Rectifier Kaliumstroms (Yazawa & Kameyama, 1990; Walsh & Kass, 1991) führt.

Auffällig in der β_3 -adrenergen Veränderung der Stromkinetik von I_{KS} ist die 7-8fache Beschleunigung der Aktivierung. Die Deaktivierung wurde hingegen durch den β_3 -Agonisten BRL 37344 nicht beeinflusst.

Einen weiteren pharmakologischen Beweis der β_3 -adrenergen Beeinflussung des I_{KS} -Kanals stellten die Versuche mit Bupranolol dar. Der $\beta_{1/2/3}$ -Antagonist konnte die Effekte des β_3 -Agonisten BRL 37344 durch eine kompetitiven Hemmung am β_3 -AR signifikant abschwächen.

Mit der getesteten Konzentration von Bupranolol konnte allerdings keine vollständige Hemmung des Effekts von BRL 37344 erreicht werden, was neben einer inkompletten Blockierung des β_3 -AR's auch durch eine Interaktion von Bupranolol mit den beiden anderen Subtypen des β -adrenergen Systems bedingt sein könnte.

5.2.3 Zeitverlauf der β_3 -AR-induzierten I_{Ks} -Hemmung

Sowohl die unselektiven β -adrenergen Katecholamine Isoproterenol und Noradrenalin als auch die β_3 -Agonisten BRL 37344 und Cl 316,243 zeigten einen einheitlichen Zeitverlauf in ihrer I_{Ks} -Stromreduktion. Charakteristisch war ein biphasischer Verlauf während der 10-minütigen Superfusion der Substanzen. Dabei war die β_3 -AR-vermittelte Stromveränderung zunächst von einer schnellen, potenten Hemmung innerhalb der ersten 1-2 Minuten geprägt.

Dies spricht, wie oben erwähnt, für eine hohe Affinität bzw. Sensitivität des β_3 -AR's zu den Agonisten und für ein rasches Auslösen der beteiligten Signaltransduktionswege.

Danach folgte eine Phase, in der die Hemmung abnahm und ein langsamer Steady-State-Zustand des I_{Ks} -Stroms erreicht wurde.

Ein vergleichbarer Verlauf einer β_3 -AR-Aktivierung wurde in weiteren Studien belegt: Hom *et al.* (2001) beobachteten nach Verabreichung eines β_3 -Agonisten bei Rhesus-Affen mit autonomer Blockade (Hexamethonium und Atropin) initial einen raschen Blutdruckabfall von ca. 40 mmHg, der sich nach 8-10 Minuten auf ein gleich bleibendes, verringertes Niveau von 15-20 mmHg einstellte.

In Kontraktilitätsversuchen von Devic *et al.* (2001) im neonatalen Mäuseherzen führte die zweite, „erholende“ Phase des β_3 -adrenergen Effektes sogar zu einer Wiederherstellung des Basalwertes, d. h. Isoproterenol und CL 316,243 konnten nur eine kurzzeitige, β_3 -adrenerg-vermittelte negative Inotropie auslösen, die nach ca. 15 Minuten nicht mehr nachweisbar war. Diese Tachyphylaxie in den Versuchen einer β_3 -adrenergen Stimulation kann verschiedene Ursachen haben.

Eine mögliche Erklärung wäre in einer Desensitivierung der β_3 -AR-Signalkaskade zu sehen, z. B. wurden „Down-Regulationen“ der Aktivität von G-Proteinen, der AC oder der PKA nach längerer β_3 -adrenerger Stimulation beschrieben (Chambers *et al.*, 1994; Granneman, 1992; Nantel *et al.*, 1993). Eine Desensitivierung des β_3 -AR's selbst kann nahezu ausgeschlossen werden, denn es fehlen, im Gegensatz zu den beiden anderen β -adrenergen Rezeptoren, Phosphorylierungsstellen für die PKA und β -ARK in der C-terminalen Region des β_3 -AR's (Carpene *et al.*, 1993; Nantel *et al.*, 1993).

Daneben könnte auch die Überlagerung zweier unterschiedlicher Signalwege (initial: hemmend, danach: steigernd) einen Grund für den charakteristischen Zeitverlauf der I_{Ks} -Step-Stromamplituden darstellen. Beispielsweise wird im Fettgewebe eine gleichzeitige Aktivierung des stimulierenden G_s - und inhibitorischen $G_{i/o}$ -Proteins diskutiert (Chaudry *et al.*, 1994). Auch von anderen G-Proteingekoppelten Rezeptoren, z. B. vom β_2 -AR oder Serotonin-Rezeptor, ist das Auslösen unterschiedlicher Signalkaskaden bekannt (Kilts *et al.*, 2000).

5.2.4 β_3 -adrenerge Effekte auf das ventrikuläre AP

Der β_3 -Agonist BRL 37344 verursachte eine schwache, aber signifikante Verlängerung des AP's von 8-10 %. Bei einer ca. 40 %igen Verringerung des repolarisierenden I_{Ks} -Stroms war ein geringes Ausmaß der AP-Veränderung zu erwarten, denn eine vollständige Blockierung des Kaliumkanals, z. B. durch die Chromanole 293B und HMR 1556 oder das Benzodiazepin L-768,673, erhöht die APD im Meerschweinchenventrikel um 30-40 % (Bosch *et al.*, 1998; Gögelein *et al.*, 2000; Selnick *et al.*, 1997).

Die Beobachtung einer ventrikulären AP-Verlängerung beim Meerschweinchen unterscheidet sich von den Ergebnissen in humanen, endomyokardialen Proben von Gauthier *et al.* (1996) und Leblais *et al.* (1999). Nach Aktivierung des β_3 -AR's wurde eine Verkürzung des AP's um ca. 20 % festgestellt. Dies würde auch den Versuchen von Kathöfer *et al.* (2000), die eine β_3 -AR-vermittelte Aktivierung des humanen I_{Ks} -Kanals beschreiben konnten, entsprechen.

Es bekräftigt wiederum die Vermutung der Speziesunterschiede in der β_3 -adrenergen Modulation von Ionenkanälen. Dabei ist nicht nur I_{Ks} betroffen, sondern auch weitere depolarisierende Kationen- ($I_{Ca,L}$) und repolarisierende Anionenströme ($I_{CL,CFTR}$), deren verminderter Fluss ebenfalls zu den beobachteten Veränderungen des AP's beitragen kann (Cheng *et al.*, 2001; Leblais *et al.*, 1999).

5.3 Mechanismus der β_3 -AR-vermittelten I_{Ks} -Inhibierung

5.3.1 Einfluss der PKA- und PKC-abhängigen Signaltransduktion

Sowohl PKA- als auch PKC-abhängige Phosphorylierungen spezifischer AS-Reste im I_{Ks} -Kanalprotein führen zu einer signifikanten Stromerhöhung (Kurokawa *et al.*, 2001). Wie in den Versuchen von Yazawa & Kameyama (1990) und Washizka *et al.* (1997) mit Acetylcholin bzw. Endothelin-1 gezeigt wurde, könnte auch eine β_3 -adrenerge Stimulation antagonistisch in die PKA- oder PKC-Signalwege eingreifen. Die Ergebnisse der Kapitel 4.6.1 und 4.6.2 lassen jedoch nur, wenn überhaupt, eine schwache Beeinflussung der beiden Systeme annehmen. Im Gegensatz zu einer Aktivierung der M-Cholino- oder ET_A -Rezeptoren, die lediglich eine Inhibierung des adrenerg erhöhten I_{Ks} -Strom verursachten, war die Stromverringerng durch BRL 37344 sowohl im basalen als auch im stimulierten Zustand der Zelle (Forskolin, 8-CPT-cAMP) im Rahmen der Messgenauigkeit in etwa gleichem Maße gegeben.

Die Inhibierung der PKA oder PKC hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Wirkung des β_3 -Agonisten BRL 37344. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der β_3 -AR eine β_1 -AR-unabhängige Signalkaskade auszulösen vermag.

Eine wichtige Veränderung in der Charakteristik der β_3 -AR-Modulation von I_{Ks} zeigte sich in den Zeitverläufen der Stromreduktion nach Forskolin- oder cAMP-Stimulation (Abbildungen 4.24 und 4.26). Unter diesen Bedingungen war der ursprüngliche, biphasische Verlauf der BRL 37344-induzierten I_{Ks} -Stromverringerng nicht mehr erkennbar.

Im Vergleich zu den Experimenten mit dem nichtstimulierten Grundstrom wurde nun ein langsamer, kontinuierlicher Abfall der Step-Stromamplituden über 5-8 Minuten beobachtet. Denkbar wäre, dass nach bereits vorhandener Aktivierung des G_s /cAMP-Systems nur noch ein (G_i -Protein-abhängiger) Signalweg funktionell mit dem β_3 -AR gekoppelt ist.

5.3.2 Einfluss von NO

Eine in der Literatur beschriebene β_3 -AR-Signalweiterleitung im Herz-Kreislaufsystem unterschiedlicher Spezies ist der NO/cGMP-Weg (Donckier *et al.*, 2001; Gauthier *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 2000; Pott *et al.*, 2003; Varghese *et al.*, 2000). Das durch NO-Synthasen gebildete Stickstoffmonoxid bzw. EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor, aus dem Gefäßendothel freigesetztes NO) und die daraus resultierende Erhöhung der cGMP-Konzentration erniedrigen $[Ca^{2+}]_i$ und hemmen I_{Ca} (Balligand *et al.*, 1993; Kelly *et al.*, 1996).

Versuche mit den beiden NO-Synthaseinhibitoren L-NAME und L-NMMA zeigten keinen Einfluss auf die β_3 -adrenerge I_{Ks} -Hemmung. Der β_3 -Agonist BRL 37344 zeigte trotz Inhibierung des Second Messengers NO vergleichbare Verringerungen der I_{Ks} -Stromamplituden. Eine Beteiligung der NO/cGMP-nachgeschalteten Proteinkinase G scheint somit nicht in Betracht zu kommen.

Im Gegensatz dazu wurde in einer neueren Studie ein stimulierender Effekt von cGMP und PKG auf den Delayed Rectifier I_{Ks} im Meerschweinchenherz beschrieben (Shimizu *et al.*, 2002).

5.3.3 Einfluss von Protein-Tyrosinkinasen

Die Versuche mit Genistein und Lavendustin A wiesen auf eine Beteiligung eines PTK-abhängigen Signalweges an der β_3 -adrenergen Modulation des I_{Ks} -Kaliumkanals hin. Da der Effekt des β_3 -Agonisten BRL 37344 auch mit PP2, einem selektiveren PTK-Inhibitor (Hanke *et al.*, 1996), unterdrückt wurde, scheint die nichtrezeptorgebundene, zelluläre Src-Kinase ein „Effektor“ des β_3 -AR's zu sein.

Eine β_3 -adrenerge Kopplung dieser Tyrosinkinase wurde bislang nur in Adipozyten beschrieben (Cao *et al.*, 2000; Lindquist *et al.*, 2000). Sie kam durch direkte Interaktion von Prolin-reichen Strukturen in der dritten, intrazellulären Domäne (i3) bzw. im Carboxy-Terminus des β_3 -AR-Proteines (siehe Abbildung 1.8 in Kapitel 1.4.1) und der SH3-Domäne der Src-Kinase zustande.

Die Aktivierung der Src-Kinase durch heptahelikale G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, z. B. $\beta_{1/2/3}$ -AR, Ach-R., $AT_{1/2}$ -R., Endothelin-R., Thrombin-R. usw., kann sowohl G-Protein-abhängig ($G_{s,\alpha}$ und $G_{i,\alpha}$) als auch direkt erfolgen (Hall *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2000).

Die Weiterleitung des Signals nach Aktivierung der Tyrosinkinase bzw. die funktionelle Verbindung zwischen der Src-Kinase und dem I_{Ks} -Kanal ist ebenso noch unklar. Wie bei verschiedenen elektrophysiologischen Studien für Kv1.5 und HERG beobachtet wurde (Cayabyab & Schlichter, 2000; Gamper *et al.*, 2003; Holmes *et al.*, 1996; Mason *et al.*, 2002), ist auch eine direkte Tyrosinphosphorylierung des I_{Ks} -Proteins potentiell möglich. Kaliumkanäle können einen engen Komplex mit spezifischen Proteinkinasen und/oder Phosphatasen bilden (Jonas & Kaczmarek, 1996). Ein „makromolekularer Signalkomplex“ (PKA, Protein-Phosphatase 1, Ankerprotein (yotiao) und hKCNQ1) wurde beispielsweise von Marx *et al.* (2002) in der β_1 -adrenergen Stimulation des humanen I_{Ks} beschrieben (siehe auch Kapitel 5.1).

Eine andere Möglichkeit der Wirkung der Src-Kinase auf I_{Ks} besteht in der Signalübertragung auf weitere Proteinkinasen, z. B. Phospholipase C, MAP-Kinasen, PI-3-Kinase usw. (Thomas & Brugge, 1997). Ein Beispiel dafür ist die Src-vermittelte Signalkaskade zur Zellproliferation und -differenzierung. Dabei werden verschiedene Typen von mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) phosphoryliert (van Biesen *et al.*, 1996). Ferner konnte in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden, dass nach Auslösen eines Angiotensin-II-Signalweges die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase) der Src-Kinase als Second Messenger nachgeschaltet ist und dadurch Ca^{2+} -Kanäle aktiviert werden (Seki *et al.*, 1999).

Abbildung 5.2 stellt abschließend die mögliche Interaktion des kardialen β_3 -AR-Src-Systems mit dem Delayed Rectifier I_{Ks} dar.

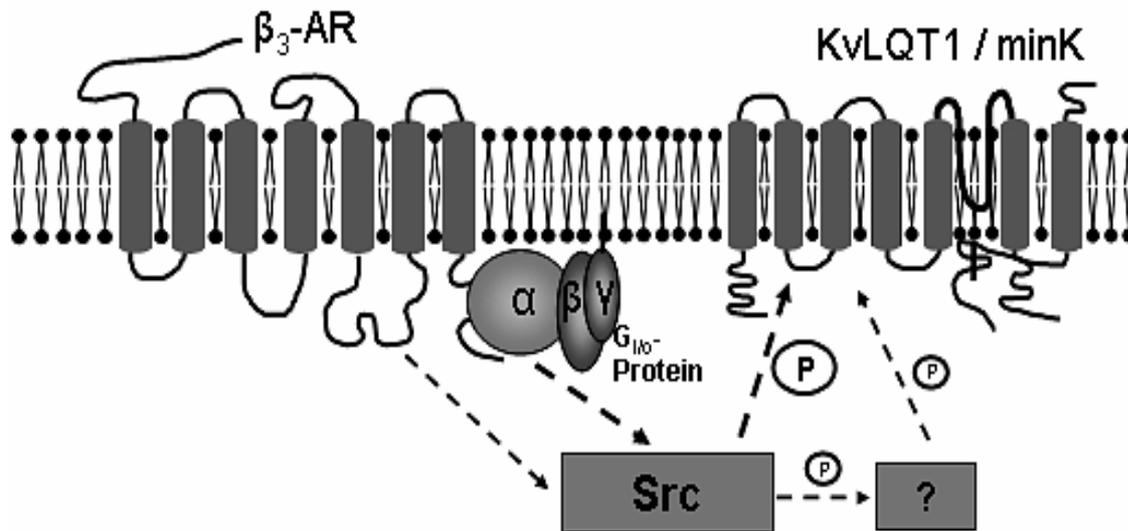


Abbildung 5.2: Möglichkeiten der β_3 -adrenergen Modulation von I_{Ks}

Die Inhibierung der I_{Ks} -Stromamplituden (KCNQ1/KCNE1-Kanal) durch Aktivierung des β_3 -AR's ist abhängig von einer Src-Tyrosinkinase. Sowohl die genaue Interaktion des Enzyms mit dem β_3 -AR als auch die folgenden Phosphorylierungsschritte sind noch nicht aufgeklärt.

5.4 Schlussfolgerung und klinische Relevanz

Die Ergebnisse der Patch-Clamp-Untersuchungen des Delayed Rectifier- I_{Ks} -Stroms in ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens ergaben erstmalig eine funktionelle Interaktion zwischen dem β_3 -adrenergen Rezeptor und einem kardialen Kaliumkanal in nativem Gewebe.

Die Stimulation des β_3 -AR's durch Katecholamine (Noradrenalin, Isoproterenol), bei gleichzeitiger Hemmung der β_1 - und β_2 -AR, oder durch spezifische β_3 -Agonisten (BRL 37344, CL 316,243) hatte einen inhibierenden Effekt auf I_{Ks} . Dies ist dem in dieser Arbeit ebenfalls dargestellten I_{Ks} -stimulierenden β_1 -adrenergen System (β -Agonist \rightarrow AC \uparrow \rightarrow cAMP \uparrow \rightarrow PKA) entgegengesetzt und äußert sich in einer schwachen Verlängerung des ventrikulären AP's.

Die β_3 -adrenerge Wirkung könnte als „kardialer Rückkopplungsmechanismus“ aufgefasst werden, der zur Aufrechterhaltung einer normalen Herzkontraktion und Hämodynamik beiträgt. Durch den I_{Ks} -hemmenden Einfluss des β_3 -AR's würde somit auch eine adrenerge Überstimulation des I_{Ks} -K $^+$ -Stroms in „Stresssituationen“ oder bei erhöhter physischer Aktivität vermieden werden.

Ferner ergibt sich aus den vorliegenden Daten eine pathophysiologische Relevanz. Zhang *et al.* beobachteten kürzlich in kultivierten Kardiomyozyten des Meerschweinchens nach lang anhaltender adrenerger Stimulation mit Isoproterenol eine ca. 30%ige Reduktion der I_{Ks} -Stromamplituden (Zhang *et al.*, 2002). In anderen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die chronische Aktivierung des β_1 -AR's – eine Ursache der Entstehung der kardialen Hypertrophie und Herzinsuffizienz – zu einer „Down-Regulation“ des I_{Ks} -Stroms führt (Li *et al.*, 2002; Tsuji *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001). Der Grund für die I_{Ks} -Inhibierung bei den oben genannten Herzerkrankungen könnte ein stärkerer Einfluss des β_3 -AR's sein, da dieser Rezeptor im Gegensatz zum β_1 -AR keiner Desensitivierung unterliegt (Post *et al.*, 1999). Eine Erhöhung der Expressionsdichte und Funktion des β_3 -AR's wurde bereits im insuffizienten Herzen des Hundes und des Menschen gezeigt (Cheng *et al.*, 2001; Moniotte *et al.*, 2001).

Die Gabe von β -Blockern, die eine β_3 -antagonistische Affinität aufweisen, z. B. Metoprolol oder Carvedilol (Schnabel *et al.*, 2000), könnte somit durch Verhinderung dieser I_{Ks} -bedingten AP-Verlängerung zur Verbesserung der Symptomatik bei chronischer Herzinsuffizienz beitragen. Da der β_3 -AR negativ inotrope Effekte am Herzen auszulösen vermag, führt die β_3 -antagonistische Komponente der Substanzen auch zu einer gleichzeitigen Stärkung der linksventrikulären Pumpfunktion.

Unsere Untersuchungen über einen β_3 -adrenergen Einfluss auf einen Ionenkanal im Säugetierherzen gibt schliesslich wichtige Hinweise auf mögliche (kardiale) Nebenwirkungen der in der Entwicklung stehenden lipolytischen bzw. antidiabetischen β_3 -Agonisten aufgrund der breiten Gewebsverteilung von I_{Ks} und seiner noch nicht vollständig bekannten physiologischen Funktionen in verschiedenen Organen.

Als denkbare Signalweiterleitung einer β_3 -adrenergen Aktivierung wurde die Src-Kinase definiert. Diese Familie von zytosolischen, nichtrezeptorgebundenen Tyrosinkinasen spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation lebenswichtiger zellulärer Signalprozesse, z. B. in der Kontrolle des Zellzyklus, der Zellproliferation und -differenzierung sowie bei der Aktivierung der T- und B-Lymphozyten. Die spezifische Funktion der Src-Kinase innerhalb G-Protein-gekoppelter Signaltransduktionswege ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

Dass der Effekt auf den Kaliumstrom unabhängig von stimulierenden PKA (β_1 -adrenerg)- und PKC (α -adrenerg)-Systemen erfolgte, gibt wiederum einen Hinweis auf die „Gegenspielerfunktion“ des β_3 -AR's im Säugetierherzen.

6 Zusammenfassung

Die langsam aktivierende Komponente des Delayed Rectifier-Kaliumstroms I_{Ks} trägt entscheidend zur Repolarisation des kardialen Aktionspotentials bei. Charakteristisch für diesen Strom ist seine ausgeprägte Aktivierung durch das sympathische Nervensystem. Nach β -adrenerger Stimulation und Auslösung der cAMP-abhängigen Signalkaskade wird ein deutlicher Anstieg der I_{Ks} -Stromamplituden beobachtet.

Die Rolle des 1989 erstmals klonierten und in zahlreichen Geweben (Herz, Fettgewebe, Gastrointestinaltrakt, Bronchialsystem) identifizierten β_3 -adrenergen Rezeptors (β_3 -AR) bei der Regulation des I_{Ks} -Stroms in Kardiomyozyten ist bisher ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des β_3 -AR's und dessen Signaltransduktionswege auf I_{Ks} mit Hilfe elektrophysiologischer Untersuchungsmethoden in Herzmuskelzellen des Meerschweinchens charakterisiert. Hierzu wurden zunächst ventrikuläre Myokardzellen über eine Collagenasebehandlung an der Langendorff-Apparatur gewonnen. Ionenströme und Aktionspotentiale der isolierten Zellen wurden mittels der Patch-Clamp-Technik aufgezeichnet.

Wie in früheren Studien beschrieben, führte die Aktivierung des β_1 -adrenergen Signalwegs mit Isoproterenol, Forskolin und 8-CPT-cAMP zur Steigerung der aktivierenden Step- und deaktivierenden Tail-Stromkomponenten von I_{Ks} .

Nach selektiver Inhibierung der β_1 - und β_2 -AR führte hingegen die Aktivierung des β_3 -AR's durch die Katecholamine Isoproterenol und Noradrenalin zu einer signifikanten Verringerung des I_{Ks} -Kaliumstroms.

Die β_3 -Agonisten BRL 37344 und CL 316,243 zeigten ebenfalls eine konzentrationsabhängige I_{Ks} -Inhibierung. Die Wirkung der beiden Substanzen war charakteristischerweise noch in sehr niedrigen Konzentrationen nachweisbar (IC_{50} : 5 nmol/l bzw. 32 nmol/l).

Eine deutliche Verringerung des hemmenden Effektes von BRL 37344 löste der $\beta_{1,2,3}$ -Antagonist Bupranolol aus. Bei 100 nmol/l BRL 37344 waren die Stromveränderungen von I_{Ks} nahezu aufgehoben.

Die β_3 -AR-vermittelte Stromreduktion war durch einen biphasischen Verlauf, mit einem schnellen und starken Beginn innerhalb von 2 Minuten und einer Abschwächung der Wirkung in den folgenden 5-8 Minuten gekennzeichnet. Dies lässt entweder eine Desensitivierung des Effektes oder die Beeinflussung zweier unabhängiger Signalkaskaden vermuten.

Bei der Analyse der spannungsabhängigen Aktivierung des I_{Ks} -Stroms wurde deutlich, dass die Verschiebung der Aktivierung zu positiven Potentialen zur Reduktion der Stromamplituden beiträgt. Zudem wurde eine 8-10fache Beschleunigung der Strom-Aktivierung festgestellt.

Ferner führte die Hemmung des repolarisierenden Kaliumstroms I_{Ks} durch 1 μ mol/l BRL 37344 zu einer durchschnittlichen Verlängerung der APD um ca. 10 %.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein möglicher Signalweg des β_3 -AR's aufgezeigt. Im Gegensatz zu der β_1 - oder α -adrenergen Modulation des I_{Ks} -Stroms war die BRL 37344-induzierte Stromreduktion PKA- und PKC-unabhängig. Eine vollständige Blockade des Effektes wurde mit der Substanz PP2 erreicht, was auf einen Src-Tyrosinkinase-abhängigen Signaltransduktionsweg hinweist.

Eine genauere Analyse der nachfolgenden Phosphorylierungsschritte erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht. Somit wäre als Mechanismus der β_3 -adrenergen I_{Ks} -Strominhibierung auch eine direkte Tyrosinphosphorylierung des Kanals möglich.

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen erstmals eine funktionelle Interaktion zwischen dem β_3 -adrenergen Rezeptor und einem kardialen Kaliumkanal. Offensichtlich kommt diesem Rezeptorsubtyp eine Rolle als Gegenspieler der β_1 -adrenergen Stimulation im Säugetierherzen zu, die gerade in pathophysiologischen Zuständen, z. B. bei Herzinsuffizienz oder Arrhythmien, bedeutsam sein könnte. Der β_3 -adrenerge Rezeptor könnte daher bei diesen Erkrankungen einen potentiellen therapeutischen Angriffspunkt darstellen.

7 Literaturverzeichnis

- Abbott, G. W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M. E., Lehmann, M. H., Timothy, K. W., Keating, M. T. & Goldstein, S. A. (1999). MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **97**, 175-187.
- Anantharam, A., Lewis, A., Panaghie, G., Gordon, E., McCrossan, Z. A., Lerner, D. J. & Abbott, G. W. (2003). RNA Interference Reveals That Endogenous Xenopus MinK-related Peptides Govern Mammalian K^+ Channel Function in Oocyte Expression Studies. *J.Biol.Chem.* **278**, 11739-11745.
- Apkon, M. & Nerbonne, J. M. (1991). Characterization of two distinct depolarization-activated K^+ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J.Gen.Physiol.* **97**, 973-1011.
- Arch, J. R. & Kaumann, A. J. (1993). β_3 and atypical β -adrenoceptors. *Med.Res.Rev.* **13**, 663-729.
- Ashcroft, F. M. (1988). Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu.Rev.Neurosci.* **11**, 97-118.
- Ashcroft, F.M. (2000). Ion channels and disease. Academic Press, San Diego, CA.
- Bachmann, A., Gutcher, I., Kopp, K., Brendel, J., Bosch, R. F., Busch, A. E. & Gögelein, H. (2001). Characterization of a novel Kv1.5 channel blocker in Xenopus oocytes, CHO cells, human and rat cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* **364**, 472-478.
- Balligand, J. L. & Cannon, P. J. (1997). Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **17**, 1846-1858.
- Balligand, J. L., Kelly, R. A., Marsden, P. A., Smith, T. W. & Michel, T. (1993). Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**, 347-351.
- Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M. & Romey, G. (1996). K_VLQT1 and I_{sK} (minK) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current. *Nature* **384**, 78-80.
- Barhanin, J., Romey, G. & Lazdunski, M. (1999). I_{sK} : a novel type of potassium channel regulatory subunit. In *Current Topics in Membranes* pp. 67-84. Academic Press, San Diego, CA.
- Berkowitz, D. E., Nardone, N. A., Smiley, R. M., Price, D. T., Kreutter, D. K., Fremeau, R. T. & Schwinn, D. A. (1995). Distribution of beta₃-adrenoceptor mRNA in human tissues. *Eur.J.Pharmacol.* **289**, 223-228.
- Berry, M. N., Friend, D. S. & Scheuer, J. (1970). Morphology and metabolism of intact muscle cells isolated from adult rat heart. *Circ.Res.* **26**, 679-687.

- Bond, M. D. & Van Wart, H. E. (1984). Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry* **23**, 3085-3091.
- Bosch, R. F., Gaspo, R., Busch, A. E., Lang, H. J., Li, G. R. & Nattel, S. (1998). Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K^+ current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc.Res.* **38**, 441-450.
- Bryant, S. M., Wan, X., Shipsey, S. J. & Hart, G. (1998). Regional differences in the delayed rectifier current (I_{Kr} and I_{Ks}) contribute to the differences in action potential duration in basal left ventricular myocytes in guinea-pig. *Cardiovasc.Res.* **40**, 322-331.
- Burashnikov, A. & Antzelevitch, C. (2000). Block of I_{Ks} does not induce early afterdepolarization activity but promotes β -adrenergic agonist-induced delayed afterdepolarization activity. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* **11**, 458-465.
- Busch, A. E., Busch, G. L., Ford, E., Suessbrich, H., Lang, H. J., Greger, R., Kunzelmann, K., Attali, B. & Stuhmer, W. (1997). The role of the I_{sK} protein in the specific pharmacological properties of the I_{Ks} channel complex. *Br.J.Pharmacol.* **122**, 187-189.
- Busch, A. E. & Maylie, J. (1994). Effects of calcium buffers and temperature on the β -receptor-mediated regulation of the slowly activating potassium current I_{Ks} in guinea pig cardiac myocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* **4**, 1-9.
- Busch, A. E. & Suessbrich, H. (1997). Role of the I_{sK} protein in the I_{minK} channel complex. *Trends Pharmacol.Sci.* **18**, 26-29.
- Bustamante, J. O., Watanabe, T. & McDonald, T. F. (1981). Single cells from adult mammalian heart: isolation procedure and preliminary electrophysiological studies. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* **59**, 907-910.
- Butler, A., Wei, A. G., Baker, K. & Salkoff, L. (1989). A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*. *Science* **243**, 943-947.
- Bylund, D. B., Eikenberg, D. C., Hieble, J. P., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P., Molinoff, P. B., Ruffolo, R. R., Jr. & Trendelenburg, U. (1994). International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol.Rev.* **46**, 121-136.
- Cao, W., Luttrell, L. M., Medvedev, A. V., Pierce, K. L., Daniel, K. W., Dixon, T. M., Lefkowitz, R. J. & Collins, S. (2000). Direct binding of activated c-Src to the β_3 -adrenergic receptor is required for MAP kinase activation. *J.Biol.Chem.* **275**, 38131-38134.
- Carmeliet, E. (1993). K^+ channels and control of ventricular repolarization in the heart. *Fundam.Clin.Pharmacol.* **7**, 19-28.
- Carpene, C., Galitzky, J., Collon, P., Esclapez, F., Dauzats, M. & Lafontan, M. (1993). Desensitization of β_1 - and β_2 -, but not β_3 -, adrenoceptor-mediated lipolytic responses of adipocytes after long-term norepinephrine infusion. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **265**, 237-247.

- Carruba, M., Tomello, C., Briscini, L. & Nisoli, E. (1998). Advances in pharmacotherapy for obesity. *Int.J.Obes.Relat.Metab.Disord.* **22 (Suppl 1)**, S13-S16.
- Cayabyab, F. S. & Schlichter, L. C. (2002). Regulation of an ERG K⁺ current by Src tyrosine kinase. *J.Biol.Chem.* **277**, 13673-13681.
- Chamberlain, P. D., Jennings, K. H., Paul, F., Cordell, J., Berry, A. *et al.* (1999). The tissue distribution of the human beta₃-adrenoceptor studied using a monoclonal antibody: direct evidence of the beta₃-adrenoceptor in human adipose tissue, atrium and skeletal muscle. *Int.J.Obes.Relat.Metab.Disord.* **23**, 1057-1065.
- Chambers, J., Park, J., Cronk, D., Chapman, C., Kennedy, F. R., Wilson, S. & Milligan, G. (1994). Beta₃-adrenoceptor agonist-induced down-regulation of G_s alpha and functional desensitization in a Chinese hamster ovary cell line expressing a beta₃-adrenoceptor refractory to down-regulation. *Biochem. J.* **303**, 973-978.
- Chandy, K. G. (1991). Simplified gene nomenclature. *Nature* **352**, 26.
- Chaudhry, A., MacKenzie, R. G., Georgic, L. M. & Granneman, J. G. (1994). Differential interaction of beta₁- and beta₃-adrenergic receptors with G_i in rat adipocytes. *Cell Signal.* **6**, 457-465.
- Cheng, H. J., Zhang, Z. S., Onishi, K., Ukai, T., Sane, D. C. & Cheng, C. P. (2001). Upregulation of functional β₃-adrenergic receptor in the failing canine myocardium. *Circ.Res.* **89**, 599-606.
- Chiang, C. E. & Roden, D. M. (2000). The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. *J.Am.Coll.Cardiol.* **36**, 1-12.
- Chinn, K. (1993). Two delayed rectifiers in guinea pig ventricular myocytes distinguished by Tail current kinetics. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **264**, 553-560.
- Chouabe, C., Neyroud, N., Guicheney, P., Lazdunski, M., Romey, G. & Barhanin, J. (1997). Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J.* **16**, 5472-5479.
- Clement, J. P., Kunjilwar, K., Gonzalez, G., Schwanstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L. & Bryan, J. (1997). Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits. *Neuron* **18**, 827-838.
- Clement, K., Vaisse, C., Manning, B. S., Basdevant, A., Guy-Grand, B., Ruiz, J., Silver, K. D., Shuldiner, A. R., Froguel, P. & Strosberg, A. D. (1995). Genetic variation in the β₃-adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N.Engl.J.Med.* **333**, 352-354.
- Cole, K. S. & Curtis, H. J. (1939). Electrical impedance of the squid giant axon during activity. *J.Gen.Physiol.* **22**, 649-670.
- Coraboeuf, E. (1978). Ionic basis of electrical activity in cardiac tissues. *Am.J.Physiol.* **234**, H101-H116.

- Courtemanche, M., Ramirez, R. J. & Nattel, S. (1999). Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation-induced electrical remodeling: insights from a mathematical model. *Cardiovasc.Res.* **42**, 477-489.
- Covarrubias, M., Wei, A. A. & Salkoff, L. (1991). Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K⁺ current systems. *Neuron* **7**, 763-773.
- Cui, J., Melman, Y., Palma, E., Fishman, G. I. & McDonald, T. V. (2000). Cyclic AMP regulates the HERG K⁺ channel by dual pathways. *Curr.Biol.* **10**, 671-674.
- Curran, M. E., Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D. & Keating, M. T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* **80**, 795-803.
- Decher, N., Uyguner, O., Scherer, C. R., Karaman, B., Yuksel-Apak, M., Busch, A. E., Steinmeyer, K. & Wollnik, B. (2001). hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. *Cardiovasc.Res.* **52**, 255-264.
- Devic, E., Xiang, Y., Gould, D. & Kobilka, B. (2001). Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta₁- and beta₂-adrenoceptor knockout mice. *Mol.Pharmacol.* **60**, 577-583.
- DiFrancesco, D. (1993). Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu.Rev.Physiol.* **55**, 455-472.
- Dolan, J. A., Muenkel, H. A., Burns, M. G., Pellegrino, S. M., Fraser, C. M., *et al.* (1994). β₃-adrenoceptor selectivity of the dioxolane dicarboxylate phenethanolamines. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **269**, 1000-1006.
- Donckier, J. E., Massart, P. E., Van Mechelen, H., Heyndrickx, G. R., Gauthier, C. & Balligand, J. L. (2001). Cardiovascular effects of β₃-adrenoceptor stimulation in perinephritic hypertension. *Eur.J.Clin.Invest.* **31**, 681-689.
- Dow, J. W., Harding, N. G. & Powell, T. (1981). Isolated cardiac myocytes. I. Preparation of adult myocytes and their homology with the intact tissue. *Cardiovasc.Res.* **15**, 483-514.
- Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. & MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.
- Drici, M. D., Burklow, T. R., Haridasse, V., Glazer, R. I. & Woosley, R. L. (1996). Sex hormones prolong the QT interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart. *Circulation* **94**, 1471-1474.
- el Hadri, A., Nicolle, E., Guillaume, M. C., Leclerc, G., Pietri-Rouxel, F., Strosberg, A. D. & Archimbault, P. (2001). Synthesis and bovine β₃-adrenergic agonistic activities of a novel series of aryloxypropanolamines. *Pharmazie* **56**, 517-522.
- Emorine, L. J., Marullo, S., Briend-Sutren, M. M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutchko, C. & Strosberg, A. D. (1989). Molecular characterization of the human β₃-adrenergic receptor. *Science* **245**, 1118-1121.

- Fakler, B., Brandle, U., Glowatzki, E., Weidemann, S., Zenner, H. P. & Ruppersberg, J. P. (1995). Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K⁺ channels is caused by intracellular spermine. *Cell* **80**, 149-154.
- Folander, K., Smith, J. S., Antanavage, J., Bennett, C., Stein, R. B. & Swanson, R. (1990). Cloning and expression of the delayed-rectifier I_{sK} channel from neonatal rat heart and diethylstilbestrol-primed rat uterus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 2975-2979.
- Fozzard, H. A. & Beeler, G. W., Jr. (1975). The voltage clamp and cardiac electrophysiology. *Circ.Res.* **37**, 403-413.
- Freeman, L. C. & Kass, R. S. (1993). Delayed rectifier potassium channels in ventricle and sinoatrial node of the guinea pig: molecular and regulatory properties. *Cardiovasc.Drugs Ther.* **7 (Suppl 3)**, 627-635.
- Gamper, N., Stockand, J. D. & Shapiro, M. S. (2003). Subunit-specific modulation of KCNQ potassium channels by Src tyrosine kinase. *J.Neurosci.* **23**, 84-95.
- Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D. & Le Marec, H. (1996). Functional β_3 -adrenoceptor in the human heart. *J.Clin.Invest.* **98**, 556-562.
- Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J. N., Khandoudi, N., Bril, A., Balligand, J. L. & Le Marec, H. (1998). The negative inotropic effect of β_3 -adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J.Clin.Invest.* **102**, 1377-1384.
- Gauthier, C., Tavernier, G., Trochu, J. N., Leblais, V., Laurent, K., Langin, D., Escande, D. & Le Marec, H. (1999). Interspecies differences in the cardiac negative inotropic effects of β_3 -adrenoceptor agonists. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **290**, 687-693.
- Gerlach, U., Brendel, J., Lang, H. J., Paulus, E. F., Weidmann, K., Brüggemann, A., Busch, A. E., Suessbrich, H., Bleich, M. & Greger, R. (2001). Synthesis and activity of novel and selective I_{Ks}-channel blockers. *J.Med.Chem.* **44**, 3831-3837.
- Gintant, G. A. (1996). Two components of delayed rectifier current in canine atrium and ventricle. Does I_{Ks} play a role in the reverse rate dependence of class III agents? *Circ.Res.* **78**, 26-37.
- Gögelein, H., Brüggemann, A., Gerlach, U., Brendel, J. & Busch, A. E. (2000). Inhibition of I_{Ks} channels by HMR 1556. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* **362**, 480-488.
- Gong, H., Heubach, J. F., Sun, H., Ravens, U., Eschenhagen, T., Poole-Wilson, P. & Harding, S. E. (2001). Stimulus-trafficking of the β_2 -adrenoceptor between inhibitory and stimulatory G-Protein in the failing human heart. *Circulation* **104**, II-51.
- Granneman, J. G. (1992). Effects of agonist exposure on the coupling of beta₁- and beta₃-adrenergic receptors to adenylyl cyclase in isolated adipocytes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **261**, 638-642.
- Hall, R. A., Premont, R. T. & Lefkowitz, R. J. (1999). Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J.Cell. Biol.* **145**, 927-932.

- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. (1981). Improved Patch-Clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**, 85-100.
- Hancox, J. C., Levi, A. J. & Witchel, H. J. (1998). Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native "rapid" delayed rectifier K⁺ current during the cardiac ventricular action potential. *Pflügers Arch.* **436**, 843-853.
- Hanke, J. H., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brissette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B. A. & Connelly, P. A. (1996). Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J.Biol.Chem.* **271**, 695-701.
- Harding, S. E. (1997). Lack of evidence for β_3 -adrenoceptor modulation of contractile force in human ventricular myocytes. *Circulation* **95**, 1-53.
- Harris, E. D., Jr. & Krane, S. M. (1974). Collagenases (first of three parts). *N.Engl.J.Med.* **291**, 557-563.
- Hausdorff, S. F., Goldstein, S. A., Rushin, E. E. & Miller, C. (1991). Functional characterization of a minimal K⁺ channel expressed from a synthetic gene. *Biochemistry* **30**, 3341-3346.
- Heath, B. M. & Terrar, D. A. (1996). Separation of the components of the delayed rectifier potassium current using selective blockers of I_{Kr} and I_{Ks} in guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Exp.Physiol.* **81**, 587-603.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. & MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys.J.* **66**, 1061-1067.
- Heubach, J. F., Rau, T., Eschenhagen, T., Ravens, U. & Kaumann, A. J. (2002). Physiological antagonism between ventricular β_1 -adrenoceptors and α_1 -adrenoceptors but no evidence for β_2 - and β_3 -adrenoceptor function in murine heart. *Br.J.Pharmacol.* **136**, 217-229.
- Hidaka, H., Watanabe, M. & Kobayashi, R. (1991). Properties and use of H-series compounds as protein kinase inhibitors. *Methods Enzymol.* **201**, 328-339.
- Hille, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. 2nd ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J.Physiol.(Lond.)* **116**, 449-472.
- Hohnloser, S. H. (1997). Proarrhythmia with class III antiarrhythmic drugs: types, risks, and management. *Am.J.Cardiol.* **80**, 82G-89G.
- Holmes, T. C., Fadool, D. A., Ren, R. & Levitan, I. B. (1996). Association of Src tyrosine kinase with a human potassium channel mediated by SH3 domain. *Science* **274**, 2089-2091.

- Hom, G. J., Forrest, M. J., Bach, T. J., Brady, E., Candelore, M. R., Cascieri, M. A. *et al.* (2001). Beta₃-adrenoceptor agonist-induced increases in lipolysis, metabolic rate, facial flushing, and reflex tachycardia in anesthetized rhesus monkeys. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **297**, 299-307.
- Horinouchi, T., Tanaka, Y. & Koike, K. (2003). Evidence for the primary role for 4-aminopyridine-sensitive K_v channels in β₃-adrenoceptor-mediated, cyclic AMP-independent relaxations of guinea-pig gastrointestinal smooth muscles. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **367**, 193-203.
- Horn, R. & Marty, A. (1988). Muscarinic activation of ionic currents measured by a new Whole-Cell recording method. *J.Gen.Physiol.* **92**, 145-159.
- Hubbard, S. R. & Till, J. H. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu.Rev.Biochem.* **69**, 373-398.
- Inagaki, N., Gonoi, T., Clement, J. P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S. & Bryan, J. (1995). Reconstitution of I_{K(ATP)}: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**, 1166-1170.
- Isenberg, G. & Klockner, U. (1982). Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflügers Arch.* **395**, 6-18.
- Jacob, R., Lieberman, M., Murphy, E. & Piwnicka-Worms, D. (1987). Effects of sodium-potassium pump inhibition and low sodium on membrane potential in cultured embryonic chick heart cells. *J.Physiol.* **387**, 549-566.
- Jan, L. Y. & Jan, Y. N. (1997). Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu.Rev.Neurosci.* **20**, 91-123.
- Jentsch, T. J. (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat.Rev.Neurosci.* **1**, 21-30.
- Jervell, A. & Lange-Nielsen, F. (1965). Congenital deaf mutism, functional heart disease with prolongation of the QT interval, and sudden death. *Am.Heart J.* **54**, 59-79.
- Jonas, E. A. & Kaczmarek, L. K. (1996). Regulation of potassium channels by protein kinases. *Curr.Opin.Neurobiol.* **6**, 318-323.
- Jurkiewicz, N. K. & Sanguinetti, M. C. (1993). Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ.Res.* **72**, 75-83.
- Kamb, A., Iverson, L. E. & Tanouye, M. A. (1987). Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell* **50**, 405-413.
- Karle, C. A., Zitron, E., Zhang, W., Kathofer, S., Schoels, W. & Kiehn, J. (2002). Rapid component I_{Kr} of the guinea-pig cardiac delayed rectifier K⁺ current is inhibited by β₁-adrenoreceptor activation, via cAMP/protein kinase A-dependent pathways. *Cardiovasc.Res.* **53**, 355-362.
- Kass, R. S. (1982a). Nisoldipine: a new, more selective calcium current blocker in cardiac Purkinje fibers. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **223**, 446-456.

- Kass, R. S. & Wiegers, S. E. (1982b). The ionic basis of concentration-related effects of noradrenaline on the action potential of calf cardiac purkinje fibres. *J.Physiol.* **322**, 541-558.
- Kathöfer, S., Zhang, W., Karle, C., Thomas, D., Schoels, W. & Kiehn, J. (2000). Functional coupling of human β_3 -adrenoreceptors to the KvLQT1/MinK potassium channel. *J.Biol.Chem.* **275**, 26743-26747.
- Kaumann, A. J., Engelhardt, S., Hein, L., Molenaar, P. & Lohse, M. (2001). Abolition of (-)-CGP 12177-evoked cardiostimulation in double β_1/β_2 -adrenoceptor knockout mice. Obligatory role of β_1 -adrenoceptors for putative β_4 -adrenoceptor pharmacology. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* **363**, 87-93.
- Kelly, R. A., Balligand, J. L. & Smith, T. W. (1996). Nitric oxide and cardiac function. *Circ.Res.* **79**, 363-380.
- Kenyon, J. L. & Gibbons, W. R. (1979). Influence of chloride, potassium, and tetraethylammonium on the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *J.Gen.Physiol.* **73**, 117-138.
- Kiehn, J., Villena, P., Beyer, T. & Brachmann, J. (1994). Differential effects of the new class III agent dofetilide on potassium currents in guinea pig cardiomyocytes. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **24**, 566-572.
- Kilts, J. D., Gerhardt, M. A., Richardson, M. D., Sreeram, G., Mackensen, G. B., Grocott, H. P. *et al.* (2000). Beta₂-adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G_s and G_i. *Circ.Res.* **87**, 705-709.
- Kitamura, T., Onishi, K., Dohi, K., Okinaka, T., Isaka, N. & Nakano, T. (2000). The negative inotropic effect of β_3 -adrenoceptor stimulation in the beating guinea pig heart. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **35**, 786-790.
- Kono, T. (1969). Roles of collagenases and other proteolytic enzymes in the dispersal of animal tissues. *Biochim.Biophys.Acta* **178**, 397-400.
- Krapivinsky, G., Gordon, E. A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L. & Clapham, D. E. (1995). The G-protein-gated atrial K⁺ channel I_{K(ACh)} is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁺-channel proteins. *Nature* **374**, 135-141.
- Krief, S., Lonnqvist, F., Raimbault, S., Baude, B., van Spronsen, A., Arner, P., Strosberg, A. D., Ricquier, D. & Emorine, L. J. (1993). Tissue distribution of β_3 -adrenergic receptor mRNA in man. *J.Clin.Invest.* **91**, 344-349.
- Kubisch, C., Schroeder, B. C., Friedrich, T., Lutjohann, B., El Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C. & Jentsch, T. J. (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* **96**, 437-446.
- Kupershmidt, S., Snyders, D. J., Raes, A. & Roden, D. M. (1998). A K⁺ channel splice variant common in human heart lacks a C-terminal domain required for expression of rapidly activating delayed rectifier current. *J.Biol.Chem.* **273**, 27231-27235.

- Langendorff, O. (1895). Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Arch.Ges.Physiol.Mens.Tiere Pflügers* **61**, 291-332.
- Langin, D., Portillo, M. P., Saulnier-Blache, J. S. & Lafontan, M. (1991). Coexistence of three β -adrenoceptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. *Eur.J.Pharmacol.* **199**, 291-301.
- Leblais, V., Demolombe, S., Vallette, G., Langin, D., Baro, I., Escande, D. & Gauthier, C. (1999). β_3 -adrenoceptor control the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through a cAMP/protein kinase A-independent pathway. *J.Biol.Chem.* **274**, 6107-6113.
- Lee, M. P., DeBaun, M. R., Mitsuya, K., Galonek, H. L., Brandenburg, S., Oshimura, M. & Feinberg, A. P. (1999). Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 5203-5208.
- Lees-Miller, J. P., Kondo, C., Wang, L. & Duff, H. J. (1997). Electrophysiological characterization of an alternatively processed ERG K⁺ channel in mouse and human hearts. *Circ.Res.* **81**, 719-726.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. & Barhanin, J. (1996). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J.* **15**, 1004-1011.
- Lesage, F. & Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am.J.Physiol.Renal Physiol.* **279**, F793-F801.
- Levesque, P. C., Hart, P. J., Hume, J. R., Kenyon, J. L. & Horowitz, B. (1992). Expression of cystic fibrosis transmembrane regulator Cl⁻ channels in heart. *Circ.Res.* **71**, 1002-1007.
- Levitzki, A. & Gazit, A. (1995). Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* **267**, 1782-1788.
- Lewis, C. J., Gong, H., Zeng, Z., Brown, M. J. & Harding, S. E. (2002). The putative β_4 -adrenergic receptor is a novel state of the β_1 -adrenergic receptor. *Br.J.Pharmacol.* **135**, 183P.
- Li, D., Melnyk, P., Feng, J., Wang, Z., Petrecca, K., Shrier, A. & Nattel, S. (2000). Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation* **101**, 2631-2638.
- Li, G. R., Feng, J., Yue, L., Carrier, M. & Nattel, S. (1996). Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circ.Res.* **78**, 689-696.
- Li, G. R., Lau, C. P., Ducharme, A., Tardif, J. C. & Nattel, S. (2002). Transmural action potential and ionic current remodeling in ventricles of failing canine hearts. *Am.J.Physiol.Heart.Circ.Physiol.* **283**, H1031-H1041.

- Li, G. R., Yang, B., Sun, H. & Baumgarten, C. M. (2000). Existence of a transient outward K^+ current in guinea pig cardiac myocytes. *Am.J.Physiol. Heart Circ.Physiol.* **279**, H130-H138.
- Lindquist, J. M., Fredriksson, J. M., Rehnmark, S., Cannon, B. & Nedergaard, J. (2000). Beta₃- and alpha₁-adrenergic Erk1/2 activation is Src- but not G_i-mediated in Brown adipocytes. *J.Biol.Chem.* **275**, 22670-22677.
- Liu, D. W. & Antzelevitch, C. (1995). Characteristics of the delayed rectifier current (I_{Kr} and I_{Ks}) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker I_{Ks} contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ.Res.* **76**, 351-365.
- Lloyd, J., Schmidt, J. B., Rovnyak, G., Ahmad, S., Atwal, K. S., Bisaha, S. N. *et al.* (2001). Design and synthesis of 4-substituted benzamides as potent, selective, and orally bioavailable I_{Ks} blockers. *J.Med.Chem.* **44**, 3764-3767.
- Lu, Z., Kamiya, K., Opthof, T., Yasui, K. & Kodama, I. (2001). Density and kinetics of I_{Kr} and I_{Ks} in guinea pig and rabbit ventricular myocytes explain different efficacy of I_{Ks} blockade at high heart rate in guinea pig and rabbit: implications for arrhythmogenesis in humans. *Circulation* **104**, 951-956.
- Lynch, J. J., Jr., Salata, J. J., Wallace, A. A., Stump, G. L., Gilberto, D. B., Jahansouz, H., Liverton, N. J., Selnick, H. G. & Claremon, D. A. (2002). Antiarrhythmic efficacy of combined I_{Ks} and β -adrenergic receptor blockade. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **302**, 283-289.
- Ma, Y. C. & Huang, X. Y. (2002). Novel signaling pathway through the β -adrenergic receptor. *Trends Cardiovasc.Med.* **12**, 46-49.
- Ma, Y. C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W. & Huang, X. Y. (2000). Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* **102**, 635-646.
- Mackinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**, 232-235.
- Main, M. C., Bryant, S. M. & Hart, G. (1998). Regional differences in action potential characteristics and membrane currents of guinea-pig left ventricular myocytes. *Exp.Physiol.* **83**, 747-761.
- Makita, N., Horie, M., Nakamura, T., Ai, T., Sasaki, K., Yokoi, H., Sakurai, M., Sakuma, I., Otani, H., Sawa, H. & Kitabatake, A. (2002). Drug-induced long-QT syndrome associated with a subclinical SCN5A mutation. *Circulation* **106**, 1269-1274.
- Makkar, R. R., Fromm, B. S., Steinman, R. T., Meissner, M. D. & Lehmann, M. H. (1993). Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. *JAMA* **270**, 2590-2597.
- Manara, L., Croci, T. & Landi, M. (1995). β_3 -adrenoceptors and intestinal motility. *Fundam.Clin.Pharmacol.* **9**, 332-342.
- Martin, C. A. & Advenier, C. (1995). β_3 -adrenoceptors and airways. *Fundam.Clin.Pharmacol.* **9**, 114-118.

- Marx, S. O., Kurokawa, J., Reiken, S., Motoike, H., D'Armiento, J., Marks, A. R. & Kass, R. S. (2002). Requirement of a macromolecular signaling complex for β -adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* **295**, 496-499.
- Mason, H. S., Latten, M. J., Godoy, L. D., Horowitz, B. & Kenyon, J. L. (2002). Modulation of Kv1.5 currents by protein kinase A, tyrosine kinase, and protein tyrosine phosphatase requires an intact cytoskeleton. *Mol.Pharmacol.* **61**, 285-293.
- Matsuda, H., Saigusa, A. & Irisawa, H. (1987). Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg^{2+} . *Nature* **325**, 156-159.
- McDonald, T. V., Yu, Z., Ming, Z., Palma, E., Meyers, M. B., Wang, K. W., Goldstein, S. A. & Fishman, G. I. (1997). A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I_{Kr} . *Nature* **388**, 289-292.
- McNutt, N. S. (1975). Ultrastructure of the myocardial sarcolemma. *Circ.Res.* **37**, 1-13.
- Melman, Y. F., Domenech, A., de la Luna, S. & McDonald, T. V. (2001). Structural determinants of KvLQT1 control by the KCNE family of proteins. *J.Biol.Chem.* **276**, 6439-6444.
- Mitcheson, J. S. & Sanguinetti, M. C. (1999). Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell.Physiol. Biochem.* **9**, 201-216.
- Milligan, G. (1993). Agonist regulation of cellular G protein levels and distribution: mechanisms and functional implications. *Trends.Pharmacol.Sci.* **14**, 413-418.
- Moss, A. J., Zareba, W., Hall, W. J., Schwartz, P. J., Crampton, R. S., Benhorin, J. *et al.* (2000). Effectiveness and limitations of β -blocker therapy in congenital long-QT syndrome. *Circulation* **101**, 616-623.
- Muir, A. R. (1965). Further observations of the cellular structure of cardiac muscle. *J.Anat.* **99**, 27-46.
- Nantel, F., Bonin, H., Emorine, L. J., Zilberfarb, V., Strosberg, A. D., Bouvier, M. & Marullo, S. (1993). The human β_3 -adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. *Mol.Pharmacol.* **43**, 548-555.
- Nantel, F., Bouvier, M., Strosberg, A. D. & Marullo, S. (1995). Functional effects of long-term activation on human β_2 - and β_3 -adrenoceptor signalling. *Br.J.Pharmacol.* **114**, 1045-1051.
- Nattel, S. & Singh, B. N. (1999). Evolution, mechanisms, and classification of antiarrhythmic drugs: focus on class III actions. *Am.J.Cardiol.* **84**, 11R-19R.
- Nattel, S., Yue, L. & Wang, Z. (1999). Cardiac ultrarapid delayed rectifiers: a novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell. Physiol. Biochem.* **9**, 217-226.
- Neher, E. & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802.

- Nerbonne, J. M. (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J.Physiol.* **525**, 285-298.
- Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Faure, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C., Schwartz, K. & Guicheney, P. (1997). A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat.Genet.* **15**, 186-189.
- Noble, D. & Tsien, R. W. (1969). Reconstruction of the repolarization process in cardiac Purkinje fibres based on voltage clamp measurements of membrane current. *J.Physiol.* **200**, 233-254.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H. *et al.* (1984). Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**, 121-127.
- Noma, A. (1983). ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* **305**, 147-148.
- Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from Drosophila. *Science* **237**, 749-753.
- Papazian, D. M., Timpe, L. C., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1991). Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* **349**, 305-310.
- Pelat, M., Verwaerde, P., Galitzky, J., Lafontan, M., Berlan, M., Senard, J. M. & Montastruc, J. L. (2003). High isoproterenol doses are required to activate beta₃-adrenoceptor-mediated functions in dogs. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **304**, 246-253.
- Pereon, Y., Demolombe, S., Baro, I., Drouin, E., Charpentier, F. & Escande, D. (2000). Differential expression of KvLQT1 isoforms across the human ventricular wall. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* **278**, H1908-H1915.
- Perfetti, R., Hui, H., Chamie, K., Binder, S., Seibert, M., McLenithan, J., Silver, K. & Walston, J. D. (2001). Pancreatic β-cells expressing the Arg64 variant of the β₃-adrenergic receptor exhibit abnormal insulin secretory activity. *J.Mol.Endocrinol.* **27**, 133-144.
- Pham, T. V., Sosunov, E. A., Gainullin, R. Z., Danilo, P., Jr. & Rosen, M. R. (2001). Impact of sex and gonadal steroids on prolongation of ventricular repolarization and arrhythmias induced by I_K-blocking drugs. *Circulation* **103**, 2207-2212.
- Pond, A. L., Scheve, B. K., Benedict, A. T., Petrecca, K., Van Wagoner, D. R., Shrier, A. & Nerbonne, J. M. (2000). Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional I_{Kr} channels. *J.Biol.Chem.* **275**, 5997-6006.
- Post, S. R., Hammond, H. K. & Insel, P. A. (1999). β-adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **39**, 343-360.
- Potet, F., Scott, J. D., Mohammad-Panah, R., Escande, D. & Baro, I. (2001). AKAP proteins anchor cAMP-dependent protein kinase to KvLQT1/I_{sK} channel complex. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* **280**, H2038-H2045.

- Pott, C., Brixius, K., Bundkirchen, A., Bolck, B., Bloch, W., Steinritz, D., Mehlhorn, U. & Schwinger, R. H. (2003). The preferential β_3 -adrenoceptor agonist BRL 37344 increases force via β_1 -/ β_2 -adrenoceptors and induces endothelial nitric oxide synthase via β_3 -adrenoceptors in human atrial myocardium. *Br.J.Pharmacol.* **138**, 521-529.
- Pusch, M. & Neher, E. (1988). Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflügers Arch.* **411**, 204-211.
- Rae, J., Cooper, K., Gates, P. & Watsky, M. (1991). Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J.Neurosci.Methods* **37**, 15-26.
- Rautureau, Y., Toumaniantz, G., Serpillon, S., Jourdon, P., Trochu, J. N. & Gauthier, C. (2003). Beta₃-adrenoceptor in rat aorta: molecular and biochemical characterization and signalling pathway. *Br.J.Pharmacol.* **137**, 153-161.
- Rettig, J., Heinemann, S. H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D. N., Dolly, J. O. & Pongs, O. (1994). Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of β -subunit. *Nature* **369**, 289-294.
- Robbins, J. (2001). KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Ther.* **90**, 1-19.
- Rockman, H. A., Koch, W. J. & Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* **415**, 206-212.
- Roden, D. M. (1998). Mechanisms and management of proarrhythmia. *Am.J.Cardiol.* **82**, 49I-57I.
- Roden, D. M., Balsler, J. R., George, A. L., Jr. & Anderson, M. E. (2002). Cardiac ion channels. *Annu.Rev.Physiol.* **64**, 431-475.
- Rogawski, M. A. (2000). KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy. *Trends Neurosci.* **23**, 393-398.
- Romano, C. (1965). Congenital cardiac arrhythmia. *Lancet* **1**, 658-659.
- Romey, G., Attali, B., Chouabe, C., Abitbol, I., Guillemare, E., Barhanin, J. & Lazdunski, M. (1997). Molecular mechanism and functional significance of the MinK control of the KvLQT1 channel activity. *J.Biol.Chem.* **272**, 16713-16716.
- Rosen, N., Bolen, J. B., Schwartz, A. M., Cohen, P., DeSeau, V. & Israel, M. A. (1986). Analysis of pp60c-src protein kinase activity in human tumor cell lines and tissues. *J.Biol.Chem.* **261**, 13754-13759.
- Rosen, M. R., Wit, A. L. & Hoffman, B. F. (1974). Electrophysiology and pharmacology of cardiac arrhythmias. I. Cellular electrophysiology of the mammalian heart. *Am.Heart J.* **88**, 380-385.
- Sager, P. T. (2000). New advances in class III antiarrhythmic drug therapy. *Curr.Opin.Cardiol.* **15**, 41-53.

- Salata, J. J., Jurkiewicz, N. K., Jow, B., Folander, K., Guinosso, P. J., Jr., Raynor, B., Swanson, R. & Fermini, B. (1996). I_K of rabbit ventricle is composed of two currents: evidence for I_{Ks} . *Am.J.Physiol.* **271**, H2477-H2489.
- Salkoff, L., Kunkel, M. T., Wang, ZW., Butler, A., Yuan-A., Nonet, M. & Wei, A. (1999). The impact of the *Caenorhabditis elegans* genome project on potassium channel biology. In *Current Topics in Membranes* pp. 9-27. Academic Press, San Diego, CA.
- Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L. & Keating, M. T. (1996). Coassembly of KvLQT1 and minK I_{sk} proteins to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature* **384**, 80-83.
- Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E. & Keating, M. T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* **81**, 299-307.
- Sanguinetti, M. C. & 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.
- Sanguinetti, M. C. & Jurkiewicz, N. K. (1991). Delayed rectifier outward K^+ current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am.J.Physiol.* **260**, H393-H399.
- Sanguinetti, M. C., Jurkiewicz, N. K., Scott, A. & Siegl, P. K. (1991). Isoproterenol antagonizes prolongation of refractory period by the class III antiarrhythmic agent E-4031 in guinea pig myocytes. Mechanism of action. *Circ.Res.* **68**, 77-84.
- Schnabel, P., Maack, C., Mies, F., Tyroller, S., Scheer, A. & Bohm, M. (2000). Binding properties of beta-blockers at recombinant β_1 -, β_2 -, and β_3 -adrenoceptors. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **36**, 466-471.
- Schram, G., Melnyk, P., Pourrier, M., Wang, Z. & Nattel, S. (2002a). Kir2.4 and Kir2.1 K^+ channel subunits co-assemble: a potential new contributor to inward rectifier current heterogeneity. *J.Physiol.* **544**, 337-349.
- Schram, G., Pourrier, M., Melnyk, P. & Nattel, S. (2002b). Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ.Res.* **90**, 939-950.
- Schröder, B. C., Waldegger, S., Fehr, S., Bleich, M., Warth, R., Greger, R. & Jentsch, T. J. (2000). A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* **403**, 196-199.
- Schulze-Bahr, E., Wang, Q., Wedekind, H., Haverkamp, W., Chen, Q. *et al.* (1997). KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat.Genet.* **17**, 267-268.
- Seamon, K. B. & Daly, J. W. (1986). Forskolin: its biological and chemical properties. *Adv.Cyclic.Nucleotide.Protein Phosphorylation.Res.* **20**, 1-150.

- Seki, T., Yokoshiki, H., Sunagawa, M., Nakamura, M. & Sperelakis, N. (1999). Angiotensin II stimulation of Ca^{2+} -channel current in vascular smooth muscle cells is inhibited by lavendustin-A and LY-294002. *Pflügers Arch.* **437**, 317-323.
- Selnick, H. G., Liverton, N. J., Baldwin, J. J., Butcher, J. W., Claremon, D. A. *et al.* (1997). Class III antiarrhythmic activity in vivo by selective blockade of the slowly activating cardiac delayed rectifier potassium current I_{Ks} by (R)-2-(2,4-trifluoromethyl)-N-[2-oxo-5-phenyl-1-(2,2,2-trifluoroethyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-3yl]acetamide. *J.Med.Chem.* **40**, 3865-3868.
- Selyanko, A. A., Hadley, J. K., Wood, I. C., Abogadie, F. C., Jentsch, T. J. & Brown, D. A. (2000). Inhibition of KCNQ1-4 potassium channels expressed in mammalian cells via M1 muscarinic acetylcholine receptors. *J.Physiol.* **522**, 349-355.
- Sesti, F., Abbott, G. W., Wei, J., Murray, K. T., Saksena, S., Schwartz, P. J., Priori, S. G., Roden, D. M., George, A. L., Jr. & Goldstein, S. A. (2000). A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**, 10613-10618.
- Shen, Y. T., Zhang, H. & Vatner, S. F. (1994). Peripheral vascular effects of β -3 adrenergic receptor stimulation in conscious dogs. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **268**, 466-473.
- Shieh, C. C., Coghlan, M., Sullivan, J. P. & Gopalakrishnan, M. (2000). Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol.Rev.* **52**, 557-594.
- Shimizu, K., Shintani, Y., Ding, W. G., Matsuura, H. & Bamba, T. (2002). Potentiation of slow component of delayed rectifier K^+ current by cGMP via two distinct mechanisms: inhibition of phosphodiesterase 3 and activation of protein kinase G. *Br.J.Pharmacol.* **137**, 127-137.
- Siegelbaum, S. A. (1994). Channel regulation. Ion channel control by tyrosine phosphorylation. *Curr.Biol.* **4**, 242-245.
- Sigworth, F. J. (1995). Electronic design of the patch clamp. In *Single-channel recording*, eds. Sakmann, B. & Neher, E., pp. 95-127. Plenum Press, New York.
- Smith, P. L., Baukrowitz, T. & Yellen, G. (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* **379**, 833-836.
- Snyders, D. J. (1999). Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc.Res.* **42**, 377-390.
- Splawski, I., Shen, J., Timothy, K. W., Lehmann, M. H., Priori, S., Robinson, J. L., Moss, A. J., Schwartz, P. J., Towbin, J. A., Vincent, G. M. & Keating, M. T. (2000). Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* **102**, 1178-1185.
- Strosberg, A. D. (1997). Structure and function of the β_3 -adrenergic receptor. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **37**, 421-450.

- Suessbrich, H. & Busch, A. E. (1999). The I_{Ks} channel: coassembly of I_{sK} (minK) and KvLQT1 proteins. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* **137**, 191-226.
- Takumi, T., Ohkubo, H. & Nakanishi, S. (1988). Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* **242**, 1042-1045.
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. & Tomita, F. (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{++} dependent protein kinase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **135**, 397-402.
- Thomas, S. M. & Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **13**, 513-609.
- Tinel, N., Diochot, S., Borsotto, M., Lazdunski, M. & Barhanin, J. (2000). KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J.* **19**, 6326-6330.
- Torp-Pedersen, C., Moller, M., Bloch-Thomsen, P. E., Kober, L., Sandoe, E., Egstrup, K. *et al.* (1999). Dofetilide in patients with congestive heart failure and left ventricular dysfunction. Danish Investigations of Arrhythmia and Mortality on Dofetilide Study Group. *N.Engl.J.Med.* **341**, 857-865.
- Tsien, R. W., Bean, B. P., Hess, P. & Nowycky, M. (1983). Calcium channels: mechanisms of β -adrenergic modulation and ion permeation. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **48**, 201-212.
- Tsuji, Y., Opthof, T., Kamiya, K., Yasui, K., Liu, W., Lu, Z. & Kodama, I. (2000). Pacing-induced heart failure causes a reduction of delayed rectifier potassium currents along with decreases in calcium and transient outward currents in rabbit ventricle. *Cardiovasc.Res.* **48**, 300-309.
- Vahouny, G. V., Wei, R., Starkweather, R. & Davis, C. (1970). Preparation of beating heart cells from adult rats. *Science* **167**, 1616-1618.
- van Biesen, T., Luttrell, L. M., Hawes, B. E. & Lefkowitz, R. J. (1996). Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr.Rev.* **17**, 698-714.
- Van Breemen, V. L. (1953). Intercalated disks in heart muscle studied with the electron microscope. *Anat.Rec.* **117**, 49-63.
- Varghese, P., Harrison, R. W., Lofthouse, R. A., Georgakopoulos, D., Berkowitz, D. E. & Hare, J. M. (2000). β_3 -adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility. *J.Clin.Invest.* **106**, 697-703.
- Varnum, M. D., Busch, A. E., Bond, C. T., Maylie, J. & Adelman, J. P. (1993). The min K channel underlies the cardiac potassium current I_{Ks} and mediates species-specific responses to protein kinase C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**, 11528-11532.
- Varro, A., Lathrop, D. A., Hester, S. B., Nanasi, P. P. & Papp, J. G. (1993). Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes. *Basic Res.Cardiol.* **88**, 93-102.

- Waldo, A. L., Camm, A. J., deRuyter, H., Friedman, P. L., MacNeil, D. J., Pauls, J. F., Pitt, B., Pratt, C. M., Schwartz, P. J. & Veltri, E. P. (1996). Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. Survival With Oral d-Sotalol. *Lancet* **348**, 7-12.
- Walsh, K. B., Begenisich, T. B. & Kass, R. S. (1988). β -adrenergic modulation in the heart. Independent regulation of K and Ca channels. *Pflügers Arch.* **411**, 232-234.
- Walsh, K. B., Begenisich, T. B. & Kass, R. S. (1989). Beta-adrenergic modulation of cardiac ion channels. Differential temperature sensitivity of potassium and calcium currents. *J.Gen.Physiol.* **93**, 841-854.
- Walsh, K. B. & Kass, R. S. (1988). Regulation of a heart potassium channel by protein kinase A and C. *Science* **242**, 67-69.
- Walsh, K. B. & Kass, R. S. (1991). Distinct voltage-dependent regulation of a heart-delayed I_K by protein kinases A and C. *Am.J.Physiol.* **261**, C1081-C1090.
- Walston, J., Silver, K., Bogardus, C., Knowler, W. C., Celi, F. S., Austin, S., Manning, B. *et al.* (1995). Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the β_3 -adrenergic-receptor gene. *N.Engl.J.Med.* **333**, 343-347.
- Wang, Q., Curran, M. E., Splawski, I., Burn, T. C., Millholland, J. M., VanRaay, T. J. *et al.* (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat.Genet.* **12**, 17-23.
- Wang, W., Xia, J. & Kass, R. S. (1998). MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled I_{sK} channel. *J.Biol.Chem.* **273**, 34069-34074.
- Ward, O. C. (1964). A new familial cardiac syndrome in children. *J.Ir.Med.Assoc.* **54**, 103-106.
- Warmke, J., Drysdale, R. & Ganetzky, B. (1991). A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science* **252**, 1560-1562.
- Warmke, J. W. & 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.
- Washizuka, T., Horie, M., Obayashi, K., & Sasayama, S. (1998). Genistein inhibits slow component delayed-rectifier K^+ currents via a tyrosine kinase-independent pathway. *J.Mol.Cell Cardiol.* **30**, 2577-2590.
- Washizuka, T., Horie, M., Watanuki, M. & Sasayama, S. (1997). Endothelin-1 inhibits the slow component of cardiac delayed rectifier K^+ currents via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Circ.Res.* **81**, 211-218.
- Weidmann, S. (1955). The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system. *J.Physiol.* **127**, 213-224.

- White, J. A., McAlpine, P. J., Antonarakis, S., Cann, H., Eppig, J. T., Frazer, K. *et al.* (1997). Guidelines for human gene nomenclature (1997). HUGO Nomenclature Committee. *Genomics* **45**, 468-471.
- Wible, B. A., Yang, Q., Kuryshev, Y. A., Accili, E. A. & Brown, A. M. (1998). Cloning and expression of a novel K⁺ channel regulatory protein, KChAP. *J.Biol.Chem.* **273**, 11745-11751.
- Worthington tissue dissociation guide. (1999). Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ.
- Xiao, R. P., Cheng, H., Zhou, Y. Y., Kuschel, M. & Lakatta, E. G. (1999). Recent advances in cardiac β_2 -adrenergic signal transduction. *Circ.Res.* **85**, 1092-1100.
- Xu, X., Rials, S. J., Wu, Y., Salata, J. J., Liu, T., Bharucha, D. B., Marinchak, R. A. & Kowey, P. R. (2001). Left ventricular hypertrophy decreases slowly but not rapidly activating delayed rectifier potassium currents of epicardial and endocardial myocytes in rabbits. *Circulation* **103**, 1585-1590.
- Yang, T., Snyders, D. J. & Roden, D. M. (1997). Rapid inactivation determines the rectification and [K⁺]_o dependence of the rapid component of the delayed rectifier K⁺ current in cardiac cells. *Circ.Res.* **80**, 782-789.
- Yang, Y. & Sigworth, F. J. (1998). Single-channel properties of I_{Ks} potassium channels. *J.Gen.Physiol.* **112**, 665-678.
- Yazawa, K. & Kameyama, M. (1990). Mechanism of receptor-mediated modulation of the delayed outward potassium current in guinea-pig ventricular myocytes. *J.Physiol.* **421**, 135-150.
- Yokoyama, H. O., Jennings, R. B. & Wartman, W. B. (1961). Intercalated discs of dog myocardium. *Exp.Cell.Res.* **23**, 29-44.
- Yoshida, T., Hiraoka, N. & Kondo, M. (1991). Effects of a β_3 -adrenoceptor agonist, BRL 26830A, on insulin and glucagon release in mice. *Endocrinol.Jpn.* **38**, 641-646.
- Yue, D. T. & Marban, E. (1988). A novel cardiac potassium channel that is active and conductive at depolarized potentials. *Pflügers Arch.* **413**, 127-133.
- Zeng, J., Laurita, K. R., Rosenbaum, D. S. & Rudy, Y. (1995). Two components of the delayed rectifier K⁺ current in ventricular myocytes of the guinea pig type. Theoretical formulation and their role in repolarization. *Circ.Res.* **77**, 140-152.
- Zhang, L. M., Wang, Z. & Nattel, S. (2002). Effects of sustained β -adrenergic stimulation on ionic currents of cultured adult guinea pig cardiomyocytes. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* **282**, H880-H889.
- Zhang, Z. J., Jurkiewicz, N. K., Folander, K., Lazarides, E., Salata, J. J. & Swanson, R. (1994). K⁺ currents expressed from the guinea pig cardiac I_{sK} protein are enhanced by activators of protein kinase C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 1766-1770.

-
- Zhang, Z. S., Onishi, K., Cheng, H. J. & Cheng, C. P. (1998). Effects of β_3 -adrenergic stimulation on cardiac L-type-Calcium current: normal vs congestive heart failure. *Circulation* **98**, 1-695.
- Zhou, Z., Gong, Q., Ye, B., Fan, Z., Makielski, J. C., Robertson, G. A. & January, C. T. (1998). Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *Biophys.J.* **74**, 230-241.
- Zimmerman, A. N. & Hülsmann, W. C. (1966). Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature* **211**, 646-647.
- Zipes, D. P., Besch, H. R., Jr. & Watanabe, A. M. (1975). Role of the slow current in cardiac electrophysiology. *Circulation* **51**, 761-766.

Meine akademischen Lehrer neben Frau Prof. Dr. G. Drews und Herrn Prof. Dr. V. Kühlkamp waren:

H.P.T Ammon

A. Bechthold

C. Beyer

G. Gauglitz

L. Heide

K.-A. Kovar

J. Lindner

E. Mechler

C. Müller

E. Reinhard

H.J. Roth

H. Safayhi

P.C. Schmidt

J.E. Schultz

D. Steinhilber

M.A. Wahl

A. Wankmüller

W. Zimmermann

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Familiennamen: Schneck
Vornamen: Alexander Christian
Geboren am/in: 18.05.1972 in Tübingen

Schulbildung

1978-1982 Mörike Grundschule, Tübingen
1982-1991 Carlo-Schmid Gymnasium, Tübingen

Zivildienst

1991-1992 Universitäts-Kinderklinik Tübingen, Abteilung Neonatologie

Berufliche Ausbildung

1992-1997 Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
11/1997- 04/1998 Praktikum in der Stadtapotheke, Zuffenhausen
05/1998-10/1998 Praktikum bei der Novartis Pharma GmbH, Wehr
01/1999 Approbation als Apotheker
Seit 02/1999 angestellter Apotheker in der Apotheke am Tübinger Tor, Reutlingen
09/1999-12/2002 Durchführung des experimentellen Teils der Promotionsarbeit bei Herrn Prof. Dr. V. Kühlkamp und Frau Prof. Dr. G. Drews in der kardiologischen Abteilung der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, mit dem Thema: „Einfluss des β_3 -adrenergen Rezeptors auf die langsame Komponente des Delayed Rectifier-Kaliumstroms in ventrikulären Kardiomyozyten des Meerschweinchens“
09/1999-08/2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Fortüne-Programm) an der Medizinischen Universitätsklinik, Abteilung Kardiologie, Tübingen
09/2000-02/2003 Promotionsstipendiat der Pinguinstiftung der Henkel AG, Düsseldorf

Publikationsverzeichnis

Originalpublikationen

Bosch, R.F.*, Schneck, A.C.*, Eigenberger, B.W., Rüb, N., Zhang, W., Kiehn, J., Gogel, J., Hambrock, A., Mewis, C., Seipel, L. & Kühlkamp, V. (2002): Functional coupling of the β_3 -adrenergic receptor to an ion channel in the heart - β_3 -adrenergic stimulation inhibits I_{Ks} in guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc.Res.* **56**, 393-403.

Bosch, R.F.*, Schneck, A.C.*, Csillag, S., Eigenberger, B.W., Gerlach, U., Brendel, C., Lang, H.J., Mewis, C., Gögelein, H., Seipel, V. & Kühlkamp, V. (2003): Effects of the chromanol HMR 1556 on potassium currents in atrial myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* **367**, 281-288;

*: geteilte Erstautorenschaft!

Kongressbeiträge

Schneck, A.C., Bosch, R.F., Eigenberger, B.W., Grammer, V. & Kühlkamp, V. (2000): β_3 -adrenergic modulation of the slow component of the delayed rectifier, I_{Ks} . *Poster auf der 24. Jahrestagung der European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology in Bern, CH.*

Bosch R.F., Grammer J.B., Eigenberger B, Schneck A.C., Mewis C. & Kühlkamp V. (2000): Cellular and molecular mechanisms of shortened atrial repolarization in hyperthyroidism. *Eur.Heart.J.* **21 (Suppl. S)**: 1312

Bosch, R.F., Wöhrl, S., Rueb, N., Schneck, A.C., Neuberger, H.R., Eigenberger, B.W., Seipel, L. & Kühlkamp, V. (2001): Changes in cellular electrophysiology after ultrashort atrial stimulation in a rapid pacing model of the rabbit. *Eur.Heart.J.* **22 (Suppl. S)**: 57

Bosch, R.F., Schneck, A.C., Csillag, S., Eigenberger, B.W., Mewis, C., Brendel, C., Gerlach, U., Busch, A. & Kühlkamp, V. (2001): The effects of the chromanol HMR 1556 on potassium channels in guinea pig and human atrial myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* **363 (Suppl.)**: R75

Schneck, A.C., Bosch, R.F., Gogel, J., Rüb, N., Eigenberger, B.W. & Kühlkamp, V. (2001): Stimulation of the β_3 -adrenoceptor inhibits the slow component of the delayed rectifier K^+ current I_{Ks} in guinea-pig ventricular myocytes. *Fund.&Clin.Pharmacol.* **15 (Suppl. 1)**: 7P165, *Poster auf dem 3. Europäischen Kongress der EPHAR in Lyon, F.*

Schneck, A.C., Bosch, R.F. & Kühlkamp, V. (2002): Tyrosinekinase-dependent inhibition of the slow delayed rectifier K^+ current I_{Ks} in guinea pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* **443 (Suppl.2)**: S277, *Poster auf dem 81. Kongress der DPG in Tübingen.*

Schneck, A.C., Bosch, R.F. & Kühlkamp, V. (2002): Beta₃-adrenoceptor inhibits the I_{Ks} K⁺current via a tyrosinekinase-dependent pathway in guinea pig ventricular myocytes. *The Pharmacologist* **44/2 (Suppl.1)**: A198, *Poster auf dem 14. Weltkongress der IUPHAR in San Francisco, USA.*

Bosch, R.F., Laszlo, R., Schneck, A.C., Gögelein, H., Bleich, M., Mewis, C. & Kühlkamp, V. (2002): AVE 0118, an antiarrhythmic drug with a novel mechanism of action - Block of I_{Kur} and I_{to} Potassium currents in human atrial myocytes. *Circulation* **106 (Suppl.2)**: 106

Vorträge

Schneck, A.C., Bosch, R.F., Gogel, J., Rüb, N., Eigenberger, B.W., Mewis, C., Zhang, W., Kiehn, J., Seipel, L. & Kühlkamp, V. (2001): Inhibition of I_{Ks} by β₃-adrenergic activation in guinea pig ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* **363 (Suppl.)**: R28, *Vortrag auf der 42. Frühjahrstagung der DGPT in Mainz.*

Schneck, A.C., Rüb, N., Eigenberger, B.W., Mewis, C., Zhang, W., Kiehn, J. & Bosch, R.F. (2001): Einfluss des β₃-adrenergen Rezeptors auf die langsame Komponente des delayed rectifier K⁺-Stroms I_{Ks}, in ventrikulären Herzmuskelzellen des Meerschweinchens. *Vortrag (V388) auf der 67. Jahrestagung der DGK in Mannheim.*