Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
Zentrum für Anästhesiologie
Prof. Dr. Alwin E. Goetz
ehemals Prof. Dr. Dr. h.c. Jochen Schulte am Esch
und
Institut für neurale Signalverarbeitung
Zentrum für molekulare Neurobiologie
Prof. Dr. Olaf Pongs

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistraße 52, 20246 Hamburg

Die Effekte langwirksamer Amidlokalanästhetika auf repolarisierende Kaliumkanäle des menschlichen Herzens

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt

von

Anna Solth

aus Düsseldorf

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 01.12.2005
Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. P. Friederich
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. H. Ehmke
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. J. R. Schwarz

Für meine Mutter und meine Schwester

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung 1
2. Einleitung 2
2.1. Klinik der Lokalanästhetikaintoxikation 2
2.1.1. Kardiale Symptomatik bei Lokalanästhetikaintoxikation 2
2.1.2. Risikogruppen: Schwangere 2
2.2. Physiologie des Herzaktionspotentials 3
2.2.1. Grundlagen der elektrischen Aktivität am Herzen 3
2.2.2. Ionenkanäle 4
2.2.3. Spannungsabhängige Kaliumkanäle des Herzens 5
2.2.3.1. Kv4.3/KChIP2.2 und I_{to} 6
2.2.3.2. KvLQT1/minK und I_{Ks} 7
2.2.3.3. HERG/MiRP1 und I_{Kr} 8
2.3. Pathophysiologie der rhythmischen Herztätigkeit: Arrhythmien 9
2.3.1. Herzinsuffizienz und Arrhythmien 10
2.3.2. LQT-Syndrome 10
2.3.2.1. Angeborene LQT-Syndrome 11
2.3.2.2. Erworbenes LQT-Syndrom 12
2.4. Lokalanästhetika 13
2.4.1. Aufbau und Entwicklung der Lokalanästhetika 13
2.4.2. Inhibition von Ionenkanälen durch Lokalanästhetika 14
2.5. Rampenprotokoll 15
3. Material und Methoden 16
3.1. Lösungen 16
3.2. Molekularbiologische Methoden 16
3.3. Zellbiologische Methoden 17
3.3.1. Zellkultur 17
3.3.2. Transfektion 17
3.4. Elektrophysiologische Methoden – *patch clamp* 17
3.4.1. Ausstattung des Messstands 18
3.5. Datenaufnahme 20
3.5.1. Verstärker (*patch clamp*-Schaltkreis) 20
3.5.2. Kapazitätskorrektur 21
3.5.3. Serienwiderstandskompensation 22

3.5.4. Leckstromkorrektur 22
3.5.5. Digitalisierung und Filterung 23
3.6. Durchführung der *patch clamp*-Experimente 23
3.6.1. Ablauf 23
3.6.2. Pulsprotokolle 24
3.6.2.1. Aktivierungsprotokoll für Kv4.3/KChIP2.2 24
3.6.2.2. Inaktivierungsprotokoll für Kv4.3/KChIP2.2 25
3.6.2.3. Rechteckpulsprotokoll für Kv4.3 und Kv4.3/KChIP2.2 25
3.6.2.4. *recovery*-Protokoll für Kv4.3/KChIP2.2 25
3.6.2.5. Protokolle zur Untersuchung der Frequenzabhängigkeit von Kv4.3/KChIP2... 25
3.6.2.6. Rampenprotokoll 26
3.6.2.7. Rechteckpulsprotokoll für KvLQT1/minK 26
3.7. Theoretische Grundlagen 27
3.7.1. Berechnung des elektrochemischen Gradienten 27
3.7.2. Berechnung der Leitfähigkeit 28
3.7.3. Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung 28
3.7.4. Zeitkonstanten der Inaktivierung 29
3.7.5. Strom-Zeit-Beziehung der Erholung von der Inaktivierung 29
3.7.6. Bestimmung von I_{max}, Q und t_{peak} 30
3.7.7. Bestimmung der Stromdichte 30
3.7.8. Berechnung der Inhibition 30
3.7.9. Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Inhibition 31
3.7.10. Statistische Signifikanz 31
4. Ergebnisse 32
4.1. Kv4.3/KChIP2.2 32
4.1.1. Eigenschaften des Kv4.3/KChIP2.2-Komplexes 32
4.1.1.1. Aktivierung 32
4.1.1.2. Spannungsabhängige Inaktivierung 33
4.1.1.3. Zeitabhängige Inaktivierung 34
4.1.1.4. Erholung von der Inaktivierung 35
4.1.1.5. Frequenz 35
4.1.2. Eigenschaften der Kv4.3-α-Untereinheit 36
4.1.3. Pharmakologie des Kv4.3/KChIP2.2-Komplexes 37
4.1.3.1. Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Inhibition 38

4.1.3.2. Überkreuzungsphänomen und Effekt auf die Zeitkonstanten 38
4.1.3.3. Parameter des Überkreuzungsphänomens 39
4.1.3.4. Einfluss von Bupivacain auf die Aktivierung 41
4.1.3.5. Einfluss von Bupivacain auf die spannungsabhängige Inaktivierung 42
4.1.3.6. Einfluss von Bupivacain auf die Erholung von der Inaktivierung 43
4.1.3.7. Spannungsabhängigkeit der Inhibition 46
4.1.3.8. Frequenzabhängigkeit der Inhibition 47
4.1.4. Pharmakologie der Kv4.3-α-Untereinheit 48
4.1.5. Untersuchungen mit Ropivacain 49
4.1.5.1. Inhibition und Überkreuzungsphänomen bei Ropivacain 49
4.1.5.2. Einfluss von Ropivacain auf das Schaltverhalten des Kv4.3/KChIP2.2-Komplexes 51
4.1.5.3. Spannungsabhängigkeit des Ropivacaineffektes 52
4.1.5.4. Frequenzabhängigkeit des Ropivacaineffektes 54
4.1.5.5. Pharmakologie der Kv4.3-α-Untereinheit 55
4.2. Rampe 56
4.2.1. Anwendung des Rampenprotokolls unter Kontrollbedingungen 56
4.2.2. Pharmakologie mit dem Rampenprotokoll bei Kv4.3/KChIP2.2 57
4.2.3. Pharmakologie mit dem Rampenprotokoll bei KvLQT1/minK 59
4.2.4. HERG-Pharmakologie 60
4.2.5. Eigenschaften von HERG, HERG/MiRP1 und HERG/ MiRP1$_{T8A}$ 63
4.2.6. Vergleichende Pharmakologie von HERG, HERG/MiRP1 und HERG/MiRP1$_{T8A}$ 65
5. Diskussion 67
5.1. Der Effekt langwirksamer Amidlokalanästhetika auf Kv4.3/KChIP2.2 67
5.2. Das Rampenprotokoll 71
5.2.1. Charakterisierung der Rampenströme von Kv43./KChIP2.2, KvLQT1/minK und HERG 71
5.2.2. Pharmakologie von Kv4.3/KChIP2.2 und KvLQT1/minK-Rampenströmen 74
5.2.3. Pharmakologie von HERG, HERG/MiRP1 und HERG/MiRP1$_{T8A}$ 75
6. Zusammenfassung 80
7. Literaturverzeichnis 81
8. Abkürzungsverzeichnis 94

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Intoxikationen mit dem Aminoamidlokalanästhetikum Bupivacain können schwere Herzrhythmusstörungen, insbesondere ventrikuläre Tachyarrhythmien, hervorrufen (Albright, 1979). Die neuen Substanzen Ropivacain und Levobupivacain sind reine Enantiomere. Sie wurden unter der Annahme entwickelt, dass die kardiotoxischen Komplikationen von Bupivacain durch stereoselektive Effekte hervorgerufen werden (Scott *et al.*, 1989; Foster & Markham, 2000).

Pharmaka sehr unterschiedlicher Substanzklassen verursachen Arrhythmien, indem sie mit kardialen Kaliumkanälen interagieren (Roden *et al.*, 1996). Die wichtigsten repolarisierenden Kaliumströme während des Herzaktionspotenials sind I_{to}, I_{Ks} und I_{Kr}. Sie werden von den aus α- und β-Untereinheiten bestehenden Kaliumkanalkomplexen Kv4.3/KChIP2.2, KvLQT1/minK und HERG/MiRP1 vermittelt. Obwohl eine Inhibition der α-Untereinheiten Kv4.3 und HERG durch Bupivacain gezeigt werden konnte (Gonzalez *et al.*, 2002a; Franqueza *et al.*, 1999), wurde der Einfluss der β-Untereinheiten auf die Lokalanästhetikasensitivität bisher nicht untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass β-Untereinheiten wie im Falle des Polymorphismus $MiRP1_{T8A}$ die Pharmakosensitivität von Kaliumkanälen modulieren können (Sesti *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit sollen die Effekte der Lokalanästhetika Bupivacain, Levobupivacain und Ropivacain auf die Kaliumkanalkomplexe Kv4.3/KChIP2.2, KvLQT1/minK und HERG/MiRP1 mit der *patch clamp*-Technik charakterisiert werden. Dabei wird das Rampenprotokoll angewandt, welches die elektrischen Verhältnisse während des Herzaktionspotentials simuliert (Hancox *et al.*, 1998).

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Welchen Effekt haben Bupivacain, Levobupivacain und Ropivacain auf Kv4.3/KChIP2.2, KvLQT1/minK und HERG/MiRP1?
2. Haben die Enantiomere Levobupivacain und Ropivacain einen anderen Effekt auf die Kanalkomplexe als das Razemat Bupivacain?
3. Verändern β-Untereinheiten die Empfindlichkeit der Kaliumkanäle gegenüber den untersuchten Lokalanästhetika?
4. Können die mit dem Rampenprotokoll erhobenen Daten zur Lokalanästhetikawirkung auf kardiale Kaliumkanäle *in vitro* Aufschluss über den Effekt dieser Substanzen auf die repolarisierenden Ströme des Herzaktionspotentials *in vivo* geben?

2. Einleitung

2.1. Klinik der Lokalanästhetikaintoxikation

Die systemische Intoxikation mit Lokalanästhetika ist ein seltenes, aber mit einer hohen Mortalität verbundenes Ereignis (Albright, 1979; Reiz & Nath, 1986). Sie folgt meist auf eine unbeabsichtigte intravasale Injektion, in den meisten Fällen trotz negativer Aspiration, selten auch durch massive Überdosierung oder abnorm gesteigerte Resorption der Substanz in den systemischen Kreislauf (Strichartz & Berde, 1994). Die systemische Toxizität manifestiert sich neben dem zentralen Nervensystem insbesondere am Herzen. Albright berichtete 1979 erstmals von Herz-Kreislaufversagen mit zum Teil tödlichem Ausgang nach Gabe der Amidlokalanästhetika Etidocain bzw. Bupivacain in sechs Fällen (Albright, 1979). Es kam zu ventrikulären Tachykardien, Kammerflimmern und Asystolie. Eine Studie von 1986 dokumentiert in einem Zeitraum von 10 Jahren 49 Fälle kardiotoxischer Wirkung von Bupivacain mit einer Gesamtmortalität von 43 % (Reiz & Nath, 1986).

2.1.1. Kardiale Symptomatik bei Lokalanästhetikaintoxikation

Am Herzen haben Lokalanästhetika vor allem eine inhibierende Wirkung auf die Kontraktilität und auf die elektrische Leitfähigkeit insbesondere im Bereich des Ventrikelmyokards (Strichartz & Berde, 1994). Sowohl in Fallberichten (Albright, 1979; Mallampati *et al.*, 1984; Long *et al.*, 1989), als auch in Experimenten mit Tiermodellen (Kotelko *et al.*, 1984; Kasten, 1986; Chang *et al.*, 2001), wurden schwere kardiale Arrhythmien beobachtet. Bei einer Lokalanästhetikaintoxikation kann das QT-Intervall im Elektrokardiogramm verlängert sein (Kasten, 1986). Ein verlängertes QT-Intervall kann eine besondere Form der ventrikulären Tachykardie, so genannte Torsaden oder *Torsades de pointes* (TdP) provozieren (Dessertenne, 1966; Crumb & Cavero, 1999; Chang *et al.*, 2001). Die *Torsades de pointes* Tachykardie ist lebensgefährlich. Sie kann zwar spontan terminieren, aber auch persistieren und in ein Kammerflimmern degenerieren.

2.1.2. Risikogruppen: Schwangere

Bei den initialen Fallberichten über die kardiotoxische Wirkung der Lokalanästhetika, bei denen es auch zu Todesfällen kam, handelte es sich um Regionalanästhesien zur Kaiserschnitt-Entbindung (Albright, 1979). Der Wechsel von der Allgemeinanästhesie zu regionalen Verfahren, insbesondere der Periduralanästhesie, in der geburtshilflichen Anästhesie (Hawkins *et al.*, 1997b, Stamer *et al.*, 1999) erhöht die klinische Relevanz von Lokalanästhetikaintoxikationen.

Physiologische Veränderungen in der Schwangerschaft, wie die Dilatation der Venen im Periduralraum, werden für die größere Ausbreitung und Stärke spinaler und periduraler Anästhesien während der Schwangerschaft verantwortlich gemacht (Bromage, 1962). Sie könnten auch das Risiko einer versehentlich intravasalen Substanzapplikation bei diesen Anästhesieverfahren erhöhen. Zudem liegt durch die während der Schwangerschaft physiologische Abnahme der Plasmaproteine (Song *et al.*, 1970) ein größerer Anteil des Lokalanästhetikums ungebunden vor (Tsen *et al.*, 1999). Ob dies einen Einfluss auf die Kardiotoxizität eines Lokalanästhetikums hat, bleibt jedoch unklar, zumal Berichte über eine erhöhte Toxizität von Bupivacain bei trächtigen Schafen gegenüber nicht-trächtigen Schafen (Morishima *et al.*, 1985) nicht reproduziert werden konnten (Santos *et al.*, 1995).

Als Konsequenz aus den Todesfällen wurde 1984 in den USA die 0,75 %ige Bupivacain-Zubereitung aus der geburtshilflichen Anästhesie genommen (Hawkins *et al.*, 1997a). Seitdem wurde ein Rückgang der mit Regionalanästhesie assoziierten Todesfälle in der Geburtshilfe beobachtet, wofür auch die erhöhte Aufmerksamkeit gegenüber kardiotoxischen Komplikationen von Lokalanästhetika und eine verbesserte Technik in der Ausführung der regionalen Anästhesieverfahren verantwortlich sein könnten (Hawkins *et al.*, 1997a). Die molekulare Ursache der Todesfälle wurde bislang nur unzureichend aufgeklärt. Damit fehlt insbesondere für die präklinische Bewertung des Risikoprofils neuerer Lokalanästhetika die wissenschaftliche Grundlage.

2.2. Physiologie des Herzaktionspotentials

Um die Hypothesen zur Pathophysiologie der kardialen Intoxikation mit Lokalanästhetika ableiten zu können, sollen zunächst die physiologischen Vorgänge dargestellt werden, die zu einer rhythmischen Pumpaktivität des Herzens führen.

2.2.1. Grundlagen der elektrischen Aktivität am Herzen

Im Herzmuskel werden elektrische Signale generiert und geordnet weitergeleitet. Diese Signale führen in jeder Herzmuskelzelle über die elektromechanische Kopplung zur Kontraktion. Diese Vorgänge müssen geordnet und rhythmisch ablaufen, damit sich das Herz als Ganzes kontrahieren und so seine Pumpfunktion erfüllen kann. Das elektrische Signal besteht aus Ionenflüssen durch die Herzmuskelzellmembran, die depolarisierend oder repolarisierend wirken. Grundeinheit des weiterzuleitenden elektrischen Signals ist das Herzaktionspotential.

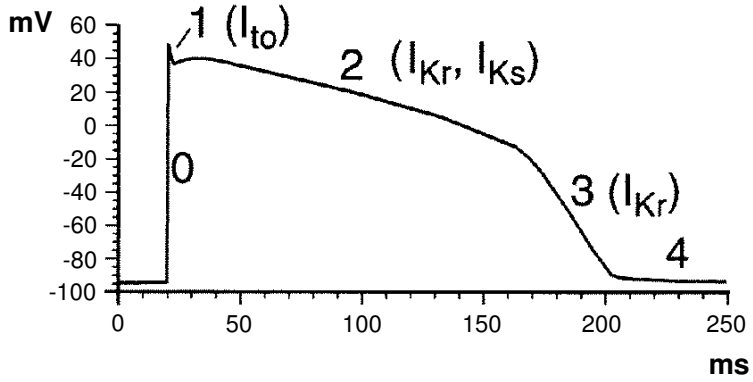

Abbildung 2.1.: Die Phasen des Herzaktionspotentials. Die wichtigsten repolarisierenden Kaliumströme sind I_{to} während der Phase 1 und I_{Ks} und I_{Kr} während der Phase 2 und 3 des Herzaktionspotentials. (Modifiziert nach Keating & Sanguinetti, 2001.)

Das Herzaktionspotential wird in 5 Phasen eingeteilt (Abbildung 2.1.): In Phase 0 findet der *upstroke* statt, eine Depolarisation von wenigen Millisekunden Dauer, verursacht durch einen schnellen depolarisierenden Natriumeinstrom. Die folgende kurze Repolarisation der Phase 1 wird als *notch* bezeichnet, welcher durch den transienten Kaliumauswärtsstrom I_{to} (*transient outward*) hervorgerufen wird. Phase 2 wird als Plateauphase bezeichnet, da die Repolarisation durch einen Kalziumeinstrom verzögert wird und das Membranpotential nahezu konstant bleibt. Diesem Kalziumeinstrom wirken zwei Kaliumauswärtsströme (I_K) entgegen, der langsam (*slow*) aktivierende I_{Ks} und der schnell (*rapid*) aktivierende I_{Kr}. Diese Phase dauert 180 - 300 ms und ist die Hauptursache für den Unterschied in der Dauer kardialer (200 - 400 ms) und neuronaler (1 ms) Aktionspotentiale (Hille, 2001). Phase 3 als Repolarisationsphase ist noch stärker durch I_{Kr} beeinflusst, als Phase 2, und Phase 4 wird als Ruhephase hauptsächlich durch I_{K1}, einen weiteren Kaliumstrom verursacht.

2.2.2. Ionenkanäle

Die Ströme des Herzaktionspotentials fließen durch Ionenkanäle. Ionenkanäle sind Proteine, die in den Membranen aller erregbaren Zellen vorkommen. Es handelt sich dabei um Poren, die selektiv oder unselektiv Ionen passieren lassen. Sie können permanent oder transient offen sein. Transient offene Kanäle können über Konformationsänderungen verschiedene Zustände einnehmen. Abbildung 2.2. zeigt schematisch die drei Hauptzustände eines Ionenkanals und den Übergang zwischen diesen Zuständen. Der Übergang eines Ionenkanals vom geschlossenen Zustand in den offenen Zustand wird Aktivierung genannt. Manche offenen Kanäle können inaktivieren. Der inaktivierte Zustand hat mit dem geschlossenen gemeinsam, dass bei beiden kein Ionenfluss stattfinden kann. Während im geschlossenen Zustand jedoch eine Aktivierung möglich ist, muss der inaktivierte Kanal sich erst wieder aus

der Inaktivierung erholen, bevor eine erneute Aktivierung stattfinden kann. Als „Erholung von der Inaktivierung“ wird der Übergang vom inaktivierten in den offenen Zustand bezeichnet. Vom offenen Zustand kann ein Kanal in den geschlossenen Zustand deaktivieren. Neben diesen Hauptzuständen können Ionenkanäle jedoch noch weitere Zustände einnehmen. Den Übergängen zwischen den verschiedenen Zuständen eines Ionenkanals liegen Konformationsänderungen zugrunde. Diese sind abhängig von chemischen oder physikalischen Reizen, wie Ligandenbindung oder Änderung von pH-Wert, Temperatur oder Membranpotential.

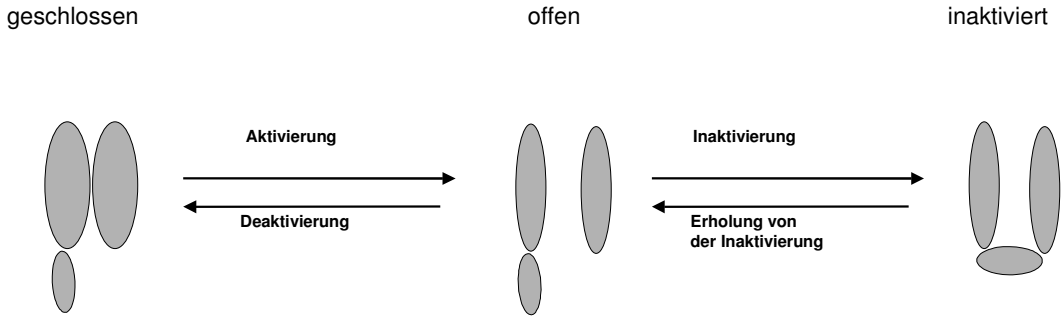

Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Hauptzustände von transient offenen Kanälen.

2.2.3. Spannungsabhängige Kaliumkanäle des Herzens

Spannungsabhängige Kaliumkanäle sind am Herzen unter anderem für die frühen (I_{to}) und späten (I_{Ks}, I_{Kr}) repolarisierenden Auswärtsströme des Herzaktionspotentials verantwortlich (Nerbonne, 2000). Diese Kanäle werden durch die Membrandepolarisation während des Herzaktionspotentials aktiviert.

Kaliumkanäle stellen die Gruppe von Ionenkanälen dar, welche die größte Heterogenität aufweist (MacKinnon, 2003). Trotz dieser Heterogenität gehören alle Kaliumkanäle zu einer Proteinfamilie, welcher sie aufgrund eines Segments mit hochkonservierter Aminosäuresequenz (Glycin-Tyrosin-Glycin bzw. Glycin-Phenylalanin-Glycin), der sogenannten Kaliumkanalsignatursequenz, zugeordnet werden können (Heginbotham *et al.*, 1994). Dieses Segment bildet den Selektivitätsfilter des Kanals für Kalium. Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle besitzen weitere gemeinsame Strukturmerkmale. Sie bestehen aus vier α-Untereinheiten, die sich zu Homo- oder Heterotetrameren zusammenlagern (MacKinnon, 1991) (Abbildung 2.3.A.). Jede α-Untereinheit besteht aus den sechs transmembranen Segmenten S1-S6 (Abbildung 2.3.B.). Der Spannungssensor im S4-Segment besteht aus regelmäßig angeordneten positiven Aminosäuren, die Segmente 5

und 6 bilden die Pore. Ein Verbindungsstück zwischen S5 und S6 ragt in die Pore hinein und enthält den Selektivitätsfilter mit der Signatursequenz.

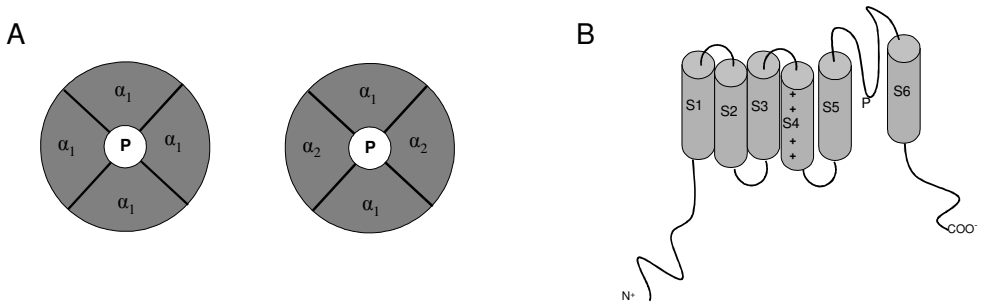

Abbildung 2.3.: A. Spannungsabhängige Kaliumkanäle bestehen aus vier α-Untereinheiten, die sich zu Homo- oder Heterotetrameren zusammenlagern, welche eine Pore (P) umschließen. B. Jede dieser α-Untereinheiten besteht aus sechs α-Helices, welche die transmembranen Segmente S1-S6 bilden. S4 enthält viele positiv geladene Aminosäuren in regelmäßigen Abständen, S5 und S6 sind durch einen *linker* oder *pore loop* (P) verbunden, der den Selektivitätsfilter enthält.

Die α-Untereinheiten der Kanäle können mit akzessorischen Proteinen, den β-Untereinheiten, interagieren und dadurch moduliert werden. β-Untereinheiten können zytoplasmatisch lokalisiert sein, wie z.B. *Kv Channel-interacting Protein* KChIP, oder wie, z.B. *minimal K Channel* minK und *minK-related Peptide-1* MiRP1, aus einem transmembranen Segment bestehen. Sie können die Antwort des Kanals auf Spannungsänderungen modulieren und die Oberflächenexpression verändern (An *et al.*, 2000; Barhanin *et al.*, 1996; Abbott *et al.*, 1999). Die in dieser Arbeit untersuchten Ionenkanäle werden in der Reihenfolge ihres Auftretens während des kardialen Aktionspotentials beschrieben.

2.2.3.1. Kv4.3/KChIP2.2 und I_{to}

Der transiente Auswärtsstrom I_{to} ruft die initiale Repolarisation, den *notch*, im Herzaktionspotential hervor (Snyders, 1999). Kv4.3 gehört zu den Kv-Kanälen (*voltage gated K Channels*) der Untergruppe 4 und ist die am häufigsten vorkommende Isoform der Kv4-Kanäle im menschlichen Myokard (Dixon *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1999). Durch Injektion der RNA dieses spannungsabhängigen Kaliumkanals in *Xenopus* Oozyten werden Ströme evoziert, die in ihren biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften I_{to} ähneln (Dixon *et al.*, 1996). Es handelt sich hierbei um typische A-Ströme, also um Ströme, die spannungsabhängig schnell aktivieren und schnell inaktivieren (Dixon *et al.* 1996; Hille, 2001). An *et al.* (2000) klonierten zytoplasmatische akzessorische Proteine, so genannte *Kv Channel-interacting Proteins* (KChIPs) aus dem Gehirn von Ratten und zeigten, dass bei Koexpression von KChIPs mit Kv4-Kanälen die biophysikalischen Eigenschaften und die Verteilungsdichte der resultierenden Ströme besser mit nativen A-Strömen übereinstimmten

als bei Expression der α-Untereinheit alleine (An *et al.*, 2000). Bähring *et al.* (2001) klonierten eine menschliche KChIP2-Spleiß-Variante (KChIP2.2) aus dem Herzen. Wird diese mit Kv4-α-Untereinheiten koexprimiert, können Ströme evoziert werden, die I_{to} sehr ähneln (Bähring *et al.*, 2001). I_{to} unterliegt in seiner Dichte und Frequenzabhängigkeit regionalen Schwankungen (Näbauer *et al.*, 1996). Die Dichte von I_{to} ist epikardial höher als endokardial. Dieser Gradient korreliert mit der Expression von KChIP2 im Herzen (Rosati *et al.*, 2001), das epikardial um ein Vielfaches stärker exprimiert wird als endokardial (Rosati *et al.*, 2001; Rosati *et al.*, 2003).

2.2.3.2. KvLQT1/minK und I_{Ks}

Der langsam aktivierende Kaliumauswärtsstrom I_{Ks} ist für die Repolarisation am Ende des Plateaus des Herzaktionspotentials während der Phase 3 mitverantwortlich. Weitere elektrophysiologische Eigenschaften von I_{Ks} sind die fehlende Inaktivierung und die langsame Deaktivierung, welche für eine Zunahme der Stromamplitude bei hohen Herzfrequenzen aufgrund einer inkompletten Deaktivierung während der Diastole verantwortlich ist (Mitcheson & Sanguinetti, 1999). I_{Ks} wird wie I_{to} von einem Kanal-Komplex generiert. Dieser besteht aus dem spannungsabhängigen *Long-QT Syndrome 1*-assoziierten Kaliumkanal KvLQT1 und der β-Untereinheit *minimal K Channel* minK (Barhanin *et al.* 1996). 1988 wurde das Gen für minK, KCNE1, aus Nierengewebe von Ratten kloniert (Takumi *et al.*, 1988). Wenn *Xenopus* Oozyten mit minK-RNA injiziert werden, erhält man Ströme mit Eigenschaften, die denen von I_{Ks} in Kardiomyozyten ähneln. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht in Säugetierzellen, wie der Skelettmuskelzelllinie C2C12, der fibroblastischen Zelllinie CHO und der T-Lymphozytenzelllinie Jurkat, reproduzierbar (Lesage *et al.*, 1993). Ursache dafür ist, dass KvLQT1 nativ in *Xenopus* Oozyten aber nicht in Säugetierzellen vorhanden ist. 1996 konnte das Gen KCNQ1, das für KvLQT1 kodiert, kloniert werden (Wang *et al.*, 1996). KvLQT1 ist ein Protein mit sechs Transmembrandomänen und einem *pore loop*, welcher die Kaliumkanalsignatursequenz enthält (Abbildung 2.4.). Es handelt sich um die α-Untereinheit des I_{Ks} generierenden Kanal-Komplexes. Bei Koexpression von KvLQT1 mit minK in COS-Zellen erhält man I_{Ks} ähnelnde Ströme (Barhanin *et al.*, 1996).

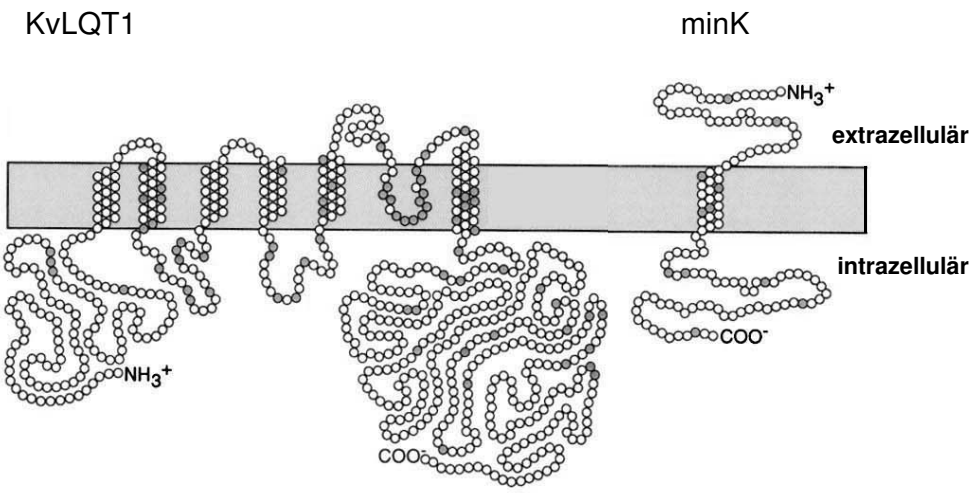

Abbildung 2.4.: Schematische Darstellung der Proteinuntereinheiten des I_{Ks}-generierenenden Kanals. Die α-Untereinheit KvLQT1 besteht aus sechs Transmembrandomänen. Der Amino- sowie der Carboxyterminus von KvLQT1 liegen zytoplasmatisch. Die β-Untereinheit wird von minK gebildet und enthält nur eine transmembrane Domäne, der Aminoterminus liegt extrazellulär, der Carboxyterminus intrazellulär. Es lagern sich je vier α- und β-Untereinheiten zu Homo- oder Heterotetrameren zusammen. (Modifiziert nach Keating & Sanguinetti, 2001.)

2.2.3.3. HERG/MiRP1 und I_{Kr}

KCNH2 codiert für den HERG (*human ether-à-gogo-related gene*)-Kanal (Abbildung 2.5.), der als molekulares Substrat von I_{Kr} identifiziert wurde (Trudeau *et al.*, 1995). Wenn HERG in *Xenopus* Oozyten exprimiert wird, gleichen seine biophysikalischen Eigenschaften weitestgehend denen von in Kardiomyozyten von Meerschweinchen gemessen I_{Kr} (Sanguinetti *et al.*, 1995). Für I_{Kr} wurde jedoch eine Empfindlichkeit gegenüber den Substanzen E-4031 (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990) und MK-499 (Lynch *et al.*, 1994) festgestellt, die nicht für den heterolog exprimierten HERG-Kanal reproduzierbar war (Sanguinetti *et al.*, 1995). Zusätzlich zeigten Abbott *et al.*, dass die Deaktivierung der HERG-Ströme *in vitro* langsamer ist, als die von I_{Kr} (Abbott *et al.*, 1999). Durch Genanalyse bei 250 Patienten mit angeborenem *Long-QT* Syndrom (siehe 2.3.2.1) wurde das *minK-related peptide 1* (MiRP1) (Abbildung 2.5.) entdeckt und eine Rolle als putative β-Untereinheit für HERG postuliert (Abbot *et al.*, 1999). Die Rolle von MiRP1 als Modulator der biophysikalischen (Abbot *et al.*, 1999, Isbrandt *et al.*, 2002) und pharmakologischen (Abbot *et al.*, 1999) Eigenschaften von HERG ist jedoch nicht unumstritten (Weerapura *et al.*, 2002).

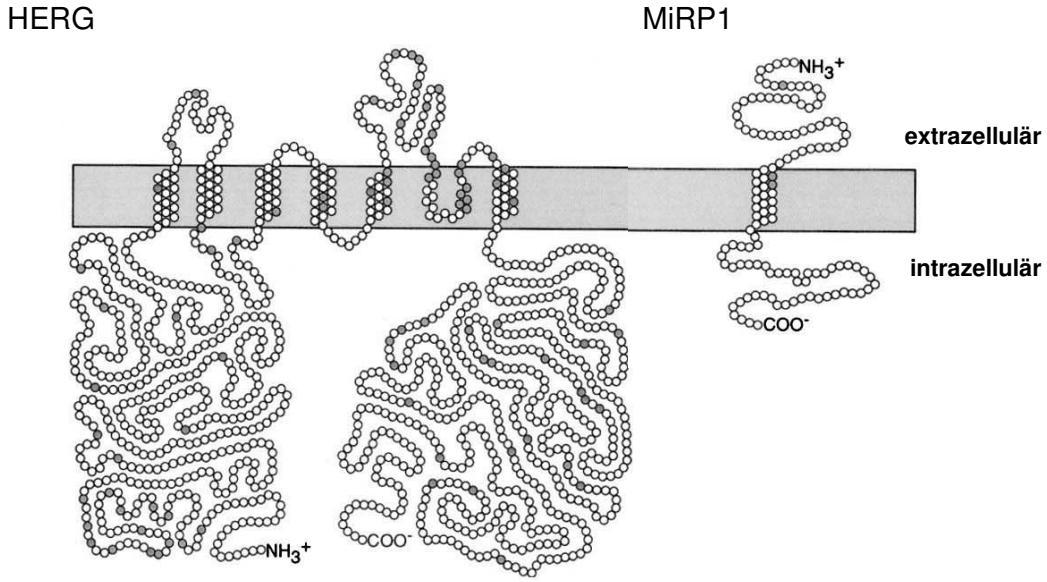

Abbildung 2.5.: Schematische Darstellung der α-Untereinheit HERG mit sechs Transmembrandomänen, *pore loop* und intrazellulären Amino- und Carboxyterminus. Die putative β-Untereinheit MiRP1 besteht aus nur einer Transmembrandomäne. (Modifiziert nach Keating & Sanguinetti, 2001.)

2.3. Pathophysiologie der rhythmischen Herztätigkeit: Arrhythmien

Eine Modulation kardialer Kaliumkanäle kann über die Veränderung der entsprechenden Stromkomponente zur Änderung von Form und Dauer des Herzaktionspotentials führen. Bei einer Verlängerung des Aktionspotentials (Abbildung 2.6.A.), die sich im Elektrokardiogramm als verlängertes QT-Intervall darstellt (Abbildung 2.6.B.), ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten früher Nachdepolarisationen (*Early After Depolarisations*, EADs) erhöht (Abbildung 2.6.A., Crumb & Cavero, 1999). In diesem Zustand besteht eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber Kammerarrhythmien insbesondere vom *Torsades de pointes*-Typ (Abbildung 2.6.C.). *Torsades de pointes* bedeutet „Drehungen um einen Punkt“ und beschreibt das Verhalten des QRS-Komplexes bei dieser Tachykardie: Die Achse des verbreiterten (>120 ms) QRS-Komplexes dreht sich um die isoelektrische Linie. Auch die Amplituden einzelner QRS-Komplexe sind unterschiedlich groß und nehmen spindelförmig zu und ab. Ein verlängertes QT-Intervall und Torsaden treten auch bei einer Lokalanästhetikaintoxikation auf. Eine Aktionspotentialsverlängerung kann aber auch antiarrhythmische Konsequenzen haben. Antiarrhythmika der Klasse Ia wie z.B. Ajmalin oder der Klasse III wie Sotalol vermitteln ihre Wirkung über eine Verlängerung der Aktionspotentialsdauer.

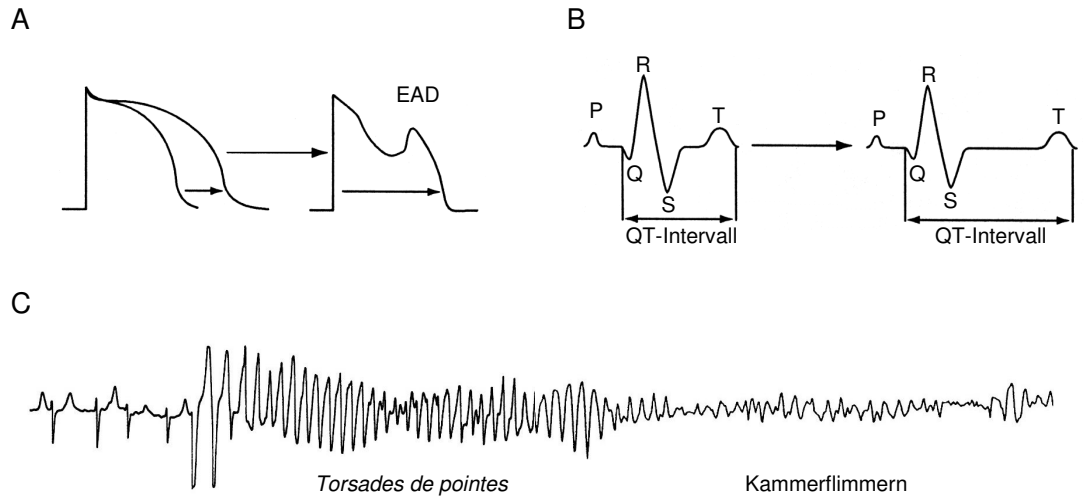

Abbildung 2.6.: A. Eine Verlängerung des Herzaktionspotentials kann zu *Early After Depolarisations* (EADs) führen. B. Im Elektrokardiogramm stellt sich die Aktionspotentialsverlängerung als QT-Intervall-Verlängerung dar. C. Treten bei QT-Intervall-Verlängerungen EADs auf, so kann dieses zu Torsaden führen. Torsaden können in ein Kammerflimmern degenerieren. (Modifiziert nach Crumb & Cavero, 1999 und Keating & Sanguinetti, 2001.)

2.3.1. Herzinsuffizienz und Arrhythmien

Eine Verlängerung der Herzaktionspotentialdauer tritt auch bei Herzversagen und in Tiermodellen kardialer Hypertrophie häufig auf, sie ist unter anderem auf eine veränderte Expression verschiedener depolarisierender und repolarisierender Ströme zurückzuführen (Wickenden *et al.*, 1998). Hier steht der aus Kv4.3 und KChIP2.2 bestehende Kanal-Komplex im Mittelpunkt. Die Menge an Kv4.3-mRNA im Kammermyokard ist bei Patienten mit Herzversagen im Vergleich zu Kontrollpersonen um 30 % vermindert und elektrophysiologische Aufnahmen an isolierten Myozyten derselben Herzen zeigen eine Reduktion von I_{to} (Kääb *et al.*, 1998). In Experimenten an Ratten mit induzierter Linksherzhypertrophie (Capuano *et al.*, 2002) bzw. Myokardinfarkt (Kaprielian *et al.*, 1999) ist der Kv4.3-mRNA-Gehalt ebenfalls reduziert.

2.3.2. LQT-Syndrome

Eine wichtige Erkrankung, bei der das Herzaktionspotential verlängert ist, ist das *Long-QT* Syndrom (LQTS), bei dem das QT-Intervall im Elektrokardiogramm verlängert ist. Das QT-Intervall repräsentiert die gesamte intraventrikuläre Erregungsdauer. Es gibt angeborene und erworbene LQT-Syndrome.

2.3.2.1. Angeborene LQT-Syndrome

Es sind sieben angeborene LQT-Syndrome bekannt (LQT-1 – LQT-7). Meist sind sie auf Mutationen in α- oder β-Untereinheiten von Ionenkanälen zurückzuführen (siehe Tabelle 2.1.). Mutationen im KCNQ1-Gen, das für KvLQT1, die α-Untereinheit des I_{Ks}-generierenden Kanal-Komplexes, codiert, rufen LQT-1 hervor (Wang *et al.*, 1996). KCNE1 codiert für minK, die β-Untereinheit dieses Komplexes (Barhanin *et al.*, 1996). Mutationen in KCNE1 rufen LQT-5 hervor (Splawski *et al.*, 1997). Heterozygote Mutationen in KCNQ1 oder in KCNE1 rufen das autosomal-dominante Romano-Ward-Syndrom hervor, während homozygote Mutationen für das autosomal-rezessive Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom JLNS verantwortlich gemacht werden konnten (Tyson *et al.*, 1997; Schulze-Bahr *et al.*, 1997). Das JLNS ist zusätzlich zu den kardialen Symptomen durch eine Innenohrschwerhörigkeit gekennzeichnet. Die KCNQ1-Mutationen, die LQT-1 verursachen, führen über unterschiedliche molekulare Mechanismen zu einer Funktionseinbuße (*loss of function*) (Wollnik *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999). Diese führt über eine Reduktion der repolarisierenden Stromkomponente I_{Ks} zu einer Verlängerung des Herzaktionspotentials. LQT-2 wird durch Mutationen im KCNH2-Gen hervorgerufen, welches für HERG codiert (Curran *et al.*, 1995). Auch wenn die Modulierung von I_{Kr} durch MiRP1 bis jetzt nicht hinreichend geklärt wurde (Weerapura *et al.*, 2002), so wird doch angenommen, dass Mutationen in KCNE2, welches für MiRP1 codiert, LQT-6 verursachen könnten (Abbott *et al.*, 1999; Isbrandt *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003). Mit Ausnahme von $HERG_{N629D}$ resultieren die Mutationen in KCNE1, KCNH2 und KCNE2 ebenfalls in einem *loss of function* mit einer Verlängerung des Herzaktionspotentials aufgrund einer verminderten Repolarisation. Der Funktionssteigerung (*gain of function*) der Mutation $HERG_{N629D}$ liegt ein Verlust der Kaliumselektivität zugrunde, der den Einstrom von Natriumionen ermöglicht und durch einen Netto-Kationeneinstrom zu einer verlängerten Depolarisation führt (Lees-Miller *et al.*, 2000). Das SCN5A-Gen kodiert für die α-Untereinheit des *human-Heart-1* (hH1)-Natriumkanals, der für die initiale Depolarisation des Herzaktionspotentials während der Phase 0 verantwortlich ist (Gellens *et al.*, 1992). Mutationen in SCN5A führen zu LQT-3 (Wang *et al.*, 1995). Diesem liegt ein *gain of function* mit verlängertem depolarisierendem Natriumeinstrom zugrunde, der sich über eine beeinträchtigte Inaktivierung erklären lässt (Bennett *et al.*, 1995, Dumaine *et al.*, 1996).

Die *loss of function*-Mutation im Ankyrin-Beta (ANKB)-Gen, welches für das Verankerungsprotein Ankyrin-β kodiert, führt über eine beeinträchtigte Verankerung

verschiedener Ankyrin-β-bindender Proteine in der Membran sowie einer Störung der Kalzium-Signal-Wege in den Kardiomyozyten zu LQT-4 (Mohler *et al.*, 2003).

LQT-7 ist Bestandteil des seltenen Andersen-Syndroms, welches zusätzlich zu den kardialen Symptomen durch periodische Lähmungen und Störungen in der Entwicklung des Skeletts gekennzeichnet ist. Das Andersen-Syndrom wird durch Mutationen in KCNJ2, das für den einwärts rektifizierenden Kaliumkanal Kir2.1 codiert, verursacht. Kir2.1 wird im Herz- und Skelettmuskel exprimiert (Kubo *et al.*, 1993). Im Herzen generiert er den späten repolarisierenden I_{K1}-Strom der Phase 4 (Wible *et al.*, 1995). Alle bekannten Mutationen resultieren ebenfalls in einem *loss of function* (Tristani-Firouzi *et al.*, 2002).

Erkrankung	Gen	Protein	Referenz
LQT-1	KCNQ1	KvLQT1	Wang *et al.*, 1996
LQT-2	KCNH2	HERG	Curran *et al.*, 1995
LQT-3	SCN5A	hH1	Wang *et al.*, 1995
LQT-4	ANKB	Ankyrin-β	Mohler *et al.*, 2003
LQT-5	KCNE1	minK	Splawski *et al.*, 1997
LQT-6	KCNE2	MiRP1	Abbott *et al.*, 1999
LQT-7	KCNJ2	Kir2.1	Tristani-Firouzi *et al.*, 2002

Tabelle 2.1: Die bei den angeborenen LQT-Syndromen betroffenen Gene und deren Genprodukte. (Modifiziert nach Kass & Moss, 2003.)

2.3.2.2. Erworbenes LQT-Syndrom

Neben angeborenen oder durch Erkrankungen induzierten Kanalfehlfunktionen, kann auch die Interaktion vieler Pharmaka mit kardialen Ionenkanälen zu Störungen der ventrikulären Repolarisation und zu Arrhythmien führen. Insbesondere die medikamentöse Inhibition von Kaliumkanälen kann ein erworbenes LQT-Syndrom und Arrhythmien vom *Torsades de pointes*-Typ hervorrufen (Roden *et al.*, 1996). Das erworbene LQT-Syndrom kann von Medikamenten aus strukturell sehr heterogenen Substanzklassen wie Antihistaminika, Antimalariamittel, Antibiotika, Psychopharmaka und Gastrokinetika verursacht werden (Crumb & Cavero, 1999). Der Pathomechanismus beruht zumeist auf einem Block von HERG-Kanälen (Mitcheson *et al.*, 2000). Der Grund für den bevorzugten Block von HERG-Kanälen durch strukturell so unterschiedliche Substanzen liegt in der dem HERG-Kanal eigenen Aminosäuresequenz Isoleuzin-Phenylalanin-Glutamat in der Porenregion von S6 (siehe Abbildung 2.3.) (Mitcheson *et al.*, 2000). Andere spannungsabhängige Kaliumkanäle haben an dieser Stelle die Sequenz Prolin-X-Prolin (Mitcheson *et al.*, 2000). Dadurch wird

ein Knick in S6 verursacht (del Camino *et al.*, 2000), der ein Eindringen von Substanzen in die Pore erschwert. Bei HERG wird jedoch durch die Isoleuzin-Phenylalanin-Glutamat-Sequenz ein Hohlraum in der Porenregion geformt, wodurch die Porenregion größer und besser zugänglich wird. Die kardialen Effekte bei Intoxikationen mit langwirksamen Amidlokalanästhetika könnten daher teilweise über eine HERG-Blockade hervorgerufen werden (Lipka *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2002a).

Nicht immer blockieren Substanzen, die den nativen I_{Kr} in Kardiomyozyten reduzieren, auch heterolog exprimierte HERG-Kanäle (siehe 2.2.3.3.; Sanguinetti *et al.* 1995). Diese Tatsache könnte auf das Vorhandensein von modulierenden Kanaluntereinheiten wie MiRP1, der putativen β-Untereinheit von HERG, zurückzuführen sein. Mehrere Mutationen in KCNE2, welches für MiRP1 kodiert, sowie auch der mit einer Häufigkeit von 1,6 % in der kaukasischen Bevölkerung auftretende Polymorphismus $MiRP1_{T8A}$ begünstigen substanzinduzierte kardiale Arrhythmien (Abbot *et al.*, 1999; Sesti *et al.*, 2000). Bei einer Lokalanästhetikaintoxikation könnte das Risiko, eine kardiale Symptomatik zu entwickeln, für Träger des $MiRP1_{T8A}$-Gens noch zusätzlich erhöht sein.

2.4. Lokalanästhetika

2.4.1. Aufbau und Entwicklung der Lokalanästhetika

Die Molekülstruktur der Lokalanästhetika weist einen lipophilen und einen hydrophilen Anteil auf. Der lipophile Anteil besteht aus einer aromatischen Ringstruktur, während ein tertiäres Amin den hydrophilen Teil bildet. Nach der Art der Bindung zwischen diesen beiden Molekülbestandteilen unterscheidet man Lokalanästhetika vom Ester- und vom Amidtyp.

Die derzeit wichtigsten langwirksamen Lokalanästhetika in der Klinik sind die Aminoamide Bupivacain und Ropivacain. Diese beiden Substanzen unterscheiden sich nur durch die Länge ihres Substituenten am tertiären Amid. Bupivacain besitzt eine Butyl- und Ropivacain eine Propylgruppe. Bupivacain wurde 1963 zugelassen und war für lange Zeit Substanz der Wahl in der geburtshilflichen Medizin aufgrund der sehr guten Differentialblockade. 1979 berichtete Albright über sechs Fälle, in denen Bupivacain und das ebenfalls sehr lipophile langwirksame Etidocain zu kardiotoxischen Zwischenfällen führten (Albright, 1979). Er postulierte bereits damals, dass langwirksame und potentere Lokalanästhetika kardiotoxischer sind als kurzwirksame, schwächere, dass also die kardiotoxische Potenz eines Lokalanästhetikums mit seiner anästhetischen Potenz und Wirkdauer korreliere, eine Auffassung, die sich mittlerweile etabliert hat (Strichartz & Berde, 1994). Es folgten weitere Fallberichte (Mallampati *et al.*, 1984; Long *et al.*, 1989), Studien (Reiz & Nath, 1986) und

Tierversuche (Kotelko *et al.*, 1984; Kasten, 1986; Chang *et al.*, 2001) zur Kardiotoxizität der langwirksamen Lokalanästhetika. Dies führte zur intensiven Forschung nach neuen weniger toxischen Medikamenten, die zunächst Ropivacain hervorbrachte, das nur als S-Enantiomer angewendet wird und weniger kardiotoxische Nebenwirkungen haben soll als Bupivacain, das als Razemat, also als eins zu eins Mischung beider Enantiomere, angewendet wird (Akerman *et al.*, 1988; Scott *et al.*, 1989). 2004 wurde Levobupivacain, das S-Enantiomer von Bupivacain, in die Klinik eingeführt. Auch Levobupivacain soll weniger kardiotoxisch sein als Bupivacain (Bardsley *et al.*, 1998; Foster & Markham, 2000). Zum einen werden diese Beobachtungen auf den Vorteil stereoselektiver Substanzen gegenüber Razematen zurückgeführt, zum anderen korreliert die systemische Toxizität einer Substanz mit ihrer Lipophilie, was im Vergleich der Toxizität von Bupivacain zu Ropivacain, welches weniger lipophil ist, eine Rolle spielen kann. Die Unterschiede in der Toxizität konnten aber in Tierversuchen nicht eindeutig belegt werden (Chang *et al.*, 2001).

2.4.2. Inhibition von Ionenkanälen durch Lokalanästhetika

Lokalanästhetika vermitteln den erwünschten Effekt, der in einer Hemmung der Reizweiterleitung in peripheren Nerven besteht, über eine Blockade von neuronalen Natriumkanälen (Strichartz & Berde, 1994). Ursprünglich wurde die Bindung des Lokalanästhetikums an kardiale Natriumkanäle als alleinige Ursache für die Entstehung der Intoxikationssymptome angesehen (Clarkson & Hondeghem, 1985). Es konnte gezeigt werden, dass beide Enantiomere von Bupivacain den Strom durch den humanen Natriumkanal hH1 inhibieren (Nau *et al.*, 2000). Im Zuge der Identifizierung von HERG als bevorzugte Zielstruktur arrhythmogener Substanzen (Mitcheson *et al.*, 2000) wurde dann jedoch auch für diesen Kanal eine Sensitivität gegenüber verschiedenen Lokalanästhetika nachgewiesen. Cocain (O'Leary *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001), Bupivacain (Lipka *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 2002a), Ropivacain (Gonzalez *et al.*, 2002a) und Levobupivacain (Gonzalez *et al.*, 2002a) inhibieren HERG bei klinisch relevanten Konzentrationen. Der Einfluss von putativen β-Untereinheiten auf die Lokalanästhetikaempfindlichkeit von HERG wurde bisher nicht untersucht. Auch andere kardiale Ionenkanäle wurden als Interaktionspartner für Lokalanästhetika identifiziert. Der humane spannungsabhängige Kaliumkanal hKv1.5 wird von Benzocain (Delpon *et al.*, 1999; Caballero *et al.*, 2002), Mepivacain (Longobardo *et al.*, 1998), Bupivacain (Valenzuela *et al.*, 1995; Franqueza *et al.*, 1997; Longobardo *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2002b) und Ropivacain (Valenzuela *et al.*, 1997; Longobardo *et al.*, 1998) inhibiert. Dieser Kanal generiert den Kaliumauswärtsstrom I_{Kur} (*ultra rapid K current*), der jedoch nur wenig zur Repolarisation des Herzaktionspotentials beiträgt. Die Inhibition von

hKv1.5 durch Bupivacain wird durch die β-Untereinheit Kvβ1.3 moduliert (Gonzalez *et al.*, 2002b). Diese Erkenntnis erlaubt ein besseres Verständnis des Mechanismus, über welchen der Kanal-Block vermittelt wird. Kv4.3 wird von Bupivacain inhibiert (Franqueza *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 2001). Hier wurden keine Versuche mit der β-Untereinheit KChIP durchgeführt. Für KvLQT1 wurde die Empfindlichkeit gegenüber Cocain (Zhang *et al.*, 2001) und Bupivacain (Lipka *et al.*, 1998) untersucht. Im Gegensatz zu HERG konnte nur eine geringe Sensitivität festgestellt werden (Lipka *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001).

2.5. Rampenprotokoll

1998 entwarfen Hancox *et al.* ein elektrophysiologisches Protokoll, das Rampenprotokoll, mit dem *in vitro* das Verhalten von HERG-Kanälen während des Aktionspotentials simuliert werden kann (Hancox *et al.*, 1998). Der Vorteil eines solchen Protokolls gegenüber der Rekonstruktion eines Ionenstroms mit Hilfe eines mathematischen Modells ist, dass es frei von jeglichen Annahmen ist. Der HERG-Kanal und die Kanal-Komplexe aus HERG und MiRP1 bzw. HERG und $MiRP1_{T8A}$ wurden bereits mit dem Rampenprotokoll untersucht (Zhou *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2001; Isbrandt *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003) und auch pharmakologische Studien an diesen Kanälen mit dem Rampenprotokoll durchgeführt (Sesti *et al.*, 2000). Die Anwendung des Protokolls unter Anwesenheit von Lokalanästhetika wurde bisher nicht durchgeführt. Auch wurden noch keine anderen Kaliumkanäle als HERG mit dem Rampenprotokoll untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Lösungen

Alle Chemikalien und Lösungen wurden von Gibco (Karlsruhe, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Sigma (Schnelldorf, Deutschland) oder AstraZeneca (Södertalje, Schweden) bezogen. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt. Bei Bedarf wurden die Lösungen autoklaviert oder sterilfiltriert.

Extrazellulärlösung (ec6):
135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, 10 mM Saccharose, 0,01 mg/ml Phenolrot, pH 7,4 (NaOH)

Intrazellulärlösung (ic6):
160 mM KCl, 0,5 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 2 mM Na_2ATP, pH 7,2 (KOH)

Pharmaka
Bupivacain-Hydrochlorid (Sigma) und S-Bupivacain (Levobupivacain)-Hydrochlorid (AstraZeneca) wurden als 1 mM Lösung in ec6 angesetzt. Die in den Versuchen verwendeten Konzentrationen wurden durch entsprechende Verdünnung dieser Stock-Lösung in ec6 hergestellt. (S)-Ropivacain-Hydrochlorid-Monohydrat (AstraZeneca) wurde als 833 µM bzw. 2,5 mM-Stock-Lösung angesetzt und entsprechend mit ec6 verdünnt.

3.2. Molekularbiologische Methoden

Für die heterologe Expression wurden Kv4.3 (mRNA Sequenz: NM 172198), KChIP2.2 (NM 173191), KvLQT1 (NM 000218), minK (NM 000219), HERG (NM 000238) und eGFP im pcDNA3-Expressionsvektor (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) verwendet. MiRP1 (NM 172201), $MiRP1_{T8A}$ wurden im pcDNA6-Expressionsvektor (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) verwendet. Die MiRP1- und $MiRP1_{T8A}$-DNA war über eine *internal ribosomal entry site* (IRES) an die eGFP-DNA gekoppelt. Dadurch war gesichert, dass alle grün fluoreszierenden Zellen ebenfalls mit MiRP1- bzw. $MiRP1_{T8A}$-DNA erfolgreich transfiziert worden waren.

3.3. Zellbiologische Methoden

3.3.1. Zellkultur

Die CHO-Zelllinie wurde in 20 ml Dulbecco's *Modified Eagle's Medium* (MEM) in 50 ml Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5% CO_2, 90 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden alle 3 Tage bei Konfluenz des *Monolayers* umgesetzt und nach Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer in einer Dichte von 10^5 Zellen/ml in Nährmedium ausplattiert. Vor dem Umsetzen wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Das Ablösen und die Vereinzelung der adhärent wachsenden Zellen erfolgten durch Zugabe von 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung und anschließender Trituration. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 50 Volumenprozent Nährmedium gestoppt. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 1200 g zentrifugiert und ein entsprechendes Aliqout in einer Mischung aus 8 ml frischem und 2 ml Nährmedium resuspendiert und kultiviert.

3.3.2. Transfektion

Die Transfektion der CHO-Zellen wurde bei einer Zelldichte von 1 – 4 x 10^4 Zellen/ml durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 2 ml Optimem gewaschen und dann mit 800 µl Optimem für 30 min inkubiert. Für den Transfektionsansatz wurden 0,1 – 2 µg Plasmid-DNA vorsichtig mit 100 µl vorgewärmten Optimem gemischt und mit einer weiteren frisch angesetzten Mischung aus 3,5 µl LipofectAMINE (Life Technologies, Inc.) und 100 µl vorgewärmten Optimem versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu den vorbehandelten CHO-Zellen gegeben. Nach 5 h wurde der Transfektionsansatz gegen 2 ml MEMα-Medium ausgetauscht. Die CHO-Zellen wurden 24 - 48 h nach Transfektion für die elektrophysiologischen Experimente verwendet.
Im Fall von KvlQT1/minK und HERG wurden auch CHO-Zelllinien verwendet, die stabil mit der entsprechenden DNA transfiziert waren. Es handelte sich um die gleichen Isoformen in den gleichen Vektoren wie bei transienter Transfektion (siehe 3.2.).

3.4. Elektrophysiologische Methoden – *patch clamp*

Die *patch clamp*-Technik ist ein Messverfahren, mit dem der Ionenstrom durch einzelne Kanäle direkt gemessen werden kann (Neher & Sakman, 1976; Hamill *et al.*, 1981; Numberger & Draguhn, 1996). Die *patch clamp*-Technik ist eine Verfeinerung der *voltage clamp*-Technik (Cole, 1979). Das Prinzip beruht darauf, Änderungen des Membranpotentials der zu untersuchenden Zelle durch Injektion eines entgegengerichteten Kompensationsstromes zu verhindern. Das aktuelle Membranpotential der Zelle wird über

eine Elektrode in der Messpipette (s.u.) kontinuierlich gemessen (U_{pip}) und mit der Sollspannung (U_{soll}) verglichen. Bei Unterschieden zwischen U_{soll} und U_{pip} wird ein entgegengerichteter Kompensationsstrom in die Zelle injiziert. Dieser sehr kleine Kompensationsstrom wird in *voltage clamp*- und in *patch clamp*-Experimenten gemessen. Er lässt unmittelbar Schlüsse auf den Membranwiderstand zu, der von Ionenkanälen mitbestimmt wird. Während die Spannungsklemme (*voltage clamp*) mit zwei separaten Elektroden arbeitet, von denen eine zur Messung von U_{pip} und die andere zur Injektion des Kompensationsstromes dient, arbeitet die *patch clamp*-Technik mit nur einer Elektrode, über welche sowohl Strom injiziert als auch gemessen wird. Zur Messung auf Einzelkanalebene müssen Ströme von wenigen pA kompensiert werden. Das Problem des Hintergrundrauschens konnte gelöst werden, indem ein sehr kleiner Bereich der Zellmembran, der *patch*, elektrisch von seiner Umgebung mit einer Mikropipette (Patchpipette) isoliert wurde. Dies konnte durch Bildung eines sehr hohen Abdichtwiderstandes in der Größenordnung mehrerer GΩ (*gigaseal*) durch Unterdruck an der Patchpipette erreicht werden. Die Membran ist dann sehr fest mit der Glaswand der Pipette verbunden. Dieser Zustand wird als *cell attached* oder *on cell*-Konfiguration bezeichnet und eignet sich für Einzelkanalmessungen. Von diesem Zustand ausgehend können weitere Modi erreicht werden. Durch weiteres Ansaugen kann die Zellmembran an der Berührungsstelle durchbrochen werden (*whole cell*-Konfiguration). Dadurch werden ein elektrischer und ein physikalischer Zugang zur Zelle geschaffen. Die Intrazellulärlösung, mit der die Patchpipette gefüllt ist, ersetzt bei diesem Vorgang die natürliche Elektrolytzusammensetzung des Intrazellulärraums. Die Elektrolytverhältnisse intra- und extrazellulär sind somit kontrollierbar. In der *whole cell*-Konfiguration kann der Ionenstrom durch alle in der Zellmembran befindlichen Kanäle gemessen werden, durch die unter der gewählten Elektrolytzusammensetzung bei definierten Membranpotentialen ein Strom fließt.

3.4.1. Ausstattung des Messstands

Um die hochempfindlichen *patch clamp*-Messungen vor mechanischen Schwingungen und Erschütterungen zu schützen, wurde das Mikroskop auf einem schwingungsgedämpften Tisch (T-250, Physik Instrumente, Waldbronn, Deutschland) gelagert. Ein elektrisches Hintergrundrauschen wurde so gering wie möglich gehalten, indem der gesamte Messstand in einem geerdeten, faradayschen Metallkäfig abschirmt wurde.

Zur Visualisierung der Annäherung der Elektrode, der Perfusionsspitze sowie der Identifizierung transfizierter Zellen wurde ein inverses Axiovert-35-Mikroskop mit Objektiven von 10- und 40-facher sowie einem Binokular von 10-facher Vergrößerung (Zeiss,

Oberkochen, Deutschland) verwendet. Insgesamt ist hierdurch eine 400-fache Vergrößerung möglich. Die transfizierten Zellen exprimierten als Reporter der erfolgten Plasmidaufnahme *Enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP, Clontech, Palo Alto, Kalifornien, USA), ein Protein, das bei Anregung im UV-Bereich grünlich fluoresziert und leicht zu identifizieren ist. Für die Identifizierung transfizierter Zellen wurde eine HBO-UV-Lampe (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) benutzt.

Für die Applikation der Testlösungen wurde ein Mehrkanal-Perfusionssystem verwendet. Dieses bestand aus mehreren Reservoirs (20 ml Spritzen), die über eine Perfusionspipette mit separatem Eingang und gemeinsamen Ausgang mit dem Zellbad verbunden waren. Alle Schlauchsysteme bestanden aus inertem Teflon. Die Superfundierung mit der Kontroll- oder Testlösung wurde unter Verwendung elektronisch gesteuerter Ventile (ValveBank 8 II, AutoMate Scientific, San Francisco, Kalifornien, USA) reguliert. Die Lösung lief gemäß dem hydrostatischen Druck in die Petrischale (Fließgeschwindigkeit etwa 1ml/min). Der Abfluss erfolgte über ein druckluftgetriebenes Saugsystem.

Alle Messungen wurden mit Pipetten aus Borosilikatglas (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) durchgeführt. Die Pipetten wurden in einem horizontalen Pipettenziehgerät (Flaming/Brown Micropipette-Puller, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) mit einem Pipettenwiderstand von 2 - 7,5 MΩ hergestellt und innerhalb weniger Stunden verwendet.

Die Silberchloridschicht des Elektrodendrahtes wurde gegebenenfalls durch Schleifen gereinigt und täglich in einer hypochloridhaltigen Bleichlauge neu chloriert, um *offset*-Potentiale zu vermeiden.

Die Pipetten wurden über einen Pipettenhalter direkt am Vorverstärker montiert. Am Pipettenhalter befand sich ein seitlicher Eingang, an dem ein Teflonschlauch befestigt war, über den durch Blasen oder Saugen ein Über- bzw. Unterdruck erzeugt werden konnte. Die Steuerung der Pipette erfolgte entweder über einen mechanischen (Narishige, Tokyo, Japan) oder motorisierten Mikromanipulator (Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

Für die Datenaufnahme wurde ein Apple Macintosh G3 verwendet. Die Pulsprotokolle zur Kontrolle des Membranpotentials wurden mit dem Programm Pulse+PulseFit 8.11 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) konfiguriert. Der *patch clamp*-Verstärker (EPC9, HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) wurde über eine ITC16-Schnittstelle angesteuert, welche im Oszilloskopfenster des Programms eine grafische Darstellung der Stromkurven ermöglichte.

3.5. Datenaufnahme

3.5.1. Verstärker (*patch clamp*-Schaltkreis)

Für die Datenaufnahme wurde ein EPC9 *patch clamp*-Verstärker (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) verwendet. Der Verstärker besteht aus einem Vorverstärker und einem Hauptverstärker. Die Zelle ist über eine Elektrode aus chloriertem Silberdraht mit dem Vorverstärker und dem Verstärker verbunden (Abbildung 3.1.).

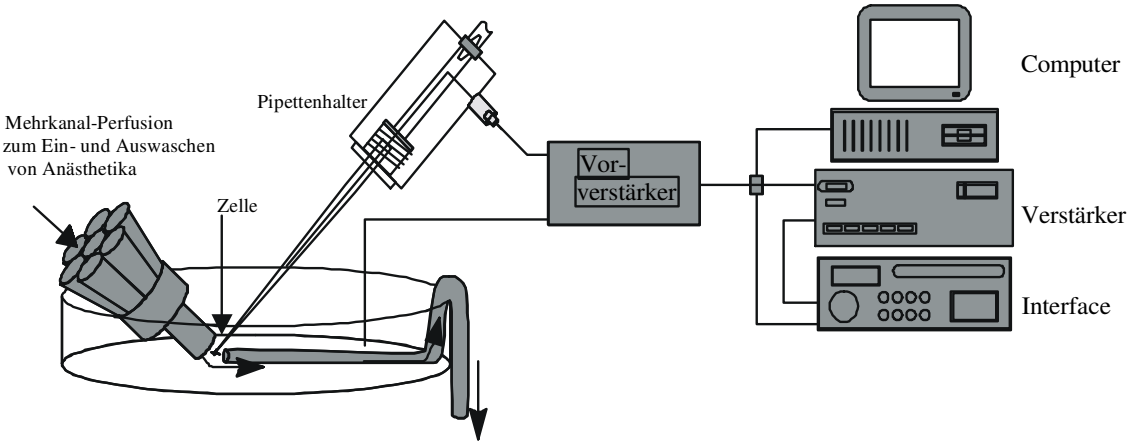

Abbildung 3.1.: Versuchsaufbau. Die zu applizierenden Lösungen werden per Mehrkanal-Perfusion superfundiert. Die Zelle ist physikalisch mit der Glaspipette und elektrisch über die Silberdrahtelektrode und den Vorverstärker mit dem Verstärker verbunden.

Die wichtigsten Funktionseinheiten des Vorverstärkers sind der Operationsverstärker (*operational amplifier*, OPA) und der Rückkopplungswiderstand R_f (*feedback resistance*). Am Plus-Eingang des OPA liegt die Kommandospannung U_{soll} an, am Minus-Eingang das Pipettenpotential U_{pip} (Abbildung 3.2.). Beide Eingänge weisen extrem hohe Widerstände auf, so dass sie die Spannungsdifferenz zwischen U_{soll} und U_{pip} messen, ohne dass ein Strom durch sie hindurch fließen und verloren gehen kann. Am Ausgang des OPA liegt eine Spannung U_f an, die proportional zur Differenz der Eingangsspannungen, aber extrem verstärkt ist. Über R_f fließt solange ein Strom I_f in die Pipette, bis $U_{soll} = U_{pip}$ ist. Dabei errechnet sich I_f aus U_f und R_f ($I_f = U_f/R_f$). Über einen weiteren Differenzverstärker wird der Unterschied zwischen U_f und U_{soll} ermittelt und liegt an dessen Ausgang als Ausgangsspannung U_{aus} an. U_{aus} ist proportional zu I_f und kann nach entsprechender Kalibrierung als Strom am Monitor gemessen werden.

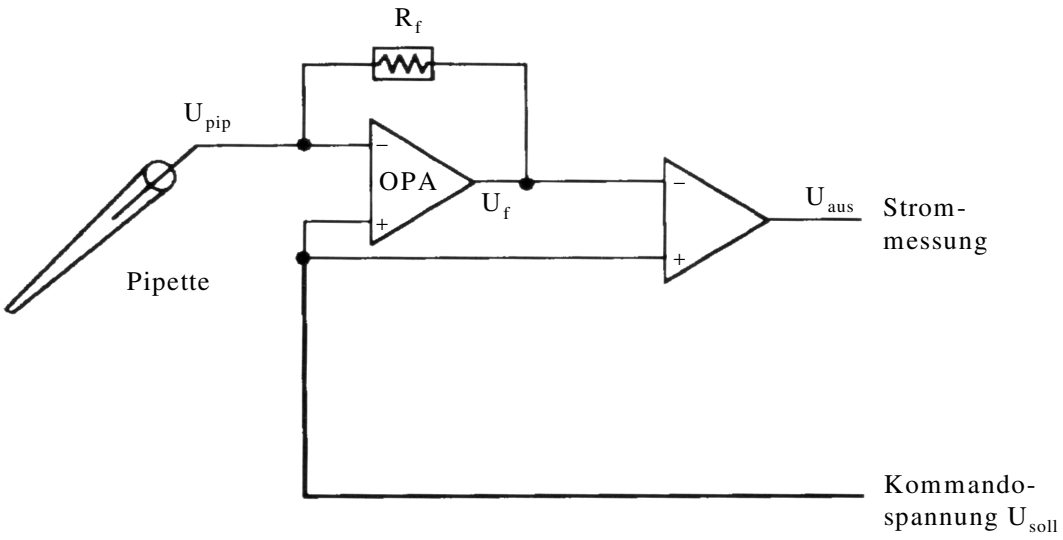

Abbildung 3.2.: Aufbau des Vorverstärkers. Der Operationsverstärker OPA misst die Differenz zwischen der Kommandospannung U_{soll} und dem Pipettenpotential U_{pip} und gibt sie als U_f an seinem Ausgang an. Über den Rückkopplungswiderstand R_f fließt der die Differenz ausgleichende Strom I_f in die Pipette. Die Differenz zwischen U_{soll} und U_f ist die Ausgangsspannung und kann ist direkt proportional zu I_f. (aus Numberger & Draguhn, 1996.)

3.5.2. Kapazitätskorrektur

Ein idealer Ohmscher Widerstand besitzt keine kapazitive Komponente. An realen Widerständen geht jedoch bei jeder Spannungsänderung etwas Zeit für die kapazitive Umladung von R_f verloren. Ein Strom-Spannungs-Wandler kann daher auf ein schnelles, fast senkrecht ansteigendes Spannungssignal (z.B. von Einzelkanalströmen) an einem Eingang nur mit einer exponentiell ansteigenden Kurve antworten. Um auch solche schnellen Signale aufzulösen, sind in den Vorverstärker noch zusätzliche Korrekturschaltkreise eingebaut, die diese Verluste ausgleichen und so die Antwortzeit auf wenige µs herabsetzen. Neben der Kapazität des Vorverstärkers spielen auch die kapazitiven Eigenschaften der Patchpipette sowie der Zellmembran eine wichtige Rolle. Eine Änderung der Kommandospannung führt nicht sofort zu einer entsprechenden Änderung des Membranpotentials, sondern zunächst werden die Kapazitäten von Pipette und Zellmembran umgeladen. Als Antwort auf den Testpuls zeigen sich schnell ansteigende und exponentiell abfallende, so genannte transiente Ströme. Da diese kurzzeitigen Ströme sehr hohe Werte annehmen können und so die eigentlichen Messsignale stören würden, werden sie korrigiert, indem der zur Umladung

benötigte Strom nicht mehr durch den Vorverstärker, sondern über einen parallelen Schaltkreis injiziert wird. Der EPC9-Verstärker besitzt zwei automatische Korrekturmechanismen. Einen mit schneller Zeitkonstante (0,5-8 µs) zur Korrektur der kapazitiven Ströme der Pipette und einen zweiten mit einer langsameren Zeitkonstante (>5µs) zur Korrektur der Umladeströme der Zellmembran. Die spezifische Kapazität biologischer Zellmembranen ist mit 1 $\mu F/cm^2$ für alle Zellen ungefähr gleich. Deshalb ist der Wert der langsamen Kapazität ein direktes Maß für die Membranfläche und damit für die Größe der untersuchten Zelle.

3.5.3. Serienwiderstandskompensation

Der Serienwiderstand R_{Serie} stellt den Widerstand, der zwischen Zellmembran und Verstärker liegt, dar und ist maßgeblich vom Eingangswiderstand der Patchpipette abhängig. Je größer die Öffnung der Pipettenspitze, umso geringer wird der Widerstand. Die Größe des Serienwiderstands bestimmt auch, ob das Membranpotential $V_{Membran}$ der angelegten Spannung V_{clamp} entspricht. Fließt ein Strom I durch die Pipette, fällt über den Serienwiderstand R_{Serie} die Spannung IR_{Serie} ab. Das Potential an der Zellmembran $V_{Membran}$ entspricht dann nicht der angelegten Spannung V_{clamp}, sondern einem Potential, das um die über den Serienwiderstand abgefallene Spannung niedriger ist ($V_{Membran} = V_{clamp} - IR_{Serie}$). Eine Übereinstimmung von V_{clamp} und dem Membranpotential $V_{Membran}$ kann annähernd nur erreicht werden, wenn IR_{Serie} klein ist und damit keine Spannung über IR_{Serie} abfällt. Um dem Serienwiderstand entgegen zu wirken, wurde dieser elektronisch kompensiert. Der Spannungsverlust lässt sich kompensieren, indem man zur angelegten Spannung noch einen zusätzlichen Anteil addiert, der proportional zum gerade injizierten Strom ist, und somit einen Teil des erwarteten Spannungsverlusts ausgleicht. Der Widerstand zwischen Pipette und Zellmembran R_{Seal} sollte im Vergleich zu R_{Kanal} groß sein, da $V_{clamp} = I \{ R_{Serie} + (R_{Seal} R_{Kanal} / (R_{Seal} + R_{Kanal}))\}$. Hierdurch wird bei kleinem R_{Serie} sichergestellt, dass die Spannung über R_{Kanal} abfällt und der gemessene Strom durch den Ionenkanal fließender Strom ist.

3.5.4. Leckstromkorrektur

Bei *patch clamp*-Messungen fließt trotz hochohmiger Abdichtung zwischen Membran und Patchpipette ein zusätzlicher Leckstrom. Ein Teil des Leckstromes fließt durch permanent geöffnete Ruhekanäle. Sie werden auch als Leckkanäle bezeichnet und sind unter anderem für die Etablierung des Membranpotentials verantwortlich. Der andere Teil des Stromes fließt trotz Abdichtung im GΩ-Bereich zwischen Membran und Patchpipette. Der Stromfluss ist in

beiden Fällen linear proportional zur angelegten Spannung, dadurch wird eine Korrektur möglich (Numberger & Draguhn, 1996). Um den Leckstrom von den tatsächlich zu messenden spannungsaktivierten Strömen zu subtrahieren, wurde in manchen Fällen (s.u.) ein Leckprotokoll durchgeführt. Dabei wurde ein dem Messprotokoll analoges, jedoch nur einen Bruchteil der Amplitude betragendes Protokoll mehrmals hintereinander durchgeführt, der gemessene Strom aufsummiert und dann vom Testpuls abgezogen.

3.5.5. Digitalisierung und Filterung

Vor der Digitalisierung des analogen Stromsignals fand eine Filterung über zwei Bessel-Filter statt. Die Grenzfrequenz des ersten Bessel-Filters betrug 10 kHz, die des zweiten 2,9 kHz. Die Digitalisierung erfolgte mit *sampling rates* von 1 bis 20 kHz statt. Entsprechend hing die *sampling rate* von dem angewendeten Protokoll ab. Die Analyse der verschiedenen Parameter von I_{max}, Q und t_{peak} wurde bei einer Filterung von 500 Hz vorgenommen. Die Beschreibung der Zeitkonstanten der zeitabhängigen Inaktivierung wurde ohne Filterung vorgenommen.

3.6. Durchführung der *patch clamp*-Experimente

3.6.1. Ablauf

Alle Experimente wurden in der *whole cell*-Konfiguration (s.o.) bei Raumtemperatur (ca. 20°C) durchgeführt. Unmittelbar vor den Messungen wurde das Kulturmedium der zu messenden CHO-Zellen durch 2 ml Extrazellulärlösung (ec6) ausgetauscht. Die Kulturschale wurde so in der Mikroskophalterung befestigt, dass die Zellen darin durch das invertierte Mikroskop sichtbar waren.

Die Pipetten wurden mit steril filtrierter Intrazellulärlösung (ic6) gefüllt und in den Elektrodenhalter eingespannt. Für jedes Experiment wurde eine neue Pipette verwendet. Durch Blasen in ein an der Pipettenhalterung angeschlossenes Schlauchsystem wurde vor dem Eintauchen in die Badlösung ein Überdruck angelegt, um ein Aufsaugen extrazellulärer Lösung und eine Partikelkontamination zu vermeiden. *Offset*-Potentiale wurden sofort korrigiert.

Unter Mikroskopkontrolle wurde die Messpipette mit einem grob angetriebenen Mikromanipulator von oben her in die Flüssigkeit mit den Zellen gebracht und langsam vorgeschoben. Dabei wurde die Pipettenspitze zunächst unmittelbar oberhalb einer gewählten Zelle platziert und dann mit einem Feinantrieb-Mikromanipulator auf die Zelle aufgesetzt.

Durch das Aufheben des angelegten Überdrucks und vorsichtiges Saugen wurde die Zellmembran in die Patchpipette gezogen, so dass eine Abdichtung von Pipette und Zellmembran gegenüber der Badlösung im GΩ-Bereich erreicht wurde. Das Membranpotential wurde auf -50 mV geklemmt. Durch weiteres Saugen wurde die Membran innerhalb der Pipettenspitze geöffnet und damit ein physikalischer Zugang zum Intrazellulärraum sowie ein elektrischer Zugang zur gesamten Zellmembran erreicht (*whole cell*-Konfiguration). Dabei auftretende kapazitive Ströme wurden unmittelbar vor den Messungen korrigiert, der Serienwiderstand wurde ebenfalls mit mindestens 85% kompensiert.

3.6.2. Pulsprotokolle

Pulsprotokolle sind definierte Veränderungen des Membranpotentials für einen definierten Zeitraum, während dem die Stromantwort aufgezeichnet wird. Sie bestehen aus mindestens einem Schritt, dem Hauptpuls. Die Stromantwort auf den Hauptpuls enthält die zu analysierende Information. Neben dem Hauptpuls kann es weitere Abschnitte in einem Pulsprotokoll geben, in denen das Membranpotential verändert wird. Das Haltepotential betrug bei allen Messungen -80 mV. Bei diesem Potential sind HERG und KvLQT1/minK in einem offen aktivierbaren Zustand. Bei einigen Protokollen zur Untersuchung von Kv4.3/KChIP2.2 wurde jedoch ein hyperpolarisierender Vorpuls ausgeführt, damit alle Kanäle im offen aktivierbaren Zustand sind (s.u.). Des Weiteren kamen bei manchen Pulsprotokollen sogenannte *tail*-Pulse vor. Sie entsprechen dem Hauptpuls insofern, dass sie die zu analysierende Stromantwort enthalten. Allerdings wurde das Membranpotential bei einem *tail* immer für den gleichen Zeitraum auf den gleichen Betrag geklemmt. Das bedeutet, dass die Variable, also z.B. die Spannung oder die Zeit, in einem dem *tail* vorgeschalteten Schritt verändert wurde.

3.6.2.1. Aktivierungsprotokoll für Kv4.3/KChIP2.2

Als Aktivierung bezeichnet man den Übergang von Kanälen vom geschlossenen in den offenen Zustand. Das Aktivierungsprotokoll dient der Evaluation der Spannungsabhängigkeit dieses Prozesses. Zunächst wurde das Membranpotential für 200 ms auf -100 mV geklemmt. Dieser hyperpolarisierende Vorpuls hatte die Aufgabe, alle Kanäle aus der Inaktivierung in einen offen aktivierbaren Zustand zu bringen (Bähring *et al.*, 2001). Anschließend wurde das Membranpotential in 10 mV-Schritten von -40 bis +60 mV für je 1000 ms angehoben. Zwischen den einzelnen Schritten des Aktivierungsprotokolls wurde ein Leckstromprotokoll ausgeführt.

3.6.2.2. Inaktivierungsprotokoll für Kv4.3/KChIP2.2

Die Inaktivierung bezeichnet den Übergang offener Kanäle in einen geschlossenen nicht-aktivierbaren Zustand. Die Spannungsabhängigkeit des Inaktivierungsverhaltens wurde mit Hilfe eines Protokolls untersucht, das aus einem 4000 ms langem Vorpuls bestand, während welchem das Membranpotential auf in 5 mV-Schritten ansteigende Potentiale von -75 mV bis -15 mV geklemmt wurde, um einen Gleichgewichtszustand der Inaktivierung bei dem jeweiligen Potential zu erreichen, und einem 25 ms langem Hauptpuls auf +40 mV, um die verbleibenden offenen Kanäle zu erfassen. Auch das Inaktivierungsprotokoll war an ein Leckstromprotokoll gekoppelt.

3.6.2.3. Rechteckpulsprotokoll für Kv4.3 und Kv4.3/KChIP2.2

Das Rechteckpulsprotokoll dient der Erfassung der Zeitabhängigkeit der Inaktivierung. Außerdem wurde die konzentrationsabhängige Inhibition von I_{max}, Q, Qcross und τ_1 mit Hilfe des Rechteckpulsprotokolls quantifiziert. Auch das Rechteckpulsprotokoll begann mit einen 200 ms andauernden Vorpuls, bei dem das Membranpotential auf -100 mV geklemmt wurde, um alle Kanäle aus der Inaktivierung zu holen. Darauf folgte eine Rechteckdepolarisation auf +40 mV für 1000 ms. Hieran war ein Leckstromprotokoll angeschlossen.

3.6.2.4. *recovery*-Protokoll für Kv4.3/KChIP2.2

Die Erholung aus der Inaktivierung (*recovery*) ist der Vorgang, bei dem inaktivierte Kanäle in einen aktivierbaren Zustand wechseln. Um die *recovery* zu messen, wurde ein Protokoll angewendet, in dem einem initialen 1500 ms andauernden Spannungssprung auf +40 mV ein 25 ms langer *tail* mit einer Depolarisation auf +40 mV folgte. Die Zeitabstände zwischen dem initialen Vorpuls und dem *tail* vergrößerten sich mit jedem Puls um den Faktor 2 ausgehend von 10 ms auf bis zu 5120 ms. Zwischen den einzelnen Pulsen wurde ein Leckstromprotokoll ausgeführt.

3.6.2.5. Protokolle zur Untersuchung der Frequenzabhängigkeit von Kv4.3/KChIP2.2

Um die Frequenzabhängigkeit der verschiedenen untersuchten Parameter sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch die Frequenzabhängigkeit der Inhibition dieser Parameter zu analysieren, wurden verschiedene Protokolle angewandt. Sie entsprachen in ihrem Aufbau grundsätzlich dem Rechteckpulsprotokoll (siehe 3.6.2.3). Der hyperpolarisierende Vorpuls wurde in jedem Fall in gleicher Länge beibehalten, da eine Verkürzung des Pulses nicht hätte gewährleisten können, dass alle Kanäle aktivierbar sind. Die Länge der darauf folgenden Depolarisation auf +40 mV wurde entsprechen der Frequenz variiert. Es wurden Frequenzen

von 0,5 Hz, 1 Hz und 1,67 Hz untersucht. Dies entsprach dem Intervall zwischen zwei Depolarisationen. Bei 0,5 Hz betrug die Länge der Depolarisation 800 ms, sie war 400 ms lang, wenn die Frequenz 1 Hz betrug, und 50 ms bei 1,67 Hz. Alle Protokolle zur Untersuchung der Frequenzabhängigkeit wurden in Kombination mit Leckstromprotokollen ausgeführt.

3.6.2.6. Rampenprotokoll

Das Rampenprotokoll ist ein Simulationsprotokoll für HERG-Kanäle. Es wurde 1998 von Hancox *et al.* entworfen, um die elektrischen Bedingungen, denen HERG während des Herzaktionspotentials unterliegt, *in vitro* zu simulieren. Im Gegensatz zu allen anderen hier angewendeten Pulsprotokollen handelt es sich hierbei nicht um einen Rechteckpuls, sondern um eine von einer initialen Depolarisation auf +60 mV nach -80 mV abfallenden Rampe. Solche Protokolle werden auch zur Untersuchung der sogenannten instantanen Strom-Spannungs-Beziehung angewandt. Sie haben den Vorteil, dass die sofortige, also instantane Reaktion der Kanäle auf Spannungsänderungen aufgenommen werden kann. Allerdings sind rampenförmige Depolarisation auch stärker durch schnelle und langsame Kapazitäten beeinträchtigt, da das Auf- und Entladen von Kondensatoren nicht nur zu Beginn und Ende des Pulses, sondern kontinuierlich erfolgt. Um diesen Fehler möglichst klein zu halten, wurden die Rampenprotokolle ohne Leckstromsubtraktion ausgeführt. Es wurden jedoch nur Experimente verwendet, bei denen der Unterschied zwischen der Inhibition von I_{max} bzw. Q mit Auswasch und der Inhibition ohne Auswasch geringer als 6 % war. Direkt im Anschluss an die Rampe wurde in dieser Arbeit eine 30 ms lange Rechteckdepolarisation auf +40 mV ausgeführt. Dadurch sollte die Fähigkeit der verschiedenen Kanäle untersucht werden, auf Depolarisationen am Ende des Herzaktionspotentials, wie sie z.B. durch Extrasystolen hervorgerufen werden können, zu reagieren.

3.6.2.7. Rechteckpulsprotokoll für KvLQT1/minK

Für die Untersuchung von KvLQT1/minK-Kanal-Komplexen wurde ein weiteres Rechteckpulsprotokoll angewendet. Im Gegensatz zu dem in 3.6.2.3. beschriebenen Protokoll wurde hier kein Vorpuls verwendet, da bei dem Haltepotential von -80 mV alle KvLQT1/minK-Kanal-Komplexe im aktivierbaren Zustand vorliegen (Barhanin *et al.*, 1996). Das Rechteckpulsprotokoll für KvLQT1/minK bestand aus einer 2000 ms andauernden Membrandepolarisation auf +40 mV und einer darauf folgenden Repolarisation auf -60 mV für 1000 ms. Bei dem Rechteckpulsprotokoll für KvLQT1/minK wurde kein Leckstromprotokoll angewendet.

3.7. Theoretische Grundlagen

3.7.1. Berechnung des elektrochemischen Gradienten

Das Membranpotential beruht auf der unterschiedlichen ionalen Zusammensetzung des intrazellulären und extrazellulären Milieus. Durch die verschiedenen Ionengradienten, die entsprechend der Permeabilität der Membran unterschiedlich steil sind, baut sich ein Diffusionspotential auf. Es gibt zwei Triebkräfte, die auf Ionen wirken. Zum einen folgt der Ionenfluss dem Konzentrationsgradienten, zum anderen dem Spannungsgradienten. Für jedes Ion kann das Potential ausgerechnet werden, bei dem chemische und elektrische Triebkräfte im Gleichgewicht sind, das Nernst- oder Gleichgewichtspotential des Ions. Es wird auch Umkehrpotential genannt, da der Ionenfluss über die Membran sich bei diesem Potential umkehrt. Das Umkehrpotential errechnet sich nach der Nernst-Gleichung:

$$E_r = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X^+]_{ext}}{[X^+]_{int}} \qquad (1)$$

Hierbei ist E_r das Nernstpotential für Ion X^+ , $[X^+]_{ext}$ die extrazelluläre Konzentration für Ion X^+, $[X^+]_{int}$ die intrazelluläre Konzentration für Ion X^+, R die Gaskonstante, F die Faradaykonstante, z die Wertigkeit des Ions und T die absolute Temperatur. Das in der Nernst-Gleichung beschriebene Diffusionspotential stellt einen Gleichgewichtszustand dar, bei dem kein Nettostrom dieses Ions mehr auftritt, das durch den Konzentrationsgradienten einerseits und ein entgegengesetztes elektrisches Feld andererseits angetrieben wird. Unter Verwendung der angegebenen Lösungen berechnete sich ein Gleichgewichtspotential für Kaliumionen (E_K) von -87,5 mV.

3.7.2. Berechnung der Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit g ist definiert als Kehrwert des Widerstandes und wird gemäß dem Ohmschen Gesetz:

$$g = \frac{1}{R} = \frac{I}{U} \qquad (2)$$

berechnet. Hier ist R der Widerstand, I die Stromstärke und U beschreibt die Spannung. Für ionenselektive Kanäle muss jedoch U durch die elektrochemische Triebkraft E für das

permeable Ion ersetzt werden, die sich aus zwei Komponenten zusammensetzt. Für die Leitfähigkeit von Kaliumionen gilt:

$$E = E_M - E_K, \tag{3}$$

wobei E_M das Membranpotential und E_K das nach der Nernst-Gleichung errechnete Kalium-Gleichgewichtspotential (siehe 3.7.1.) ist. Setzt man Gleichung (3) in Gleichung (2) ein erhält man für die Kaliumleitfähigkeit g_K:

$$g_K = \frac{I_K}{(E_M - E_K)} \tag{4}$$

I_K ist die maximale Stromamplitude bei der jeweilig angelegten Spannung E_M. Diese Berechnung der Leitfähigkeit gilt für Ströme, die durch Protokolle ohne *tail*, wie z.B. dem Aktivierungsprotokoll (3.6.2.1.), hervorgerufen wurden. Bei einem Protokoll mit *tail*, wie z.B. dem Inaktivierungsprotokoll (3.6.2.2.), entspricht die I_{max} des *tails* in ihrem Verhalten der Leitfähigkeit und muss daher zur Erstellung von Leitfähigkeits-Spannungs- oder Leitfähigkeits-Zeit-Beziehungen nicht umgerechnet werden.

3.7.3. Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung

Um die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Inaktivierung zu untersuchen, Prozessen, bei denen es zu Leitfähigkeitsänderungen kommt, wurde die normalisierte Leitfähigkeit auf der Ordinate gegen die Spannung auf der Abszisse aufgetragen. Diese Beziehung wurde mit einer Boltzmann-Gleichung beschrieben:

$$y = G_{\max} /(1 + \exp((V_{mid} - E_M)/k)). \tag{5}$$

E_M ist das Membranpotential. V_{mid} bezeichnet den Aktivierungsmittelpunkt, also das Potential bei dem die Hälfte aller Kanäle geöffnet ist. k ist der Steigungsfaktor (*slope factor*) der Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung. Die maximale Leitfähigkeit wird durch G_{max} ausgedrückt. Die Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen wurden mithilfe des Programms Kaleidagraph Version 3.1 (Synergy Software, Reading, Pennsylvania, USA) beschrieben.

3.7.4. Zeitkonstanten der Inaktivierung

Die Zeitkonstanten der Inaktivierung und deren Amplituden wurden durch die Anpassung einer Exponentialfunktion an die gemessenen Kurven mit Hilfe des Pulse+PulseFit Programms (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) ermittelt.

3.7.5. Strom-Zeit-Beziehung der Erholung von der Inaktivierung

Für die Analyse der Zeitabhängigkeit der Erholung von der Inaktivierung wurde die I_{max} des *tails* des *recovery*-Protokolls auf die I_{max} des Vorpulses normalisiert. Die normalisierte I_{max} wurde gegen die Dauer der Repolarisation zwischen den beiden depolarisierenden Schritten aufgetragen und mit einer exponentiellen Funktion beschrieben. Je nach Verlauf der Beziehung wurde hierbei entweder eine monoexponentielle

$$y = 1 - (\exp(\Delta t / \tau_{rec1})) \qquad (6)$$

oder eine biexponentielle

$$y = 1 - \tau_{rec1} * \exp(-\Delta t / amp1) - \tau_{rec2} * \exp(-\Delta t / amp2_4) \qquad (7)$$

Funktion verwendet. Hierbei ist Δt die Dauer der Repolarisation, τ_{rec1} die erste Zeitkonstante und, im Falle der biexponentiellen Funktion, amp 1 die Gewichtung der ersten Zeitkonstanten. τ_{rec2} ist dann entsprechend die zweite Zeitkonstante und amp 2 ihre Gewichtung. Das Programm Kaleidagraph Version 3.1 (Synergy Software, Pennsylvania, Reading, USA) wurde für die Beschreibung der Strom-Zeit-Beziehung verwendet.

3.7.6. Bestimmung von I_{max}, Q und t_{peak}

Die maximale Stromamplitude, die während der Stromantwort auf ein Rechteckpulsprotokoll floss, wurde als I_{max} bezeichnet, die maximale Stromamplitude während des Rampenstroms als I_{Rampe}. Die Integration der Stromspur in Abhängigkeit von der Zeit ist direkt proportional zur Ladungsmenge Q, die in dem gewählten Zeitraum über die Membran fließt. Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Stromamplitude ist die t_{peak}. I_{max}, Q und t_{peak} wurden mit Hilfe von Pulse+PulseFit (HEKA Elektronik, Lambrecht) ermittelt.

3.7.7. Bestimmung der Stromdichte

Die maximale Stromamplitude I_{max} unterliegt einer hohen Variabilität. Unter anderem hat die Größe einer Zelle, die proportional zu ihrer Kapazität ist, einen Einfluss auf die I_{max}. Dieser

Einfluss kann durch Bestimmung der Stromdichte (I_p) berücksichtigt werden. I_p wurde mit der Gleichung

$$I_p = \frac{I_M}{C_M} \tag{8}$$

ermittelt. Als Membrankapazität C_M wurde die durch Kompensation ermittelte langsame Kapazität am EPC-9 mit der Software Pulse+PulseFit (HEKA Elektronik, Lambrecht) herangezogen.

3.7.8. Berechnung der Inhibition

Die Inhibition wurde unabhängig vom jeweiligen Parameter, Kanal, Pulsprotokoll und Substanz stets mit derselben Gleichung berechnet. Auch die Beschleunigung von τ wurde mit dieser Gleichung errechnet:

$$y = \left\{1 - \left(X_{einwasch} \Big/ \left(\frac{X_{kontrolle} + X_{auswasch}}{2} \right) \right) \right\} \times 100\,, \tag{9}$$

wobei X dem jeweiligen Parameter entspricht, dessen Inhibition errechnet werden soll. Zusätzlich wurde die Inhibition ohne Auswasch nach der Gleichung:

$$y = \left\{1 - \left(X_{einwasch} / X_{kontrolle} \right) \right\} \times 100 \tag{10}$$

errechnet. Unterschied sich die Inhibition unter Einbeziehung des Auswaschs von der Inhibition ohne Auswasch um mehr als 6 %, wurde der Wert nicht verwendet, da eine zu große Abweichung des Kontrollwertes vom Auswaschwert als Indikator für eine schlechte Messung definiert wurde.

3.7.9. Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Inhibition

Zur Beschreibung der Beziehung zwischen den beiden Parametern wurde die nach Gleichung (9) errechnete Inhibition auf der Ordinate gegen die applizierte Lokalanästhetikum-Konzentration auf der Abszisse halblogarhitmisch aufgetragen. Diese Beziehung wurde mit einer Hill-Gleichung beschrieben:

$$e / e_{max} = 1/[1 + (IC_{50} / c)^{\gamma}] \quad (11)$$

e ist die Inhibition, e_{max} ist die maximale Inhibition. c bezeichnet die Konzentration des Lokalanästhetikums. γ ist der Hill-Koeffizient. Der Hill-Koeffizient beschreibt die Steigung der Kurve und gibt Auskunft über das Vorhandensein von Kooperativität, wenn mehrere inhibierende Moleküle binden. Der IC_{50}-Wert ist die Konzentration, bei der die halbmaximale Inhibition des jeweiligen Parameters erreicht ist. Die Beschreibung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen erfolgte ebenfalls mit Kaleidagraph Version 3.1 (Synergy Software, Pennsylvania, Reading, USA).

3.7.10. Statistische Signifikanz

Statistische Signifikanz wurde den Erfordernissen entsprechend entweder mit ANOVA (*An*alysis *o*f *va*riance) und Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test (Graph Pad Prism, San Diego, Kalifornien, USA), oder mit homoskedastischem bzw. heteroskedastischem zweiseitigen Student t-Test für ungepaarte bzw. gepaarte Stichproben (Microsoft Excel, Redmond, Washington, USA) überprüft.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in zwei Teile gegliedert. Zunächst wird der Kanal-Komplex aus Kv4.3 und KChIP2.2, der den Hauptanteil des transienten Kaliumauswärtsstroms I_{to} des Herzaktionspotentials generiert, behandelt. Es gibt bisher keine Untersuchungen zur Lokalanästhetikaempfindlichkeit dieses Proteinkomplexes. Der erste Teil der Ergebnisse enthält daher eine ausführliche Charakterisierung des Effektes von Bupivacain, Levobupivacain und Ropivacain auf Kv4.3/KChIP2.2.

Im zweiten Teil wird mit dem Rampenprotokoll (siehe Methoden) ein elektrophysiologisches Protokoll vorgestellt, welches die elektrischen Vorgänge am Herzen während des Aktionspotentials simuliert. Dieses Protokoll ist für den HERG-Kanal bereits etabliert (Hancox *et al.*, 1998). Hier soll nun seine Anwendbarkeit auf die weiteren für die Repolarisation des Herzaktionspotentials verantwortlichen Kaliumkanäle Kv4.3/KChIP2.2 und KvLQT1/minK unter Kontrollbedingungen und bei Applikation der genannten Lokalanästhetika untersucht werden. Zusätzlich soll der Einfluss der β-Untereinheit MiRP1 sowie des Polymorphismus $MiRP1_{T8A}$ auf die Lokalanästhetikasensitivität von HERG untersucht werden.

4.1. Kv4.3/KChIP2.2

4.1.1. Eigenschaften des Kv4.3/KChIP2.2-Komplexes

Zunächst wurden die Eigenschaften des Kv4.3/KChIP2.2-Kanal-Komplexes unter Kontrollbedingungen, also ohne Substanzapplikation, untersucht. Zur Charakterisierung des Kv4.3/KChIP2.2-Komplexes wurden die Aktivierung, die zeitabhängige Inaktivierung, die spannungsabhängige Inaktivierung, die Erholung von der Inaktivierung sowie die frequenzabhängigen Veränderungen des Stromes analysiert.

4.1.1.1. Aktivierung

Abbildung 4.1.A. zeigt Stromspuren, die mit dem Aktivierungsprotokoll (siehe 3.6.2.1.) hervorgerufen wurden. Die maximale Stromstärke bei jedem Potential wurde gemessen und zur Berechnung der entsprechenden Leitfähigkeit herangezogen (siehe 3.7.2.). Die Leitfähigkeiten wurden normalisiert und gegen die Spannung aufgetragen. Die Leitfähigkeit des Kv4.3/KChIP2.2-Komplexes war spannungsabhängig und ließ sich mit einer Boltzmann-Gleichung (siehe 3.7.3.) mathematisch beschreiben (Abbildung 4.1.B.). Das Potential bei dem die Hälfte aller Kanäle geöffnet, also aktiviert, waren (V_{mid}), betrug

(Mittelwert ± Standardabweichung) 0 ± 4 mV, der Steigungskoeffizient (*slope factor*) betrug 13 ± 3, die maximale Leitfähigkeit (G_{max}) 97 ± 2 % (n=10, Tabelle 4.1.).

4.1.1.2. Spannungsabhängige Inaktivierung

Die Stromspuren der Abbildung 4.1.C. wurden mit dem Inaktivierungsprotokoll (siehe 3.6.2.2.) aufgenommen. Es wurde die maximale Stromamplitude während des zweiten Spannungssprungs des Protokolls gemessen. Da das Membranpotential bei diesem Schritt immer auf das gleiche Potential geklemmt wurde, war die Stromamplitude direkt proportional zur Leitfähigkeit (siehe 3.7.2.). Die normalisierte Stromamplitude wurde gegen die Spannung aufgetragen und ebenfalls mit einer Boltzmann-Gleichung beschrieben (Abbildung 4.1.D.). Das Potential, bei dem die Hälfte aller Kanäle inaktiviert waren, betrug -46 ± 4 mV, der *slope factor* war -3 ± 0,4 (n=8) (Tabelle 4.1.).

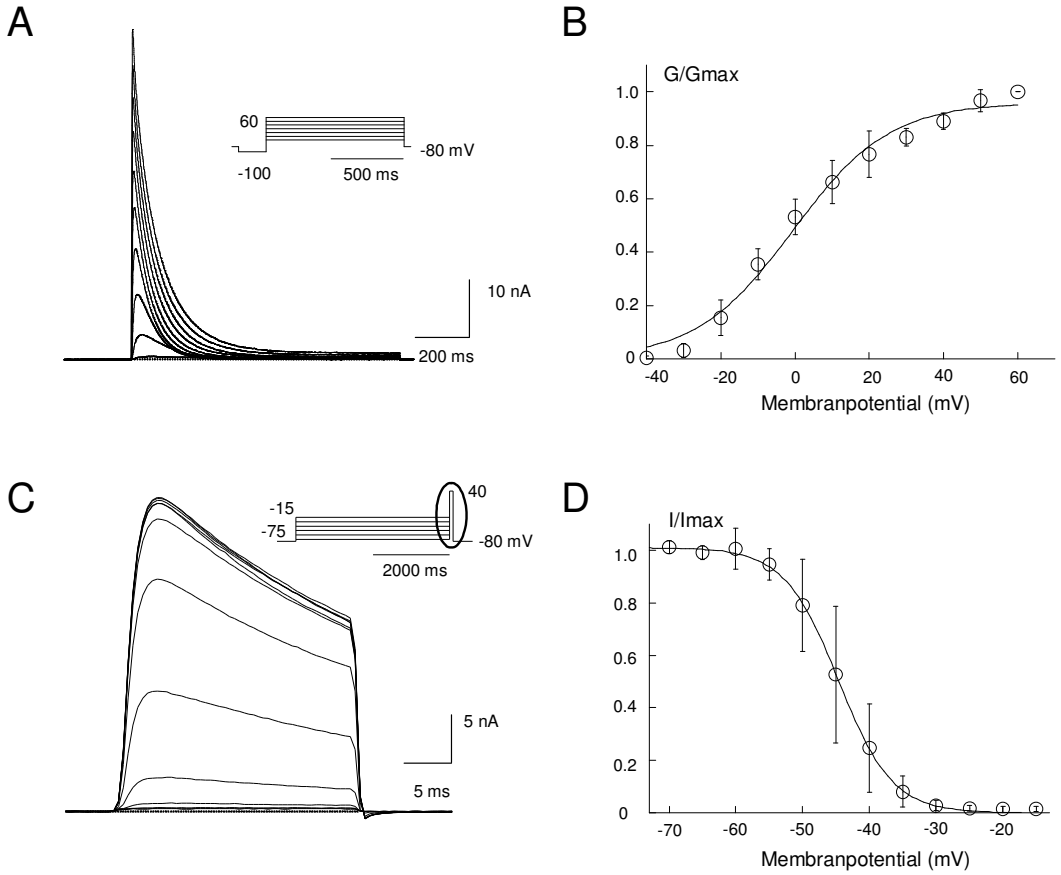

Abbildung 4.1.: A. Stromantwort des Kv4.3/KChIP2.2-Komplexes auf das Aktivierungsprotokoll (Einschub). B. Die auf den Maximalwert normalisierte Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung während der Aktivierung wurde mit einer Boltzmann-Funktion beschrieben. C. Ausschnitt aus der Stromantwort von Kv4.3/KChIP2.2 auf das Inaktivierungsprotokoll (Einschub) während des Sprungs auf +40 mV. D. Beziehung der normalisierten Stromamplitude zur Spannung. Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung wurde mit einer Boltzmann-Gleichung beschrieben.

4.1.1.3. Zeitabhängige Inaktivierung

Die zeitabhängige Inaktivierung wurde bei einem Potential von +40 mV mit einem Rechteckpulsprotokoll (siehe 3.6.2.3.) detailliert analysiert. Die Stromantwort von Kv4.3/KChIP2.2 auf diese angelegte Spannung unter Kontrollbedingungen zeigt Abbildung 4.2.A. Es handelt sich um einen schnell inaktivierenden Strom. Die Inaktivierung wurde mit einer biexponentiellen Funktion (siehe 3.7.4.) beschrieben. Hieraus resultierten die Zeitkonstanten τ_1 und τ_2. τ_1 betrug (Mittelwert ± Standardabweichung) 35 ± 10 ms (n=16) und τ_2 91 ± 34 ms (n=16). Die Gewichtung von τ_1, welche durch die Amplitude 1 ausgedrückt wird, betrug 61 ± 11 %, die Amplitude 2 entsprechend 39 ± 11 % (Tabelle 4.1.). Die maximale Stromamplitude I_{max} war 23 ± 13 nA (n=18). Dies entsprach einer mittleren Stromdichte von 1057 ± 714 pA/pF (n=18). Die Ladung Q, die während des gesamten Zeitraums der angelegten depolarisierenden Spannung über die Membran floss, betrug im Mittel 1412 ± 766 pC (n=18).

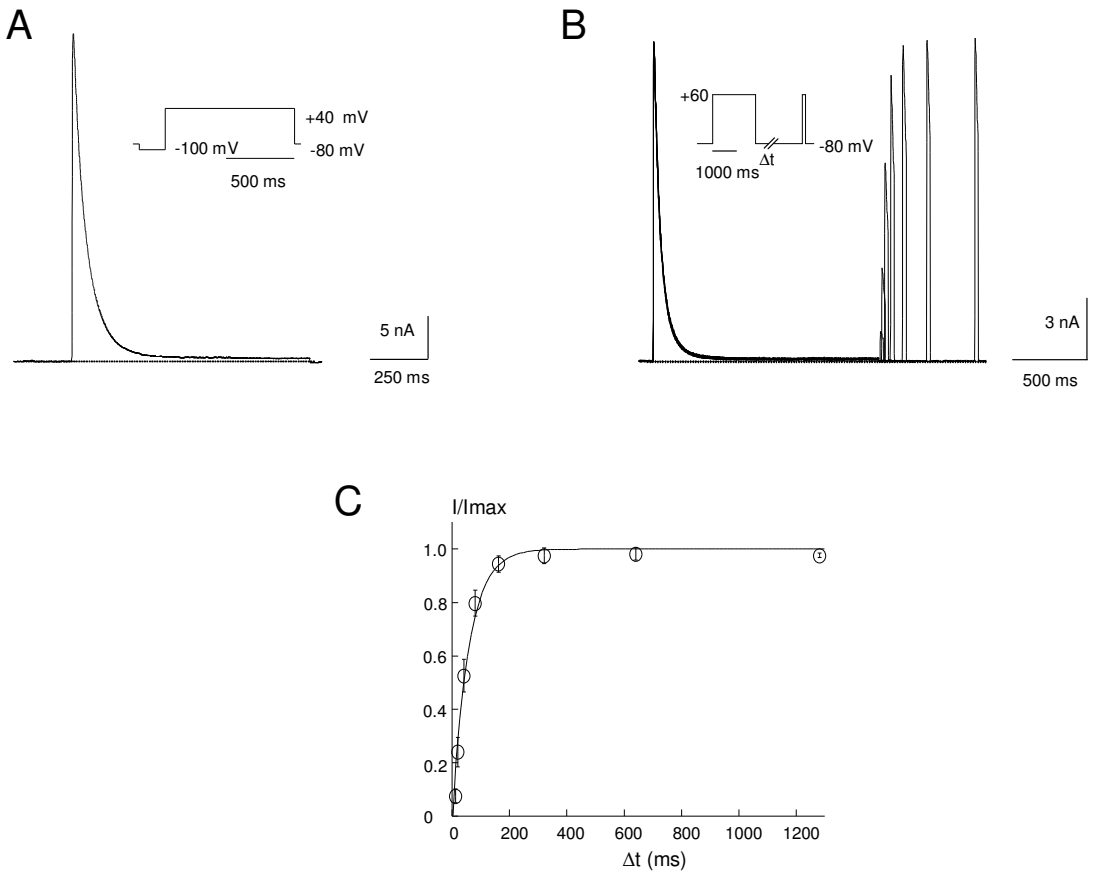

Abbildung 4.2.: A. Stromantwort des Kv4.3/KChIP2.2-Komplexes auf das Rechteckpulsprotokoll (Einschub). Es handelte sich um einen schnell inaktivierenden Strom. B. Überlagerte Stromspuren, die mit dem *recovery*-Pulsprotokoll (Einschub) evoziert wurden. Die Zeit zwischen zwei Depolarisationen (Δt) verdoppelte sich mit jedem neuen Puls. C. Die Beziehung der auf den Maximalwert normalisierten Stromstärke zur jeweiligen Repolarisationsdauer wurde mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben.

4.1.1.4. Erholung von der Inaktivierung

Abbildung 4.2.B. zeigt die Stromantwort von Kv4.3/KChIP2.2 auf das *recovery*-Protokoll (siehe 3.6.2.4.). Die auf den Maximalwert normalisierte Stromamplitude der zweiten Depolarisation wurde gegen die Zeit aufgetragen. Mit zunehmender Dauer der Repolarisation zwischen den zwei depolarisierenden Pulsen wurde die Amplitude größer. Diese Beziehung wurde mit einer monoexponentiellen Funktion (siehe 3.7.5.) beschrieben (Abbildung 4.2.C.). Die Zeitkonstante der Erholung τ_{rec} betrug 58 ± 8 ms (n=6) (Tabelle 4.1.).

Aktivierung	
V_{mid} (mV)	-0,1 ± 4,2
slope factor	13,1 ± 2,6
G_{max} (%)	96,7 ± 2,1
n	10
spannungsabhängige Inaktivierung	
V_{mid} (mV)	-46,0 ± 3,6
slope factor	-3,2 ± 0,4
G_{max} (%)	101,3 ± 3,3
n	8
zeitabhängige Inaktivierung	
τ_1 (ms)	34,5 ± 10,4
τ_2 (ms)	91,3 ± 34,0
amp 1 (%)	60,6 ± 11,1
amp 2 (%)	39,4 ± 11,1
n	16
Erholung von der Inaktivierung	
τ_{rec} (ms)	57,9 ± 8,0
n	6

Tabelle 4.1.: Parameter des Öffnungs- und Schließverhaltens von Kv4.3/KChIP2.2 Kanälen unter Kontrollbedingungen (Mittelwerte ± Standardabweichungen). V_{mid}: Membranpotential der halbmaximalen Aktivierung bzw. Inaktivierung, *slope factor*: Steigungskoeffizient, G_{max}: maximale Aktivierung bzw. Inaktivierung, n: Anzahl der Experimente, τ_1 bzw. τ_2: schnelle bzw. langsame Konstante der zeitabhängigen Inaktivierung, amp 1 bzw. amp 2: Gewichtung der ersten bzw. der zweiten Zeitkonstante der Inaktivierung, τ_{rec}: Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung.

4.1.1.5. Frequenz

Die untersuchten Frequenzen waren 0,5 Hz, 1 Hz und 1,67 Hz. Die Kanäle wurden mit verschiedenen Rechteckpulsprotokollen (siehe 3.6.2.5.) aktiviert. Es wurde die maximale Stromamplitude I_{max} und die Ladung, die über den gesamten Zeitraum des Pulsprotokolls floss, Q, analysiert. Zusätzlich wurde die Ladung, die während der ersten 50 ms des jeweiligen Pulsprotokolls floss Q_{50ms} untersucht. So konnten trotz unterschiedlicher Länge der Pulsprotokolle die Ladungsflüsse während eines gleichen Zeitraums miteinander verglichen werden. Bei 0,5 Hz (entsprechend einer Herzfrequenz von 30 Schlägen/min)

betrug I_{max} 28 ± 14 nA (n=9), bei 1 Hz (60 Schlägen/min entsprechend) 27 ± 14 nA (n=9) und bei 1,67 Hz (100 Schlägen/min entsprechend) 26 ± 13 nA (n=9). Die Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander (p>0,05). Q betrug bei 0,5 Hz 3037 ± 1848 pC (n=9), bei 1 Hz 2714 ± 1702 pC (n=9) und bei 1,67 Hz 1036 ± 546 pC (n=9). Diese Werte unterschieden sich signifikant voneinander, was auf die unterschiedliche Länge der Pulsprotokolle (siehe 3.6.2.5.) zurückzuführen ist (p<0,05), da zwischen den Werten für Q_{50ms} kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Frequenzen bestand (p>0,05). Diese waren 1074 ± 588 pC (n=9) für 0,5 Hz, 1044 ± 578 pC (n=9) für 1 Hz und 1036 ± 546 pC (n=9) für 1,67 Hz.

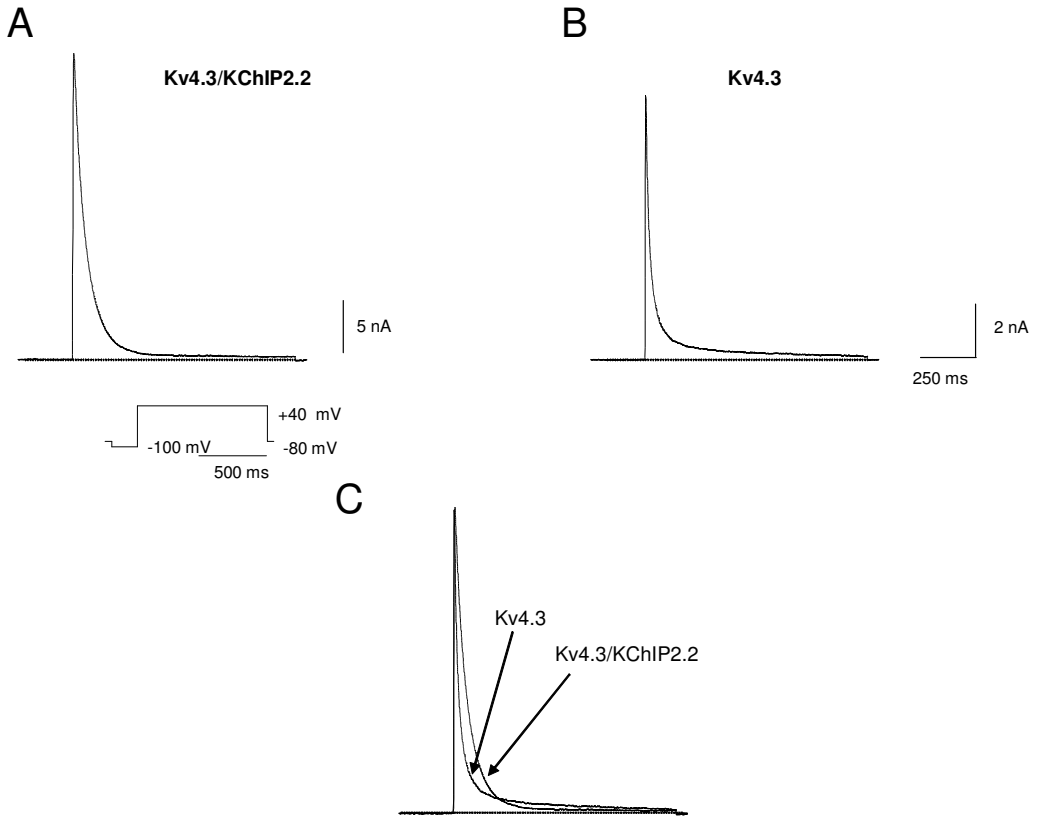

Abbildung 4.3.: A. Originalstromspur, die der Kv4.3/KChIP2.2-Komplex in Antwort auf das Rechteckpulsprotokoll generierte. B. Stromspur, die durch das gleiche Protokoll bei dem Kv4.3-Kanal ohne akzessorische Untereinheit hervorgerufen wurde. C. Bei Überlagerung der beiden normalisierten Stromspuren ist ein Überkreuzungsphänomen zu erkennen.

4.1.2. Eigenschaften der Kv4.3-α-Untereinheit

Kv4.3 ohne KChIP2.2 zeigte auf das Rechteckpulsprotokoll (siehe 3.6.2.3.) eine Stromantwort, die in Abbildung 4.3.B. wiedergegeben ist. Es gibt einige Unterschiede zu dem Strom, der von dem Kanal-Komplex aus Kv4.3/KChIP2.2 generiert wurde (Abbildung 4.3.A.). τ_1 der Inaktivierung des Kv4.3-Stromes war mit 20 ± 2 ms (n=10) signifikant

geringer ($p<0,05$) als τ_1 von Kv4.3/KChIP2.2. τ_2 war dagegen mit 153 ± 33 ms (n=10) signifikant ($p<0.05$) größer. Die Amplitude 1 nahm signifikant zu auf 81 ± 6 % (n=10, $p<0,05$), die Amplitude 2 betrug entsprechend 19 ± 6 %. Dies führte zu einem Überkreuzungsphänomen: Überlagert man die auf eine Größe normierten Stromspuren von Kv4.3 und dem Kv4.3/KChIP2.2-Komplex, so überkreuzen sie sich während der Inaktivierung (Abbildung 4.3.C.). Die maximale Amplitude der Kv4.3-Stromantwort unterschied sich mit 6 ± 5 nA (n=10) signifikant von Kv4.3/KChIP2.2 (23 ± 13 nA, n=19, $p<0,05$). Die korrespondierende Stromdichte betrug 365 ± 263 pA/pF (n=10), der Ladungsfluss 367 ± 285 pC (n=10). Auch hierin unterschied sich Kv4.3 signifikant von Kv4.3/KChIP2.2 (1085 ± 705 pA/pF, n=19 und 1412 ± 766 pC, n=18; $p<0,05$).

4.1.3. Pharmakologie des Kv4.3/KChIP2.2-Komplexes

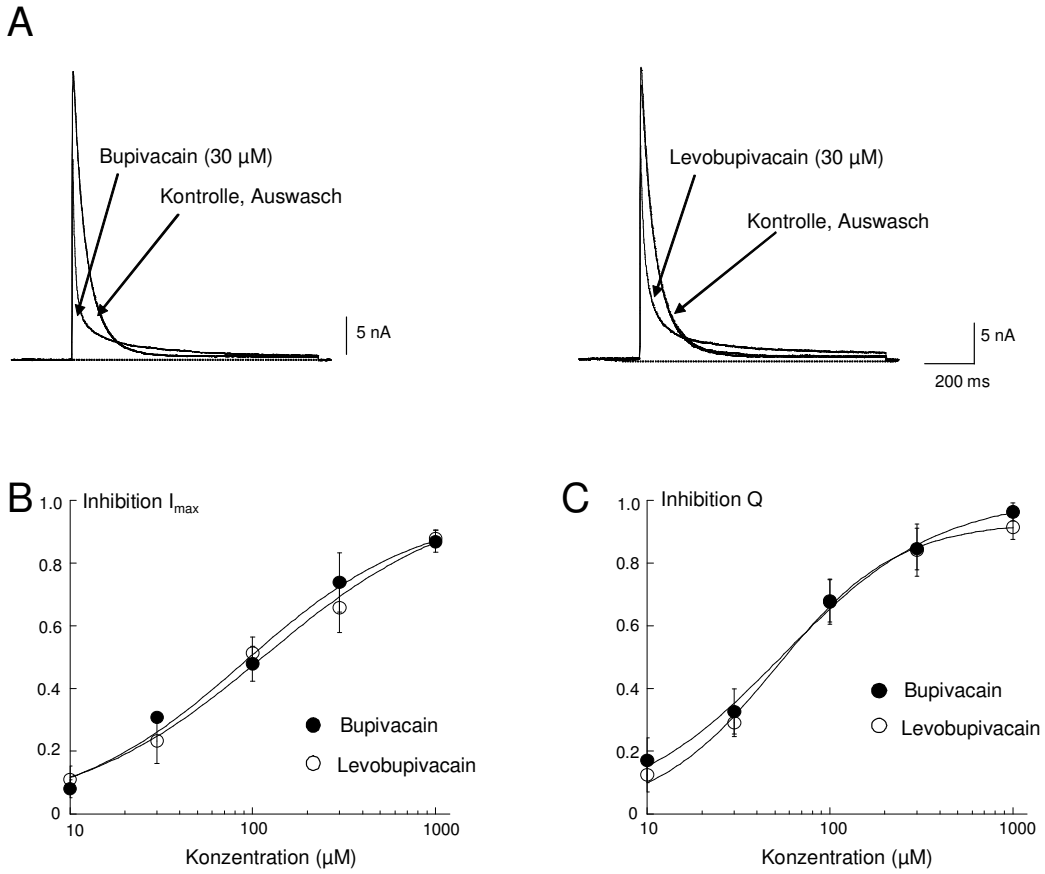

Abbildung 4.4.: A. Effekt von 30 µM Bupivacain und 30 µM Levobupivacain auf Ströme, die mit dem Rechteckpuls-Protokoll hervorgerufen wurden. B. Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition von I_{max} durch Bupivacain und Levobupivacain. Die Beziehung wurde mit einer Hill-Funktion beschrieben. C. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Ladungsinhibition über den gesamten Zeitraum der Depolarisation wurde ebenfalls mit einer Hill-Funktion beschrieben.

4.1.3.1. Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Inhibition

Bupivacain und Levobupivacain inhibierten den Kv4.3/KChIP2.2-Strom reversibel. Abbildung 4.4.A. zeigt den Effekt von Bupivacain (30 µM) und Levobupivacain (30 µM) auf Kv4.3/KChIP2.2-Ströme, die mit dem Rechteckpulsprotokoll (siehe 3.6.2.3.) hervorgerufen wurden. Die Inhibition (siehe 3.7.8.) nahm mit steigender Konzentration zu. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Inhibition von I_{max} konnte mit einer Hill-Funktion (siehe 3.7.9.) beschrieben werden (Abbildung 4.4.B.). Die Konzentration der halbmaximalen Inhibition (IC_{50}-Wert), betrug für Bupivacain (Mittelwert ± Standardfehler) 90 ± 33 µM (n=27) und für Levobupivacain 116 ± 47 µM (n = 29). Die Hill-Koeffizienten waren für beide Substanzen nahe eins (Tabelle 4.2., Seite 40). Auch die Unterdrückung des Ladungsflusses Q über die Membran wurde mit einer Hill-Funktion beschrieben (Abbildung 4.4.C.). Dabei ergaben sich IC_{50}-Werte von 55 ± 8 µM (n=20) für Bupivacain und 50 ± 5 µM (n=26) für Levobupivacain (Tabelle 4.2.).

4.1.3.2. Überkreuzungsphänomen und Effekt auf die Zeitkonstanten

Abbildung 4.5.A. zeigt normalisierte Stromspuren unter Kontrollbedingungen und bei Applikation von 30 µM, 100 µM und 300 µM Bupivacain. Bupivacain und Levobupivacain beschleunigten τ_1 der zeitabhängigen Inaktivierung konzentrationsabhängig (Abbildung 4.5.B.). Die Abnahme von τ_1 ließ sich mit einer Hill-Funktion beschreiben (Abbildung 4.5.C.). Die Hill-Parameter für diese Funktion ergaben IC_{50}-Werte von 19 ± 5 µM (n=23) für Bupivacain und 17 ± 1 µM (n=29) für Levobupivacain. Die Hill-Koeffizienten waren auch hier nahe eins (Tabelle 4.2.). τ_2 zeigte eine hohe Variabilität. 30 µM Bupivacain und 30 µM Levobupivacain vergrößerten τ_2 signifikant gegenüber der Kontrolle ($p<0,05$). 1000 µM dieser Substanzen führten jedoch gegenüber der Kontrolle zu einer signifikanten Abnahme von τ_2 (Abbildung 4.5.D.). Die Amplitude 1 nahm mit steigender Konzentration zu. Bei Konzentrationen ab 100 µM Bupivacain und 30 µM Levobupivacain war diese Zunahme signifikant ($p<0,05$). Die Überkreuzung scheint somit auf eine substanzabhängige Änderung der Inaktivierungszeitkonstanten zurückzuführen zu sein.

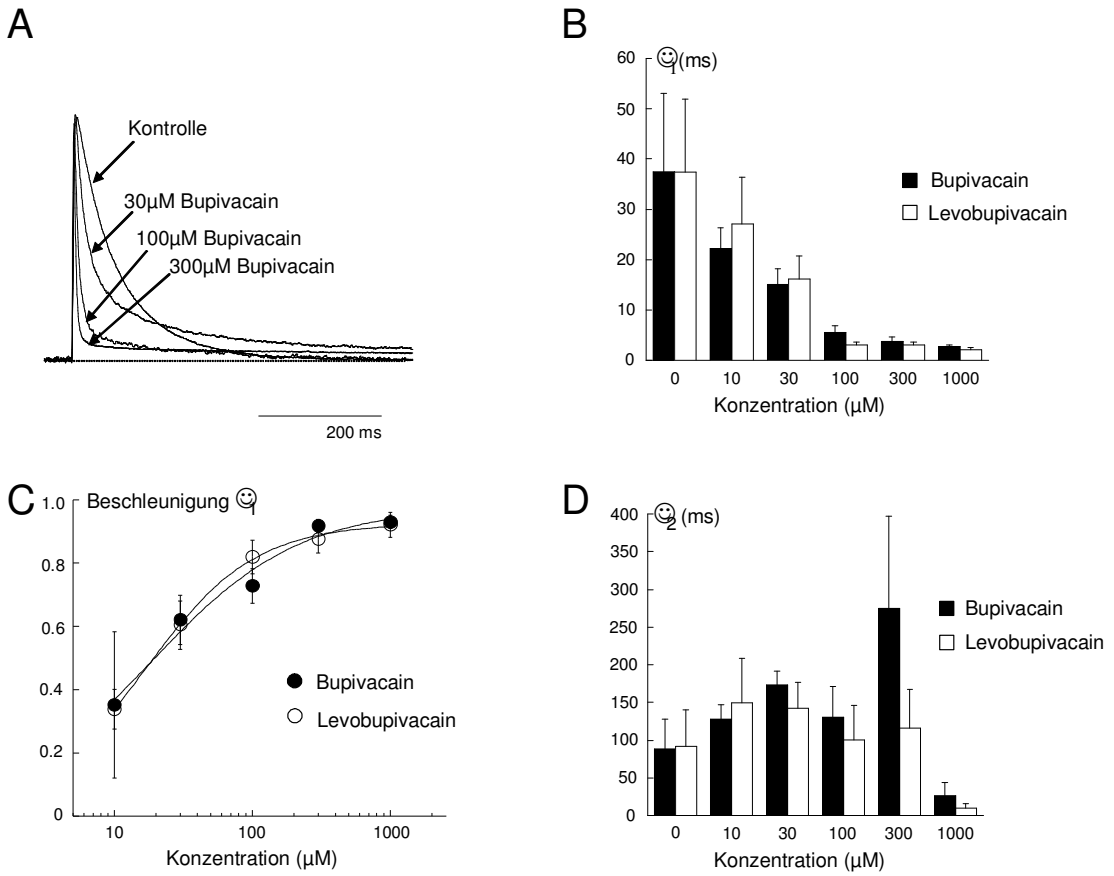

Abbildung 4.5.: A. Überlagerung einer Kontrollstromspur mit Stromspuren bei Applikation verschiedener Bupivacainkonzentrationen. B. Werte der ersten Zeitkonstanten τ_1 unter Kontrollbedingungen und bei Applikation verschiedener Bupivacain- und Levobupivacainkonzentrationen. C. Die konzentrationsabhängige Beschleunigung der ersten Zeitkonstante durch Bupivacain bzw. Levobupivacain wurde mit einer Hill-Funktion beschrieben. D. Die Veränderung von τ_2 unter Kontrollbedingungen und bei Applikation verschiedener Bupivacain- und Levobupivacainkonzentrationen.

4.1.3.3. Parameter des Überkreuzungsphänomens

Das Überkreuzungsphänomen bei Substanzeinwasch bedingte, dass durch die Lokalanästhetika sowohl eine Inhibition, als auch eine Stimulation des transmembranösen Stroms hervorgerufen wurde. Im Zeitabschnitt vor der Überkreuzung wurde der Strom inhibiert, im Zeitabschnitt danach stimuliert (Abbildung 4.6.A.). Der Zeitpunkt der Überkreuzung war konzentrationsabhängig. Mit ansteigenden Konzentrationen nahm die Zeit bis zur Überkreuzung zu (Abbildungen 4.5.A. und 4.6.B.). Die Beziehung der Ladungsreduktion vor der Überkreuzung (Q_{cross}) zur Konzentration ließ sich mit einer Hill-Funktion beschreiben (Abbildung 4.6.C.). Da ab Konzentrationen von 300 µM Lokalanästhetikum keine Überkreuzung mehr stattfand, wurden für höhere Konzentrationen die Inhibitions-Werte von Q eingesetzt (Abbildung 4.6.C.). Der IC_{50}-Wert war für Bupivacain 30 ± 7 µM (n=24) und für Levobupivacain 26 ± 2 µM (n=28) (Tabelle 4.2.). So wurde Q_{cross} insgesamt stärker inhibiert als Q. Die Stimulation der Ladung nach dem

Überkreuzen Q_{stim} zeigte eine hohe Variabilität und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen (p>0,05) (Abbildung 4.6.D.).

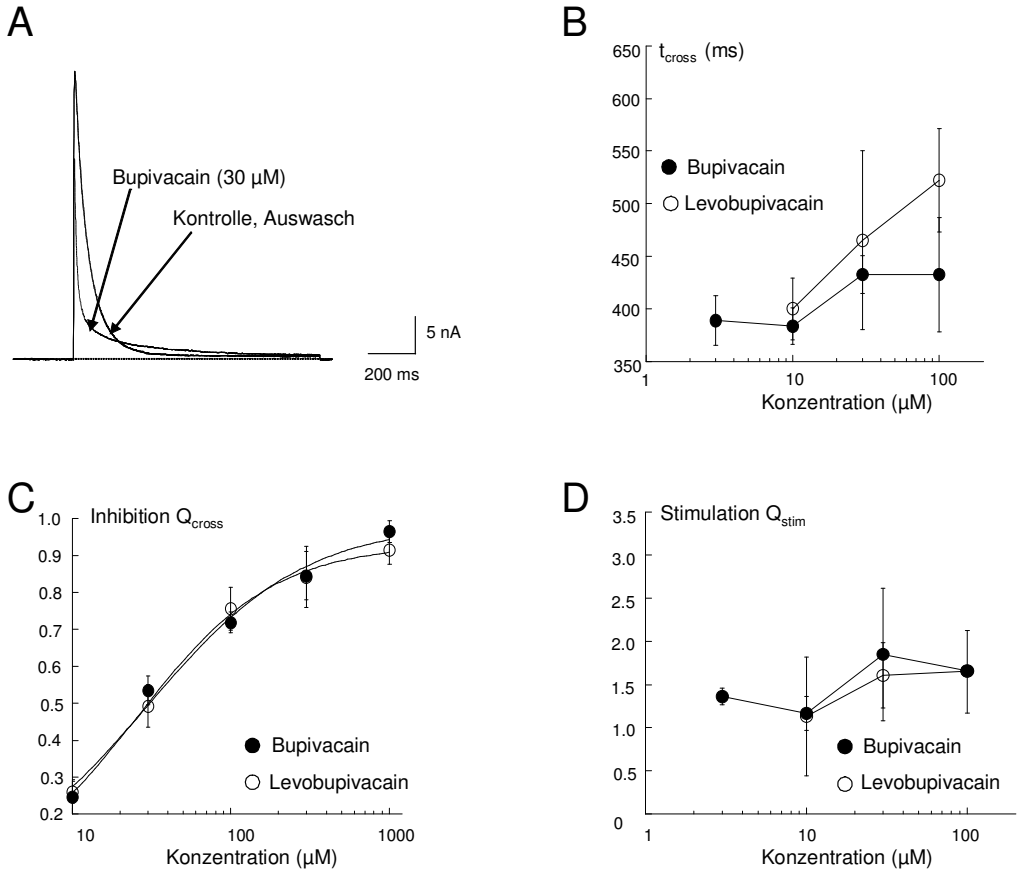

Abbildung 4.6.: A. Durch die Überkreuzung bei Bupivacain-Applikation kam es sowohl zu einer Inhibition wie auch zur Stimulation des KV4.3/KChIP2.2-Stromes. B. Die Zeit bis zum Zeitpunkt des Überkreuzungsphänomens t_{cross} nahm mit steigender Konzentration zu. C. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für Q_{cross} wurde mit einer Hill-Funktion beschrieben. D. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Stimulation Q_{stim} war für beide Lokalanästhetika sehr variabel und wurde nicht mit einer Funktion beschrieben.

	Inhibition I_{max} Bupivacain		*Inhibition I_{max} Levobupivacain*		*Inhibition Q Bupivacain*		*Inhibition Q Levobupivacain*	
V_{max} (%)	97	± 11	101	± 13	101	± 5	93	± 3
Hill	0,91	± 0,2	0,83	± 0,16	1,02	± 0,12	1,31	± 0,14
IC_{50} (µM)	89,8	± 32,5	116,4	± 47,4	55,0	± 8,2	50,4	± 5,1
n	27		29		20		26	

	Beschleunigung τ_1 Bupivacain		*Beschleunigung τ_1 Levobupivacain*		*Inhibition Q_{cross} Bupivacain*		*Inhibition Q_{cross} Levobupivacain*	
V_{max} (%)	97	± 8	93	± 1	99	± 7	93	± 2
Hill	0,81	± 0,24	1,09	± 0,06	0,88	± 0,18	1,01	± 0,08
IC_{50} (µM)	18,5	± 5,3	16,6	± 0,7	29,7	± 6,9	25,8	± 2,0
n	23		29		24		28	

Tabelle 4.2.: Die Konzentrationsabhängigkeiten der verschiedenen Bupivacain- und Levobupivacaineffekte auf Kv4.3/KChIP2.2-Komplexe ließen sich mittels Hill-Funktionen beschreiben. V_{max}: maximaler Effekt, Hill: Hill-Koeffizient, IC_{50}: Konzentration des halbmaximalen Effektes, n: Anzahl der Experimente.

Da die Konzentrations-Wirkungs-Kurven, wie auch alle anderen Parameter zwischen Bupivacain und Levobupivacain, keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, wurde nur die Wirkung von Bupivacain im Detail weiter untersucht. Hierzu wurden zwei Konzentrationen ausgewählt, 30 µM und 100 µM Bupivacain. 30 µM Bupivacain ist der IC_{50}-Wert von Q_{cross}. 100 µM Bupivacain liegt nahe dem IC_{50}-Wert von I_{max}. Zwischen den beiden Werten liegt der IC_{50}-Wert für Q.

4.1.3.4. Einfluss von Bupivacain auf die Aktivierung

Es wurde der Effekt von 30 µM und 100 µM Bupivacain auf den Strom, den das Aktivierungsprotokoll hervorruft, untersucht (siehe 3.6.2.1.).

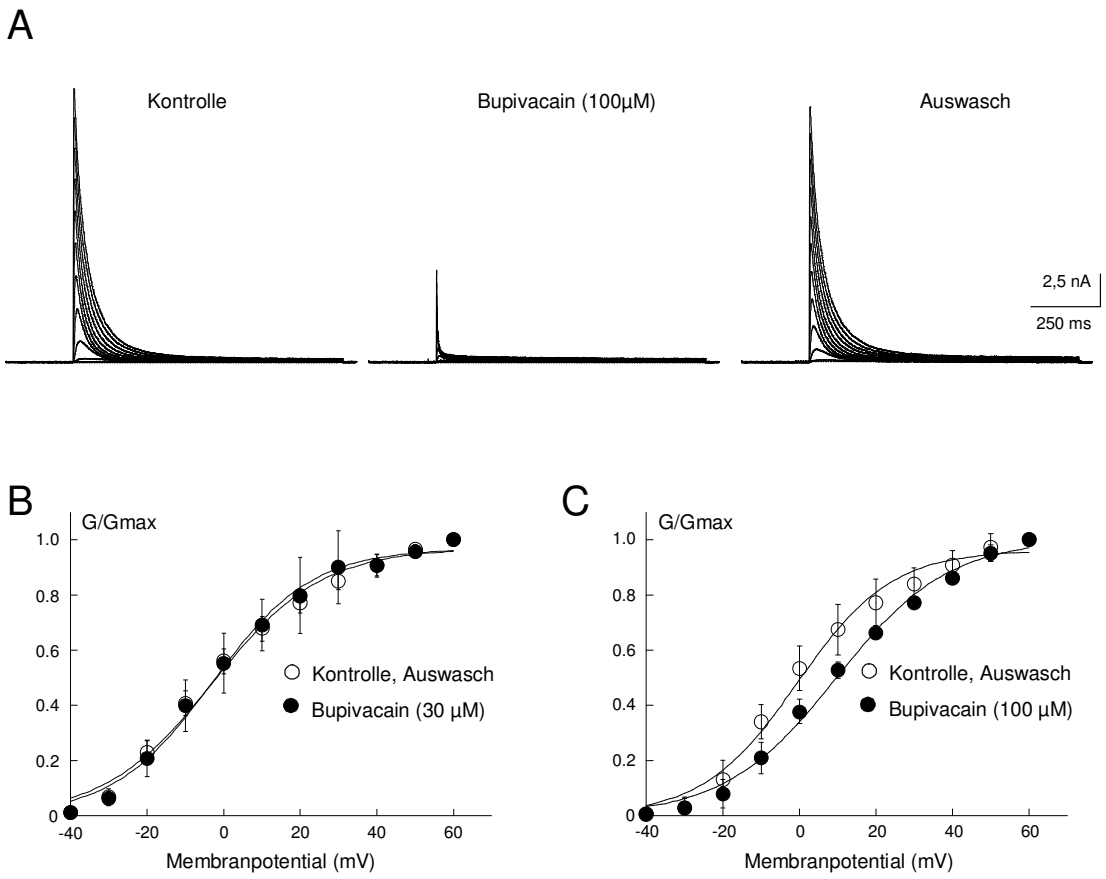

Abbildung 4.7.: A. Originalstromspuren, die mit dem Aktivierungsprotokoll evoziert wurden unter Kontrollbedingungen, bei Applikation von 100 µM Bupivacain und nach Auswasch. B. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung unter Kontroll-Auswasch-Bedingungen und unter 30 µM Bupivacain wurde mit einer Boltzmann-Gleichung beschrieben. Das Aktivierungsverhalten wurde durch 30 µM Bupivacain nicht verändert. C. 100 µM Bupivacain veränderten jedoch das Aktivierungsverhalten des Kv4.3/KChIP2.2-Kanal-Komplexes. Die mit einer Boltzmann-Funktion beschriebene Aktivierungs-Kurve ist in depolarisierter Richtung verschoben.

Die Applikation von Bupivacain (30 µM und 100 µM) führte zu einer reversiblen Stromreduktion. Abbildung 4.7.A. zeigt Originalstromspuren vor, während und nach der Applikation von 100 µM Bupivacain. 30 µM Bupivacain veränderten das

Aktivierungsverhalten, also die spannungsabhängige Änderung der Leitfähigkeit, jedoch nicht (Abbildung 4.7.B.). Der Mittelwert von V_{mid} unter Kontroll- und unter Auswasch-Bedingungen betrug -3 ± 3 mV und bei Gabe von Bupivacain (30 µM) -2 ± 5 mV (n=5) (Tabelle 4.3.). Im Gegensatz hierzu veränderten 100 µM Bupivacain die Leitfähigkeits-Spannungsbeziehung. V_{mid} wurde durch Applikation von 100 µM Bupivacain um +10 ± 4 mV verschoben (n=5) ($p<0,05$). Auch die anderen Boltzmann-Parameter wurden durch Bupivacain-Gabe signifikant verändert (Tabelle 4.4., Seite 45; Abbildung 4.7.C.).

4.1.3.5. Einfluss von Bupivacain auf die spannungsabhängige Inaktivierung

Beide Konzentrationen von Bupivacain führten zu einer Reduktion des Auswärtsstroms, der durch das Inaktivierungsprotokoll (siehe 3.6.2.2.) evoziert wurde. Abbildung 4.8.A. zeigt die Stromspuren unter dem Einfluss von 100 µM Bupivacain.

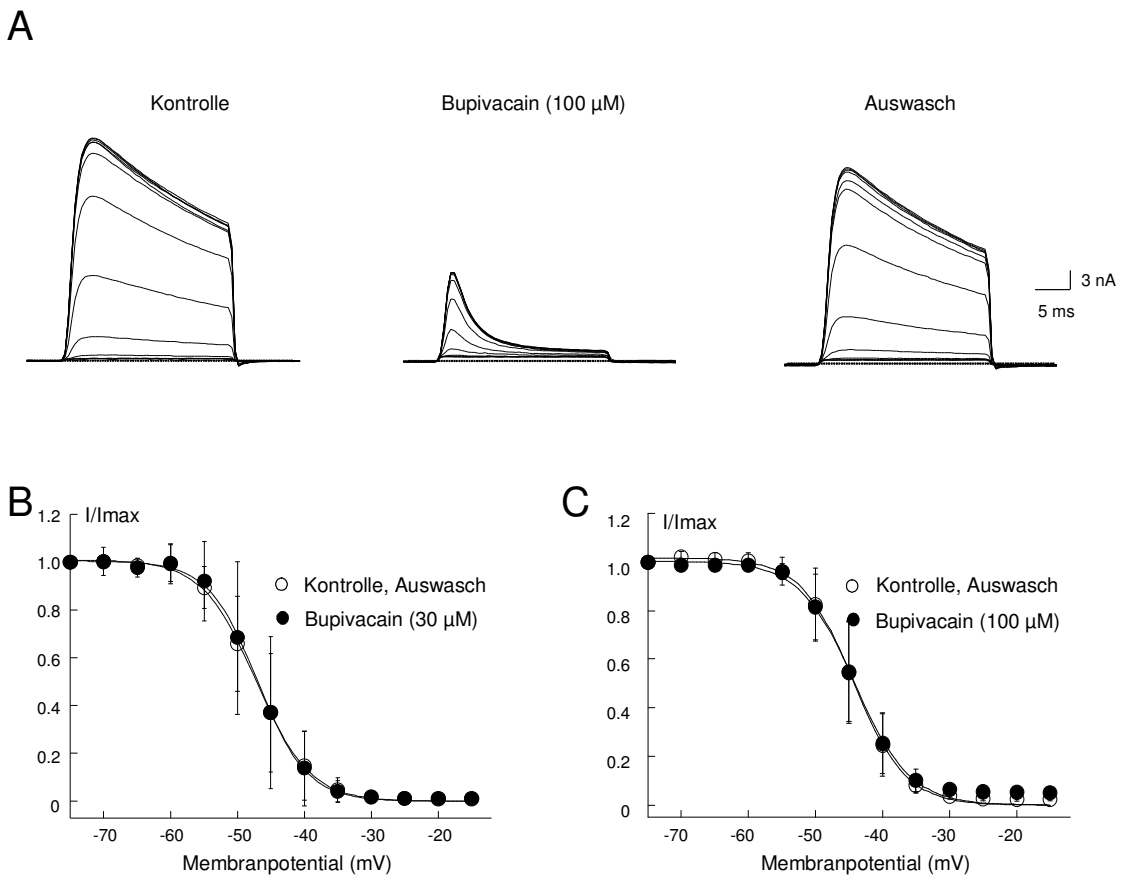

Abbildung 4.8.: A. Originalstromspuren, die mit dem Inaktivierungsprotokoll evoziert wurden, unter Kontrollbedingungen, bei Applikation von 100 µM Bupivacain und nach Auswasch. B. Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung unter Kontroll-Auswasch-Bedingungen und unter 30 µM Bupivacain wurde mit einer Boltzmann-Gleichung beschrieben. Das Inaktivierungsverhalten wurde durch Bupivacain nicht verändert. C. Auch 100 µM Bupivacain veränderten das Inaktivierungsverhalten des Kv4.3/KChIP2.2-Kanal-Komplexes nicht.

Abbildung 4.8.B. zeigt die Beziehung zwischen normalisierter Stromstärke und angelegtem Potential unter Kontroll- und Auswaschbedingungen und bei Applikation von 30 µM Bupivacain. Die Beziehung wurde mit einer Boltzmann-Funktion (siehe 3.7.3) beschrieben. Zwischen den Boltzmann-Parametern unter Kontroll- und Auswaschbedingungen und denen unter Einfluss von Bupivacain (30 µM)-Applikation gab es keinen signifikanten Unterschied ($p>0,05$). V_{mid} betrug unter Kontroll-Auswasch-Bedingungen -47,0 ± 4,1 mV (n=4) und nach Applikation von 30 µM Bupivacain -47,3 ± 4,4 mV (n=4, $p>0,05$) (Tabelle 4.3., Seite 45). Auch 100 µM Bupivacain veränderten die Inaktivierungseigenschaften des Kanal-Komplexes nicht. Die Boltzmann-Inaktivierungskurve zeigte keine Verschiebung und die Boltzmann-Parameter unterschieden sich nicht signifikant von den Kontroll-Auswasch-Werten ($p>0,05$) (Abbildung 4.8.C., Tabelle 4.4.).

4.1.3.6. Einfluss von Bupivacain auf die Erholung von der Inaktivierung

Abbildung 4.9.A. zeigt Original-Stromspuren, die durch das *recovery*-Pulsprotokoll (siehe 3.6.2.4.) evoziert wurden. Unter Einwasch von 30 µM bzw. 100 µM Bupivacain kam es zur Reduktion der Stromamplituden. Dieser Effekt war auswaschbar. Der normalisierte Strom wurde gegen die Dauer des Zwischenpulses aufgetragen und diese Beziehung mit einer monoexponentiellen Funktion (siehe 3.7.5.) beschrieben. Die Zeitkonstante der Erholung (τ_{rec}) unter Bupivacain (30 µM)-Applikation unterschied sich mit 52 ± 7 ms nicht signifikant gegenüber τ_{rec} unter Kontroll-Auswasch-Bedingungen mit 56 ± 6 ms (n=5, $p>0,05$) (Abbildung 4.9.B., Tabelle 4.3.). 100 µM Bupivacain veränderten die Erholung von der Inaktivierung jedoch derart, dass unter Bupivacaineinfluss eine zweite Zeitkonstante zur adäquaten Beschreibung der Strom-Zeit-Beziehung eingeführt werden musste (Abbildung 4.9.C.). τ_{rec} unter Kontroll-Auswasch-Bedingungen war 57 ± 7 ms (n=6). Die Zeitkonstanten zur Beschreibung der Strom-Zeit-Beziehung unter Bupivacain (100 µM) betrugen 42 ± 6 ms für τ_{rec1} und 2339 ± 728 ms für τ_{rec2} (n=6, Tabelle 4.4.). τ_{rec1} sowie τ_{rec2} unterschieden sich signifikant von τ_{rec} unter Kontroll-Auswasch-Bedingungen ($p<0,05$).

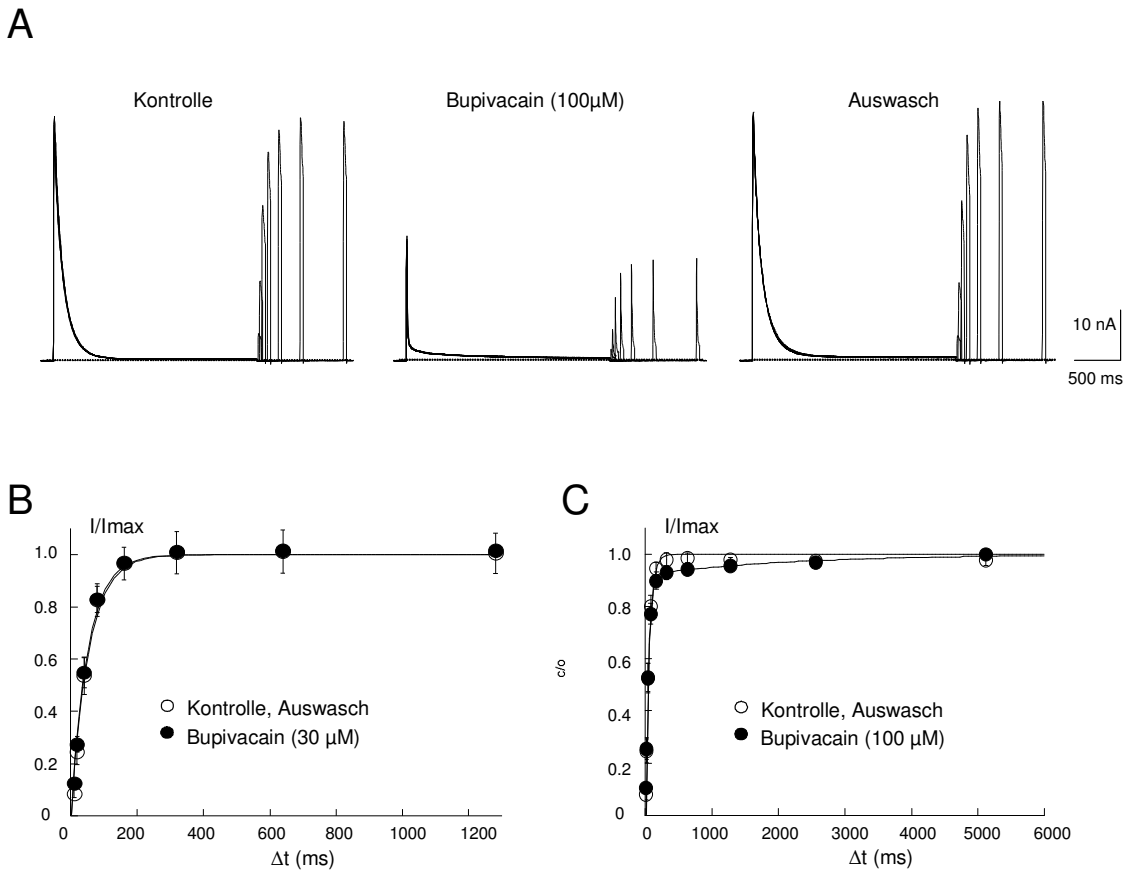

Abbildung 4.9.: A. Originalstromspuren, die mit dem *recovery*-Pulsprotokoll evoziert wurden, unter Kontrollbedingungen, bei Applikation von 100 µM Bupivacain und nach Auswasch. B. Das Ausmaß der Erholung, gemessen als die normalisierte maximale Stromamplitude (siehe 3.7.5.), war abhängig von der Dauer der Repolarisation. Diese Beziehung wurde mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben. Nach ungefähr 300 ms war ein Plateau erreicht. Die Zeitabhängigkeit der Erholung wurde durch Bupivacain (30 µM) nicht verändert. C. Unter Einfluss von 100 µM Bupivacain verlängerte sich der Zeitraum bis zum Erreichen des Plateaus. Die Beziehung wurde mit einer biexponentiellen Funktion beschrieben. Der unterschiedliche Maßstab der Abszissen ist zu beachten.

Aktivierung	*Kontrolle/Auswasch*	*30 µM Bupivacain*
V_{mid} (mV)	-2,6 ± 2,9	–1,8 ± 5,3
slope factor	14,1 ± 1,3	13,4 ± 2,2
G_{max} (%)	97 ,2 ± 2,0	98,6 ± 2,6
n	5	5

spannungsabhängige Inaktivierung	*Kontrolle/Auswasch*	*30 µM Bupivacain*
V_{mid} (mV)	-47,0 ± 4,1	-47,3 ± 4,4
slope factor	-3,1 ± 0,2	-2,9 ± 0,2
G_{max} (%)	100,0 ± 3,2	101,0 ± 5,0
n	4	4

Erholung von der Inaktivierung	*Kontrolle/Auswasch*	*30 µM Bupivacain*
τ_{rec} (ms)	55,6 ± 6,3	52,2 ± 6,8
n	3	3

Tabelle 4.3.: Einfluss von 30 µM Bupivacain auf die verschiedenen Schaltvorgänge von Kv4.3/KChIP2.2

Aktivierung	*Kontrolle/Auswasch*	*100 µM Bupivacain*
V_{mid} (mV)	-0,1 ± 3,8	9,6 ± 2,0
slope factor	12,4 ± 2,6	14,6 ± 1,6
G_{max} (%)	96,9 ± 1,9	100,4 ± 0,9
n	5	5

spannungsabhängige Inaktivierung	*Kontrolle/Auswasch*	*100 µM Bupivacain*
V_{mid} (mV)	-44,4 ± 2,7	-44,1 ± 3,0
slope factor	-3,4 ± 0,3	-3,7 ± 0,3
G_{max} (%)	101,0 ± 1,2	100,0 ± 0,8
n	4	4

Erholung von der Inaktivierung	*Kontrolle/Auswasch*	*100 µM Bupivacain*
τ_{rec1} (ms)	57,2 ± 7,0	41,7 ± 5,6
τ_{rec2} (ms)		2338,5 ± 728,1
n	6	6

Tabelle 4.4.: Einfluss von 100 µM Bupivacain auf das Schaltverhalten von Kv4.3/KChIP2.2.

4.1.3.7. Spannungsabhängigkeit der Inhibition

Die Spannungsabhängighängigkeit der Inhibition durch 100 µM Bupivacain wurde anhand des Aktivierungsprotokolls (siehe 3.6.2.1.) untersucht. Die untersuchten Parameter waren die Reduktion von I_{max} und Q, die Veränderung der Überkreuzungsparameter t_{cross} und Q_{cross} und die Veränderung von τ_1 sowie des Verhältnisses der Amplituden zueinander. Die Spannungsabhängigkeit dieser Parameter wurde im Bereich von -10 bis +40 mV analysiert (siehe 3.7.10.). Die Spannungsabhängigkeit der Amplituden wurde nur im Bereich von 0 bis +40 mV analysiert, da eine zweite Zeitkonstante und damit auch eine zweite Amplitude unter Kontroll-Auswasch-Bedingungen erst ab diesem Potential bei allen Experimenten nachweisbar war.

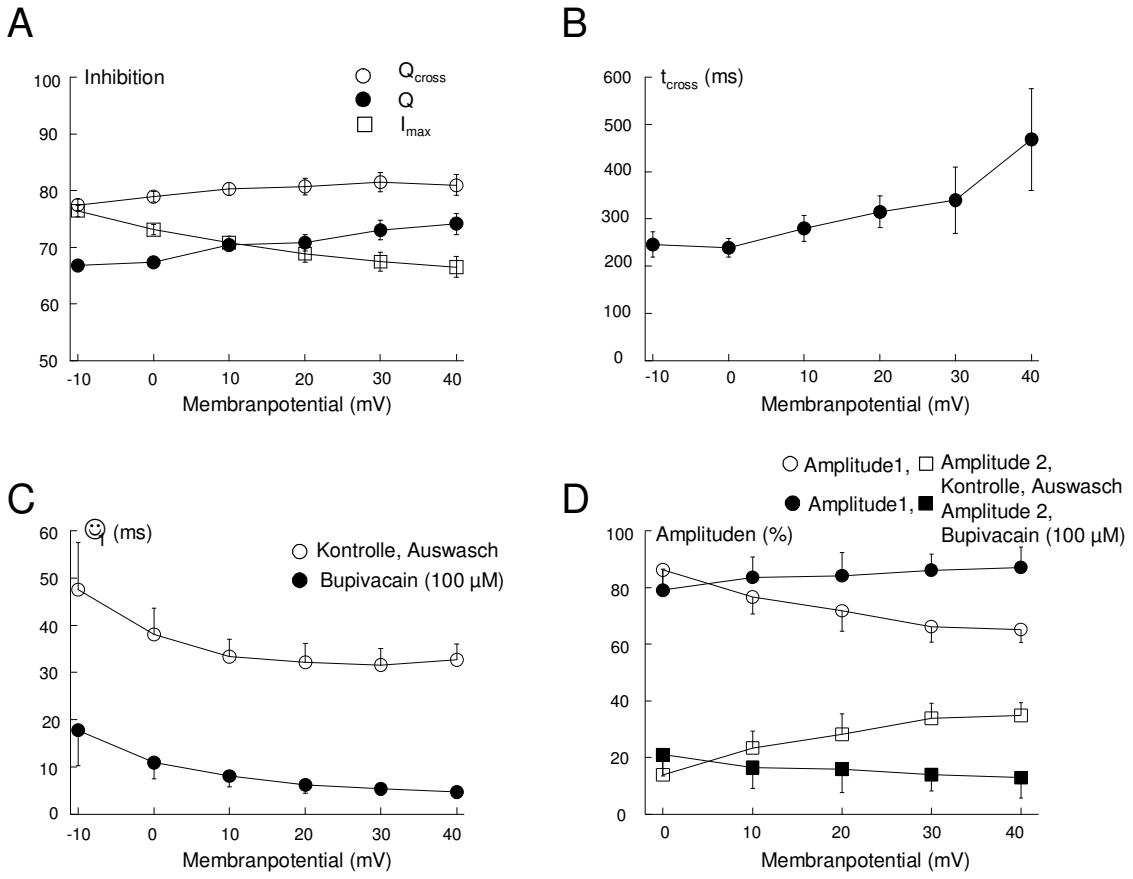

Abbildung 4.10.: A. Die Inhibition von Q_{cross}, Q, und I_{max} durch 100 µM Bupivacain wurde zu verschiedenen Potentialen im Bereich von -10 bis +40 mV berechnet. B. Der Zeitraum bis zum Überkreuzen der Ströme, t_{cross}, vergrößerte sich mit depolarisierteren Potentialen zunehmend. C. τ_1 war unter Kontrollbedingungen wie auch bei Applikation von 100 µM Bupivacain spannungsabhängig. D. Die Spannungsabhängigkeit der Amplituden der beiden Zeitkonstanten kehrte sich unter 100 µM Bupivacain um.

Die Inhibition von I_{max} durch 100 µM Bupivacain war bei niedrigen Membranpotentialen größer als bei hohen, während die Inhibition von Q mit steigender Depolarisation zunahm (n=4, $p<0,05$) (Abbildung 4.10.A.). Auch die Inhibition des Überkreuzungsparameters Q_{cross} (Abbildung 4.10.A.) und der Betrag des Überkreuzungsparameters t_{cross} (Abbildung 4.10.B.)

nahmen mit positiveren Potentialen zu. τ_1 war unter Kontroll- und Auswasch-Bedingungen spannungsabhängig (n=4, p<0,05). Es zeigte sich eine Beschleunigung mit zunehmender Depolarisation. Diese Spannungsabhängigkeit blieb bei 100µM Bupivacain bestehen (p<0,05) (Abbildung 4.10.C.). Die Spannungsabhängigkeit der Amplituden unter Kontroll-Auswasch-Bedingungen, die zu einer Angleichung der beiden Amplituden führte, wurde durch 100 µM Bupivacain umgekehrt (p<0,05) (Abbildung 4.10.D.).

4.1.3.8. Frequenzabhängigkeit der Inhibition

Zur Beurteilung einer möglichen Frequenzabhängigkeit der Inhibition von I_{max}, Q und Q_{50ms} wurde die Wirkung von 30 µM Bupivacain bei den Stimulationsfrequenzen 0,5 Hz, 1 Hz und 1,67 Hz untersucht. Zusätzlich zu den Parametern, die unter Kontrollbedingungen analysiert wurden, wurde Q_{cross} untersucht.

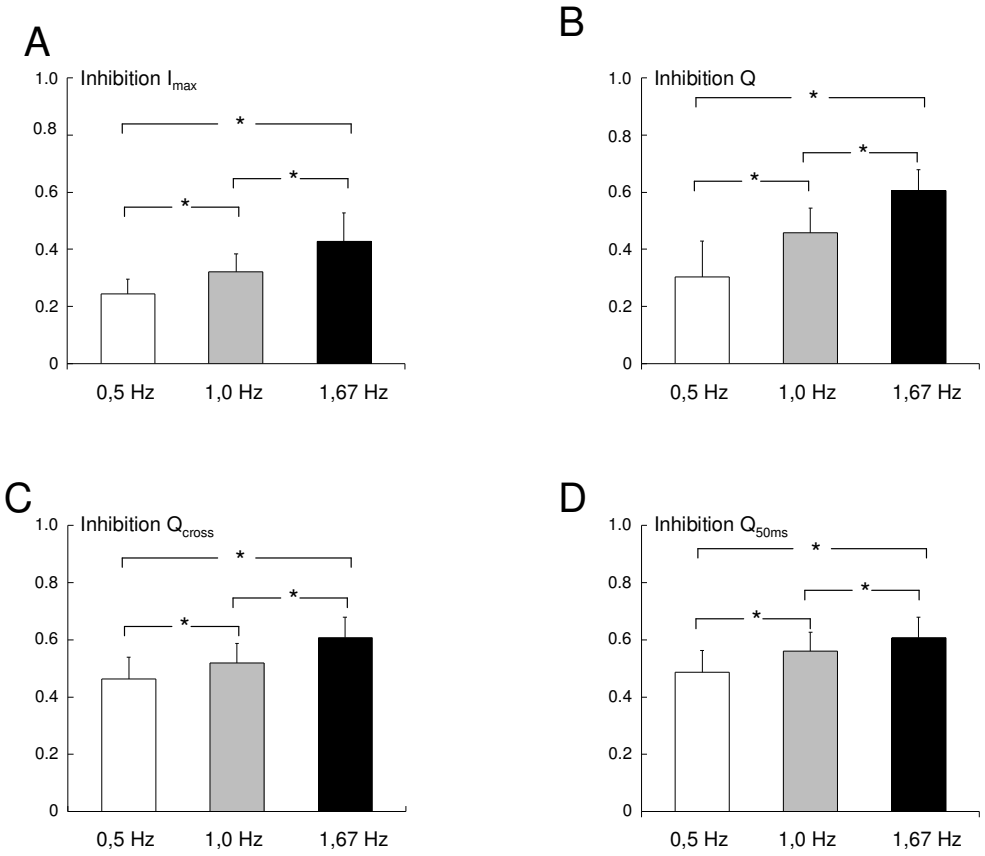

Abbildung 4.11.: Frequenzabhängigkeit des Bupivacaineffektes. A. I_{max} wurde bei einer Frequenz von 1,67 Hz signifikant stärker inhibiert, als bei Frequenzen von 1 Hz und 0,5 Hz. B. Die Inhibition von Q war bei 1,67 Hz ebenfalls signifikant größer als bei 1 Hz und 0,5 Hz. C. Q_{cross} wurde ebenfalls frequenzabhängig reduziert, die Inhibition war bei 1,67 Hz größer, als bei Frequenzen von 1 und 0,5 Hz. D. Auch die Inhibition des Parameters Q_{50} war frequenzabhängig. (*) gibt einen signifikanten Unterschied an.

I_{max} wurde von Bupivacain (30 µM) bei 0,5 Hz um 25 ± 5 % (n=9) inhibiert, bei 1 Hz um 32 ± 6 % (n=9) und bei 1,67 Hz um 43 ± 10 % (n=9) (Abbildung 4.11.A.). Damit war die Inhibition von I_{max} bei 1,67 Hz signifikant größer, als bei 1 Hz und 0,5 Hz ($p<0,05$) und bei 1 Hz signifikant größer, als die bei 0,5 Hz ($p<0,05$). Die Inhibitionen von Q (Abbildung 4.11.B.) und von Q_{cross} (Abbildung 4.11.C.) unterschieden sich bei allen Frequenzen signifikant voneinander ($p<0,05$). Der Parameter Q_{50ms} wurde von 30 µM Bupivacain wie folgt inhibiert: 49 ± 8 % (n=9) bei 0,5 Hz, 56 ± 7 % (n=9) bei 1 Hz und 61 ± 7 % (n=9) für 1,67 Hz (Abbildung 4.11.D.). Die Inhibition von Q_{50ms} bei 1,67 Hz unterschied sich signifikant von der bei 1 Hz sowie der Inhibition bei 0,5 Hz ($p<0,05$) und auch zwischen der Inhibition bei 1 Hz und bei 0,5 Hz bestand ein signifikanter Unterschied ($p<0,05$).

4.1.4. Pharmakologie der Kv4.3-α-Untereinheit

Bupivacain (30 µM) inhibierte den Strom, der bei Stimulation mit dem Rechteckpulsprotokoll durch Kv4.3 floss (Abbildung 4.12.B.). Die Kontroll- und Auswasch-Stromspuren über die Stromspur bei Bupivacain-Applikation gelagert zeigen bei Kv4.3 im Gegensatz zu Kv4.3/KChIP2.2 (Abbildung 4.12.A.) keine Überkreuzung. Dennoch scheint das Inaktivierungsverhalten unter Bupivacain verändert zu sein. Bupivacain beschleunigte τ_1 signifikant von 20 ± 2 ms (n=6) unter Kontrollbedingungen auf 7 ± 1 ms (n=6) ($p<0,05$). τ_2 wurde im Gegensatz zu Kv4.3/KChIP2.2 ebenfalls signifikant beschleunigt: von 127 ± 31ms (n=6) unter Kontrollbedingungen auf 88 ± 7ms (n=6) bei Bupivacain-Applikation ($p<0,05$). 30 µM Bupivacain hatte keinen Einfluss auf die Amplituden von τ_1 und τ_2.

Die Inhibition von I_{max} des durch Kv4.3 generierten Stroms unterschied sich mit 31 ± 6 % (n=6) nicht signifikant von der Inhibition von I_{max}, die der Kanal-Komplex mit 30 ± 2 % (n=5, $p>0,05$) (Abbildung 4.12.C.) leitete. Auch die Inhibition von Q_{cross} durch Kv4.3/KChIP2.2 ergab mit 54 ± 6 % (n=5) keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Inhibition von Q durch Kv4.3 mit 53 ± 6 % (n=4, $p>0,05$) (Abbildung 4.12.E.). Dagegen wurde die Ladung Q, welche durch Kv4.3 floss, signifikant stärker inhibiert, als Q durch Kv4.3/KChIP2.2 (53 ± 6 %, n=4 gegenüber 36 ± 6%, n=5, $p<0,05$) (Abbildung 4.12.D.). Aufgrund des fehlenden Überkreuzungsphänomens fand keine Stimulation des Ladungsflusses statt.

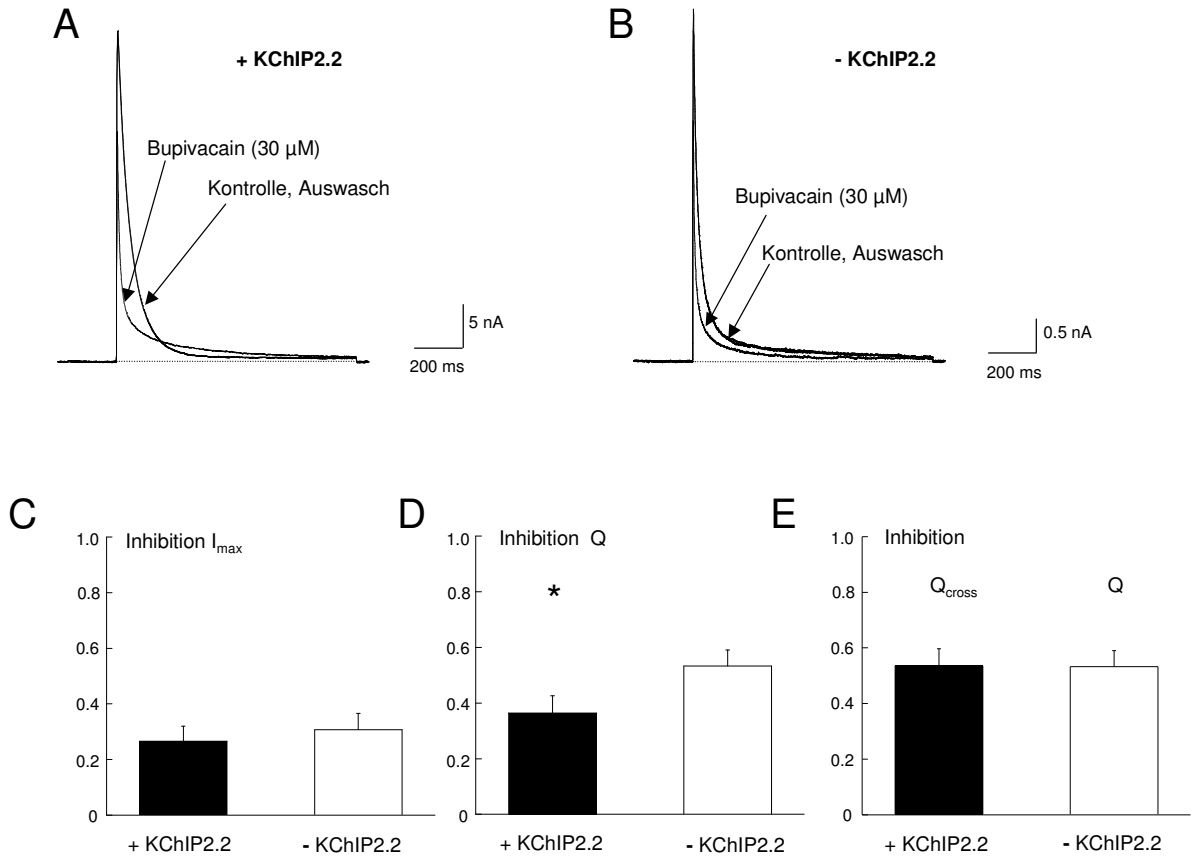

Abbildung 4.12.: A. Applikation von 30 µM Bupivacain führten bei Kv4.3/KChIP2.2 zum Überkreuzungsphänomen. B. Bei von Kv4.3 generierten Strömen trat jedoch keine Überkreuzung auf. (Die unterschiedliche Skalierung der Ordinate ist zu beachten.). C. Beim Vergleich der Inhibition von I_{max} durch 30 µM Bupivacain bei Kv4.3 mit und ohne KChIP2.2 ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p>0,05$). D. Die Inhibition des Parameters Q war bei Kv4.3/KChIP2.2 gegenüber Kv4.3 alleine signifikant vermindert ($p<0,05$). (*) zeigt den signifikanten Unterschied an. E. Wird die Inhibition von Q_{cross} bei Kv4.3/KChIP2.2 mit der Inhibition von Q bei Kv4.3 verglichen, ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p>0,05$).

4.1.5. Untersuchungen mit Ropivacain

4.1.5.1. Inhibition und Überkreuzungsphänomen bei Ropivacain

Die Sensitivität des Kv4.3/KChIP2.2-Komplexes gegenüber Ropivacain wurde anhand des Rechteckpulsprotokolls (siehe 3.6.2.3.) bei verschiedenen Ropivacainkonzentrationen untersucht. Abbildung 4.13.A. zeigt normalisierte Stromspuren, die von Kv4.3/KChIP2.2 generiert wurden. Verschiedene Konzentrationen von Ropivacain inhibierten den Kv4.3/KChIP2.2-Strom verschieden stark. Die Inhibition des Stromes war bei Auswasch der Substanz reversibel. Auch Ropivacain rief bei Kv4.3/KChIP2.2 ein Überkreuzungsphänomen der Stromspuren hervor (Abbildung 4.13.A.). Die Dauer bis zum Erreichen der Überkreuzung nahm mit steigender Ropivacainkonzentration zu (Abbildung 4.13.A. & C.).

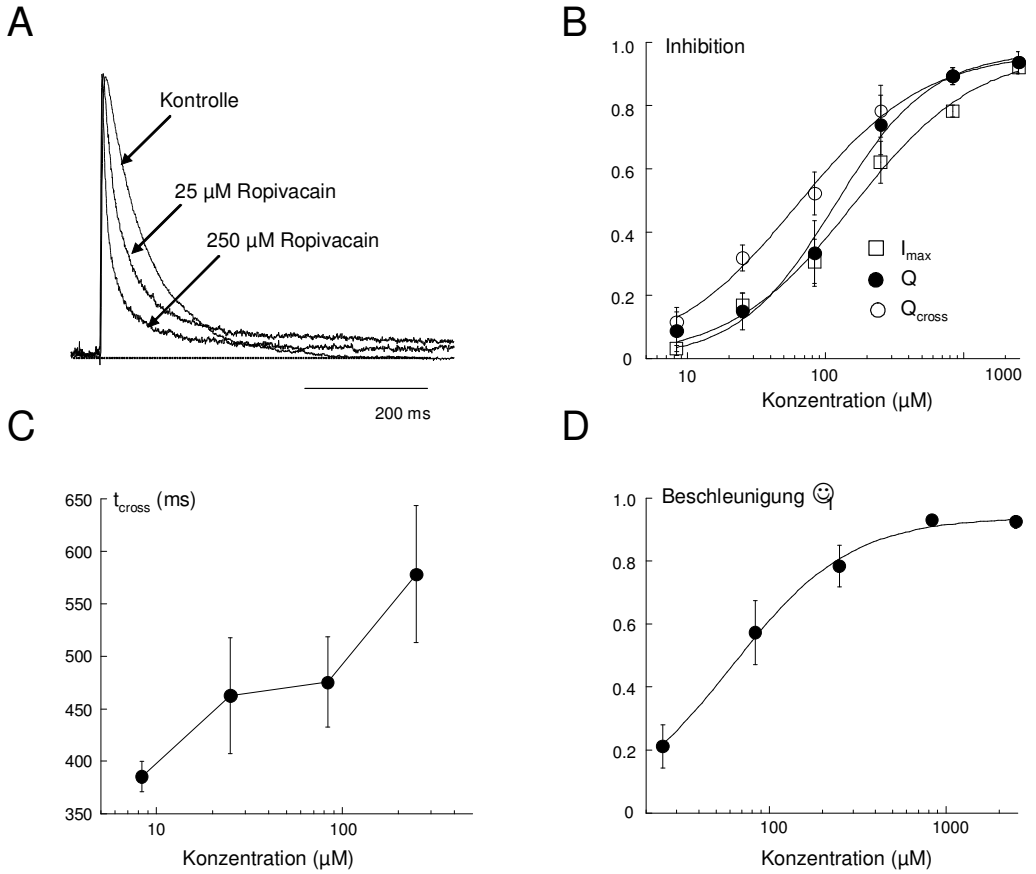

Abbildung 4.13.: A. Überlagerung von normalisierten Kv4.3/KChIP2.2-Stromspuren unter Kontrollbedingungen und bei Applikation von 25 und 250 µM Ropivacain. B. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Inhibitionen von I_{max}, Q und Q_{cross} wurden mit Hill-Funktionen beschrieben. C. Der Zeitraum bis zur Überkreuzung, t_{cross}, nahm konzentrationsabhängig zu. D. Die Beschleunigung von τ_1 in Abhängigkeit von der Konzentration wurde mit einer Hill-Funktion beschrieben.

	Inhibition I_{max}		*Inhibition Q*		*Beschleunigung τ_1*		*Inhibition Q_{cross}*	
V_{max} (%)	97	± 6	97	± 5	95	± 5	97	± 3
Hill	0,97	± 0,14	1,25	± 0,23	1,26	± 0,2	0,93	± 0,09
IC_{50} (µM)	158,8	± 33,1	116,7	± 21,0	77,1	± 10,9	62,1	± 7,9
n	34		30		30		33	

Tabelle 4.5.: Konzentrationsabhängige Effekte von Ropivacain, mit Hill-Funktionen beschrieben.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Parameter I_{max}, Q und Q_{cross} wurde mit Hill-Funktionen beschrieben (Abbildung 4.13.B.). Die IC_{50}-Werte waren für I_{max} 159 ± 33 µM (n=34) und für Q 117 ± 21 µM (n=30) (Tabelle 4.5.). Bei Q_{cross} wurde für Konzentrationen größer 250 µM Ropivacain die Inhibition der des Parameters Q gleichgesetzt, da keine Überkreuzung mehr stattfand. Es ergab sich mit 62 ± 8 µM (n=33) ein weitaus niedrigerer IC_{50}-Wert als der für Q (Tabelle 4.5.).

Ropivacain beschleunigte die zeitabhängige Inaktivierung reversibel. Dieser Prozess wurde mit zwei Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 beschrieben. Die Abnahme von τ_1 wurde berechnet (siehe

3.7.4.) und gegen die Konzentration aufgetragen. Diese Beziehung wurde mit einer Hill-Funktion beschrieben (Abbildung 4.13.D.) und ergab einen IC_{50}-Wert von 77 ± 11 µM (n=30) (Tabelle 4.5.). τ_2 zeigte eine hohe Variabilität. Ropivacain vergrößerte τ_2 signifikant bei Konzentrationen von 8 µM, 25µM und 83 µM ($p<0,05$). 250 µM, 833 µM und 2499 µM dieser Substanz riefen jedoch keine signifikante Veränderung der Zeitkonstanten τ_2 hervor ($p>0,05$).

4.1.5.2. Einfluss von Ropivacain auf das Schaltverhalten des Kv4.3/KChIP2.2-Komplexes

Nachdem die basale Sensitivität des Kv4.3/KChIP2.2-Kanal-Komplexes gegenüber Ropivacain bestimmt worden war, wurde der Einfluss auf das Schaltverhalten näher untersucht (Tabelle 4.6.). Zu diesem Zweck wurde der Einfluss von 83 µM Ropivacain auf die Aktivierung, die spannungsabhängige Inaktivierung und die Erholung von der Inaktivierung untersucht (Abbildung 4.14.). Die verwendete Konzentration liegt zwischen den IC_{50}-Werten für die Inhibition von I_{max} und Q einerseits und τ_1 und Q_{cross} andererseits.

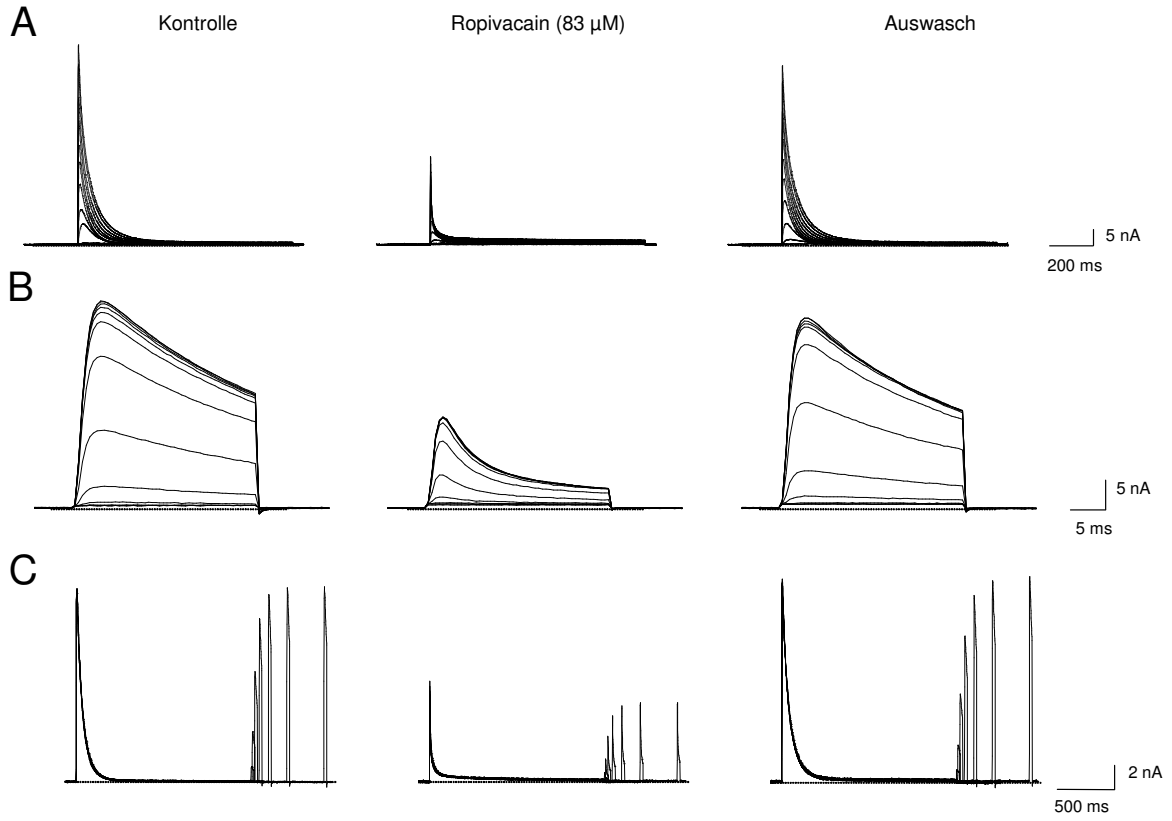

Abbildung 4.14.: Der Effekt von 83 µM Ropivacain auf Kv4.3/KChIP2.2-Ströme, die mit A. dem Aktivierungsprotokoll, B. dem Inaktivierungsprotokoll und C. dem *recovery*-Pulsprotokoll hervorgerufen wurden.

Abbildung 4.14.A. zeigt die Stromantwort des Komplexes auf das Aktivierungsprotokoll (siehe 3.6.2.1.) unter Kontrollbedingungen, bei Applikation von 83 µM Ropivacain und nach Auswasch. Ropivacain verschob in dieser Konzentration den Aktivierungsmittelpunkt V_{mid} um 7 ± 3 mV (n=6) in depolarisierte Richtung. Der *slope factor* der Kurve nahm um 2 ± 1 (n=6) zu (Tabelle 4.6., Abbildung 4.15.A.).

83 µM Ropivacain inhibierten den durch das Inaktivierungsprotokoll (siehe 3.6.2.2.) hervorgerufenen Strom (Abbildung 4.14.B.), veränderten jedoch nicht die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung (Abbildung 4.15.B., Tabelle 4.6.).

Auch der mit dem *recovery*-Protokoll (siehe 3.6.2.4.) hervorgerufene Strom wurde durch 83 µM Ropivacain inhibiert (Abbildung 4.14.C.). Die Erholung von der Inaktivierung wurde durch 83 µM Ropivacain verlangsamt. Während unter Kontroll- und Auswaschbedingungen die Beziehung zwischen normalisierter Stromstärke und Repolarisationszeit (Protokoll und Berechnung siehe Methoden) einem monoexponentiellen Verlauf folgte, der mit einer Zeitkonstante τ_{rec} von 54 ± 11 ms (n=7) beschrieben wurde, musste unter dem Einfluss von Ropivacain (83 µM) eine zweite Zeitkonstante eingeführt werden, um den Verlauf der Kurve adäquat zu beschreiben (Abbildung 4.15.C.). Die resultierenden Zeitkonstanten waren τ_{rec1} mit 40 ± 6 ms und τ_{rec2} mit 1222 ± 882 ms (n=7) (Tabelle 4.6.). Beide Zeitkonstanten unterschieden sich signifikant von τ_{rec} unter Kontroll- und Auswaschbedingungen ($p<0,05$).

Aktivierung	*Kontrolle/Auswasch*	*83 µM Ropivacain*
V_{mid} (mV)	-1,1 ± 1,7	6,2 ± 3,8
slope factor	12,8 ± 1,2	14,8 ± 1,4
G_{max} (%)	96,6 ± 0,9	99,0 ± 2,6
n	6	6

spannungsabhängige Inaktivierung	*Kontrolle/Auswasch*	*83 µM Ropivacain*
V_{mid} (mV)	-44,6 ± 4,5	-44,7 ± 4,4
slope factor	-4,1 ± 1,3	-4,4 ± 1,5
G_{max} (%)	98,7 ± 1,4	97,8 ± 2,3
n	6	6

Erholung von der Inaktivierung	*Kontrolle/Auswasch*	*83 µM Ropivacain*
τ_{rec1} (ms)	53,6 ± 11,3	39,9 ± 6,1
τ_{rec2} (ms)		1222,3 ± 882,4
n	7	7

Tabelle 4.6.: Veränderung des Schaltverhaltens von Kv4.3/KChIP2.2 durch Ropivacain.

4.1.5.3. Spannungsabhängigkeit des Ropivacaineffektes

Die Spannungsabhängighängigkeit wurde anhand des Aktivierungsprotokolls (siehe Methoden) im Bereich von -10 bis +40 mV untersucht. Im Fall der Amplituden wurde die Spannungsabhängigkeit nur im Bereich von 0 bis +40 mV ausgewertet, da eine zweite Zeitkonstante und damit auch eine zweite Amplitude erst ab diesem Potential in allen Experimenten zu analysieren war.

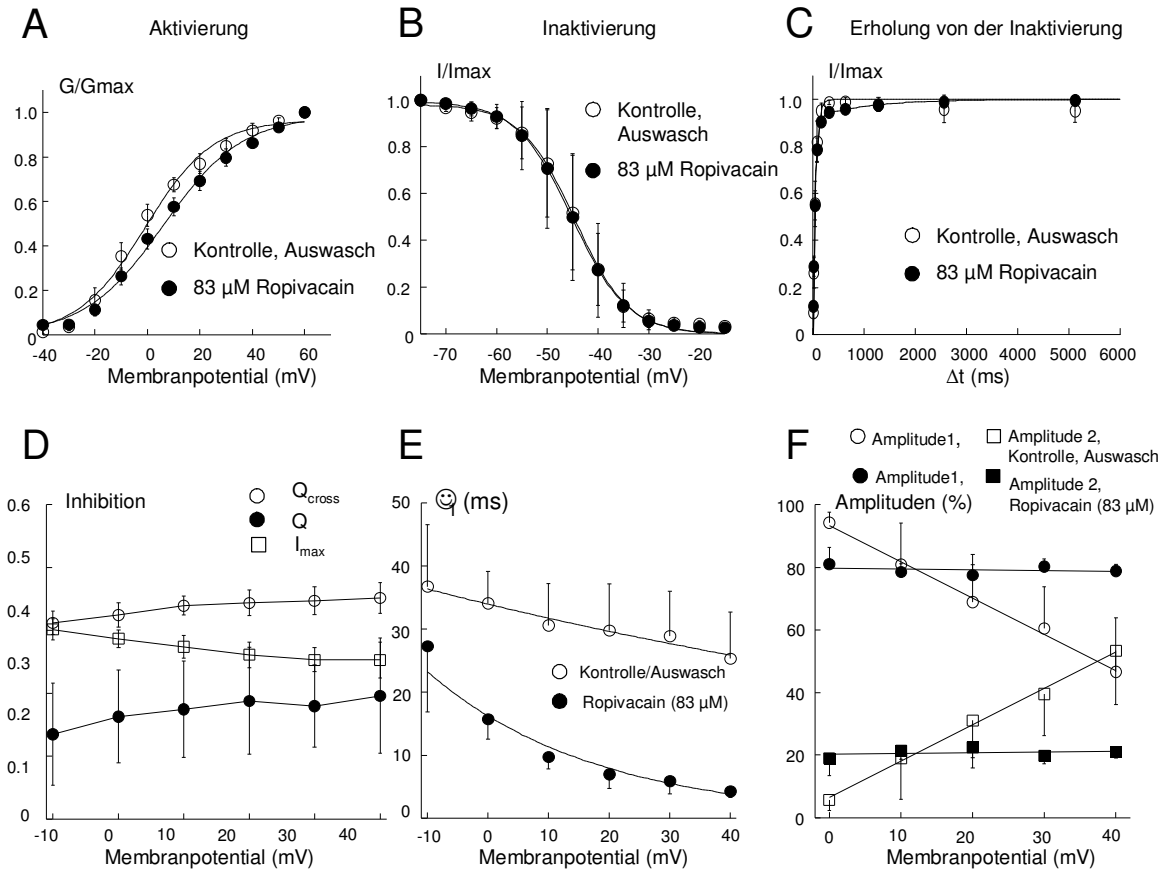

Abbildung 4.15.: A. 83 µM Ropivacain verschoben die Aktivierungskurve des Kv4.3/KChIP2.2-Komplexes zu depolarisierteren Potentialen ($p<0,05$). B. Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.3/KChIP2.2 wurde nicht beeinträchtigt. C. Die Erholung von der Inaktivierung wurde jedoch verlangsamt. D.-E.: Spannungsabhängigkeit der Ropivacaineffekte. D. Die Inhibition von I_{max}, Q und Q_{cross} war spannungsabhängig. E. Die Reduktion von τ_1 wurde mit zunehmender Spannung größer. F. Die Spannungsabhängigkeit der Amplituden wurde im Gegensatz zu 100 µM Bupivacain durch 83 µM Ropivacain aufgehoben.

Bei Applikation von 83 µM Ropivacain nahm die Inhibition von I_{max} mit zunehmender Depolarisation ab, während die Inhibition von Q zunahm (n=6, $p<0,05$) (Abbildung 4.15.D.). Die Überkreuzungsparameter Q_{cross} (Abbildung 4.15.D.) und t_{cross} nahmen beide spannungsabhängig zu. τ_1 war unter Kontroll-Auswasch-Bedingungen spannungsabhängig (n=6, $p<0,05$). Es zeigte sich eine Beschleunigung mit zunehmender Depolarisation. Diese Spannungsabhängigkeit blieb bei 83 µM Ropivacain bestehen ($p<0,05$) (Abbildung 4.15.E.). Unter Kontroll-Auswasch-Bedingungen zeigte sich eine Spannungsabhängigkeit der

Amplituden, die zu einer Überkreuzung der beiden Amplituden bei 40 mV führte (n=6, p<0,05). Diese Spannungsabhängigkeit wurde durch 83 µM Ropivacain aufgehoben (p>0,05) (Abbildung 4.15.F.).

4.1.5.4. Frequenzabhängigkeit des Ropivacaineffektes

Es wurde der Einfluss von 83 µM Bupivacain auf Kv4.3/KChIP2.2 bei 0,5 Hz, 1 Hz und 1,67 Hz auf I_{max}, Q, Q_{cross} und Q_{50ms} untersucht (Abbildungen 4.16.A.-D.). I_{max} wurde von Ropivacain (83 µM) bei 1,67 Hz signifikant stärker inhibiert als bei 0,5 Hz (p<0,05). Zwischen der Inhibition von I_{max} bei Frequenzen von 1, 67 Hz und 1 Hz, sowie 1 Hz und 0,5 Hz bestand jedoch kein signifikanter Unterschied (p>0,05) (Abbildung 4.16.A.). Die Inhibition von Q war zwischen allen Frequenzen signifikant unterschiedlich (Abbildung 4.16.B.) (p<0,05). Q_{cross} wurde von Ropivacain (83 µM) bei 1,67 Hz signifikant stärker inhibiert, als bei 0,5 Hz (p<0,05). Die Inhibition bei 1 Hz unterschied sich nicht von der bei den anderen Frequenzen (p>0,05) (Abbildung 4.16.C.). Bei der Inhibition von Q_{50ms} gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Frequenzen (p>0,05) (Abbildung 4.16.D.).

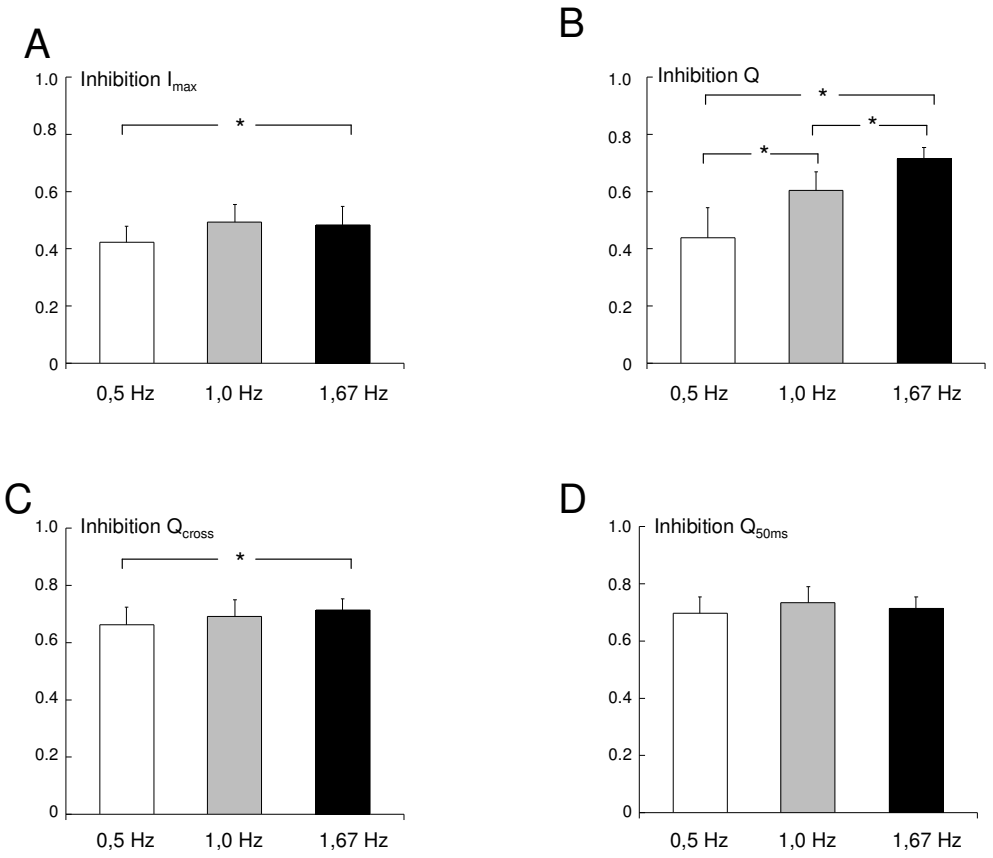

Abbildung 4.16.: Frequenzabhängigkeit der Inhibition von Kv4.3/KChIP2.2 durch 83 µM Ropivacain. A. Die Inhibition von I_{max} war frequenzabhängig. B. Die Inhibition von Q nahm mit zunehmenden Frequenzen von 0,5 Hz, 1 Hz und 1,67 Hz signifikant zu. C. Q_{cross} wurde ebenfalls frequenzabhängig inhibiert. D. Q_{50ms} wurde jedoch unabhängig von der Frequenz inhibiert. (*) gibt einen signifikanten Unterschied an.

4.1.5.5. Pharmakologie der Kv4.3-α-Untereinheit

Ropivacain (83 µM) induzierte bei Kv4.3 (Abbildung 4.17.B.) im Gegensatz zu Kv4.3/KChIP2.2 (Abbildung 4.17.A.) keine Überkreuzung der Ströme. Demnach fand auch keine Ladungsstimulation statt und während I_{max} beider Kanäle gleich stark inhibiert wurde ($p>0,05$) (Abbildung 4.17.C.), wurde Q bei Kv4.3 signifikant stärker inhibiert als bei Kv4.3/KChIP2.2 ($p<0,05$) (Abbildung 4.17.D.). Ein Vergleich der Inhibition von Q_{cross} bei Kv4.3/KChIP2.2 mit Q bei Kv4.3 ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p>0,05$; Abbildung 4.17.E.).

τ_1 wurde durch Ropivacain signifikant von 22 ± 3 ms (n=9) unter Kontrollbedingungen auf 8 ± 2 ms (n=9) beschleunigt ($p<0,05$). τ_2 wurde im Gegensatz zu Kv4.3/KChIP2.2 ebenfalls signifikant beschleunigt: von 140 ± 3 ms (n=9) unter Kontrollbedingungen auf 68 ± 18 ms (n=9) bei Ropivacain-Applikation ($p<0,05$). 83 µM Ropivacain führten zu einer Reduktion der Amplitude 1 ($p<0,05$).

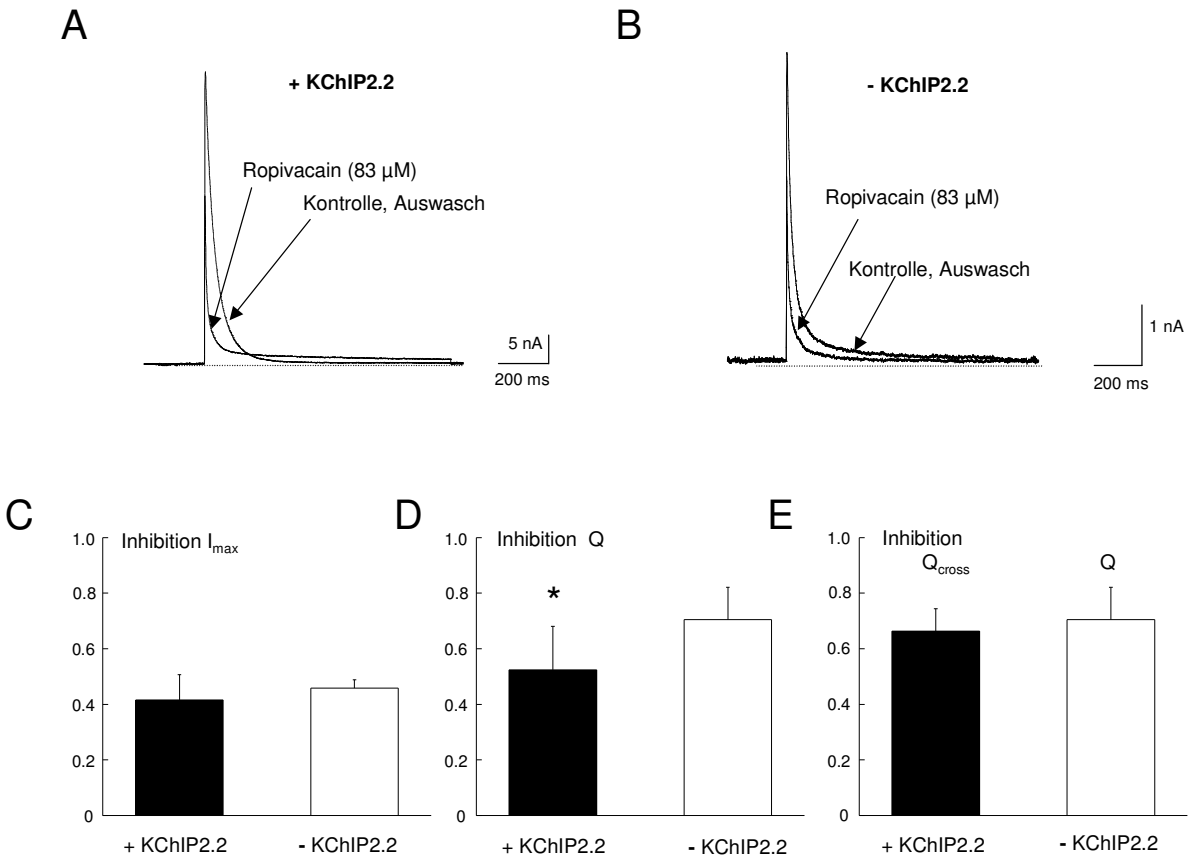

Abbildung 4.17.: A. Applikation von Ropivacain (83 µM) rief bei Kv4.3/KChIP2.2 ein Überkreuzungsphänomen hervor. B. Bei Kv4.3 ohne akzessorische Untereinheit kam es zu einer Stromreduktion ohne Überkreuzung. C. Die Inhibition von I_{max} unterschied sich nicht zwischen den beiden Kanälen. D. Dagegen war die Inhibition von Q bei Kv4.3 signifikant größer, da hier keine Stimulation von Ladung stattfand. (*) indiziert den signifikanten Unterschied. E. Vergleich der Ladungsinhibition vor der Überkreuzung Q_{cross} bei Kv4.3/KChIP2.2 mit der Inhibition von Q bei Kv4.3. Es gab keinen signifikanten Unterschied.

4.2. Rampe

Im ersten Teil der Ergebnisse wurde der Einfluss langwirksamer Amidlokalanästhetika auf den Kv4.3/KChIP2.2-Kanal-Komplex untersucht. Dabei wurden Protokolle angewendet, die die Analyse der einzelnen Schaltvorgänge, ohne dass diese einander überlagern, erlaubten. Diese Untersuchungen dienen der Aufklärung biophysikalischer Vorgänge, sie entsprechen jedoch nicht den Abläufen während des Herzaktionspotentials. Im folgenden Abschnitt soll das Verhalten verschiedener repolarisierender Kaliumkanäle des Herzens mithilfe eines Protokolls beschrieben werden, welches die elektrischen Verhältnisse während des Herzaktionspotentials simuliert. Dazu wurde das Rampenprotokoll verwendet, welches verschiedene Schaltvorgänge kombiniert hervorruft. Seine Gültigkeit für den HERG-Kanal konnte bereits gezeigt werden, hier sollte nun untersucht werden, ob es auch auf andere am Herzaktionspotential beteiligte Kanäle anwendbar ist. Zusätzlich wurde das Rampenprotokoll durch eine konsekutive Rechteckdepolarisation erweitert, die die Fähigkeit der verschiedenen Kanäle evaluieren sollte, Extrasystolen am Ende des Herzaktionspotentials entgegenzuwirken. Das Rampenprotokoll wurde auf Kv4.3/KChIP2.2 und KvLQT1/minK sowie auf HERG, HERG/MiRP1 und HERG/MiRP1$_{T8A}$ angewendet.

4.2.1. Anwendung des Rampenprotokolls unter Kontrollbedingungen

In Abbildung 4.18.A. sind Originalstromspuren dargestellt, die das Rampenprotokoll (siehe 3.6.2.6.) bei Kv4.3/KChIP2.2, KvLQT1/minK und HERG hervorrief. Die maximale Stromamplitude während der Rampe I_{Rampe} wurde bei den verschiedenen Kanälen nach unterschiedlichen Zeiträumen erreicht. Der Zeitraum bis zum Erreichen der maximalen Stromamplitude t_{peak} betrug bei Kv4.3/KChIP2.2 3,9 ± 0,4 ms (n=10) und bei KvLQT1/minK 418 ± 24 ms (n=5). HERG hatte mit 711 ± 41 ms (n=15) die größte t_{peak} (Abbildung 4.18.B.). Die Fähigkeit der verschiedenen Kanäle bzw. Kanal-Komplexe, der an die Rampe anschließenden Rechteckdepolarisation entgegenzuwirken, wurde durch das Verhältnis der maximalen Stromamplitude bei Rechteckdepolarisation $I_{Rechteck}$ zu I_{Rampe} ($I_{Rechteck}/I_{Rampe}$) ausgedrückt. Mit 0,73 ± 0,04 (n=10) war $I_{Rechteck}/I_{Rampe}$ von Kv4.3/KChIP2.2 am geringsten. Das Verhältnis war bei KvLQT1/minK (1,21 ± 0,07, n=5) und HERG (3,4 ± 0,82, n=5) dagegen größer eins (Abbildung 4.18.C.).

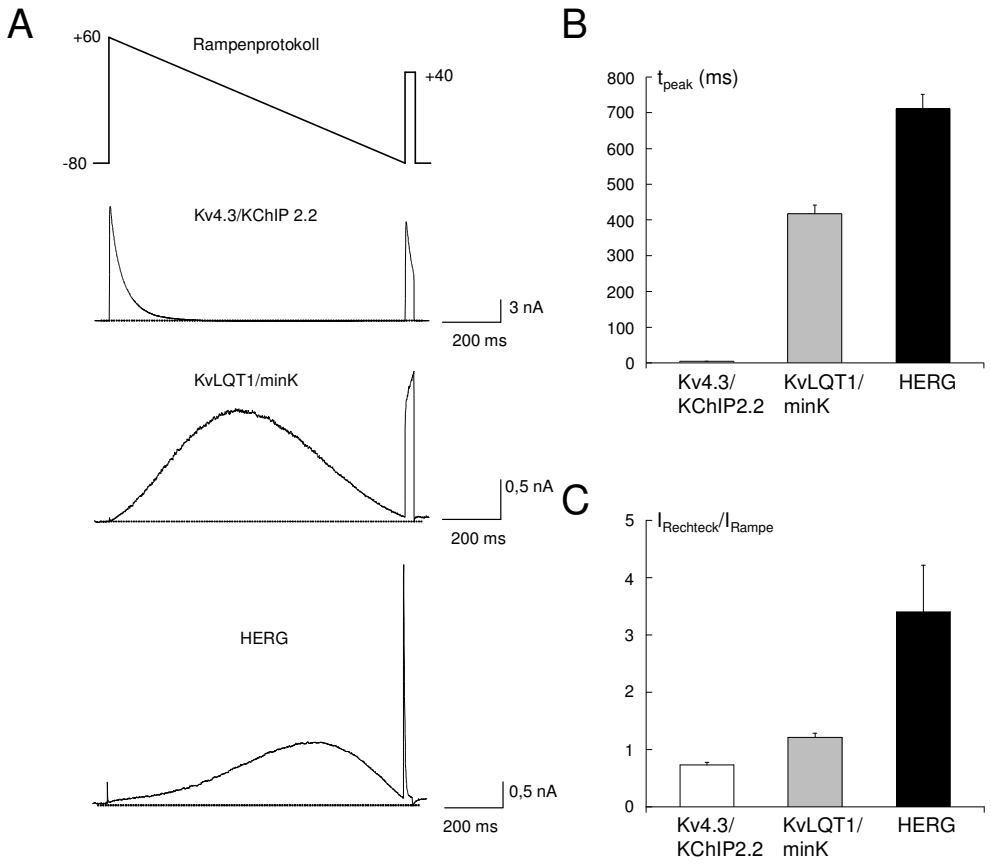

Abbildung 4.18.: A. Das Rampenprotokoll simuliert die elektrischen Verhältnisse während des Herzaktionspotentials, die anschließende Rechteckdepolarisation soll eine plötzliche Depolarisation entsprechend einer Extrasystole imitieren. Das Protokoll rief Auswärtsströme bei Kv4.3/KChIP2.2, KvLQT1/minK und bei HERG hervor. B. Die Zeit bis zum Erreichen von I_{Rampe}, t_{peak}, ist bei Kv4.3/KChIP2.2 am geringsten und bei HERG am größten. C. Das Verhältnis der maximalen Stromamplitude während der Rechteckdepolarisation $I_{Rechteck}$ zu I_{Rampe} ($I_{Rechteck}/I_{Rampe}$) ist bei Kv4.3/KChIP2.2 am kleinsten und bei HERG ebenfalls am größten.

4.2.2. Pharmakologie mit dem Rampenprotokoll bei Kv4.3/KChIP2.2

Abbildung 4.19.A. zeigt den Effekt von 30 µM Bupivacain auf den Strom, den der Kv4.3/KChIP2.2-Komplex bei Stimulation mit dem Rechteckpulsprotokoll (siehe 3.6.2.3.) generiert. Dem gegenübergestellt ist in Abbildung 4.19.B. der Effekt derselben Konzentration des Lokalanästhetikums auf einen Strom, der mit dem Rampenprotokoll (siehe 3.6.2.6.) hervorgerufen wurde. Unter Kontrollbedingungen evozierte das Rampenprotokoll bei Kv4.3/KChIP2.2 einen Auswärtsstrom mit einer maximalen Stromstärke I_{max} von 39 ± 35 nA (n=8) und einer Gesamtladung Q von 2585 ± 1744 pC (n=6). Die Inaktivierung wurde mit einer biexponentiellen Funktion (siehe 3.7.4.) beschrieben, die daraus resultierenden Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 betrugen 21 ± 8 ms für τ_1 und 115 ± 51 ms für τ_2 (n=6). Die Amplitude 1 betrug 64 ± 24 % und der Wert der Amplitude 2 war 36 ± 24 %.

30 µM Bupivacain reduzierten die maximale durch das Rechteckpulsprotokoll (siehe 3.6.2.3.) hervorgerufene Stromstärke durch Kv4.3/KChIP2.2 um 31 ± 1 % (n=5) und um 31 ± 4 % (n=4), wenn der Strom durch das Rampenprotokoll (siehe 3.6.2.6.) evoziert wurde (Abbildung 4.19.C.). Zwischen den Inhibitionen bestand kein signifikanter Unterschied (p>0,05). Auch die Inhibition des Parameters Q (Abbildung 4.19.D.) unterschied sich zwischen Rechteckpuls- und Rampenprotokoll nicht signifikant (33 ± 7 % (n=5) bei Rechteckpulsprotokoll gegenüber 44 ± 13 % (n=4) bei Rampenprotokoll (p>0,05)).

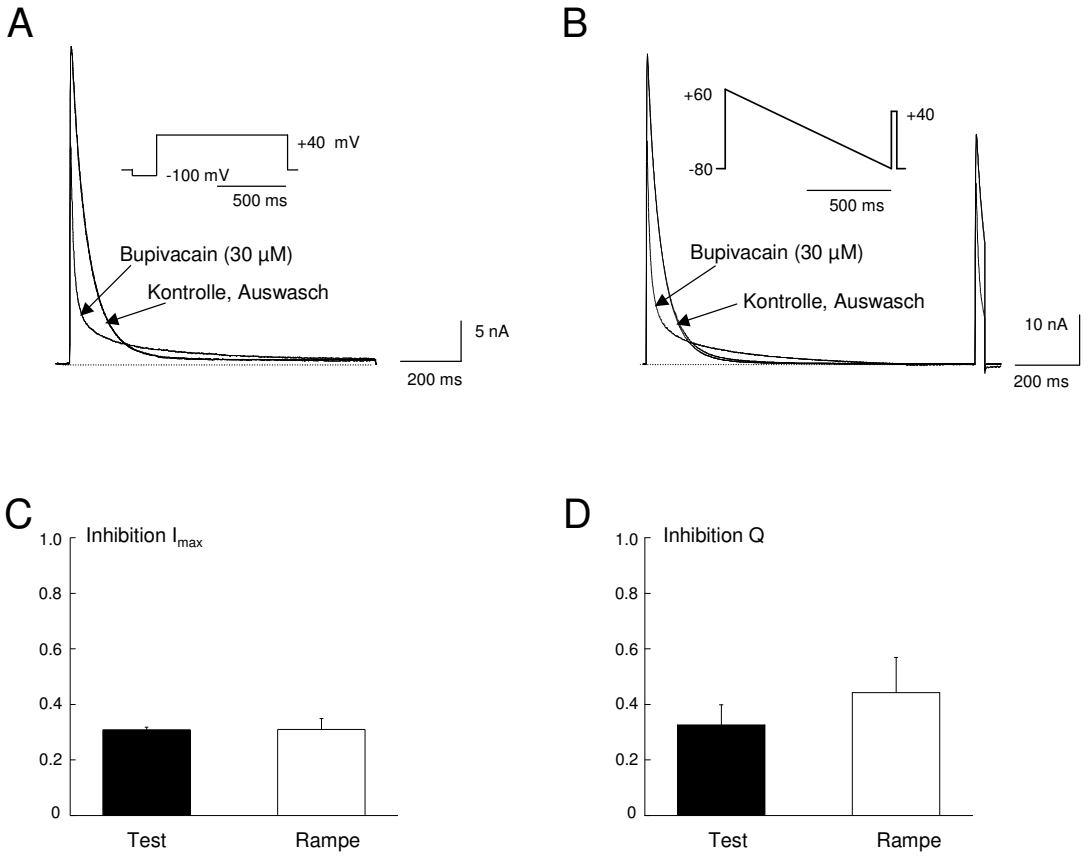

Abbildung 4.19.: A. Mit dem Rechteckpulsprotokoll hervorgerufener Kv4.3/KChIP2.2-Strom. B. Der mit dem Rampenprotokoll hervorgerufeneKv4.3/KChIP2.2-Strom. Die Ströme ähnelten sich unter Kontrollbedingungen sowie bei Bupivacain-Applikation (30 µM). C. Auch die quantitative Analyse der Inhibition der maximalen Stromamplitude, sowie, D., der Gesamtladung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Protokollen (p>0,05).

Auch 83 µM Ropivacain hatten auf den Rampenstrom den gleichen Effekt wie auf den Rechteckpulsstrom. I_{max} des durch das Rechteckpulsprotokoll hervorgerufenen Stroms wurde durch Ropivacain (83 µM) um 43 ± 3 % (n=8) reduziert, die Inhibition betrug ebenfalls 43 ± 3 % (n=8), wenn der Strom durch das Rampenprotokoll evoziert wurde. Zwischen den Inhibitionen bestand kein signifikanter Unterschied (p>0,05). Auch die Inhibition des Parameters Q unterschied sich zwischen Rechteckpuls- und Rampenprotokoll nicht

signifikant: 44 ± 8 % (n=6) bei Rechteckpuls- gegenüber 52 ± 10 % (n=8) bei Rampenprotokoll (p>0,05).

4.2.3. Pharmakologie mit dem Rampenprotokoll bei KvLQT1/minK

Der KvLQT1/minK-Komplex, der I_{Ks} generiert, wird in der Literatur als relativ unempfindlich gegenüber Cocain (Zhang *et al.*, 2001) und Bupivacain (Lipka *et al.*, 1998) beschrieben. Da die Applikation von 30 µM Bupivacain keinen messbaren Einfluss auf den KvLQT1/minK-Strom hatte, wurden weitere Experimente mit der 10-fach höheren Konzentration durchgeführt. Das Rechteckpulsprotokoll für KvLQT1/minK (siehe 3.6.2.7.) rief einen langsam aktivierenden, nicht inaktivierenden Strom hervor (Abbildung 4.20.A.), während der durch das Rampenprotokoll evozierte Strom glockenförmig war (Abbildung 4.20.B.). Die maximale Stromamplitude I_{max}, die das Rechteckpulsprotokoll evozierte, war signifikant größer als die durch das Rampenprotokoll evozierte I_{Rampe} ($p<0,05$). I_{max} der Stromantwort auf das Rechteckpulsprotokoll betrug 13 ± 6 nA (n=6), I_{Rampe} war 4 ± 2 nA (n=7, $p<0,05$). Die Ladung, die über den gesamten Zeitraum des entsprechenden Protokolls floss, Q, betrug für das Rechteckpulsprotokoll 15 ± 8 nC (n=6) und für das Rampenprotokoll 2 ± 1 nC (n=7). Auch hier bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten ($p<0,05$).

Bupivacain (300 µM), Levobupivacain (300 µM) und Ropivacain (830 µM) inhibierten sowohl die mit Rechtecksprotokoll als auch die mit dem Rampenprotokoll hervorgerufenen KvLQT1/minK-Ströme reversibel (Abbildungen 4.20.A. & B.). Die Inhibition von I_{max} des Rechteckpulses durch 300 µM Bupivacain unterschied sich mit 19 ± 8 % (n=6) nicht signifikant von der Inhibition der I_{Rampe} mit 24 ± 3 % (n=7, $p>0,05$) (Abbildung 4.20.C.). Auch Levobupivacain (300 µM) inhibierte Rechteckpulsströme mit 19 ± 9 % (n=7) nicht stärker, als Rampenströme mit 27± 8 % (n=6, $p<0,05$) (Abbildung 4.20.C.). Ropivacain (830 µM) rief bei Rechteckpulsströmen eine Inhibition der I_{max} von 24 ± 5 % (n=9) und bei Rampenströmen eine Inhibition um 22 ± 4 % (n=5, $p>0,05$) hervor (Abbildung 4.20.C.). Q des Rechteckstroms wurde um 18 ± 6 % (n=6) (300 µM Bupivacain), 20 ± 7 % (n=7) (300 µM Levobupivacain) und 21 ± 3 % (n=9) (830 µM Ropivacain) inhibiert. Die Gesamtladung des Rampenstroms wurde durch Bupivacain um 25 ± 5 % (n=7), durch Levobupivacain um 27 ± 9 % (n=7) und von Ropivacain um 23 ± 5 % (n=5) inhibiert (Abbildung 4.20.D.). Die Inhibition der Ladung war bei allen Lokalanästhetika für Rechteckpuls- und Rampenströme gleich ($p>0,05$). Aufgrund der relativen Unempfindlichkeit der KvLQT1/minK-Komplexe gegenüber den verwendeten Lokalanästhetika wurde auf eine weiterführende Analyse verzichtet.

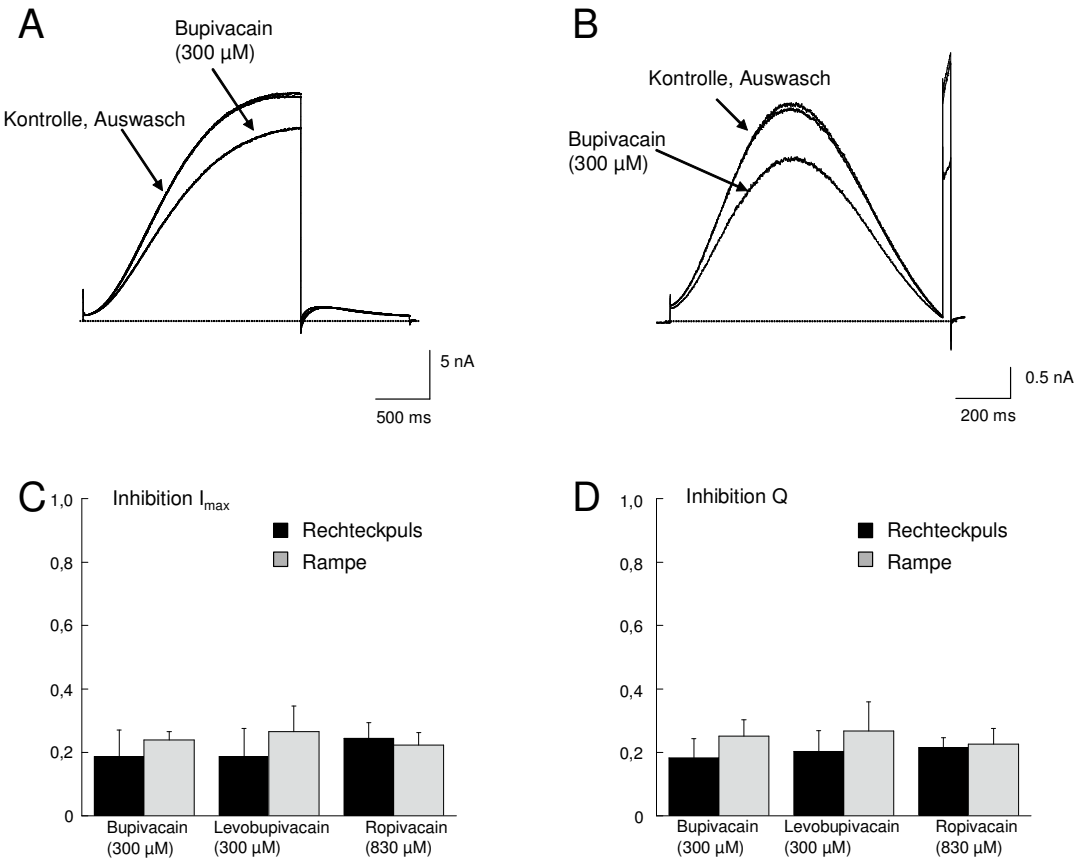

Abbildung 4.20.: A. Originalstromspuren, die mit einem Rechteckpulsprotokoll evoziert wurden. 300 µM Bupivacain reduzierten den Strom reversibel. B. Das Rampenprotokoll rief weitaus kleinere Ströme hervor (siehe Skalierung). Bupivacain (300 µM) inhibierte auch diese Ströme reversibel. C. Die Inhibition der maximalen Stromstärke und, D., der Gesamtladung Q war jedoch unabhängig vom angewendeten Protokoll die gleiche. Die Inhibition war im Vergleich mit den anderen untersuchten Kanälen bzw. Kanal-Komplexen gering.

4.2.4. HERG-Pharmakologie

Da das Rampenprotokoll für HERG bereits etabliert ist, wurde kein Vergleich zu einem reinem Aktivierungsprotokoll vorgenommen. Das Rampenprotokoll (siehe 3.6.2.6.) wurde entwickelt, um das Leitungsverhalten des HERG-Kanals während des Herzaktionspotentials zu simulieren (Hancox *et al.*, 1998). Es evozierte einen glockenförmigen Auswärtsstrom durch die Aktivierung der HERG-Kanäle (Abbildung 4.22.A.). Die maximale Stromamplitude I_{max} betrug $0{,}5 \pm 0{,}2$ nA (n=20). Sie wurde bei einem Membranpotential von etwa – 40 mV erreicht. Der maximalen Stromamplitude entsprach eine Stromdichte von 32 ± 12 pA/pF (n=20, Abbildung 4.22.B.). Die Ladung, die während des Zeitraums der Rampe über die Membran floss, Q_{Rampe} betrug 356 ± 107 pC (n=20, Abbildung 4.22.C.). Die Zeit, die verging, bis die maximale Stromamplitude erreicht wurde, t_{peak} war 711 ± 41 ms (n=15, Abbildung 4.22.D.).

Abbildung 4.21.A. zeigt den Effekt von 30 µM Bupivacain, 10 µM Levobupivacain und 25 µM Ropivacain auf HERG-Ströme, die mit dem Rampenprotokoll (siehe 3.6.2.6.) evoziert wurden. Die Lokalanästhetika inhibierten die HERG-Ströme reversibel und konzentrationsabhängig. Die konzentrationsabhängige Reduktion der Ladung Q_{Rampe}, die während der Rampendepolarisation floss, wurde mathematisch mit Hill-Funktionen (siehe 3.7.9.) beschrieben (Abbildung 4.21.B.). Die IC_{50}-Werte betrugen für Bupivacain 20 ± 2 µM (n=29), für Levobupivacain 10 ± 1 µM (n=40) und für Ropivacain 20 ± 2 µM (n=49). Die Hill-Koeffizienten (Mittelwert ± Standardfehler) waren bei allen Substanzen nahe eins (Tabelle 4.7.). Die konzentrationsabhängige Reduktion von I_{max} wurde ebenfalls mit Hill-Funktionen beschrieben. Die Werte der einzelnen Parameter waren denen der Inhibition von Q_{Rampe} sehr ähnlich.

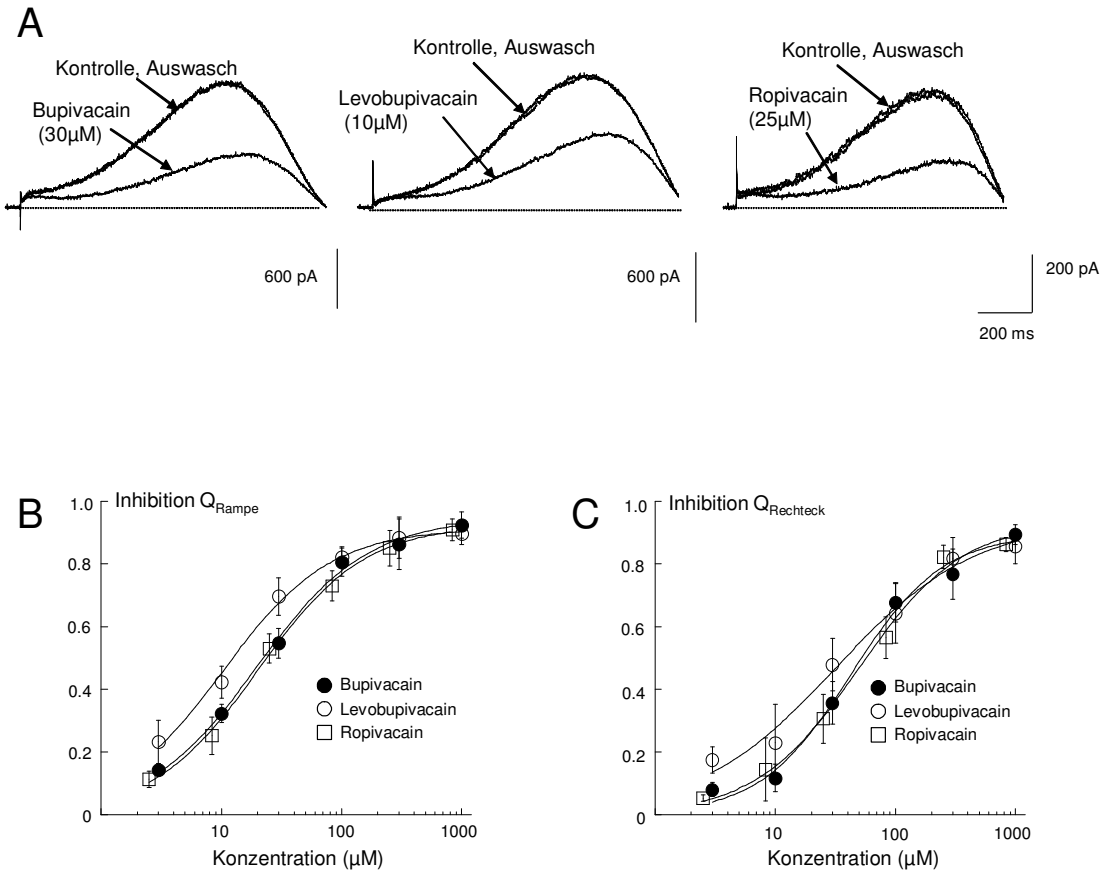

Abbildung 4.21.: A. HERG-Ströme, die mit dem Rampenprotokoll evoziert wurden. Dargestellt sind die Ströme unter Kontrollbedingungen, bei Applikation von 30 µM Bupivacain, 10 µM Levobupivacain und 25 µM Ropivacain und nach Auswasch des entsprechenden Lokalanästhetikums. B. Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Inhibition von Q_{Rampe} durch Bupivacain, Levobupivacain und Ropivacain. Die Kurven wurden mit einer Hill-Funktion beschrieben und ergaben IC_{50}-Werte zwischen 10 und 20 µM. C. Die Inhibitionen des Ladungsflusses während der Rechteckdepolarisation wurden ebenfalls in Bezug zur Konzentration aufgetragen und mit Hill-Funktionen beschrieben. Die IC_{50}-Werte für die Inhibition von $Q_{Rechteck}$ waren zwei- bis dreimal so groß wie die für die Inhibition von Q_{Rampe}.

Alle drei Lokalanästhetika veränderten die Form des HERG-Stroms, der mit dem Rampenprotokoll hervorgerufen wurde. Unter Kontrollbedingungen wurde I_{max} nach 723 ± 36 ms (n=15) erreicht. 30 µM Bupivacain verlängerten die Zeit bis zum Erreichen des maximalen Stromes, t_{peak}, signifikant auf 766 ± 33 ms (n=7, p<0,05). Bei 10 µM Levobupivacain war t_{peak} 796 ± 49 ms (n=6, p<0,05) und 25 µM Ropivacain verlängerten t_{peak} auf 803 ± 10 ms (n=6, p<0,05). Vergleicht man die maximale Stromamplitude unter Kontrollbedingungen mit der Stromamplitude, die zum gleichen Zeitpunkt bei Substanzeffekt erreicht wird, so ergibt sich eine Reduktion der Stromstärke um 60 ± 4 % (n=7) für 30 µM Bupivacain, 48 ± 6% (n=6) für 10 µM Levobupivacain und 53 ± 4 % (n=6) für 25 µM Ropivacain. Vergleicht man jedoch die maximale Stromstärke bei Substanzeffekt mit der Stromstärke, die zu diesem Zeitpunkt unter Kontrollbedingungen erreicht wird, so ist die Stromreduktion für alle drei Lokalanästhetika signifikant geringer (p<0,05): 55 ± 3 % (n=7) für 30 µM Bupivacain, 39 ± 3 % (n=6) für 10 µM Levobupivacain und 43 ± 7 % (n=6) für 25 µM Ropivacain.

	Inhibition Q_{Rampe} Bupivacain			*Inhibition Q_{Rampe} Levobupivacain*			*Inhibition Q_{Rampe} Ropivacain*		
V_{max} (%)	94	±	2	91	±	2	93	±	2
Hill	0,95	±	0,08	0,97	±	0,09	0,99	±	0,07
IC_{50} (µM)	20	±	2	10	±	1	20	±	2
n	29			40			49		

	Inhibition $Q_{Rechteck}$ Bupivacain			*Inhibition $Q_{Rechteck}$ Levobupivacain*			*Inhibition $Q_{Rechteck}$ Ropivacain*		
V_{max} (%)	90	±	5	94	±	7	93	±	5
Hill	1,14	±	0,18	0,75	±	0,14	1,01	±	0,12
IC_{50} (µM)	43	±	8	32	±	10	50	±	8
n	34			28			26		

Tabelle 4.7.: Inhibition der Rampenparameter

Auch die Inhibition der Ladung, die während des Zeitraums des Rechteckpulsprotokolls über die Membran floss, $Q_{Rechteck}$, war konzentrationsabhängig und reversibel. Die Beschreibung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit einer Hill-Funktion (Abbildung 4.21.C.) ergab IC_{50}-Werte, die zwei- bis dreimal so groß waren, wie die für die Inhibition von Q_{Rampe}. Die Hill-Koeffizienten waren wie bei Q_{Rampe} nahe eins (Tabelle 4.7.).

4.2.5. Eigenschaften von HERG, HERG/MiRP1 und HERG/ MiRP1$_{T8A}$

Die Auswärtsströme, die das Rampenprotokoll bei HERG/MiRP1 und HERG/MiRP1$_{T8A}$ evozierte, waren ebenfalls glockenförmig mit einer I_{max} von 0,7 ± 0,5 nA (n=10) beziehungsweise 0,8 ± 0,4 nA (n=10). Diesen entsprachen Stromdichten von 35 ± 11 pA/pF (n=10) für HERG/MiRP1 und 33 ±12 pA/pF (n=10) für HERG/MiRP1$_{T8A}$ (Abbildung 4.22.B.). Q_{Rampe} betrug für HERG/MiRP1 376 ± 203 pC (n=15) und 397 ± 183 pC (n=15) für HERG/MiRP1$_{T8A}$ (Abbildung 4.22.C.). T_{peak} betrug 725 ± 43 ms (n=15) für HERG/MiRP1 und 728 ± 39 ms (n=15) für HERG/MiRP1$_{T8A}$ (Abbildung 4.22.D.). Keiner dieser Parameter unterschied sich signifikant zwischen den verschiedenen Kanälen bzw. Kanal-Komplexen (p>0,05).

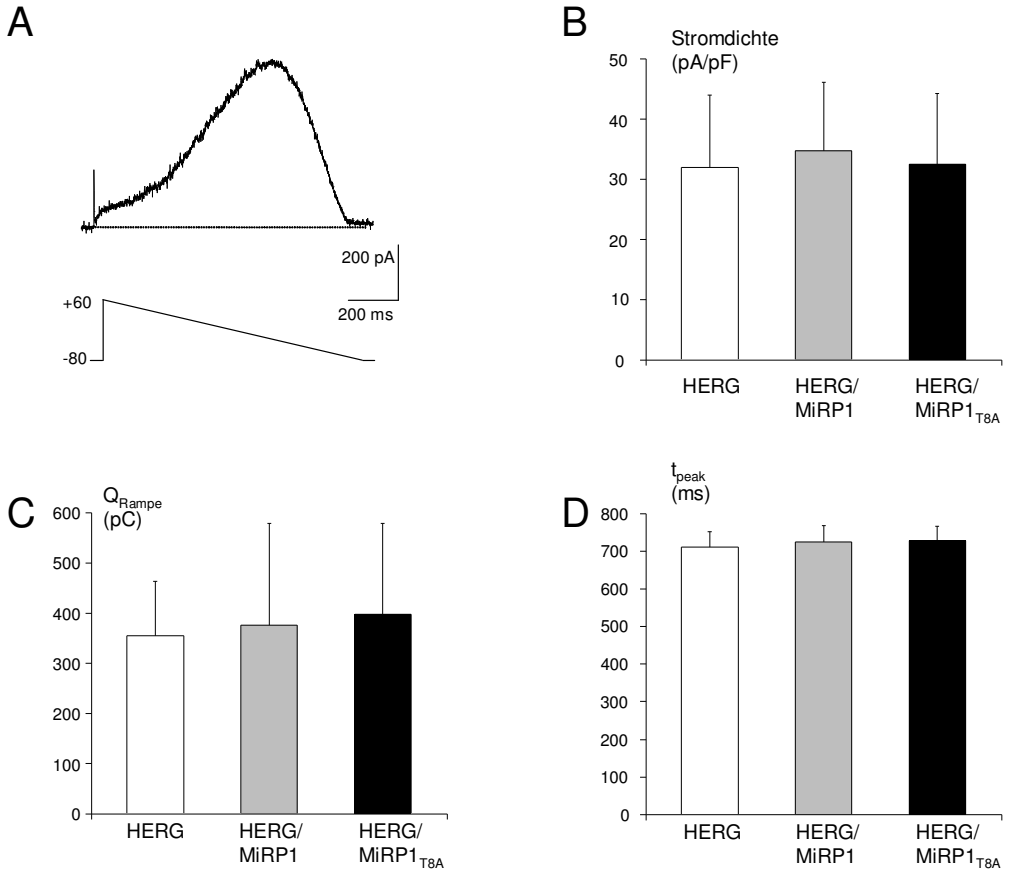

Abbildung 4.22.: A. HERG-Stromantwort auf das Rampenprotokoll unter Kontrollbedingungen. B. Die Stromdichten unterschieden sich nicht zwischen HERG, HERG/MiRP1 und HERG/MiRP1$_{T8A}$. C. Auch der Ladungsfluss während des Rampenprotokolls unterschied sich nicht zwischen HERG, HERG/MiRP1 und HERG/MiRP1$_{T8A}$. D. MiRP1 und MiRP1$_{T8A}$ veränderten die Dauer bis zum Erreichen der maximalen Stromstärke t_{peak} nicht.

Die an die Rampe anschließende Rechteckdepolarisation (siehe 3.6.2.6.) evozierte schnell inaktivierende Auswärtsströme durch HERG, HERG/MiRP1 (Abbildung 4.23.A.) und HERG/MiRP1$_{T8A}$.

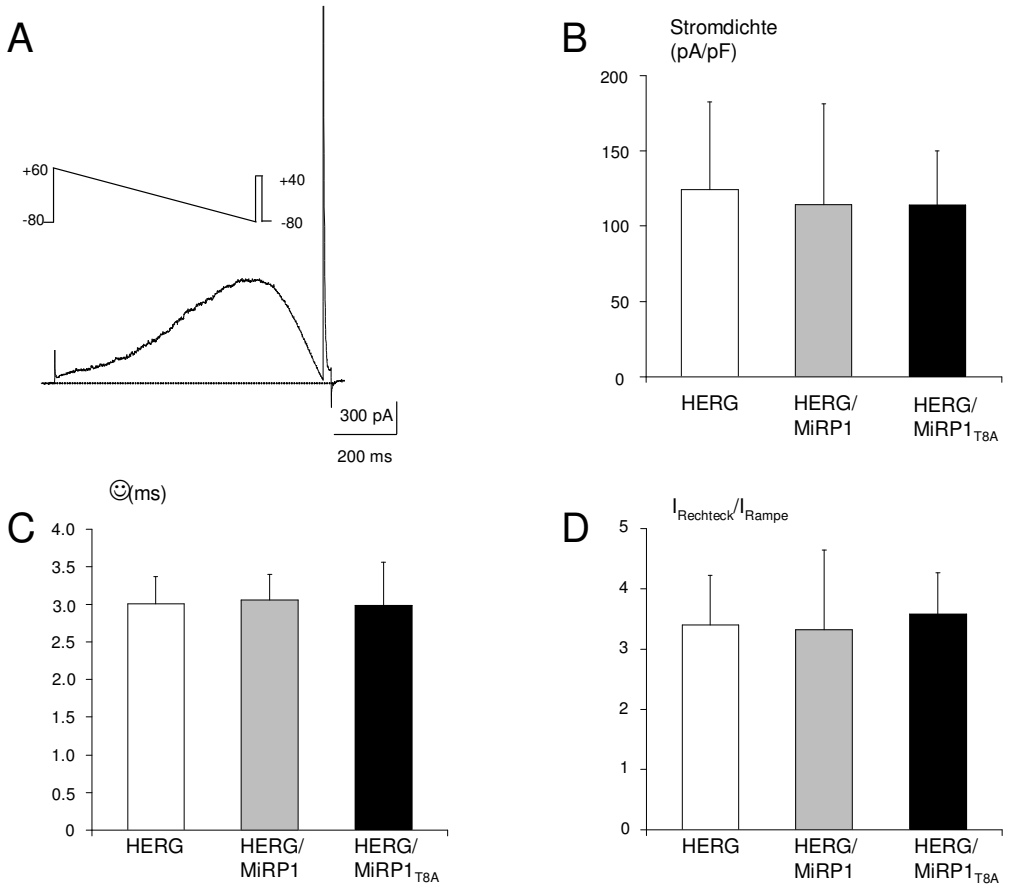

Abbildung 4.23.: A. Originalstromspur, die im *whole cell*–Modus an mit HERG und MiRP1 transifizierten CHO-Zellen aufgenommen wurde. Dem Rampenprotokoll folgte eine 30 ms lange Rechteckdepolarisation, die eine Extrasystole simulieren soll. Die Rechteckdepolarisation evozierte schnell inaktivierende Auswärtsströme. B. Die Stromdichte der schnell inaktivierenden Auswärtsströme während der Rechteckdepolarisation unterschied sich nicht zwischen HERG, HERG/MiRP1 und HERG/MiRP1$_{T8A}$. C. Die zeitabhängige Inaktivierung während der Rechteckdepolarisation wurde mit einer Zeitkonstante beschrieben. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den entsprechenden Kanal-Komplexen. D. Das Verhältnis $I_{Rechteck}/I_{Rampe}$ betrug 3,5:1 bei HERG und wurde weder durch MiRP1, noch durch MiRP1$_{T8A}$ beeinflusst.

Die Stromdichten betrugen 120 ± 46 pA/pF (n=18), 114 ± 67 pA/pF (n=9) und 114 ± 36 pA/pF (n=10) für HERG, HERG/MiRP1 und HERG/MiRP1$_{T8A}$ (Abbildung 4.23.B.). Die Stromdichten unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p>0,05$). Die schnelle Inaktivierung wurde mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben. Die Zeitkonstante τ betrug für HERG alleine 3,0 ± 0,4 ms (n=14), für HERG/MiRP1 3,1 ± 0,4 ms (n=9) und für HERG/MiRP1$_{T8A}$ 3,0 ± 0,6 ms (n=9) (Abbildung 4.23.C.). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kanal-Komplexen ($p>0,05$). Das Verhältnis von maximaler Stromamplitude während der Rechteckdepolarisation zu maximaler Stromamplitude während der vorangegangenen Rampe ($I_{Rechteck}/I_{Rampe}$) betrug 3,4 ± 0,8 (n=5), 3,3 ± 1,3 (n=6) und 3,6 ± 0,7 (n=13) für HERG, HERG/MiRP1 bzw. HERG/MiRP1$_{T8A}$ (Abbildung 4.23.D.). Auch hier unterschieden sich die verschiedenen Kanäle nicht signifikant voneinander ($p>0,05$).

4.2.6. Vergleichende Pharmakologie von HERG, HERG/MiRP1 und HERG/MiRP1$_{T8A}$

Der Einfluss von MiRP1 und von MiRP1$_{T8A}$ auf die Lokalanästhetikaempfindlichkeit wurde bei Substanzkonzentrationen nahe der IC_{50}-Werten der drei Lokalanästhetika für die Inhibition von Q_{Rampe} untersucht. Falls MiRP1 oder MiRP1$_{T8A}$ die Sensitivität von HERG-Kanälen gegenüber diesen Lokalanästhetika verändern würden, wäre ein solcher Effekt am deutlichsten bei einer Konzentration während des steilsten Teils der Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu sehen.

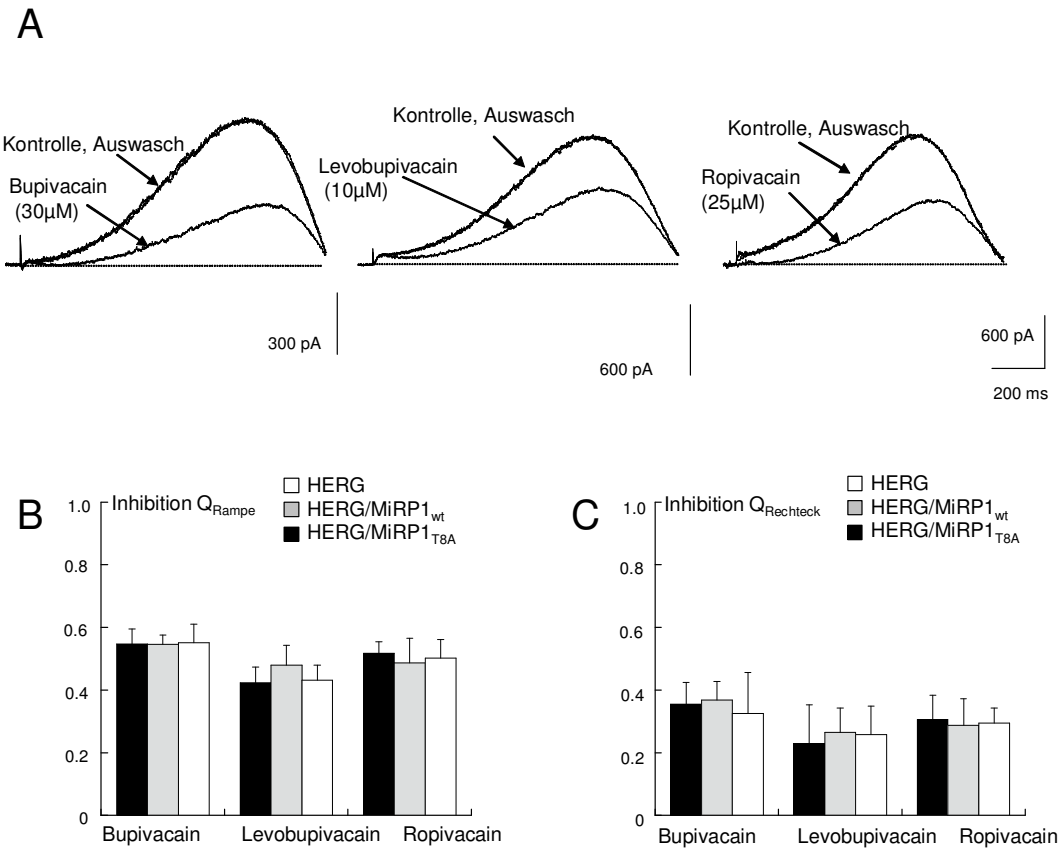

Abbildung 4.24.: A. HERG/MiRP1$_{T8A}$–Stromspuren, die durch das Rampenprotokoll evoziert wurden, unter dem Einfluss von Bupivacain (30 µM), Levobupivacain (10 µM) und Ropivacain (25 µM). B. Bei allen drei Kanälen wurde eine reversible Reduktion von Q_{Rampe} induziert. Diese unterschied sich in den genannten Konzentrationen nicht zwischen den Kanälen. C. Auch die Inhibition von $Q_{Rechteck}$ wurde durch MiRP1 bzw. MiRP1$_{T8A}$ nicht beeinflusst.

Alle drei Lokalanästhetika inhibierten HERG/MiRP1 sowie HERG/MiRP1$_{T8A}$ (Abbildung 4.24.A.) reversibel. Q_{Rampe} durch HERG/MiRP1 wurde durch 30 µM Bupivacain um 55 ± 3 % (n=10), für 10 µM Levobupivacain um 48 ± 6 % (n=7) und für 25 µM Ropivacain um 49 ± 8 % (n=12, Abbildung 4.24.B.) inhibiert. Die Inhibition von $Q_{Rechteck}$ betrug bei Applikation von 30 µM Bupivacain 37 ± 6 % (n=5), für 10 µM Levobupivacain 27 ± 8 % (n=4) und für 25 µM Ropivacain 29 ± 9 % (n=8, Abbildung 4.24.C.).

Das Ausmaß der Inhibition von Q_{Rampe} bei HERG/MiRP1 unterschied sich bei keinem der drei Lokalanästhetika signifikant von dem bei HERG alleine ($p>0,05$). Die Inhibition der von HERG/MiRP1$_{T8A}$ generierten Q_{Rampe} betrug für Bupivacain (30 µM) 55 ± 6% (n=7), für Levobupivacain (10 µM) 43 ±5% (n=14) und für Ropivacain (25 µM) 50 ± 6% (n=9). Die Inhibition von $Q_{Rechteck}$ betrug bei Applikation von 30 µM Bupivacain 33 ± 13% (n=6), für 10 µM Levobupivacain 26 ± 9% (n=13) und für 25 µM Ropivacain 29 ± 5% (n=9). Das Ausmaß der Inhibition von $Q_{Rechteck}$ bei HERG/MiRP1$_{T8A}$ unterschied sich ebenfalls bei keinem der drei Lokalanästhetika signifikant von dem bei HERG/MiRP1 ($p>0,05$).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt langwirksamer Amidlokalanästhetika auf die humanen kardialen Kaliumkanal-Komplexe Kv4.3/KChIP2.2, KvLQT1/minK und HERG/MiRP1 untersucht.

Zunächst wird der Lokalanästhetikaeffekt auf den I_{to}-generierenden Kanalkomplex aus Kv4.3 und KChIP2.2 ausführlich charakterisiert. Danach werden die Ergebnisse der Untersuchungen aller drei Kaliumkanal-Komplexe mit dem Rampenprotokoll analysiert. Es soll beurteilt werden, ob das Rampenprotokoll auch auf andere repolarisierende Kaliumkanäle des Herzens als HERG angewendet werden kann. Anhand der Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen mit dem Rampenprotokoll sollen die Auswirkungen der Lokalanästhetika auf das Herzaktionspotential analysiert werden.

5.1. Der Effekt langwirksamer Amidlokalanästhetika auf Kv4.3/KChIP2.2

In dieser Arbeit wurde der Kanalkomplex aus der α-Untereinheit Kv4.3 und der β-Untereinheit KChIP2.2 untersucht. Er generiert den Hauptanteil des transienten Kaliumauswärtsstroms I_{to} (Dixon *et al.*, 1996; Bähring *et al.*, 2001), der für die frühe Repolarisation während der Phase 1 des Herzaktionspotentials verantwortlich ist (Snyders, 1999). Dafür wurde die DNA beider Untereinheiten in einer Säugetierzelllinie heterolog koexprimiert. Elektrophysiologische Untersuchungen an diesen Zellen zeigten, dass der Kanal-Komplex einen schnell aktivierenden und schnell inaktivierenden sogenannten A-Typ (Hille, 2001) Strom vermittelte, dessen biophysikalische Eigenschaften mit den in der Literatur angegebenen Werten übereinstimmten (Bähring *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). Die Koexpression von KChIP-Untereinheiten mit Kv4 Untereinheiten erhöht deren Stromdichte (An *et al.*, 2000; Bähring *et al.*, 2001; Rosati *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002; Deschenes *et al.*, 2002; Rosati *et al.*, 2003). Des Weiteren zählen zu den KChIP-Effekten eine Verschiebung der Aktivierungskurve in hyperpolarisierende Richtung (An *et al.*, 2000; Bähring *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002), eine Verlangsamung der zeitabhängigen Inaktivierung (Bähring *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; Gebauer *et al.*, 2004) und eine Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung (Bähring *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002).

Es wurde der Einfluss des Razemats Bupivacain und seines S-Enantiomers Levobupivacain, sowie des ihnen chemisch verwandten S-Ropivacains auf Kv4.3/KChIP2.2-Kanal-Komplexe untersucht. Es handelt sich hierbei um das am häufigsten verwendetet langwirksame Lokalanästhetikum (Bupivacain) und zwei erst kürzlich entwickelte verwandte

Lokalanästhetika (Levobupivacain und Ropivacain), welche geringere kardiotoxische Nebenwirkungen haben sollen (Akerman *et al.*, 1988; Scott *et al.*, 1989; Bardsley *et al.*, 1998; Foster & Markham, 2000). Alle drei Substanzen reduzierten die Kv4.3/KChIP2.2-Ströme und beschleunigten die Abnahme der Stromamplitude in konzentrationsabhängiger und reversibler Weise. Bupivacain und Levobupivacain unterschieden sich nicht in ihrer inhibitorischen Potenz und waren, abhängig vom jeweiligen Parameter, zwei- bis viermal potenter als Ropivacain (Tabellen 4.2. und 4.5.). Da zwischen razemischem Bupivacain und dem S-Enantiomer kein Unterschied in der Inhibition der untersuchten Parameter festzustellen war, wurden weitergehende Untersuchungen zum modulatorischen Effekt der Substanzen nur mit Bupivacain und Ropivacain durchgeführt. Beide Substanzen verschoben die Kv4.3/KChIP2.2-Aktivierungskurve in depolarisierte Richtung und verlangsamten die Erholung von der Inaktivierung. Die KChIP-Effekte auf Aktivierung, Inaktivierung und auf die Erholung von der Inaktivierung, sowie auf die Stromdichte schienen somit durch die Lokalanästhetika rückgängig gemacht worden zu sein.

Die Beschleunigung des makroskopischen Stromabfalls ist ein charakteristisches Zeichen für einen Offen-Kanal-Block (Armstrong, 1969). Dieser Mechanismus wurde bereits für die Inhibition verschiedener α-Untereinheiten spannungsabhängiger Kaliumkanäle verantwortlich gemacht (Franqueza *et al.*, 1997, Franqueza *et al.*, 1999, Friederich *et al.*, 2002; Nilsson *et al.*, 2003, Gonzalez *et al.*, 2002a), unter anderem auch für die Inhibition von Kv1.5 durch die Bupivacain-Enantiomere Dextro- und Levobupivacain (Valenzuela *et al.*, 1995). Kv1.5 ist eine weitere α-Untereinheit eines kardialen Kaliumkanals. Sie assoziiert mit den β-Untereinheiten Kvβ1.3 und Kvβ2.1 und stellt das molekularbiologische Substrat des schnellen (*ultra rapid*) Kaliumstroms I_{Kur} im menschlichen Vorhofmyokard dar (Fedida *et al.*, 1993; England *et al.*, 1995; Uebele *et al.*, 1996). Aminosäuren in der Porenregion sowie dem S6-Segment von Kv1.5 scheinen bei der Interaktion mit den Bupivacain-Enantiomeren eine Rolle zu spielen (Franqueza *et al.*, 1997). In der Porenregion handelt es sich dabei um die polare Aminosäure Threonin in der Position 477 (T477) in der Tetraethylammonium-Bindungs-Domäne. Wird sie durch eine hydrophobe Aminosäure ersetzt, ist die Affinität gegenüber R- und S-Bupivacain herabgesetzt. Im S6-Segment sind die Aminosäuren Threonin 505, Lysin 508 und Valin 512 von Bedeutung. Die Inhibition von Kv1.5 durch Bupivacain ist stereoselektiv: Dextrobupivacain ist siebenfach potenter, als Levobupivacain. Mutationen von T505, L508 und V512 heben die Stereoselektivität des Kanal-Blocks auf. T477 in Kv1.5 entspricht der Aminosäure Threonin 358 in der Porenregion von Kv4.3. Das Valin 512 im Kv1.5-S6-Segment entspricht Valin 401 in Kv4.3. Dieses Valin 401 wie auch ein Valin in

der Position 399 spielen eine Rolle für die modulatorischen Effekt von KChIP-Untereinheiten auf Kv4.3-Kanäle (Wang *et al.*, 2002). Es ist daher durchaus vorstellbar, dass Bupivacain und Ropivacain ihre Effekte über eine Interaktion mit diesem Bereich im Rahmen eines Offen-Kanal-Blocks ausüben und dadurch mit dem KChIP-Effekt auf Kv4.3 interferieren. Diese Interaktionen sind in Abbildung 5.1. in einem vereinfachtem Schalt-Modell zusammengefasst.

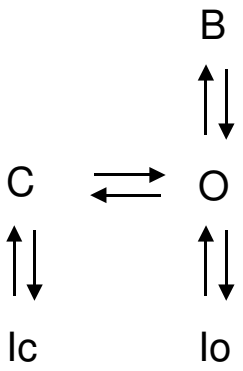

Abbildung 5.1.: Die Interaktion von KChIP2.2 und den Lokalanästhetika mit dem Kv4.3-Kanal interferieren miteinander. (C) bezeichnet einen geschlossenen Zustand, (O) den offenen Zustand. (Ic) und (Io) sind die inaktivierten Zustände, die über einen offenen bzw. geschlossenen Zustand erreicht werden. (B) ist der durch das jeweilige Lokalanästhetikum blockierte Zustand.

Kv4-Kanäle können sowohl aus einem geschlossenen Zustand (C), als auch aus einem geöffneten Zustand (O) inaktivieren. Während es bei der Inaktivierung aus dem geschlossenen Zustand (Ic) zu Konformationsänderungen an der intrazellulären Porenöffnung kommt (Jerng *et al.*, 1999; Beck *et al.*, 2002), sind bei der Inaktivierung aus dem offenen Zustand (Io) die N-Termini der α-Untereinheit beteiligt (Beck *et al.*, 2002; Gebauer *et al.*, 2004). Die Interaktion von KChIP mit den N-Termini beeinträchtigt die Inaktivierung aus dem offenen Zustand, indem sie eine Interaktion der N-Termini mit der intrazellulären Öffnung der Pore verhindert (Beck *et al.*, 2002). Daraus resultiert in den Kanal-Komplexen aus Kv4- und KChIP-Untereinheiten eine überwiegende Inaktivierung aus dem geschlossenen Zustand (Beck *et al.*, 2002). Indem die Amidlokalanästhetika mit der Porenregion interagieren, führen sie einen offen-blockierten Zustand (B) des Kanal-Komplexes ein, der einem aus dem offenen Zustand inaktivierten Zustand (Io) ähnelt (Armstrong, 1969; Zhou *et al.*, 2001). Die Überkreuzung der Stromspuren bei Substanzapplikation mit dem Strom unter Kontrollbedingungen ist ebenfalls mit einer Aufhebung des KChIP-Effekts vereinbar (Bähring *et al.*, 2001; Beck *et al.*, 2002). Weiterhin wird diese Interpretation durch die Tatsache unterstützt, dass Ropivacain die Spannungsabhängigkeit der Amplituden der Inaktivierungszeitkonstanten veränderte. In der Anwesenheit des Lokalanästhetikums sind die Amplituden der Inaktivierungszeitkonstanten im Gegensatz zu Kontrollbedingungen nicht

spannungsabhängig. Dies trifft ebenfalls für die α-Untereinheit Kv4.3 zu, wenn sie ohne KChIP2.2 exprimiert wird (Beck *et al.*, 2001).

Die inhibitorischen Effekte von Bupivacain, Levobupivacain und Ropivacain auf Kv4.3/KChIP2.2-Komplexe führen zu einer Reduktion von I_{to}. Auch die Modulation des Schaltverhaltens durch diese Substanzen lässt unter physiologischen Bedingungen eine weitere Verringerung von I_{to} erwarten. Dadurch würde die frühe Repolarisation während der Phase 1 des Herzaktionspotentials vermindert, was zu einer Verlängerung des QT-Intervalls im Elektrokardiogramm beitragen kann. Weiterhin wird angenommen, dass eine Verlängerung der initialen Repolarisation des Herzaktionspotentials durch Inhibition von I_{to} die ventrikuläre Erregungs-Kontraktions-Kopplung beeinträchtigen kann (Sah *et al.*, 2002). Eine Unterdrückung von I_{to} kann so komplexe Veränderungen der myokardialen Funktion hervorrufen. Die Amplitude von I_{to} nimmt von epi- nach endokardialen Myokardschichten ab. Diesen Unterschieden liegt eine unterschiedlich hohe KChIP-Expression in den einzelnen Muskelschichten zugrunde (Rosati *et al.*, 2001; Kuo *et al.*, 2001; Rosati *et al.*, 2003). Die unterschiedliche Lokalanästhetikaempfindlichkeit von Kv4.3-Kanälen und Kv4.3/KChIP2.2-Kanal-Komplexen impliziert, dass Myokardschichten, in denen eine geringere KChIP-Expression vorliegt, gegenüber der arrhythmischen Wirkung von Bupivacain, Levobupivacain und Ropivacain empfänglicher sind, als solche in denen eine höhere KChIP-Expression vorliegt.

Die Ergebnisse des ersten Abschnitts der Arbeit zeigen, dass es sich bei den langwirksamen Amidlokalanästhetika Bupivacain, Levobupivacain und Ropivacain um potente Inhibitoren des transienten Kaliumauswärtsstroms I_{to} am Herzen handelt. I_{to} wurde bei Konzentrationen inhibiert, die kardiotoxische Nebenwirkungen *in vivo* hervorrufen (Kotelko *et al.*, 1984; Feldman *et al.*, 1989, Chang *et al.*, 2001). Bei diesen Konzentrationen sind jedoch auch andere repolarisierende Kaliumströme betroffen (Valenzuela *et al.*, 1997; Lipka *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 2003), so dass weitere Untersuchungen notwendig sind, um die Rolle von I_{to} bei lokalanästhetikainduzierten Arrhythmien genauer zu definieren.

5.2. Das Rampenprotokoll

Das Rampenprotokoll wurde für den HERG-Kanal entworfen und simuliert die elektrischen Vorgänge während des Herzaktionspotentials (Hancox *et al.*, 1998). Dadurch können die Auswirkungen einer Kanalmodulation durch Pharmaka auf den entsprechenden repolarisierenden Strom des Herzaktionspotentials beurteilt werden. In dieser Arbeit wurden neben HERG, HERG/MiRP1 und HERG/MiRP1$_{T8A}$ auch Kv4.3/KChIP2.2 und KvLQT1/minK mit dem Rampenprotokoll untersucht und der Einfluss von Bupivacain, Levobupivacain und Ropivacain auf die Rampenströme analysiert. Das bei diesen Experimenten verwendete Rampenprotokoll wurde außerdem um eine an die Rampendepolarisation angefügte Rechteckdepolarisation erweitert (siehe 3.6.2.6.), um weitere Funktionen repolarisierender Kaliumkanäle und Effekte der Lokalanästhetika auf diese zu untersuchen.

5.2.1. Charakterisierung der Rampenströme von Kv4.3/KChIP2.2, KvLQT1/minK und HERG

Das Rampenprotokoll evozierte bei Kv4.3/KChIP2.2 einen A-Typ-Strom, während es bei KvLQT1/minK und HERG einen glockenförmigen Auswärtsstrom hervorrief. Dies beruht auf den unterschiedlichen Schaltverhalten der Kanäle. Kv4.3/KChIP2.2 aktiviert und inaktiviert schnell. KvLQT1/minK zeichnet sich durch eine langsame Aktivierung und fehlende Inaktivierung aus, der Abfall der Stromkurve ist auf den abnehmenden elektrochemischen Gradienten bei Annäherung an das Kalium-Gleichgewichtspotential zurückzuführen. Die Aktivierungsrate des HERG-Kanals ist verglichen mit seiner sehr schnellen Inaktivierung langsam. Der Inaktivierungsvorgang setzt bereits ein, wenn die Aktivierung noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Durch die Überlagerung dieser beiden Vorgänge kann bei einer Depolarisation zunächst nur ein sehr geringer Strom fließen. Bei der Repolarisation werden jedoch trotz des abnehmenden elektrochemischen Gradienten größere Ströme geleitet, weil die HERG-Kanäle sich sehr schnell von der Inaktivierung erholen, bevor sie mit einer langsameren Rate deaktivieren (Smith *et al.*, 1996). Der von HERG-Kanälen während des Rampenprotokolls erzeugte Strom wird also hauptsächlich durch Kanäle generiert, die sich bereits von der Inaktivierung erholt haben, aber noch nicht deaktiviert sind.

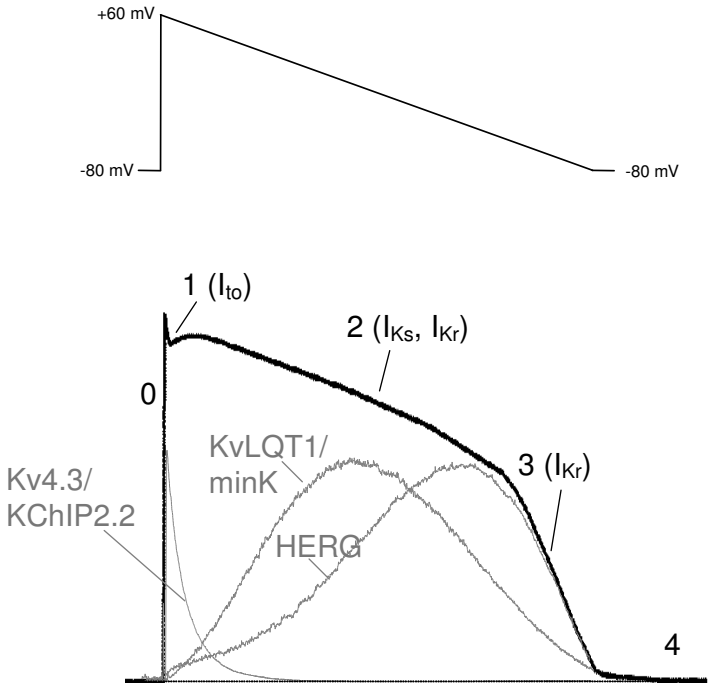

Abbildung 5.2.: Die wichtigsten repolarisierenden Kaliumströme des ventrikulären Herzaktionspotentials (schwarze Linie) treten in der frühen (I_{to}) und in der späten (I_{Ks} und I_{Kr}) Repolarisationsphase auf. Sie korrelieren mit den Strömen, die das Rampenprotokoll bei Kv4.3/KChIP2.2, KvLQT1/minK bzw. HERG hervorruft.

Die Stromantworten der Ionenkanäle auf das physiologische Rampenprotokoll wiesen einige für die korrespondierenden physiologischen Ströme charakteristische Merkmale auf: Der Zeitpunkt, an dem die maximale Stromamplitude I_{max} erreicht war, korrelierte gut mit dem Auftreten des jeweiligen Stromes während des Herzaktionspotentials (Abbildung 5.2.). Bei Kv4.3/KChIP2.2 war dieser Zeitpunkt am frühesten erreicht, was dem Auftreten von I_{to} im Herzaktionspotential während der Phase 1 entspricht. Als zweites wurde die I_{max} des durch KvLQT1/minK fließenden Stroms erreicht. Zu diesem Zeitpunkt floss aber auch bereits ein großer Teil des von HERG generierten Stroms, so dass die Beteiligung sowohl von I_{Ks} als auch von I_{Kr} an der Phase 2 des Herzaktionspotentials nachvollziehbar ist. Der von HERG generierte Strom erreicht die maximale Amplitude jedoch erst nach dem KvLQT1/minK-Strom, was dem Auftreten von I_{Kr} in der Phase 3 während des Herzaktionspotentials entspricht.

Das in dieser Arbeit angewendete Rampenprotokoll wurde durch eine auf die Rampendepolarisation folgende Rechteckdepolarisation erweitert (siehe 3.6.2.6.). Hierdurch

wurde die Fähigkeit der Kanäle untersucht, plötzlichen Depolarisationen, welche z.B. von ventrikulären Extrasystolen verursacht werden können, entgegenzuwirken. 1998 entwickelte Roden das Konzept der Repolarisationsreserve des Myokards (Roden, 1998). Es bezieht sich auf die Fähigkeit, auch unter zusätzlichen depolarisierenden Bedingungen, wie z.B. Extrasystolen, eine ausreichende Repolarisation zur rechtzeitigen Beendigung des Herzaktionspotentials zu gewährleisten. Die Rechteckdepolarisation am Ende des Rampenprotokolls soll eine solche depolarisierende Situation simulieren, für die eine unter normalen Bedingungen nicht benötigte Repolarisationsreserve von Bedeutung ist. Alle drei Kanäle reagierten auf die Rechteckdepolarisation mit einem Auswärtsstrom und scheinen somit die Fähigkeit zu besitzen, plötzlichen Depolarisationen am Ende des Herzaktionspotentials entgegenzuwirken. Das Verhältnis der maximalen Stromamplitude während der Rechteckdepolarisation zur maximalen Stromamplitude während der Rampendepolarisation ($I_{Rechteck}/I_{Rampe}$) gibt einen Hinweis auf den Anteil an der Repolarisationsreserve, welchen der jeweilige Kanal am Ende des Herzaktionspotentials hat. Je größer $I_{Rechteck}/I_{Rampe}$ ist, desto größer ist die Repolarisationsreserve des einzelnen Kanals. Die absolute Repolarisationsreserve ist abhängig von der Dichte des repolarisierenden Stroms und damit von der Expression des jeweiligen Kanals. Für Kv4.3/KChIP2.2 war das Verhältnis $I_{Rechteck}/I_{Rampe}$ kleiner eins. Am Ende der Rampe befindet sich ein Teil der Kv4.3/KChIP2.2-Kanal-Komplexe noch in der Inaktivierung, aber ein anderer Teil hat sich aufgrund der Repolarisation bereits erholt, so dass er für die erneute Aktivierung zu Verfügung steht. Für KvLQT1/minK war $I_{Rechteck}/I_{Rampe}$ nahe eins. Diese Tatsache lässt sich vor allem durch die langsame Deaktivierung und die fehlende Inaktivierung des KvLQT1/minK-Komplexes (Pusch, 1998) erklären. Bei Beginn der Rechteckdepolarisation hat nur eine geringe Deaktivierung und keine Inaktivierung stattgefunden. Der Hauptanteil der Kanäle befindet sich im offenen Zustand und kann bei erneuter Entfernung vom Kaliumgleichgewichtspotential durch die Rechteckdepolarisation instantan ähnlich viele Ionen leiten wie bei der Rampendepolarisation zum Zeitpunkt der maximalen Stromamplitude. Bei HERG war das Verhältnis $I_{Rechteck}/I_{Rampe}$ mit 3,5 größer eins. Die I_{max}, die durch die Rampendepolarisation evoziert wurde, war also weitaus geringer, als die durch die darauf folgende Rechteckdepolarisation hervorgerufene maximale Stromamplitude. Während der Rampendepolarisation wird die Aktivierung der Kanäle von inaktivierenden und deaktivierenden Vorgängen überlagert. Bei Beendigung der Rampendepolarisation ist aufgrund der schnellen Erholung von der Inaktivierung ein großer Anteil der Kanäle offen und noch nicht deaktiviert, so dass bei der Rechteckdepolarisation instantan Ionen geleitet

werden können, ohne dass eine Überlagerung durch die Inaktivierung stattfindet (Smith *et al.*, 1996). Das unterschiedliche Verhältnis $I_{Rechteck}/I_{Rampe}$ von KvLQT1/minK und HERG liegt damit vor allem in der durch den Inaktivierungsvorgang reduzierten I_{max} während der Rampe bei einer ähnlichen Fähigkeit, während der Rechteckdepolarisation instantan repolarisierende Ströme zu generieren. Daher kann man nicht nur HERG, sondern auch KvLQT1/mink trotz eines deutlich niedrigeren Verhältnisses von $I_{Rechteck}/I_{Rampe}$ eine große Bedeutung bei der Vermeidung von ventrikulären Arrhythmien nicht nur durch rechtzeitige Beendigung des Herzaktionspotentials, sondern auch durch Entgegenwirken von plötzlichen Depolarisationen beimessen.

5.2.2. Pharmakologie von Kv4.3/KChIP2.2 und KvLQT1/minK-Rampenströmen

Da sowohl der Kv4.3/KChIP2.2-Komplex, als auch KvLQT1/minK bislang nur mit Rechteckpulsprotokollen und noch nicht mit Rampenprotokollen untersucht worden waren, wurde der Lokalanästhetikaeffekt sowohl mit dem Rampenprotokoll, als auch mit Rechteckpulsprotokollen (siehe Methoden) untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Die Rampenströme von Kv4.3/KChIP2.2 wiesen hohe Ähnlichkeit mit den durch ein Rechteckpulsprotokoll (siehe Methoden) hervorgerufenen Strömen auf. Dies lässt sich durch das Schaltverhalten des Kanal-Komplexes erklären, welcher schnell aktiviert und schnell inaktiviert (siehe 4.1.). Dem Rampenprotokoll fehlt im Gegensatz zum Rechteckpulsprotokoll der hyperpolarisierende Vorpuls, so dass sich bei Beginn der Rampe ein Teil der Kanäle im inaktivierten Zustand befand, dennoch war die maximale Stromamplitude, die mit dem Rampenprotokoll hervorgerufen wurde größer, als die des Rechteckstroms. Dies lässt sich jedoch durch den stärkeren elektrochemischen Gradienten erklären, der durch eine Depolarisation auf +60 mV beim Rampenprotokoll erreicht wurde, während die Depolarisation des Rechteckspulsprotokolls nur bis +40 mV reichte. Der Zeitpunkt der maximalen Stromamplitude unterschied sich nicht zwischen Rampenströmen und Rechteckströmen und war mit dem Auftreten von I_{to} während des Herzaktionspotentials vereinbar.

Der Einfluss von Bupivacain und Ropivacain auf Kv4.3/KChIP2.2 unterschied sich nicht zwischen Rampenströmen und Rechteckströmen. Die Lokalanästhetika inhibierten Kv4.3/KChIP2.2 unabhängig vom angewendeten Pulsprotokoll in gleichem Ausmaß. Auch ein Überkreuzungsphänomen durch Bupivacain und Ropivacain wurde sowohl bei Rampenströmen als auch bei Rechteckströmen hervorgerufen.

Bei der Anwendung des Rampenprotokolls auf Kv4.3/KChIP2.2 konnten wichtige Merkmale von I_{to} reproduziert werden. Das Rampenprotokoll scheint sich neben HERG auch für die Untersuchung anderer kardialer Kaliumkanäle zu eignen. Pharmakologische Untersuchungen mit Lokalanästhetika kamen weitestgehend zu den gleichen Ergebnissen unabhängig vom angewendeten Protokoll. Das Rampenprotokoll kann aber zusätzliche Informationen, z.B. über die Repolarisationsreserve im Anschluss an das Herzaktionspotential liefern.

Die Stromantwort des KvLQT1/minK-Komplexes auf das Rampenprotokoll unterschied sich stark von der Stromantwort auf ein Rechteckpulsprotokoll (siehe Methoden), sowohl was die Stromgröße, als auch was dessen Form betrifft. Die Stromantwort auf das Rampenprotokoll sah im Gegensatz zum Rechtecksstrom glockenförmig aus. Dies liegt unter anderem an dem langsamen Aktivierungsverhalten dieses Kanal-Komplexes. Mit zunehmender Repolarisation während der abfallenden Rampe, nimmt zum einen der elektrochemische Gradient für Kaliumionen ab, zum anderen beginnt ein Teil der Kanäle zu deaktivieren. Daher ist die maximale Amplitude des Rampenstroms kleiner und wird früher erreicht als die des Rechteckstroms. Der Zeitpunkt der maximalen Amplitude des Rampenstroms entspricht eher dem physiologischen Auftreten von I_{Ks} während des Herzaktionspotentials, als beim Rechteckpulsprotokoll. Die Anwendung des Rampenprotokolls ist auch bei KvLQT1/minK möglich und gegenüber dem Rechteckpulsprotokoll zur Untersuchung des Einflusses auf das Herzaktionspotential sogar vorteilhaft.

KvLQT1/minK erwies sich unabhängig vom angewendeten Protokoll als wenig empfindlich gegenüber den untersuchten Lokalanästhetika. 300 µM Bupivacain reduzierten Rampen- und Rechtecksströme um 20 %, es bestand kein Unterschied zu Levobupivacain. 830 µM Ropivacain führten zu einer Stromreduktion von 25 %. Eine ähnliche Konstellation wird in der Literatur für Cocain beschrieben, welches HERG-Kanäle potent inhibiert, aber selbst in Konzentrationen bis 200 µM keinen messbaren Effekt auf KvLQT1/minK hatte (Zhang *et al.*, 2001). Der Kanal-Komplex, der den repolarisierenden I_{Ks} vermittelt, scheint somit keine Zielstruktur für arrhythmieauslösende Amidlokalanästhetika zu sein.

5.2.3. Pharmakologie von HERG, HERG/MiRP1 und HERG/MiRP1$_{T8A}$

Da das Rampenprotokoll für Untersuchungen mit dem HERG-Kanal entworfen wurde (Hancox *et al.*, 1998) und bereits bei pharmakologische Untersuchungen angewendet worden ist (Sesti *et al.*, 2000), wurde auf einen Vergleich mit einem Rechteckpulsprotokoll verzichtet. Der HERG-Kanal ist aufgrund seiner außergewöhnlichen Struktur Angriffspunkt für viele inhibierend wirksame Substanzen (Mitcheson *et al.*, 2000). Auch Amidlokalanästhetika haben einen inhibierenden Effekt auf den Kanal (Gonzalez *et al.*, 2002a). Die

Untersuchungen zur Lokalanästhetikasensitivität wurden jedoch nicht mit einem Rampenprotokoll durchgeführt. Der Einfluss akzessorischer β-Untereinheiten auf die Lokalanästhetikaempfindlichkeit spannungsabhängiger Kaliumkanäle wurde bereits für Kv1.5-Kanäle nachgewiesen (Gonzalez *et al.*, 2002b). Der HERG-Kanal wird durch die β-Untereinheit MiRP1 moduliert (Abbot *et al.*, 1999; Sesti *et al.*, 2000, Lu *et al.*, 2001). Ob MiRP1 einen Einfluss auf die Pharmakosensitivität des Kanals hat, ist jedoch nicht bekannt. Von einem möglichen modulatorischen Einfluss genetischer Variationen der Ionenkanaluntereinheiten auf die Lokalanästhetikaempfindlichkeit ist bisher ebenfalls nicht berichtet worden. Eine Empfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum Sulfamethoxazol wurde jedoch für den Polymorphismus $MiRP1_{T8A}$ festgestellt (Sesti *et al.*, 2000). Diese Mutation führte zu einem unter Ruhebedingungen klinisch unauffälligem Phänotyp (Abbott *et al.*, 1999), bei Gabe von therapeutischen Konzentrationen des Antibiotikums kam es jedoch zu einer Verlängerung des QT-Intervalls im Elektrokardiogramm (Sesti *et al.*, 2000). Genetische Faktoren, die nicht zu einem angeborenen LQT-Syndrom führen, scheinen jedoch für ein erworbenes LQT-Syndrom prädisponieren zu können. Sollten in der Bevölkerung häufig auftretende klinisch unauffällige Mutationen von Ionenkanaluntereinheiten die Lokalanästhetikaempfindlichkeit erhöhen, könnte die Anwendung einer genetischen Rasteruntersuchung möglicherweise helfen, schwere kardiale Nebenwirkungen bei Lokalanästhetikaintoxikation zu reduzieren. Das Konzept dieses Teils der vorliegenden Arbeit erlaubte, den Einfluss von Lokalanästhetika auf HERG, HERG/MiRP1 und HERG/$MiRP1_{T8A}$ mit Hilfe eines Protokolls zu untersuchen, das die komplexen biophysikalischen Vorgänge während des Herzaktionspotentials berücksichtigt.

Der glockenförmige Auswärtsstrom, den das Rampenprotokoll bei HERG hervorrief wurde weder in seiner Amplitude, noch in seiner Form verändert, wenn MiRP1 bzw. $MiRP1_{T8A}$ koexprimiert wurden. Abbott *et al.* klonierten 1999 zum ersten Mal das transmembrane Protein, das bei Patienten mit LQT-6 mutiert ist. Sie entdeckten, dass die Koexpression von HERG mit MiRP1 die pharmakologische Diskrepanzen, die in der Literatur zwischen HERG-Strömen und nativem I_{Kr} beschrieben werden (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990; Sanguinetti *et al.*, 1995), aufhob und postulierten für MiRP1 die Rolle einer β-Untereinheit des HERG-Kanals. Die Deaktivierungskinetik des HERG-Kanals war beschleunigt, wenn MiRP1 koexprimiert wurde (Abbott *et al.*, 1999). Es wurden zwar keine Experimente mit dem Rampenprotokoll durchgeführt. Da aber der während des Rampenprotokolls erzeugte Strom auch von der relativ langsamen Deaktivierungskinetik des HERG-Kanals beeinflusst wird, würde eine Beschleunigung dieses Prozesses wahrscheinlich nicht ohne Veränderung des

Rampenstroms bleiben. So zeigten Lu *et al.* 2003 auch eine veränderte Kinetik des Rampenstroms, wenn HERG mit MiRP1 koexprimiert wurde. Die Rolle von MiRP1 als modulierende β-Untereinheit des HERG-Kanals ist jedoch nicht unumstritten und die Beschleunigung der Deaktivierung sowie die Aufhebung der pharmakologischen Diskrepanzen konnten in einer folgenden Arbeit nicht reproduziert werden (Weerapura *et al.*, 2002). Auch in den Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte eine Modulation des Rampenstroms bei Koexpression mit MiRP1 nicht reproduziert werden. Wenn HERG mit der mutierten Untereinheit $MiRP1_{T8A}$ koexprimiert wird, änderte sich seine Kinetik gegenüber dem HERG/MiRP1-Komplex nicht (Sesti *et al.*, 2000). Diese Beobachtung konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Bupivacain, Levobupivacain und Ropivacain inhibierten HERG auf konzentrationsabhängige Weise. Die Substanzen hatten zwei Effekte auf die maximale Stromamplitude I_{max}, die HERG bei Stimulation mit dem Rampenprotokoll hervorrief: I_{max} wurde reduziert und die Zeit bis zum Erreichen von I_{max} wurde verlängert. Beide Effekte vermindern den repolarisierenden Auswärtsstrom während der Phase 3 des Herzaktionspotentials.

Gonzalez *et al.* (2002a) konnten zeigen, dass die Inhibition von HERG durch Amidlokalanästhetika spannungs- und zeitabhängig ist und postulierten eine Bindung des Substrats an den Kanal im offenen und im inaktivierten Zustand. Dies ist auch der Mechanismus, über den viele andere Substanzen den Kanal blockieren (Mitcheson *et al.*, 2000). Somit ist es vorstellbar, dass Lokalanästhetika an der gleichen Bindungsstelle, wie auch andere HERG-inhibierende Substanzen ihre Wirkung ausüben. Die Konzentrationen der halbmaximalen Inhibition von I_{max} korrelieren sehr gut mit den Werten, die Gonzalez *et al.*, (2002a) allerdings unter Verwendung eines anderen Pulsprotokolls, angeben. Bupivacain und Ropivacain unterdrückten die maximale Stromstärke mit gleicher Potenz. Das S-Enantiomer Levobupivacain war ein stärkerer Inhibitor der I_{max} als das Razemat, was mit einem stereoselektiven Block vereinbar ist. Kv1.5-Kanäle werden ebenfalls stereoselektiv inhibiert (Valenzuela *et al.*, 1995; Valenzuela *et al.*, 1997), hier ist jedoch das R-Enantiomer der potentere Inhibitor. In den Interaktionsmechanismus von Bupivacain mit Kv1.5 involvierte Aminosäuren sind Threonin 505, Lysin 508 und Valin 512 im S6-Segment des Kanals (Franqueza *et al.* 1997, siehe 5.1). Die mit dem Valin 512 korrespondierende Aminosäure ist bei HERG ein Phenylalanin in Position 656. Das Phenylalanin 656 gehört zu der entscheidenden Aminosäuresequenz Isoleuzin-Phenylalanin-Glutamat (siehe 2.3.2.2.), die nur Mitgliedern der HERG-Famile eigen ist und für die Bindung von Medikamenten verschiedenster chemischer Struktur verantwortlich gemacht wird (Mitcheson *et al.*, 2000).

Diese Aminosäuresequenz könnte auch für die umgekehrte Stereoselektivität des HERG-Kanals für Bupivacain-Enantiomere verantwortlich sein.

Bupivacain, Levobupivacain und Ropivacain beeinträchtigten ebenfalls die Fähigkeit von HERG, plötzlichen Depolarisationen mit einem schnellen Auswärtsstrom entgegenzuwirken. Auch dieser Effekt war konzentrationsabhängig und reversibel, wobei jedoch höhere Konzentrationen zur halbmaximalen Inhibition der Rechteckströme erforderlich waren. Die Fähigkeit der HERG-Kanäle, plötzlichen Depolarisationen entgegenzuwirken, scheint somit durch Lokalanästhetika weniger stark eingeschränkt zu sein, als die Repolarisation während des Herzaktionspotentials. Sowohl die Verlängerung der Herzaktionspotentialdauer, als auch die verminderte Fähigkeit, Depolarisationen am Ende des Aktionspotentials zu unterdrücken, können ventrikuläre Tachyarrhythmien, wie sie bei Lokalanästhetikaintoxikationen beobachtet werden, provozieren.

Die Konzentration, welche benötigt wurde, um HERG halbmaximal zu inhibieren, wurde verwendet, um die Lokalanästhetikaempfindlichkeit von HERG mit HERG/MiRP1 und HERG/MiRP1$_{T8A}$ zu vergleichen. Koexpression von HERG mit MiRP1 veränderte den Substanzeffekt nicht. Demzufolge scheint der Lokalanästhetikaeffekt auf HERG-Kanäle nicht mit einer Interaktion der β-Untereinheit zu interferieren. Zwischen HERG/MiRP1 und HERG/MiRP1$_{T8A}$ bestand ebenfalls kein Unterschied in der Lokalanästhetikaempfindlichkeit. Der T8A-Polymorphismus wurde bei genetischen Rasteruntersuchungen mit einer Häufigkeit von 1,6 % in der kaukasischen Bevölkerung gefunden (Abbott *et al.*, 1999). Er ruft keine klinischen Symptome (Abbott *et al.*, 1999) oder Elektrokardiogrammveränderungen hervor (Sesti *et al.*, 2000). Allerdings wurde ihm bereits eine Rolle bei der Entstehung substanzinduzierter kardialer Arrhythmien zugewiesen (Sesti *et al.*, 2000). Therapeutische Konzentrationen des Antibiotikums Sulfamethoxazol inhibierten HERG/MiRP1$_{T8A}$-Komplexe während HERG/MiRP1-Komplexe nicht beeinträchtigt wurden (Sesti *et al.*, 2000). Die Empfindlichkeit gegenüber Lokalanästhetika wurde durch den T8A-Polymorphismus jedoch nicht verändert, eine Prädisposition für lokalanästhetikainduzierte Arrhythmien scheint daher unwahrscheinlich und eine genetische Rasteruntersuchung für MiRP1$_{T8A}$ nicht erforderlich zu sein. In dieser Arbeit konnte ein Einfluss von MiRP1 oder MiRP1$_{T8A}$ weder auf HERG-Rampenströme, noch auf die Lokalanästhetikaempfindlichkeit von HERG gezeigt werden. Die Rolle von MiRP1 als akzessorische β-Untereinheit von HERG ist in der Literatur umstritten (Abbott *et al.*, 1999; Sesti *et al.*, 2000, Isbrandt *et al.*, 2002; Weerapura *et al.*, 2002, Lu *et al.*, 2003) und bleibt nach diesen Resultaten weiterhin fraglich.

Die Ergebnisse des zweiten Abschnitts der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die drei langwirksamen Amidlokalanästhetika Bupivacain, Levobupivacain und Ropivacain potente Inhibitoren der repolarisierenden Kaliumkanäle Kv4.3/KChIP2.2 und HERG des menschlichen Herzens bei Konzentrationen sind, die *in vivo* ventrikuläre Tachyarrhythmien hervorrufen. Ropivacain kann in Bezug auf die Inhibition repolarisierender Kaliumströme am Herzen nicht weniger kardiotoxisch als Bupivacain angesehen werden. Levobupivacain, das S-Enantiomer von Bupivacain, welches als nebenwirkungsärmere Alternative zum Razemat entwickelt wurde, erwies sich als der potenteste Inhibitor des wichtigen repolarisierenden HERG-Stroms.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Lokalanästhetika Bupivacain, Levobupivacain und Ropivacain auf die heterolog exprimierten kardialen Kaliumkanäle Kv4.3/KChIP2.2, KvLQT1/minK und HERG/MiRP1mit der *patch clamp*-Technik untersucht. Diese Kaliumkanäle leiten am Herzen die wichtigsten repolarisierenden Ströme I_{to}, I_{Ks} und I_{Kr}.

Zwei der drei untersuchten Kanäle, Kv4.3/KChIP2.2 und HERG, wurden von den Lokalanästhetika mit IC_{50}-Werten zwischen 10 µM und 100 µM bei klinisch relevanten Konzentrationen inhibiert, während der KvLQT1/minK-Komplex erst bei Konzentrationen 6 bis 30-fach oberhalb dieser IC_{50}-Werte inhibiert wurde. HERG erwies sich gegenüber den untersuchten Lokalanästhetika als der empfindlichste Kanal.

Die neueren Substanzen Levobupivacain und Ropivacain besaßen eine ähnliche inhibitorische Potenz gegenüber Kv4.3/KChIP2.2 und HERG wie Bupivacain. Da die Inhibition von HERG durch Lokalanästhetika stereoselektiv war, war Levobupivacain sogar ein potenterer Blocker des HERG-Kanals als Bupivacain. Der Kv4.3/KChIP2.2-Kanal-Komplex wurde von Bupivacain nicht stereoselektiv inhibiert.

Bupivacain und Ropivacain modulierten das Schaltverhalten von Kv4.3/KChIP2.2 derart, dass unter physiologischen Bedingungen eine zusätzliche Stromreduktion zu erwarten ist. Die modulierenden und inhibierenden Eigenschaften der Lokalanästhetika auf diesen Kanal-Komplex sind mit einem Offen-Kanal-Block und einer partiellen Aufhebung der KChIP-Effekte vereinbar.

Akzessorische β-Untereinheiten kardialer Kaliumkanäle können deren Lokalanästhetikasensitivität verändern. Die β-Untereinheit KChIP2.2 verminderte die Empfindlichkeit des Kv4.3-Kanals gegenüber den Lokalanästhetika. Die β-Untereinheit MiRP1 hatte jedoch keinen modulierenden Effekt auf die Sensitivität des HERG-Kanals. Auch der im Zusammenhang mit kardialen Arrhythmien bei Antibiotikagabe beschriebene Polymorphismus $MiRP1_{T8A}$ hatte keinen Einfluss auf die Lokalanästhetikasensitivität von HERG.

Mit dem Rampenprotokoll konnten wichtige Merkmale der repolarisierenden Ströme I_{to}, I_{Ks} und I_{Kr} reproduziert werden. Die Inhibition von Rampenströmen bei Kv4.3/KChIP2.2 und HERG weist auf eine mögliche Reduktion von I_{to} und I_{Kr} in der frühen bzw. in der späten Phase des Herzaktionspotentials hin. Eine solche Reduktion kann *in vivo* zu einer Verlängerung des QT-Intervalls im Elektrokardiogramm und zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber der Entstehung von ventrikulären Tachyarrhythmien führen.

7. Literaturverzeichnis

Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT & Goldstein SA (1999) MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. Cell 97(2): 175-87

Akerman B, Hellberg IB & Trossvik C (1988) Primary evaluation of the local anaesthetic properties of the amino amide agent ropivacaine (LEA 103). Acta Anaesthesiol Scand 32(7): 571-8

Albright GA (1979) Cardiac arrest following regional anesthesia with etidocaine or bupivacaine. Anesthesiology 51(4): 285-7

An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS & Rhodes KJ (2000) Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. Nature 403(6769): 553-6

Armstrong CM (1969) Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion injection in squid axons. J Gen Physiol 54(5): 553-75

Bähring R, Dannenberg J, Peters HC, Leicher T, Pongs O & Isbrandt D (2001) Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. J Biol Chem 276(26): 23888-94

Bardsley H, Gristwood R, Baker H, Watson N & Nimmo W (1998) A comparison of the cardiovascular effects of levobupivacaine and rac-bupivacaine following intravenous administration to healthy volunteers. Br J Clin Pharmacol 46(3): 245-9

Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M & Romey G (1996) K(V)LQT1 and lsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. Nature 384(6604): 78-80

Beck EJ, Bowlby M, An WF, Rhodes KJ & Covarrubias M (2002) Remodelling inactivation gating of Kv4 channels by KChIP1, a small-molecular-weight calcium-binding protein. J Physiol 538(Pt 3): 691-706

Bennett PB, Yazawa K, Makita N & George AL, Jr. (1995) Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. Nature 376(6542): 683-5

Bromage PR (1962) Spread of analgesic solutions in the epidural space and their site of action: a statistical study. Br J Anaesth 34: 161-78

Caballero R, Moreno I, Gonzalez T, Valenzuela C, Tamargo J & Delpon E (2002) Putative binding sites for benzocaine on a human cardiac cloned channel (Kv1.5). Cardiovasc Res 56(1): 104-17

Capuano V, Ruchon Y, Antoine S, Sant MC & Renaud JF (2002) Ventricular hypertrophy induced by mineralocorticoid treatment or aortic stenosis differentially regulates the expression of cardiac K+ channels in the rat. Mol Cell Biochem 237(1-2): 1-10

Chang DH, Ladd LA, Copeland S, Iglesias MA, Plummer JL & Mather LE (2001) Direct cardiac effects of intracoronary bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine in the sheep. Br J Pharmacol 132(3): 649-58

Clarkson CW & Hondeghem LM (1985) Mechanism for bupivacaine depression of cardiac conduction: fast block of sodium channels during the action potential with slow recovery from block during diastole. Anesthesiology 62(4): 396-405

Cole KS (1979) Mostly membranes. Annu Rev Physiol 41: 1-24

Crumb W, Cavero I (1999) QT interval prolongation by non-cardiovascular drugs: issues and solutions for novel drug development. Pharm Sci Technol Today 2(7): 270-280

Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED & Keating MT (1995) A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. Cell 80(5): 795-803

del Camino D, Holmgren M, Liu Y & Yellen G (2000) Blocker protection in the pore of a voltage-gated K+ channel and its structural implications. Nature 403(6767): 321-5

Delpon E, Caballero R, Valenzuela C, Longobardo M, Snyders D & Tamargo J (1999) Benzocaine enhances and inhibits the K+ current through a human cardiac cloned channel (Kv1.5). Cardiovasc Res 42(2): 510-20

Deschenes I, DiSilvestre D, Juang GJ, Wu RC, An WF & Tomaselli GF (2002) Regulation of Kv4.3 current by KChIP2 splice variants: a component of native cardiac I(to)? Circulation 106(4): 423-9

Dessertenne F, Fabiato A & Coumel P (1966) [A new chapter in electrocardiography: progressive variations in the amplitude of the electrocardiogram]. Actual Cardiol Angeiol Int (Paris) 15(4): 241-58

Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS & McKinnon D (1996) Role of the Kv4.3 K+ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. Circ Res 79(4): 659-68

Dumaine R, Wang Q, Keating MT, Hartmann HA, Schwartz PJ, Brown AM & Kirsch GE (1996) Multiple mechanisms of Na+ channel--linked long-QT syndrome. Circ Res 78(5): 916-24

England SK, Uebele VN, Shear H, Kodali J, Bennett PB & Tamkun MM (1995) Characterization of a voltage-gated K+ channel beta subunit expressed in human heart. Proc Natl Acad Sci U S A 92(14): 6309-13

Fedida D, Wible B, Wang Z, Fermini B, Faust F, Nattel S & Brown AM (1993) Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K+ channel current. Circ Res 73(1): 210-6

Feldman HS, Arthur GR & Covino BG (1989) Comparative systemic toxicity of convulsant and supraconvulsant doses of intravenous ropivacaine, bupivacaine, and lidocaine in the conscious dog. Anesth Analg 69(6): 794-801

Foster RH & Markham A (2000) Levobupivacaine: a review of its pharmacology and use as a

local anaesthetic. Drugs 59(3): 551-79

Franqueza L, Longobardo M, Vicente J, Delpon E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ & Valenzuela C (1997) Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. Circ Res 81(6): 1053-64

Franqueza L, Valenzuela C, Eck J, Tamkun MM, Tamargo J & Snyders DJ (1999) Functional expression of an inactivating potassium channel (Kv4.3) in a mammalian cell line. Cardiovasc Res 41(1): 212-9

Friederich P, Benzenberg D & Urban BW (2002) Bupivacaine inhibits human neuronal Kv3 channels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Br J Anaesth 88(6): 864-6

Gebauer M, Isbrandt D, Sauter K, Callsen B, Nolting A, Pongs O & Bahring R (2004) N-type inactivation features of Kv4.2 channel gating. Biophys J 86(1 Pt 1): 210-23

Gellens ME, George AL, Jr., Chen LQ, Chahine M, Horn R, Barchi RL & Kallen RG (1992) Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. Proc Natl Acad Sci U S A 89(2): 554-8

Gonzalez T, Arias C, Caballero R, Moreno I, Delpon E, Tamargo J & Valenzuela C (2002a) Effects of levobupivacaine, ropivacaine and bupivacaine on HERG channels: stereoselective bupivacaine block. Br J Pharmacol 137(8): 1269-79

Gonzalez T, Navarro-Polanco R, Arias C, Caballero R, Moreno I, Delpon E, Tamargo J, Tamkun MM & Valenzuela C (2002b) Assembly with the Kvbeta1.3 subunit modulates drug block of hKv1.5 channels. Mol Pharmacol 62(6): 1456-63

Gonzalez T, Longobardo M, Caballero R, Delpon E, Tamargo J & Valenzuela C (2001) Effects of bupivacaine and a novel local anesthetic, IQB-9302, on human cardiac K+ channels. J Pharmacol Exp Ther 296(2): 573-83

Guo W, Li H, Aimond F, Johns DC, Rhodes KJ, Trimmer JS & Nerbonne JM (2002) Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K+ currents. Circ Res

90(5): 586-93

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B & Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch 391(2): 85-100

Hancox JC, Levi AJ & Witchel HJ (1998) Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native "rapid" delayed rectifier K current during the cardiac ventricular action potential. Pflugers Arch 436(6): 843-53

Hawkins JL, Gibbs CP, Orleans M, Martin-Salvaj G & Beaty B (1997a) Obstetric anesthesia work force survey, 1981 versus 1992. Anesthesiology 87(1): 135-43

Hawkins JL, Koonin LM, Palmer SK & Gibbs CP (1997b) Anesthesia-related deaths during obstetric delivery in the United States, 1979-1990. Anesthesiology 86(2): 277-84

Heginbotham L, Lu Z, Abramson T & MacKinnon R (1994) Mutations in the K+ channel signature sequence. Biophys J 66(4): 1061-7

Hille B (2001) Ion Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates Inc., Sunderland, 3rd edition: 95-129

Isbrandt D, Friederich P, Solth A, Haverkamp W, Ebneth A, Borggrefe M, Funke H, Sauter K, Breithardt G, Pongs O & Schulze-Bahr E (2002) Identification and functional characterization of a novel KCNE2 (MiRP1) mutation that alters HERG channel kinetics. J Mol Med 80(8): 524-32

Jerng HH, Shahidullah M & Covarrubias M (1999) Inactivation gating of Kv4 potassium channels: molecular interactions involving the inner vestibule of the pore. J Gen Physiol 113(5): 641-60

Kääb S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D & Tomaselli GF (1998) Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a

reduction in current density. Circulation 98(14): 1383-93

Kaprielian R, Wickenden AD, Kassiri Z, Parker TG, Liu PP & Backx PH (1999) Relationship between K+ channel down-regulation and [Ca2+]i in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. J Physiol 517 (Pt 1): 229-45

Kass RS & Moss AJ (2003) Long QT syndrome: novel insights into the mechanisms of cardiac arrhythmias. J Clin Invest 112(6): 810-5

Kasten GW (1986) Amide local anesthetic alterations of effective refractory period temporal dispersion: relationship to ventricular arrhythmias. Anesthesiology 65(1): 61-6

Keating MT & Sanguinetti MC (2001) Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. Cell 104(4): 569-80

Kotelko DM, Shnider SM, Dailey PA, Brizgys RV, Levinson G, Shapiro WA, Koike M & Rosen MA (1984) Bupivacaine-induced cardiac arrhythmias in sheep. Anesthesiology 60(1): 10-8

Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN & Jan LY (1993) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. Nature 362(6416): 127-33

Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, Nguyen-Tran VT, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR & Chien KR (2001) A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I(to) and confers susceptibility to ventricular tachycardia. Cell 107(6): 801-13

Lees-Miller JP, Duan Y, Teng GQ, Thorstad K & Duff HJ (2000) Novel gain-of-function mechanism in K(+) channel-related long-QT syndrome: altered gating and selectivity in the HERG1 N629D mutant. Circ Res 86(5): 507-13

Lesage F, Attali B, Lakey J, Honore E, Romey G, Faurobert E, Lazdunski M, Barhanin J (1993) Are Xenopus oocytes unique in displaying functional IsK channel heterologous expression? Receptors Channels 1(2): 143-52

Lipka LJ, Jiang M & Tseng GN (1998) Differential effects of bupivacaine on cardiac K channels: role of channel inactivation and subunit composition in drug-channel interaction. J Cardiovasc Electrophysiol 9(7): 727-42

Long WB, Rosenblum S & Grady IP (1989) Successful resuscitation of bupivacaine-induced cardiac arrest using cardiopulmonary bypass. Anesth Analg 69(3): 403-6

Longobardo M, Delpon E, Caballero R, Tamargo J & Valenzuela C (1998) Structural determinants of potency and stereoselective block of hKv1.5 channels induced by local anesthetics. Mol Pharmacol 54(1): 162-9

Longobardo M, Gonzalez T, Caballero R, Delpon E, Tamargo J & Valenzuela C (2001) Bupivacaine effects on hKv1.5 channels are dependent on extracellular pH. Br J Pharmacol 134(2): 359-69

Lu Y, Mahaut-Smith MP, Huang CL & Vandenberg JI (2003) Mutant MiRP1 subunits modulate HERG K+ channel gating: a mechanism for pro-arrhythmia in long QT syndrome type 6. J Physiol 551(Pt 1): 253-62

Lu Y, Mahaut-Smith MP, Varghese A, Huang CL, Kemp PR & Vandenberg JI (2001) Effects of premature stimulation on HERG K(+) channels. J Physiol 537(Pt 3): 843-51

Lynch JJ, Jr., Wallace AA, Stupienski RF, 3rd, Baskin EP, Beare CM, Appleby SD, Salata JJ, Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC, Stein RB & *et al.* (1994) Cardiac electrophysiologic and antiarrhythmic actions of two long-acting spirobenzopyran piperidine class III agents, L-702,958 and L-706,000 [MK-499]. J Pharmacol Exp Ther 269(2): 541-54

MacKinnon R (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. Nature 350(6315): 232-5

MacKinnon R (2003) Potassium channels. FEBS Lett 555(1): 62-5

Mallampati SR, Liu PL & Knapp RM (1984) Convulsions and ventricular tachycardia from

bupivacaine with epinephrine: successful resuscitation. Anesth Analg 63(9): 856-9

Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C & Sanguinetti MC (2000) A structural basis for drug-induced long QT syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 97(22): 12329-33

Mitcheson JS, Chen J & Sanguinetti MC (2000) Trapping of a methanesulfonanilide by closure of the HERG potassium channel activation gate. J Gen Physiol 115(3): 229-40

Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogne K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H & Bennett V (2003) Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. Nature 421(6923): 634-9

Morishima HO, Finster M, Arthur GR & Covino BG (1990) Pregnancy does not alter lidocaine toxicity. Am J Obstet Gynecol 162(5): 1320-4

Morishima HO, Pedersen H, Finster M, Hiraoka H, Tsuji A, Feldman HS, Arthur GR & Covino BG (1985) Bupivacaine toxicity in pregnant and nonpregnant ewes. Anesthesiology 63(2): 134-9

Näbauer M, Beuckelmann DJ, Uberfuhr P & Steinbeck G (1996) Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. Circulation 93(1): 168-77

Nau C, Wang SY, Strichartz GR & Wang GK (2000) Block of human heart hH1 sodium channels by the enantiomers of bupivacaine. Anesthesiology 93(4): 1022-33

Neher E & Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature 260(5554): 799-802

Nerbonne JM (2000) Molecular basis of functional voltage-gated K+ channel diversity in the mammalian myocardium. J Physiol 525 Pt 2: 285-98

Nilsson J, Madeja M & Arhem P (2003) Local anesthetic block of Kv channels: role of the S6 helix and the S5-S6 linker for bupivacaine action. Mol Pharmacol 63(6): 1417-29

Numberger M & Draguhn A (1996) Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg. Berlin. Oxford.

O'Leary ME (2001) Inhibition of human ether-a-go-go potassium channels by cocaine. Mol Pharmacol 59(2): 269-77

Pusch M (1998) Increase of the single-channel conductance of KvLQT1 potassium channels induced by the association with minK. Pflugers Arch 437(1): 172-4

Reiz S & Nath S (1986) Cardiotoxicity of local anaesthetic agents. Br J Anaesth 58(7): 736-46

Roden DM (1998) Taking the "idio" out of "idiosyncratic": predicting torsades de pointes. Pacing Clin Electrophysiol 21(5): 1029-34

Roden DM, Lazzara R, Rosen M, Schwartz PJ, Towbin J, Vincent GM (1996) Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS. Circulation 94(8):1996-2012

Rosati B, Grau F, Rodriguez S, Li H, Nerbonne JM & McKinnon D (2003) Concordant expression of KChIP2 mRNA, protein and transient outward current throughout the canine ventricle. J Physiol 548(Pt 3): 815-22

Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE & McKinnon D (2001) Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. J Physiol 533(Pt 1): 119-25

Sah R, Ramirez RJ & Backx PH (2002) Modulation of Ca(2+) release in cardiac myocytes by changes in repolarization rate: role of phase-1 action potential repolarization in excitation-contraction coupling. Circ Res 90(2): 165-73

Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME & Keating MT (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. Cell

81(2): 299-307

Sanguinetti MC & Jurkiewicz NK (1990) Two components of cardiac delayed rectifier K+ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. J Gen Physiol 96(1): 195-215

Santos AC, Arthur GR, Wlody D, De Armas P, Morishima HO & Finster M (1995) Comparative systemic toxicity of ropivacaine and bupivacaine in nonpregnant and pregnant ewes. Anesthesiology 82(3): 734-40

Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y, Rubie C, Hordt M, Towbin JA, Borggrefe M, Assmann G, Qu X, Somberg JC, Breithardt G, Oberti C & Funke H (1997) KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. Nat Genet 17(3): 267-8

Scott DB, Lee A, Fagan D, Bowler GM, Bloomfield P & Lundh R (1989) Acute toxicity of ropivacaine compared with that of bupivacaine. Anesth Analg 69(5): 563-9

Sesti F, Abbott GW, Wei J, Murray KT, Saksena S, Schwartz PJ, Priori SG, Roden DM, George AL, Jr. & Goldstein SA (2000) A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. Proc Natl Acad Sci U S A 97(19): 10613-8

Smith PL, Baukrowitz T & Yellen G (1996) The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. Nature 379(6568): 833-6

Snyders DJ (1999) Structure and function of cardiac potassium channels. Cardiovasc Res 42(2): 377-90

Song CS, Merkatz IR, Rifkind AB, Gillette PN, Kappas A (1970) The influence of pregnancy and oral contraceptive steroids on the concentration of plasma proteins. Studies with a quantitative immunodiffusion method. Am J Obstet Gynecol 108(2): 227-31

Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC & Keating MT (1997) Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. Nat Genet

17(3): 338-40

Stamer UM, Messerschmidt A & Wulf H (1998) Anaesthesia for caesarean section--a German survey. Acta Anaesthesiol Scand 42(6): 678-84

Strichartz GR & Berde CB (1994) Local Anesthetics. In: Miller RD (ed) Anesthesia, Churchill Livingstone, New York 4th edition: 489-521

Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S (1988) Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. Science 242(4881): 1042-5

Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A, Bendahhou S, Kwiecinski H, Fidzianska A, Plaster N, Fu YH, Ptacek LJ & Tawil R (2002) Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). J Clin Invest 110(3): 381-8

Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B & Robertson GA (1995) HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. Science 269(5220): 92-5

Tsen LC, Tarshis J, Denson DD, Osathanondh R, Datta S & Bader AM (1999) Measurements of maternal protein binding of bupivacaine throughout pregnancy. Anesth Analg 89(4): 965-8

Tyson J, Tranebjaerg L, Bellman S, Wren C, Taylor JF, Bathen J, Aslaksen B, Sorland SJ, Lund O, Malcolm S, Pembrey M, Bhattacharya S & Bitner-Glindzicz M (1997) IsK and KvLQT1: mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. Hum Mol Genet 6(12): 2179-85

Uebele VN, England SK, Chaudhary A, Tamkun MM & Snyders DJ (1996) Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kv beta 2.1 subunits. J Biol Chem 271(5): 2406-12

Valenzuela C, Delpon E, Franqueza L, Gay P, Snyders DJ & Tamargo J (1997) Effects of ropivacaine on a potassium channel (hKv1.5) cloned from human ventricle. Anesthesiology

86(3): 718-28

Valenzuela C, Delpon E, Tamkun MM, Tamargo J & Snyders DJ (1995) Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. Biophys J 69(2): 418-27

Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD & Keating MT (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. Nat Genet 12(1): 17-23

Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA & Keating MT (1995) SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. Cell 80(5): 805-11

Wang S, Patel SP, Qu Y, Hua P, Strauss HC & Morales MJ (2002) Kinetic properties of Kv4.3 and their modulation by KChIP2b. Biochem Biophys Res Commun 295(2): 223-9

Wang Z, Tristani-Firouzi M, Xu Q, Lin M, Keating MT & Sanguinetti MC (1999) Functional effects of mutations in KvLQT1 that cause long QT syndrome. J Cardiovasc Electrophysiol 10(6): 817-26

Weerapura M, Nattel S, Chartier D, Caballero R & Hebert TE (2002) A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? J Physiol 540(Pt 1): 15-27

Wible BA, De Biasi M, Majumder K, Taglialatela M & Brown AM (1995) Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K+ channel from human atrium. Circ Res 76(3): 343-50

Wickenden AD, Kaprielian R, Kassiri Z, Tsoporis JN, Tsushima R, Fishman GI & Backx PH (1998) The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure. Cardiovasc Res 37(2): 312-23

Wollnik B, Schroeder BC, Kubisch C, Esperer HD, Wieacker P & Jentsch TJ (1997) Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive KVLQT1 K+ channel mutations found in inherited cardiac arrhythmias. Hum Mol Genet 6(11): 1943-9

Zhang S, Rajamani S, Chen Y, Gong Q, Rong Y, Zhou Z, Ruoho A & January CT (2001) Cocaine blocks HERG, but not KvLQT1+minK, potassium channels. Mol Pharmacol 59(5): 1069-76

Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S & MacKinnon R (2001) Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. Nature 411(6838): 657-61

Zhou Z, Gong Q, Ye B, Fan Z, Makielski JC, Robertson GA & January CT (1998) Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. Biophys J 74(1): 230-41

Zhu XR, Wulf A, Schwarz M, Isbrandt D, Pongs O (1999) Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K+ current. Receptors Channels 6(5): 387-400

8. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
amp	Amplitude
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Coulomb, Kapazität
$CaCl_2$	Kalziumchlorid
CHO	*Chinese Hamster Ovary*
COS	*african green monkey kidney*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Potential
EAD	*Early After Depolarisation*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	*enhanced green fluorescent protein*
EKG	Elektrokardiogramm
ES	Extrasystole
F	Farad, Faradaykonstante
g	Gramm, Leitfähigkeit
G	Giga, Leitfähigkeit
G_{max}	maximale Leitfähigkeit
h	Stunde, human
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HERG	*human ether-à-gogo-related gene*
hH1	*human-Heart-1*
Hz	Hertz
I	Strom
IC_{50}	Konzentration der halbmaximalen Inhibition
I_{max}	maximale Stromamplitude
I_{Rampe}	maximale Amplitude während des Rampenstroms
$I_{Rechteck}$	maximale Amplitude während der Rechteckdepolarisation im Anschluss an das Rampenprotokoll
JLNS	Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom
K	Kalium
KChIP	*Kv Channel-interacting Protein*
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
Kv	spannungsabhängiger Kaliumkanal
LQT	*Long-QT*
l	Liter
µ	micro
m	milli
M	Mega
MEM	*Modified Eagle's Medium*
min	Minute
minK	*minimal K Channel*
MiRP	*minK-related peptide*
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
mRNA	*messenger* Ribonukleinsäure
n	Nano, Anzahl

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
p	Pico
PBS	*Phosphate Buffer Saline*
Q	Ladungsfluss
Q_{50ms}	Ladungsfluss während der ersten 50 ms
Q_{cross}	Ladungsfluss vor dem Überkreuzen
Q_{Rampe}	Ladungsfluss während des Rampenprotokolls
$Q_{Rechteck}$	Ladungsfluss während der Rechteckdepolarisation im Anschluss an das Rampenprotokoll
R	Gaskonstante
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
τ_1	schnelle Zeitkonstante der Inaktivierung
τ_2	langsame Zeitkonstante der Inaktivierung
τ_{rec}	Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung
T	Temperatur
TdP	*Torsades de pointes*
t_{peak}	Zeitraum bis zum Erreichen der Maximalamplitude
t_{cross}	Zeitraum bis zum Erreichen des Überkreuzens
V	Volt
V_{max}	maximaler Effekt
V_{mid}	Potenzial der halbmaximalen Aktivierung bzw. Inaktivierung
z	Wertigkeit eines Ions
z.B.	zum Beispiel

Anhang

A. Danksagung ii
B. Lebenslauf iii
C. Eidesstattliche Versicherung iv

A. Danksagung

Herrn Privatdozent Dr. med. P. Friederich danke ich für die Überlassung des Themas und für die intensive Betreuung meiner Arbeit.

Ich möchte Herrn Professor Pongs dafür danken, dass er es mir ermöglichte, die ausgezeichneten wissenschaftlichen Bedingungen zu nutzen, die ich in seinem Institut vorfand.

Außerdem bedanke ich mich bei dem wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Personal des Instituts für neurale Signalverarbeitung, insbesondere bei Dr. rer. nat. Britta Callsen, Cornelia Siebrands und Dr. rer. nat. Manuel Gebauer, für die immer geduldige und großzügige Hilfsbereitschaft in arbeitsbezogenen wie arbeitsfernen Fragen.

Anne Schneider-Darlison und Andrea Zaisser danke ich für die Arbeit in der Zellkultur und Dr. med. Isbrandt und Stefan Schillemeit für die Klonierung des $MiRP1_{T8A}$-Polymorphismus' und der IRES-Konstrukte von MiRP1 und $MiRP1_{T8A}$ und Dr. med. Isbrandt außerdem für die vielen interessanten wissenschaftlichen Anregungen.

Bei meiner Familie bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung und Zuneigung, auf die ich mich immer verlassen kann.

B. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anna Maria Elisabeth Aglaia Solth
Geburtsort	Düsseldorf
Geburtsdatum	02.12.76

Schulausbildung

1983-1987	Brüder-Grimm-Grundschule Marburg
1987-1996	Martin-Luther-Schule Marburg
Juni 1996	Abitur, Notendurchschnitt: 1,8

Studium

Oktober 1996- März 1997	Studium der Musikwissenschaft an der Universität Regensburg
April 1997- April 2005	Studium der Humanmedizin an den Universitäten Marburg, Aachen und Hamburg
September 1999	Ärztliche Vorprüfung; Note: 2,66
September 2000	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: -gut-
April 2003	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: 1,66
April 2005	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: -sehr gut-

Forschung

April 2003- März 2004	Forschungsstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft: Graduiertenkolleg „Neurale Signaltransduktion und deren pathologische Störungen" in der Arbeitsgruppe von PD Dr. P. Friederich, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, am Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg

Publikationen

1. Solth A, Siebrands C, Friederich P (2005) Inhibition of Kv4.3/KChIP2.2 channels by bupivacaine and its modulation by the pore mutation $Kv4.3_{V401I}$. Anesthesiology. (Angenommen zur Publikation)

2. Friederich P, Solth A (2004) Interaction of ropivacaine with cloned cardiac Kv4.3/KChIP2.2 complexes. Anesthesiology 101(6): 1347-56

3. Friederich P, Solth A, Schillemeit S, Isbrandt D (2004) Local anaesthetic sensitivities of cloned HERG channels from human heart: comparison with HERG/MiRP1 and HERG/MiRP1 T8A. Br J Anaesth 92(1): 93-101

4. Isbrandt D, Friederich P, Solth A, Haverkamp W, Ebneth A, Borggrefe M, Funke H, Sauter K, Breithardt G, Pongs O, Schulze-Bahr E (2002) Identification and functional characterization of a novel KCNE2 (MiRP1) mutation that alters HERG channel kinetics. J Mol Med 80(8): 524-32

C. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Anna Solth

Hamburg, Mai 2005