

Aus der Klinik für
Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek

Elektrophysiologische Untersuchungen
der TASK-1 „*Knock-out*“-Maus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Lukas Clasen

2014

Meinen Eltern

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Donner

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Rassaf

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

PETRIC, STELLA*; CLASEN, LUKAS*; VAN WESSEL, CARINA; GEDULDIG, NORA; DING, ZHAOPING; SCHULLENBERG, MARTINA; MERSMANN, JAN; ZACHAROWSKI, KAI; ALLER, MARIA I.; SCHMIDT, KLAUS G.; DONNER, BIRGIT C. (2012): *In vivo* electrophysiological characterization of TASK-1 deficient mice. *Cellular Physiology and Biochemistry* 30 (3), 523–537.

* Geteilte Erstautorenschaft

Zusammenfassung

Der plötzliche Herztod ist in Europa und den USA für ca. ¼ Millionen Todesfälle jährlich verantwortlich. In diesem Zusammenhang hat die Entdeckung von genetisch bedingten Herzrhythmusstörungen, den sog. Ionenkanalerkrankungen, eine neue Zielgruppe junger Patienten aufgedeckt, die neue Therapieansätze über die konventionellen Therapiemöglichkeiten hinaus erfordert.

TASK-1 gehört zur Gruppe der zweiporigen Kalium-Kanäle (K_{2P}) und wird im Herzen vor allem auf ventrikulärer Ebene exprimiert, wo es am Hintergrund-Kaliumstrom beteiligt ist. Im Modell der TASK-1 defizienten Maus konnte der Phänotyp einer QT-Verlängerung gezeigt werden, einhergehend mit einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer. Weiterhin geht TASK-1 Defizienz mit einer erhöhten mittleren Herzfrequenz und einer Verminderung sowohl der Herzfrequenzvariabilität als auch tendenziell des Barorezeptorreflex nach adrenerger Stimulation einher, was für eine gesteigerte Sympathikusaktivität spricht.

Vor diesem Hintergrund stellten wir die Frage, welchen Einfluss verschiedene Anästhetika und Isoprenalin auf den Phänotyp der TASK-1 defizienten Maus nehmen. Es wurden die Hypothesen aufgestellt, dass TASK-1 Defizienz a) eine erhöhte Vulnerabilität für ventrikuläre Arrhythmien und b) eine gestörte Barorezeptor-vermittelte Herzfrequenzsteuerung darstellt. Zur Prüfung dieser Hypothesen wurden elektrophysiologische Untersuchungen über einen transvenös einliegenden Katheter durchgeführt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (I) Eine QT_c Verlängerung bei TASK-1 defizienten Mäusen konnte unter Pentobarbital und Avertin, nicht aber unter Isofluran gesehen werden. Avertin hatte den geringsten Einfluss auf die Herzfrequenz.
- (II) TASK-1 defiziente Mäuse zeigen keine erhöhte ventrikuläre Vulnerabilität vor und nach Isoprenalingabe im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen.
- (III) Der Barorezeptorreflex ist bei den TASK-1 defizienten Mäusen im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen reduziert.

Hieraus zogen wir die Schlussfolgerung, dass TASK-1 an der ventrikulären Repolarisation beteiligt ist, ohne dabei Einfluss auf die Arrhythmogenität im Mausmodell zu nehmen. Die TASK-1 defiziente Maus stellt somit ein stabiles Modell dar, um die Repolarisation über Multielektrodenmapping künftig näher zu studieren. TASK-1 ist außerdem mitverantwortlich für die Barorezeptor-vermittelte Herzfrequenzsteuerung. Die Erkenntnisse dieser Arbeit tragen zum Wissen um die Ionenkanalfunktion von TASK-1 bei, was bei Therapiestudien berücksichtigt werden könnte.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|--|
| AB | Atriale Burststimulation |
| AF | <i>atrial fibrillation</i> |
| AH | atriohisäres bzw. Atrium-His Intervall |
| AP | Aktionspotential |
| APD | Aktionspotentialdauer |
| ARP | atriale Refraktärperiode |
| AV | atrioventrikuläres bzw. Atrium-Ventrikel Intervall |
| AVNRP | atrioventrikulär-nodale Refraktärperiode |
| C57Bl/6 | Zuchtmaus für Laborzwecke |
| Ca²⁺ | Calcium Ion |
| cDNA | <i>complementary deoxyribonucleic-acid</i> |
| CL | <i>cycle length</i> |
| Ct | <i>cycle threshold</i> |
| Del | deletierte Sequenz im TASK-1 Gen |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| DNase | Deoxyribonuklease (katalysieren die DNA Hydrolyse) |
| EAD | <i>early after depolarisation</i> |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| EPU | elektrophysiologische Untersuchung |
| Exon | <i>expression region</i> |
| HRT | <i>heart rate turbulence</i> |
| HRV | <i>heart rate variability</i> |
| HV | hisventrikuläres bzw. His-Ventrikel (Intervall) |
| ICD | <i>implanted cardiac defibrillator</i> |
| i.p. | intraperitoneal |
| K⁺ | Kalium Ion |
| K_{2P} | Zweiporige Kalium Kanäle |
| KO | <i>Knock-Out</i> |
| lacZ | Lactose-Z-Gen |
| LQTS | Long QT Syndrom |
| mRNA | <i>messenger ribonucleic acid</i> |
| ms | Millisekunde |
| mV | Millivolt |

| | |
|-----------------------------|--|
| n | <i>number</i> |
| Na⁺ | Natrium Ion |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ Konzentration |
| PR | Intervall zwischen P Welle und R Zacke |
| QRS | Intervall zwischen Q und S Zacke |
| QT | Intervall zwischen Q Zacke und T Welle |
| QTc | <i>rate corrected QT interval</i> |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> |
| RNase | Ribonukleasen (katalysieren die RNA-Hydrolyse) |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| RR | Intervall zwischen benachbarten R Zacken |
| SCD | <i>sudden cardiac death</i> |
| SCL | <i>sinus cycle length</i> |
| SNRT | <i>sinus node recovery time</i> |
| SNRT_c | <i>rate corrected sinus node recovery time</i> |
| TASK | <i>TWIK-related acid sensitive K⁺-channel</i> |
| TASK-1^{-/-} | TASK-1 defiziente Maus (homozygot <i>Knock-Out</i>) |
| TASK-1^{+/-} | Heterozygote Maus (heterozygoter Merkmalträger) |
| TASK-1^{+/+} | Wildtyp Maus (homozygoter Merkmalträger) |
| TDR | Transmurale Dispersion der Repolarisation |
| THIK | <i>tandem pore domain halothane inhibited K⁺-channel</i> |
| TO | <i>turbulence onset</i> |
| TREK | <i>tandem pore domains in a weak inwardly rectifying K⁺-channel-related K⁺-channel</i> |
| TS | <i>turbulence slope</i> |
| TWIK | <i>tandem pore domains in a weak inwardly rectifying K⁺-channel</i> |
| VB | Ventrikuläre Burststimulation |
| VPC | <i>ventricular premature contraction</i> |
| VRP | ventrikuläre Refraktärperiode |
| VT | ventrikuläre Tachykardie |
| WT | Wildtyp |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Von der Klinik zur experimentellen Forschung – Herzrhythmusstörungen | 1 |
| 1.1.1 | Epidemiologie von Herzrhythmusstörungen | 1 |
| 1.1.2 | Klassifikation von Herzrhythmusstörungen | 1 |
| 1.1.3 | Diagnostische Möglichkeiten zur Detektion von Arrhythmien | 2 |
| 1.1.4 | Pathophysiologie von Herzrhythmusstörungen..... | 2 |
| 1.1.5 | Der Plötzliche Herztod | 4 |
| 1.1.6 | Heart Rate Turbulence..... | 6 |
| 1.1.7 | Long QT Syndrom | 6 |
| 1.1.8 | Das Mausmodell zur Erforschung von Ionenkanalerkrankungen | 10 |
| 1.2 | Kalium Kanäle..... | 11 |
| 1.2.1 | Einteilung..... | 11 |
| 1.2.2 | Die Gruppe der K ₂ P Kanäle | 11 |
| 1.2.3 | Expression und Funktion von TASK-1 | 13 |
| 1.2.4 | Bisherige Erkenntnisse über den kardialen Phänotyp der TASK-1 defizienten Maus | 14 |
| 1.3 | Ziele und Fragestellungen der Arbeit..... | 15 |
| 2 | Material und Methoden..... | 17 |
| 2.1 | Einführung | 17 |
| 2.1.1 | Die TASK-1 „Knock-Out“ Maus..... | 17 |
| 2.1.2 | Haltung und Zucht der Versuchstiere..... | 18 |
| 2.1.3 | Genehmigung für Tierversuche | 19 |
| 2.2 | <i>In vitro</i> Analysen | 19 |
| 2.2.1 | Geräte..... | 19 |
| 2.2.2 | Computer und Software | 19 |
| 2.2.3 | Kits und Verbrauchsmaterialien | 19 |
| 2.2.4 | Chemikalien | 20 |
| 2.2.5 | Genotypisierung..... | 20 |
| 2.3 | <i>In vivo</i> Analysen..... | 27 |
| 2.3.1 | Geräte..... | 27 |
| 2.3.2 | Computer und Software | 28 |
| 2.3.3 | Instrumente und Verbrauchsmaterialien | 28 |
| 2.3.4 | Pharmaka | 29 |
| 2.3.5 | Arbeitsplatz und Dokumentation | 31 |
| 2.3.6 | Vorgehen | 31 |
| 2.3.7 | Oberflächen-Elektrokardiogramm | 32 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.3.8 | Elektrophysiologische Untersuchung | 33 |
| 2.3.9 | <i>Heart Rate Turbulence</i> | 45 |
| 2.3.10 | Analyse und Statistische Auswertung | 48 |
| 3 | Ergebnisse | 49 |
| 3.1 | Besonderheiten im Oberflächen-EKG der TASK-1 ^{-/-} Maus | 49 |
| 3.1.1 | Einfluss der Anästhesie auf die Herzfrequenz bei der TASK-1 ^{+/+} und TASK-1 ^{-/-} Maus | 49 |
| 3.1.2 | Erregungsbildung und –ausbreitung der TASK-1 defizienten Maus im Vergleich zu den Wildtypen | 50 |
| 3.1.3 | QT Verlängerung unter Berücksichtigung des Einfluss der Anästhesie bei der TASK-1 ^{-/-} und TASK-1 ^{+/+} Maus..... | 52 |
| 3.1.4 | Einfluss der beta-adrenergen Stimulation mit Isoprenalin auf das QT und QT _c Intervall der TASK-1 ^{-/-} und der TASK-1 ^{+/+} Maus | 54 |
| 3.2 | Elektrophysiologische Untersuchung der TASK-1 ^{-/-} Maus | 56 |
| 3.3 | <i>Heart Rate Turbulence</i> bei der TASK-1 ^{-/-} Maus | 59 |
| 4 | Diskussion | 61 |
| 4.1 | Befunde im Oberflächen-EKG der TASK-1 ^{-/-} Maus..... | 61 |
| 4.1.1 | Einfluss der Anästhesie auf die Herzfrequenz der TASK-1 ^{-/-} und TASK-1 ^{+/+} Maus | 61 |
| 4.1.2 | Erregungsbildung und -ausbreitung der TASK-1 defizienten Maus im Vergleich zu den Wildtypen | 62 |
| 4.1.3 | QT Verlängerung unter Berücksichtigung des Einfluss der Anästhesie bei der TASK-1 ^{-/-} und TASK-1 ^{+/+} Maus..... | 62 |
| 4.1.4 | Einfluss der beta-adrenergen Stimulation mit Isoprenalin auf das QT und QT _c Intervall der TASK-1 ^{-/-} und TASK-1 ^{+/+} Maus .. | 64 |
| 4.2 | Elektrophysiologische Untersuchung der TASK-1 ^{-/-} Maus | 65 |
| 4.3 | Eingeschränkte <i>Heart Rate Turbulence</i> bei der TASK-1 ^{-/-} Maus..... | 68 |
| 5 | Schlussfolgerungen | 71 |
| 6 | Abbildungsverzeichnis..... | 72 |
| 7 | Tabellenverzeichnis..... | 74 |
| 8 | Literatur- und Quellenverzeichnis | 75 |
| 9 | Danksagung | 86 |
| 10 | Eidesstattliche Versicherung | 87 |

1 Einleitung

1.1 Von der Klinik zur experimentellen Forschung – Herzrhythmusstörungen

1.1.1 Epidemiologie von Herzrhythmusstörungen

Kardiale Arrhythmien atrialen oder ventrikulären Ursprungs stellen in der Klinik eine ständige Herausforderung dar. Der Plötzliche Herztod (SCD), ausgelöst durch ventrikuläre Tachyarrhythmien, ist mit geschätzt 180.000 – 250.000 Fällen pro Jahr in den westlichen Industrieländern eine der Haupttodesursachen (Chugh 2008). Neben den erworbenen Herzrhythmusstörungen durch akute oder chronische Erkrankungen ischämischer oder entzündlicher Genese werden in zunehmenden Maße angeborene Störungen als Ursache für Arrhythmien erforscht. So wurden in den 90er Jahren erstmalig Genmutationen als Ursache für Ionenkanalerkrankungen wie z.B. dem Long-QT-Syndrom identifiziert, die lebensbedrohliche ventrikuläre Herzrhythmusstörungen bereits in jungen Lebensjahren verursachen können.

Die Erkenntnisse über die herausragende Bedeutung supraventrikulärer und ventrikulärer Arrhythmien für das Lebensschicksal der Menschen unterstreichen die Notwendigkeit der Forschung nach Ursachen und Mechanismen der Entstehung abweichender kardialer Rhythmen.

1.1.2 Klassifikation von Herzrhythmusstörungen

Das Herz kann entweder kongenital oder im Alterungsprozess erworbene Erkrankungen aufweisen, die zu Störungen der Erregungsbildung und –ausbreitung führen.

Allgemein lassen sich bradykarde von tachykarden Herzrhythmusstörungen unterscheiden. Die tachykarden Herzrhythmusstörungen umfassen supraventrikuläre und ventrikuläre Tachykardien. Auf Kammerebene finden sich ventrikuläre Extrasystolen, Kammertachykardien (VT) sowie Kammerflimmern. Es gibt idiopathische Herzrhythmusstörungen, welche ohne strukturelle Herzerkrankung bei Gesunden in Ruhe entstehen (Hiss und Lamb 1962, Engstrom 1999). Sekundär kann der Herzrhythmus durch Stoffwechselveränderungen (Oliver 2002), Elektrolytschwankungen (Fisch 1973) oder unerwünschte Medikamentenwirkungen (Hill 1932, Selzer und Wray 1964) gestört werden. Ventrikuläre Tachykardien können bei Kardiomyopathien und genetischen Arrhythmiesyndromen wie dem Long-QT-Syndrom (LQTS) auftreten (Buxton 2006).

Hinsichtlich der klinischen Symptomatik kann man von subjektiv unbemerkten („asymptomatischen“) und vom Patienten bemerkten („symptomatischen“) Herzrhythmusstörungen sprechen (Buxton 2006).

1.1.3 Diagnostische Möglichkeiten zur Detektion von Arrhythmien

Intermittierende Herzrhythmusstörungen bleiben im Ruhe-EKG als nicht-invasive Methode häufig verborgen. Im Belastungs-EKG können mit und ohne medikamentöse Stresstestung belastungsabhängige oder Ischämie-bedingte Arrhythmien erkannt werden (Fortuin und Weiss 1977, Billman 1985, Shimizu 2003). Klären die genannten Herangehensweisen nicht hinreichend die Beschwerdesymptomatik des Patienten, kann eine invasive Elektrophysiologische Untersuchung (EPU) indiziert sein (Wellens 1972, Freedman 1988, Wilber 1988).

Mit den ersten elektrophysiologischen Testungen in den 60er Jahren wurden die Grundlagen für die klinische Elektrophysiologie gelegt. Zunächst war die EPU indiziert, um bradykarde Rhythmusstörungen zu diagnostizieren und die Entstehung von AV-Blockierungen hinsichtlich ihrer Lokalisation im AV-Knoten, His-Bündel oder His-Purkinjesystem aufzuklären. In den 70er und 80er Jahren verlagerte sich mit der Einführung der programmierten Vorhof- und Kammerstimulation der Schwerpunkt hin zu den tachykarden Rhythmusstörungen. Mitte der 80er Jahre erhielten therapeutische Ablationsverfahren Einzug in die Klinik und sind heute aus den kardiologischen Schwerpunktzentren nicht mehr weg zu denken (Block 1998). Die EPU ermöglicht die invasive Messung der Erregungsbahnen, Lokalisation ektooper Erregungsursprünge, sowie die Testung der kardialen Vulnerabilität für Herzrhythmusstörungen und der Effektivität einer medikamentösen antiarrhythmischen Therapie (Block 1998). Die Mehrzahl der Tachyarrhythmien beim Menschen kann mit Hilfe von drei Extrastimulationen ausgelöst werden (Hummel 1994). Eine Vorhersage des Risikos für das Auftreten eines SCD kann die EPU bislang nur in der Zusammenschau mit nicht-invasiver Diagnostik treffen (Thomas und Josephson 2008).

1.1.4 Pathophysiologie von Herzrhythmusstörungen

Das Aktionspotential (AP) einer Herzmuskelzelle wird durch die geordnete Abfolge depolarisierender Na^+ -, Ca^{2+} - und repolarisierender K^+ -Ionenströme bestimmt, welche den Ladungszustand der Zellmembran verändern. Durch den raschen Na^+ -Einstrom wird die Aufstrichphase vermittelt, was eine Ladungsumkehr der Zellmembran ausgehend von etwa -80 mV auf +20 mV bewirkt. Während der Ca^{2+} getragenen Plateauphase des AP ist die Herzmuskelzelle elektrisch absolut refraktär, wodurch kein weiteres AP ausgelöst

werden kann. Somit kann es sinnvollerweise nicht zur Tetanisierung kommen und die Ventrikel können in einer geordneten Reihenfolge von Einzelkontraktionen der Kardiomyozyten ihre Pumpfunktion erfüllen. Anschließend repolarisiert die Zelle mit Hilfe von auswärtsgerichteten K^+ Kanälen über einen Wert von -40mV hinaus zu negativeren Potentialen und die Natriumkanäle werden teilweise aktivierbar, wenn auch mit geringer Anstiegssteilheit, kurzer Dauer und langsamer Fortleitung. In dieser so genannten relativen Refraktärperiode ist das Arbeitsmyokard inhomogen erregbar und vulnerabel für die Entstehung von Arrhythmien durch kreisende Erregungen. Im Oberflächen EKG entspricht die aufsteigende Flanke der T-Welle der relativen Refraktärperiode.

Mechanismen, die zur Entstehung von einer Rhythmusstörung beitragen, sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Zum einen können ektope Extrasystolen während der Repolarisation (*early after-depolarization*, EAD) oder spät zum Ende bzw. unmittelbar nach der Repolarisation (*delayed after-depolarization*, DAD) auftreten (Abb. 1A). EAD treten auf, wenn die L-Typ Ca^{2+} Kanäle sich bei verlängerter AP Dauer erholen konnten und die noch depolarisierte Zellmembran erneut depolarisieren (January 1988). Dahingegen entstehen DAD bei verstärkter Ca^{2+} Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch Aktivierung des Na^+/Ca^{2+} Austauschers oder des Ca^{2+} aktivierten Cl^- Ionenkanals (Jiang 2005). Zum anderen kann durch eine verlangsamte Leitungsbahn die Selbstausschöpfung einer Erregung verhindert werden, so dass die verzögerte Erregung über den benachbarten Leitungsast zurückgeleitet wird und eine kreisende Erregung entsteht (Abb 1B). Ein weiterer Mechanismus ist die heterogene Verteilung der AP Dauer in Abhängigkeit von der Lokalisation (transmurale Dispersion der Repolarisation). Epikardial ist die Dauer des AP wesentlich kürzer als endokardial, was potentiell zu vorzeitiger Wiedererregbarkeit führen kann (Abb 1C). Weiterhin kann es durch die zeitliche Variation der AP Dauer und Amplitude benachbarter Areale zur Ausbildung eines Blocks im dazwischen liegenden Gewebe kommen, wo dann kreisende Erregungen entspringen können (Abb 1D) (Rosenbaum 1994, Pastore 1999).

Terminieren die *reentry*-Erregungen nicht, kann es zur ungeordneten Kammererregung kommen, die in ein Kammerflimmern übergeht. Dabei kommt keine wirksame Füllung und Entleerung des Ventrikels mehr zustande, resultierend in einem Herz-Kreislaufstillstand. Aufgrund einer abnormalen Repolarisation besteht bei Patienten mit einem verlängertem QT Intervall im Oberflächen-EKG ein erhöhtes Risiko für tachykarde Rhythmusstörungen. Sowohl ein verlangsamter K^+ Ausstrom während der Repolarisation als auch ein verlängerter Na^+ Einstrom führen zu einer verlängerten Plateauphase und einer verzögerten Repolarisation. Zusätzlich besteht durch die heterogene Verteilung der Myozyten midmyokardial eine verlängerte der Repolarisationszeit. Die

Summe aller veränderten Einzelpotentiale äußert sich im Oberflächen-EKG als verlängertes QT Intervall.

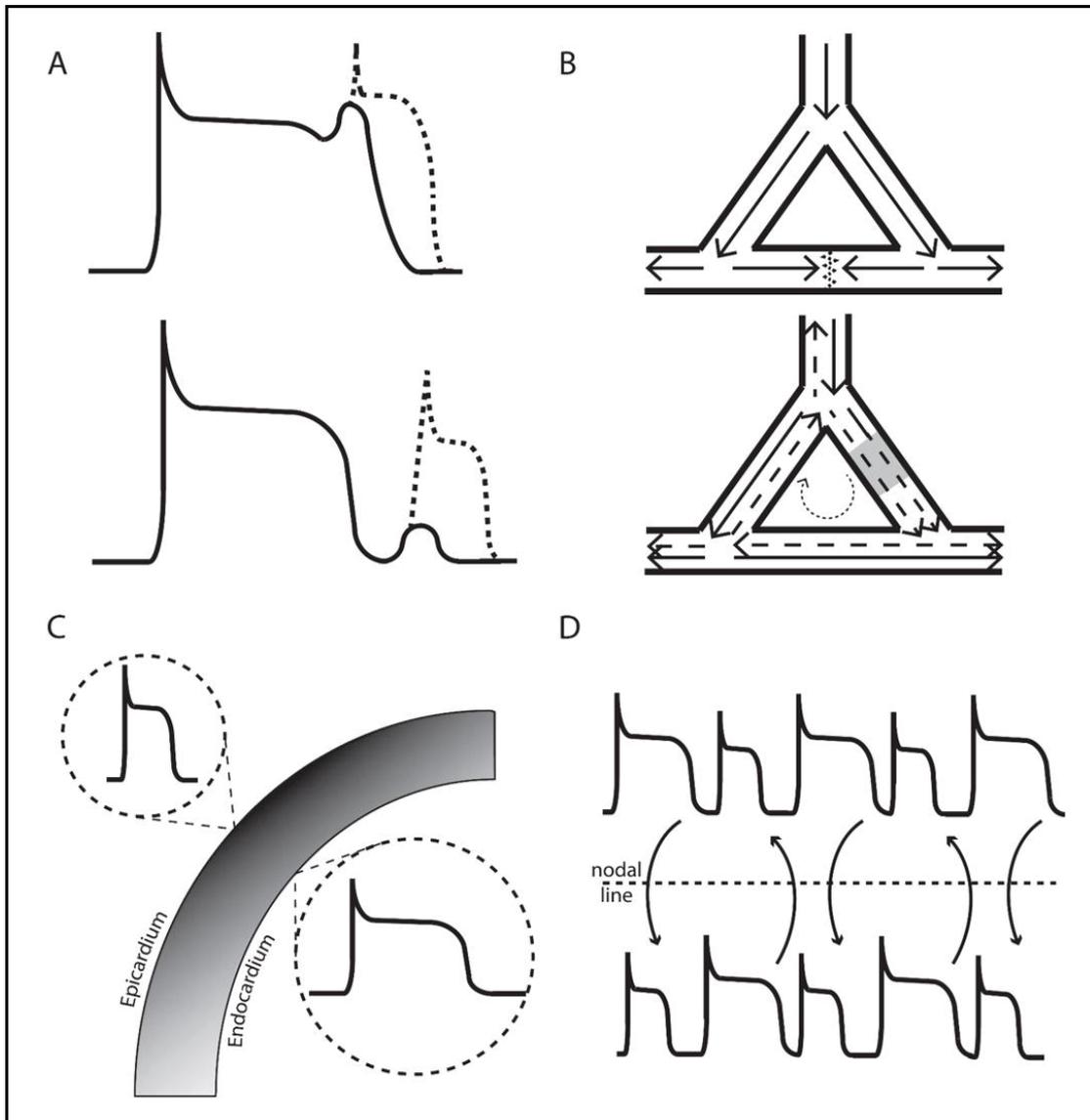


Abb. 1: **Pathomechanismen der Arrhythmogenese.**

Potentielle Mechanismen für das Auftreten von Herzrhythmusstörungen sind frühe oder späte Nachdepolarisationen (A), ein *reentry*-Mechanismus, der durch eine verlangsamt Leitungsbahn nach einer Aufzweigung inadäquat Myokard erregen kann (unten), was bei normal leitenden Bahnen durch Selbstauslöschung verhindert wird (oben) (B), die regionale Heterogenität der APD (C) und zeitliche Heterogenität der APD benachbarter Regionen (D). Einzelheiten im Text. Mit Genehmigung aus Martin 2012.

1.1.5 Der Plötzliche Herztod

Der Plötzliche Herztod (SCD) ist ein akutes kardiovaskuläres Ereignis, welches nach Definition der kardiologischen Gesellschaften AHA (*American Heart Association*), ACC (*American College of Cardiology*) und HRS (*Heart Rhythm Society*) bei nicht hospitalisierten Patienten innerhalb einer Stunde nach

Auftreten erster Symptome zum Tod führt (Goldberger 2008). Nach Definition der WHO (*World Health Organization*) gilt auch ein nicht beobachteter Todeseintritt innerhalb von 24 Stunden als SCD (Chugh 2004), wobei mehr natürliche Todesursachen und verhältnismäßig weniger kardiale Akutereignisse eingeschlossen werden (Kuller 1980). Fallzahlen des SCD sowohl in Europa als auch Nordamerika belaufen sich auf jährlich 51,2 – 56 von 100.000 Einwohnern (Vaillancourt 2004, Chugh 2004, Byrne 2008), entsprechend etwa 180.000 - 250.000 und weltweit 4 – 5 Millionen Fälle pro Jahr (Chugh 2008). Nach Schätzungen einer dänischen Studie in den Jahren 2000 bis 2006 war der Tod junger Menschen im Alter von 1 – 35 Jahren in 7% auf den SCD zurückzuführen. Während in 38% eine Herzerkrankung als Auslöser festgestellt werden konnte, war in 29% autoptisch keine Ursache eruierbar, was an einen primär arrhythmogenen Ursprung denken lässt (Winkel 2011). In knapp der Hälfte der Fälle ist der SCD mit VT und VF assoziiert (Teodorescu 2010). Die Inzidenz für den SCD über 35-jähriger ist im Vergleich zu den Jüngeren 100fach höher (Zheng 2001). Am häufigsten liegt dem SCD im Erwachsenenalter eine koronare Herzerkrankung zu Grunde, gefolgt von nicht-ischämischen Kardiomyopathien (Zipes 2006). Bis zu 10% des SCD sind der Gruppe angeborener Ionenkanalerkrankungen geschuldet, wie dem Long QT Syndrom, dem Short QT Syndrom, Brugada Syndrom und der katecholaminergen VT (Zipes 2006). Diese sog. *channelopathies* beruhen auf der Störung von kardialen Ionen-Kanälen, die durch Mutation eines Gens entstehen. Die erworbenen kardialen Krankheitsbilder wie Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt und Arrhythmien sind vergesellschaftet mit einer veränderten Genexpression von Ionen-Kanälen (Nilles und London 2007). Dieses sogenannte arrhythmogene *remodeling* wird als molekulare Ursache einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität angesehen (Nattel 2007).

Tragischerweise wird die Diagnose einer solchen Herzerkrankung oft erst beim Eintreten der fatalen kardialen Arrhythmie bzw. des SCD gestellt (Adabag 2008, Fishman 2010). Obwohl eine hochgradig eingeschränkte linksventrikuläre Pumpfunktion als Haupt-Risikofaktor für den SCD gilt, ist diese bei vielen Betroffenen allerdings erhalten (Mäkikallio 2005). Daher werden gegenwärtig eine Reihe potentieller Risikomarker diskutiert (Dagues und Hindricks 2013). Zur Prophylaxe des SCD steht die Implantation eines Defibrillators (ICD) zur Verfügung, der hämodynamisch nicht tolerierte Tachyarrhythmien automatisch detektiert und terminiert (Jung 2006). Ein gesunder Lebensstil mit Nicht-Rauchen, körperlichem Training >30 min/d, mediterraner Ernährung und Normalgewichtigkeit ist seltener mit dem SCD assoziiert (Chiuve 2011). Eine optimale medikamentöse Therapie der Grunderkrankung wie z.B. bei Herzinsuffizienz Betablocker, ACE-Hemmer, Statine und Aldosteronantagonisten können das Risiko für den SCD weiter reduzieren (Goldberger 2011).

1.1.6 Heart Rate Turbulence

Bei der Risikostratifizierung des SCD scheint die *heart rate turbulence* (HRT) eine Rolle zu spielen. Die Bestimmung der HRT Parameter *turbulence onset* und *turbulence slope* gelingt mittels Langzeit-EKG (Bauer 2008). Als Surrogat für den Barorezeptorreflex trifft die HRT eine Aussage über die autonome kardiale Herzfrequenzregulation. Nach einem Herzinfarkt und bei der Herzinsuffizienz ist die HRT eingeschränkt, was mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko einhergeht (Schmidt 1999, Bauer 2008). Körperliches Training im Anschluss an einen Herzinfarkt kann die autonome kardiale Regulationsfähigkeit wieder herstellen (Billman 2009, Huikuri 2010). Ebenfalls kann die HRT als medikamentöses Therapiemonitoring nach einem Herzinfarkt genutzt werden (Bauer 2008).

1.1.7 Long QT Syndrom

Viele wissenschaftliche Arbeiten auf dem Gebiet der kardialen *channelopathies* untermauern den Zusammenhang zwischen Mutationen kardialer Ionen-Kanäle und lebensbedrohlichen Arrhythmien sowie dem SCD (Priori 2010). In den 90er Jahren wurden die ersten Gendefekte mit veränderten Ionenkanalfunktionen in I_{Ks} (LQTS 1), I_{Kr} (LQTS 2) und I_{Na} (LQTS 3) entdeckt (Wang 1996, Curran 1995, Wang 1995), die mit über 87% der Fälle assoziiert sind (Tester 2006) (Tabelle 1). Mittlerweile gehören der Gruppe des LQTS 13 Varianten an (Napolitano 2012).

| Variante | Gen | Protein | Effekt der Mutation |
|----------|--------------|---------|---------------------|
| LQTS 1 | <i>KCNQ1</i> | KvLQT1 | I_{Ks} reduziert |
| LQTS 2 | <i>KCNH2</i> | HERG | I_{Kr} reduziert |
| LQTS 3 | <i>SCN5A</i> | Nav1.5 | I_{Na} erhöht |

Tabelle 1: **Die Hauptvertreter der Gruppe der Long QT Syndrome.**

Jede Variante des LQTS zeichnet sich durch die Mutation eines bestimmten Gens aus, was zu einem Funktionsverlust oder –gewinn zugehöriger Ionen-Kanäle führt. Stellvertretend sind hier die drei häufigsten Varianten aufgeführt. Modifiziert nach Napolitano 2012.

Das LQTS ist definiert als eine arrhythmogene Störung, die mit einer QT Verlängerung (Ackerman 2002), einer genotypischen ST-T-Segment Konfiguration (Zhang 2000), einer Synkope und dem SCD einhergeht (Jervell und Nielsen 1957, Romano 1963, Ward 1964, Tan 1995). Je nach Mutation kommt es bedingt durch die Beeinträchtigung von Repolarisationsströmen (*loss of function*) oder vermehrten Depolarisationsströmen (*gain of function*) zu einer QT Zeit-Verlängerung im Oberflächen-EKG (Abb. 2) (Napolitano 2012). Die für das LQTS charakteristische *Torsade-de-pointes*-Tachykardie ist ein paroxysmales Kammerflattern vom Spitzenumkehrtyp (Tan 1995, Roden 2008).

Es handelt sich dabei pathomorphologisch um kreisende Erregungen, die aufgrund der verzögerten Repolarisationszeit und einer ausgedehnten transmuralen Dispersion der Repolarisation (TDR) durch vorzeitig einfallende ventrikuläre Extrasystolen entstehen (Baker 2000, Salama 2009).

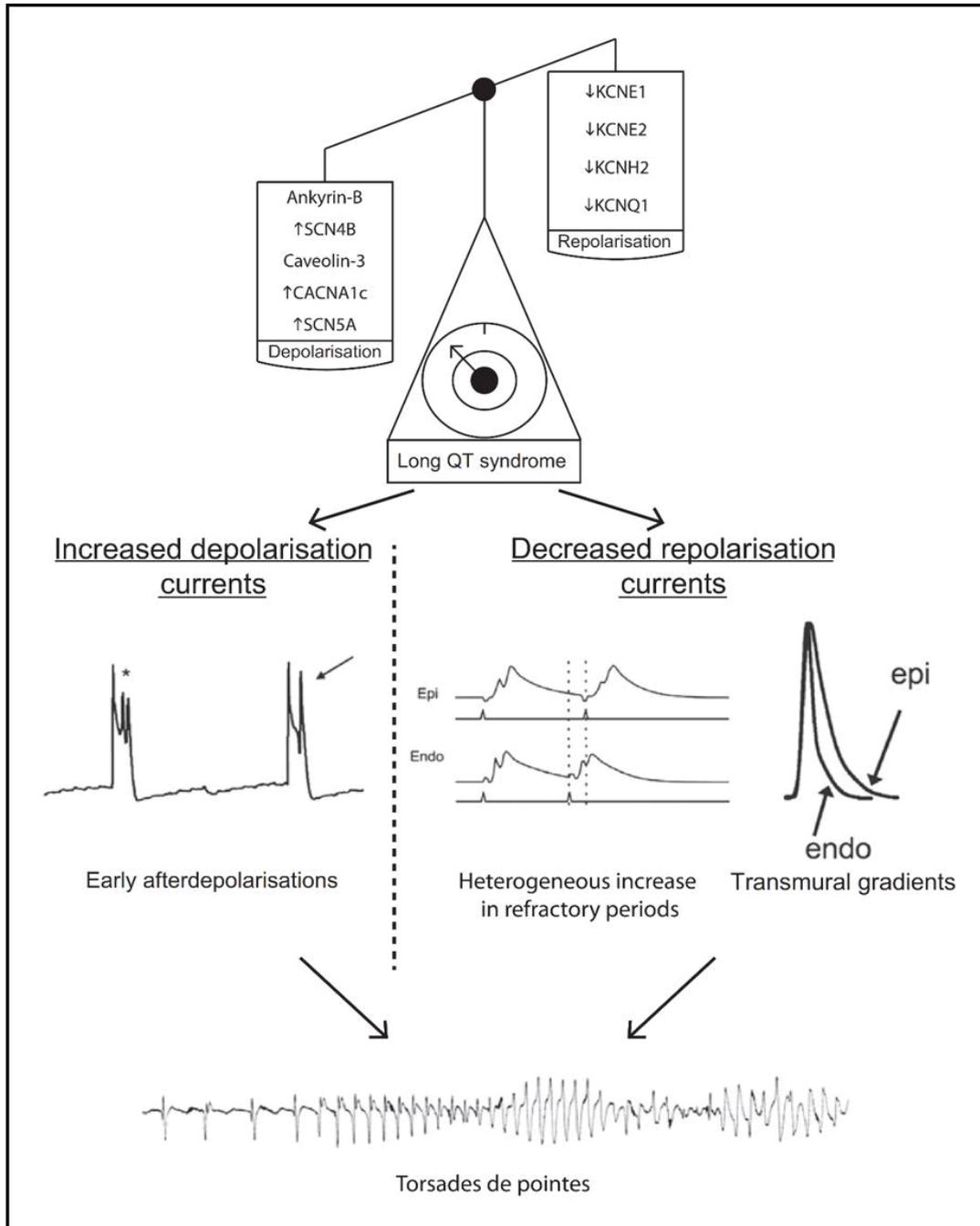


Abb. 2: **Elektrische Pathomechanismen beim LQTS im Mausmodell.**

Je nach Mutation des jeweiligen Ionenkanals kommt es zu einer Beeinträchtigung von Repolarisationsströmen (*Decreased repolarisation currents*) oder zu vermehrten Depolarisationsströmen (*Increased depolarisation currents*). Die Entstehung von EAD (*Early afterdepolarisations*) und vermehrte heterogene Erholungszeiten der transmuralen Myozyten (*Heterogenous increase in refractory periods*) führen zur Entstehung der charakteristischen *Torsade-de-pointes*-Tachykardien. Mit Genehmigung aus Martin 2012.

Durch die Aktivierbarkeit früher Depolarisationsströme kann es durch getriggerte Aktivität zu EAD kommen. Im Bereich der midmyokardialen M-Zellen ist die Repolarisation durch den verzögerten I_{Kr} deutlich verlängert im Vergleich zu den subendokardialen und epikardialen Zellen. Hieraus resultiert eine heterogene Erholungszeit der Erregung, wodurch im Bereich der M-Zellen eine Zone der funktionellen Refraktärität entsteht als potentieller *reentry*-Mechanismus (Antzelevitch 1994). *Torsade-de-pointes*-Tachykardien können sich zu VF entwickeln und damit zum SCD führen (Yap und Camm 2003) (Abb. 2).

Zur Vollständigkeit sei noch die Gruppe des erworbenen LQTS durch Medikamente genannt (aktuelle Informationen auf der Internet-Seite „www.crediblemeds.org“), welche die Repolarisationszeit durch die verzögerten Auswärtskaliumgleichrichter I_{Kr} und I_{Ks} verlängern (Yap und Camm 2003). Bei verlängertem frequenzkorrigiertem QT Intervall (*rate corrected QT interval*, QT_c) sind die Medikamente abzusetzen und bei bekanntem LQTS kontraindiziert (Fazio 2013).

Das autosomal-dominant vererbte Romano-Ward-Syndrom (RWS) ist eine Variante des LQTS und häufig Ursache des SCD jüngerer Individuen (Priori 2003). In Abgrenzung zum Jervell/Lange-Nielsen Syndrom (LQTS 1 und 5) (Neyroud 1997, Schulze-Bahr 1997), haben die Betroffenen ein normales Gehör (Schwartz 1997, Romano 1963, Ward 1964). Die Prävalenz wird auf 1:2000 geschätzt (Schwartz 2009). *Torsade-de-pointes*-Tachykardien rufen beim RWS Synkopen hervor, die bei körperlicher Belastung und emotionaler Stress (LQTS 1 und 2), seltener in Ruhe oder im Schlaf (LQTS 2 und 3) auftreten (Schwartz 2001).

Für die Wahrscheinlichkeit der klinischen Diagnose eines LQTS gibt es ein Scoring-System nach Schwartz und Crotti (Schwartz und Crotti 2011, Tabelle 2). Hierbei fließen EKG-Kriterien wie eine QT_c Verlängerung, Torsaden, T-Wellen alternans, eingekerbte T-Wellen und eine niedrige Herzfrequenz ein. Ebenso erhöht eine QT_c Verlängerung in der vierten Minute der Erholungsphase nach körperlichem Stresstest die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines LQTS (Sy 2011). Auch die Anamnese ist entscheidend, ob die Synkope unter Stress auftrat, das Syndrom bereits in der Familie vertreten ist und ob es in der Familie einen plötzlichen Todesfall <30 Lebensjahr gegeben hat (Schwartz und Crotti 2011). Ab einer Punktzahl von 3,5 wird die Diagnose LQTS hoch wahrscheinlich eingeschätzt. Bei Unsicherheiten können Belastungs-EKG, Langzeit-EKG oder pharmakologische Provokationstests die Aussagekraft beträchtlich steigern, da eine physiologische Verkürzung der QT_c ausbleibt (Shimizu 2003, Hekkala 2010). Eine genetische Testung ist sinnvoll in LQTS-Familien, um asymptotische Träger prophylaktisch mit Betablockern behandeln und die Wahrscheinlichkeit der Vererbung für ihre Nachkommen

| <u>EKG-Auffälligkeiten</u> | | <u>Punkte</u> |
|----------------------------|--|---------------|
| A | QT _c ≥ 480 ms | 3 |
| | QT _c 460 – 479 ms | 2 |
| | QT _c 450 – 459 ms | 1 |
| B | QT _c ≥ 480 ms in der 4. min nach Stresstest | 1 |
| C | Torsade de pointes | 2 |
| D | T-Wave alternans | 1 |
| E | Einkerbung der T-Welle in 3 Ableitungen | 1 |
| F | Niedrige Ruheherzfrequenz | 0,5 |
| <u>Krankengeschichte</u> | | |
| A | Synkope mit Stress | 2 |
| | Synkope ohne Stress | 1 |
| B | Angeborene Taubheit | 0,5 |
| <u>Familienanamnese</u> | | |
| A | Angehörige mit LQTS | 1 |
| B | Unklarer SCD < 30 Jahre naher Verwandter | 0,5 |

Tabelle 2: **Diagnose Kriterien für das LQTS.**

Die Diagnosewahrscheinlichkeit des LQTS kann abhängig von der Summe der Punkte abgeschätzt werden. Hierbei fließen die angegebenen EKG-Kriterien, die Krankengeschichte sowie die Familienanamnese ein. Ein Score von ≤ 1 Punkt bedeutet eine geringe, 1,5 – 3 Punkte eine mittlere und ≥ 3,5 Punkte eine hohe Wahrscheinlichkeit. QT_c = frequenzkorrigiertes QT Intervall, LQTS = Long QT Syndrom, SCD = *sudden cardiac death*. ms = Millisekunden. Modifiziert nach Schwartz und Crotti 2011.

beurteilen zu können (Schwartz und Crotti 2011). Weiterhin ist die Genanalyse für die Risikostratifizierung und Therapie von Patienten mit LQTS entscheidend (Zipes 2006, Fazio 2013). Das Risiko der LQTS-Träger für den SCD steigt mit zunehmendem Alter und ist vierfach größer verglichen mit genetisch Gesunden (Goldenberg 2008, Zareba 1998). Am gefährdetsten sind die Träger des LQTS 1, 2 und 3 vor dem 40. Lebensjahr vor Einleitung einer Therapie (Priori 2003).

Verhaltensmaßnahmen für symptomatische Patienten sind das Vermeiden kompetitiver Belastungen wie Schwimmen (LQTS1) oder akustische Stimuli im Schlaf (LQTS2), sowie QT verlängernde Medikamente und Kalium-/Magnesiumverlust (Zipes 2006). Unter Beta-Blockern treten 90% der LQTS1-Träger keine kardialen Ereignisse auf, während sie für die Typen LQTS 2 und 3 nicht einheitlich zu empfehlen sind (Ruan 2008). Als Prophylaxe des SCD steht zusätzlich zur Betablocker-Therapie die Implantation eines Defibrillators für die Patienten zur Verfügung, die bereits ventrikuläre Tachykardien, Synkopen bzw.

einen Herzstillstand hatten (Jung 2006, Zipes 2006). Bei Patienten die trotz Betablockertherapie weiter synkopieren steht die linkskardiale sympathische Denervierung als anderes Therapieverfahren zur Auswahl, welches eine signifikante Reduktion von Synkopen und kardialen Ereignissen erreicht (Schwartz 1991, Bos 2013).

1.1.8 Das Mausmodell zur Erforschung von Ionenkanalerkrankungen

Transgene Tiere haben eine besondere Bedeutung in der Erforschung der kardialen Elektrophysiologie und kardialen Erkrankungen des Menschen bekommen (London 2001, Martin 2012, Priori 2010). Über eine homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen von Mäusen kann gezielt ein spezifisches Gen ausgeschaltet oder modifiziert werden. Die so hergestellte *Knock-Out-Maus* gibt Aufschluss über Funktion und Rolle des Gens bei Pathomechanismen (James 1998). Auf Proteinniveau sind die murinen Ionenkanäle denen des Menschen zu mindestens 95% identisch und haben ähnliche elektrophysiologische sowie pharmakologische Eigenschaften (Nilles und London 2007, VanderBrink 1999). Unterschiede bestehen hinsichtlich der AP Dauer, da die murinen verglichen mit den humanen Myozyten keine typische Plateauphase aufweisen (London 2001).

Im Mäuseherz findet die Depolarisation in einigen Bereichen zeitgleich mit der frühen Phase der Repolarisation in anderen Bereichen statt, was sich im Oberflächen-EKG als Verschmelzung der ST Strecke mit dem QRS Komplex und einer positiven J Welle widerspiegelt, gefolgt von einer niedrigen Amplitude der ST Strecke (London 2001, Speerschneider und Thomsen 2013) (Abb. 3).

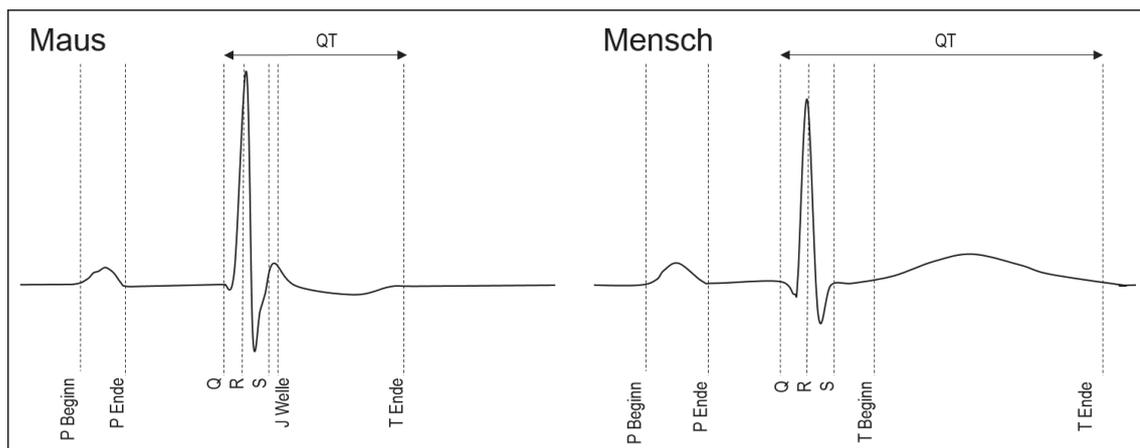


Abb. 3: **EKG von Maus und Mensch im Vergleich.**

Dargestellt ein stilisiertes EKG der Maus und rechts des Menschen mit den Anteilen P, QRS und T. Depolarisation und frühe Repolarisation vereinen sich im QRS-Komplex sowie der prominenten J Welle (positiver Ausschlag) im EKG der Maus (links). Es schließt sich eine T-Welle von niedriger Amplitude an, die zum Ende die isoelektrische Linie kreuzt. Im Gegensatz dazu ist im EKG des Menschen ist die Repolarisationsphase (T-Welle) von der Ventrikel-erregung (QRS) deutlich abgesetzt (rechts). Der Beginn und das Ende der T-Welle lassen sich mit dem Schnittpunkt der isoelektrischen Linie abgrenzen. Eigene Abbildung.

Die Verschiedenheit des EKG von Maus und Mensch verdeutlicht Abb. 3. Im Vergleich zum menschlichen EKG findet sich im EKG der Maus keine klare Trennung der Erregungsausbreitung (QRS) und –rückbildung (ST).

Das expandierende Wissen über das Mausgenom, relativ kurze Gestationszeiten, technische Möglichkeiten, Kosten und ethische Beweggründe machen die Maus zur Spezies der Wahl im Bereich der molekularen Forschung. Transgene Mäuse bieten Einsichten in die Pathogenese elektrophysiologischer Erkrankungen und Überleitungsabnormalitäten. Darüber hinaus stellt das Mausmodell ein wichtiges Bindeglied zur Entwicklung geeigneter Therapien von Arrhythmien dar (Berul 2003).

1.2 Kalium Kanäle

1.2.1 Einteilung

Kalium Kanäle (K^+ Kanäle) stellen die größte Familie aller Ionen-Kanäle dar (Duprat 1997). Sie beeinflussen das Membranpotential, die neuronale Leitfähigkeit, die Muskelerregung und die Hormonsekretion (Rudy 1988). Im Herzgewebe sind K^+ Kanäle entscheidend für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials, die Amplitude und Dauer des AP, die Refraktärität und Automatizität (Lesage und Lazdunski 2000, Nerbonne 2001). Die Familie der K^+ Kanäle umfasst die spannungsaktivierten K_v (I_{to} , I_K , I_{K1}), die ligandengesteuerten einwärtsgerichtenden K_{IR} (I_{KATP} , I_{KAch}) (Nerbonne 2001) und die zweiporenbildenden K_{2P} (Ketchum 1995).

1.2.2 Die Gruppe der K_{2P} Kanäle

Die Gruppe der K_{2P} Kanäle, nach dem *human genome comittee* auch KCNK bezeichnet (Graham 2006), ist erst im Jahr 1995 entdeckt worden (Bayliss 2003, Ketchum 1995). Dazu gehören nach Goldstein 15 Gene, die für K_{2P} Untereinheiten kodieren und sich funktionell in sechs Klassen gliedern lassen (Bryan 2007, Goldstein 2005):

- 1) Schwach einwärtsgerichtende K_{2P} Kanäle (TWIK-1, TWIK-2, KCNK7);
- 2) Mechanisch gesteuerte K_{2P} Kanäle (TREK-1, TREK-2, TRAAK);
- 3) Alkalisch aktivierte K_{2P} Kanäle (TALK-1, TALK-2, TASK-2);
- 4) Säure gehemmte K_{2P} Kanäle (TASK-1, TASK-3, TASK-5);
- 5) Halothan inhibierte K_{2P} Kanäle (THIK-1, THIK-2);
- 6) Calcium aktivierte K_{2P} Kanäle (TRESK).

Ihr gemeinsames Strukturmerkmal sind vier transmembrane Domänen und zwei Poren-formende Schleifen, die sich als Tandem arrangieren (Abb. 4) (Lesage und Lazdunski 2000). Als funktionelle Dimere formieren sich die Untereinheiten zu Homodimeren, sie sind aber auch in der Lage mit anderen Untereinheiten Heterodimere zu bilden wie TASK-1/TASK-3, wodurch sich die Kanalfunktion und -regulation ändert (Czirják und Enyedi 2002, Aller 2005, Honoré 2007, Aller und Wisden 2008).

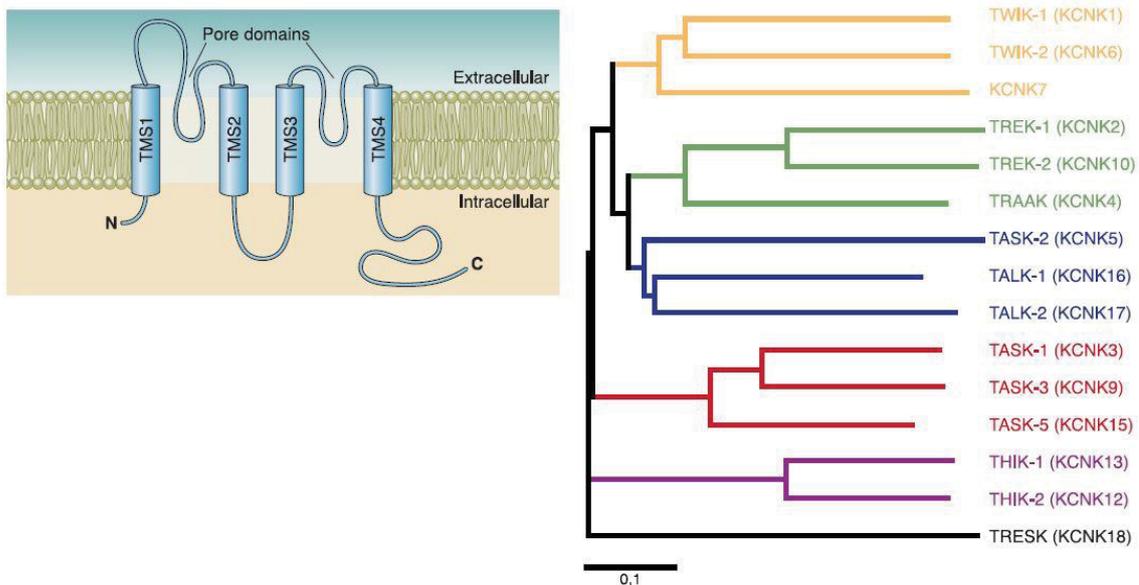


Abb. 4: **Schema und Dendrogramm der K_{2P} Kanäle.**

Schematisch dargestellt eine Kanal-Untereinheit (links) mit vier transmembrane Domänen und zwei porenbildenden Schleifen, die sich mit einer weiteren Untereinheit zum funktionellen Dimer arrangiert. Das Dendrogramm (rechts) der zwei Poren bildenden Kalium Kanäle veranschaulicht ihre Klassifikation nach funktionellen Gesichtspunkten (Einzelheiten im Text). Mit Genehmigung aus Enyedi und Czirják 2010.

Funktionell weisen K_{2P} Kanäle die Charakteristika von selektiven Kalium Hintergrundströmen („background“) für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials auf (Fink 1996, Duprat 1997, Ilan und Goldstein 2001, Bockenhauer 2001). Durch den Ausstrom von Kalium wird die Zelle bei hyperpolarisierten Spannungen, unterhalb des Schwellenpotentials von Nerven und Muskeln, stabilisiert während ein unterdrückter Hintergrundfluss eine Erregung durch Depolarisation erlaubt (Goldstein 2001, Bayliss 2003). Die Offenwahrscheinlichkeit erfolgt nicht spannungsgesteuert (Fink 1996, Duprat 1997), sondern über G-Protein-Rezeptoren, Phosphorylierung (Bockenhauer 2001) und Desumoylation (Rajan 2005), sowie pH-Wert Veränderungen (Duprat 1997, Kim 1999, Aller 2005), Lipide (Maingret 2000) und mechanische Dehnung (Maingret 1999). Die Kanalaktivität der Subtypen TREK-1/2, TASK-1/2/3 und TALK-1 ist unter volatilen Anästhetika wie Isofluran erhöht (Patel 1999, Lesage und Lazdunski 2000, Lazarenko 2010), während die Aktivität bei den Subtypen

TASK-1/2/3 unter den Lokalanästhetika Lidocain und Bupivacain gehemmt ist (Leonoudakis 1998).

1.2.3 Expression und Funktion von TASK-1

TASK-1 wird überwiegend im Herzen, im Nervensystem, Glomus caroticum und der Nebennierenrinde exprimiert (Duprat 1997, Kim 1999, Czirják 2000, Kim 2009). Expressionsanalysen unserer Arbeitsgruppe zeigen eine ausgeprägte Expression von TASK-1 in den Ventrikeln von Mäusen, aber auch in den Atrien des Myokardiums (Hüning 2010) (Abb. 5). Es gibt zunehmend Belege für die funktionelle Rolle von TASK-1 bei der Erhaltung des Ruhemembranpotentials, der Stabilisierung des AP und der Repolarisation in der Physiologie des Herzens (Kim 1999, Putzke 2007, Decher 2011, Donner 2011, Limberg 2011).

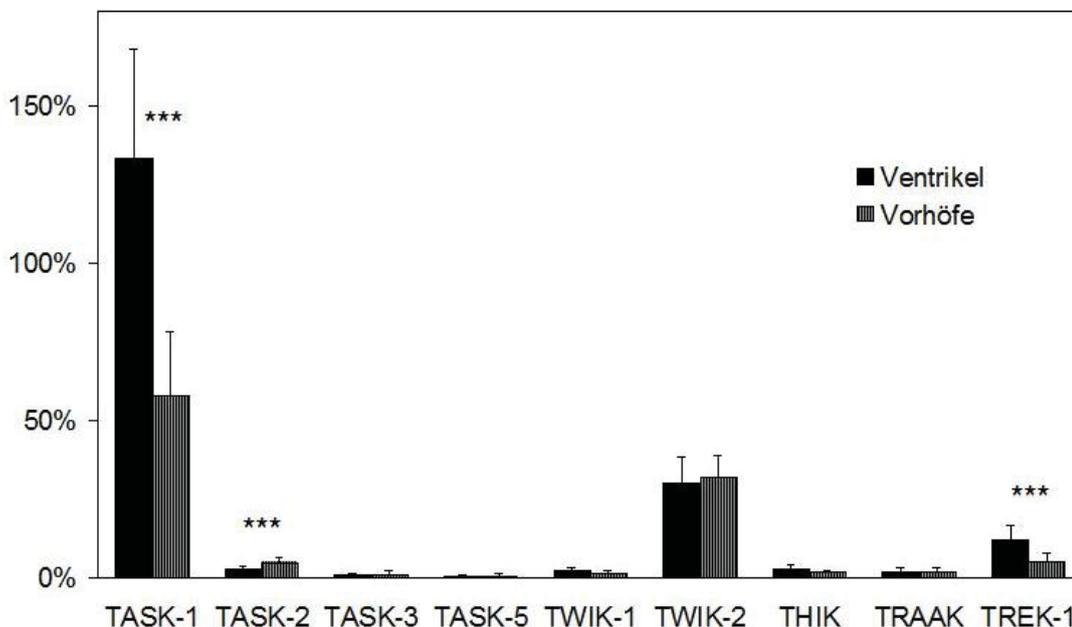


Abb. 5: mRNA Expressionsanalyse von K_{2P} Kanälen in TASK-1^{+/+} Mäusen.

Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von n-Ventrikel = 13-14 sowie n-Vorhöfe = 8-9 (***) $p < 0.001$. n = Anzahl. Aus Hüning 2010.

Auf zellulärer Ebene ist der stabilisierende Einfluss von TASK-1 auf die AP Dauer von *patch-clamp*-Untersuchungen an Kardiomyozyten von Ratten und Menschen bekannt (Putzke 2007, Limberg 2011). Pharmakologisch kann TASK-1 in ventrikulären Kardiomyozyten durch Methoxamin und A293 gehemmt werden, was zu einer signifikanten Verlängerung der AP Dauer in Froscheizellen (*Xenopus*) oder isolierten Kardiomyozyten von Ratten führt (Putzke 2007). Die AP-Verlängerung entsteht ebenso, wenn I_{TASK} in Kardiomyozyten von Ratten durch Endothelin-1 über die Phospholipase C inhibiert wird (Schiekel 2013). In ventrikulären Kardiomyozyten von Mäusen wird TASK-1 durch den Phospholipid Plättchen-aktivierenden Faktor über die Proteinkinase C gehemmt, was zu einer

verzögerten Repolarisation und dem Auftreten von EAD führt (Barbuti 2002, Besana 2004).

1.2.4 Bisherige Erkenntnisse über den kardialen Phänotyp der TASK-1 defizienten Maus

Beim Aufzeichnen kardialer AP in Langendorff perfundierten Herzen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass TASK-1 defiziente Mäuse eine signifikant verlängerte AP Dauer aufweisen (Donner 2011). *In situ* damit im Einklang war das verlängerte QT_c Intervall im Oberflächen-EKG (Decher 2011, Donner 2011). Herzversagen oder strukturelle Abnormalitäten konnten echokardiographisch bei der TASK-1 defizienten Maus als Ursache für die QT Verängerung ausgeschlossen werden (Decher 2011, Donner 2011). TASK-1 kommt demnach eine maßgebliche Rolle bei der kardialen Repolarisation zu.

Sowohl in Ruhe als auch unter körperlicher Aktivität beim Schwimmen bzw. Ergometrie konnte keine erhöhte Inzidenz von Arrhythmien bei TASK-1 defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Donner 2011). Unter Epinephrintestung traten bei beiden Genotypen vermehrt ventrikuläre Extrasystolen, Couplets und Triplets auf, sowie in wenigen Fällen AV-Blockierungen II° (Donner 2011). In menschlichen Vorhöfen unterstützt I_{TASK-1} den aufrechterhaltenden Auswärtsgleichrichter I_{KsUS} und ist daher eine bedeutsame Komponente der Hintergrundleitfähigkeit. Dieser Zusammenhang könnte von funktioneller Relevanz bei der Pathogenese des Vorhofflimmerns sein (Limberg 2011).

TASK-1 ist an der Regulation der Herzfrequenzvariabilität (*heart rate variability*, HRV) beteiligt und beeinflusst den Barorezeptorreflex (Donner 2011). Die Analyse der HRV mit den Parametern der Zeit- und Frequenzdomänen im 24 Stunden EKG deutet auf eine verminderte autonome Regulationsfähigkeit und eine Überlegenheit des Sympathikus bei den TASK-1 defizienten Mäusen hin. Die erhöhte mittlere Herzfrequenz unterstreicht ebenfalls diese Hypothese (Donner 2011).

Während TASK-3 Defizienz beim Menschen das mütterlich vererbte Birk-Barel-Syndrom mit mentaler Retardierung, Hypotonien und Gesichtsdysmorphien hervorruft (Barel 2008), konnte bislang keine Ionenkanalkrankheit auf Mutationen in TASK-1 zurückgeführt werden. Aufgrund der bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse scheint TASK-1 aber eine wichtige Rolle für die kardiovaskuläre Funktion zu spielen, da es die Repolarisation und autonome Regulation des Herzens zu beeinflussen scheint.

1.3 Ziele und Fragestellungen der Arbeit

Der Stand der Wissenschaft verdeutlicht den Bedarf weiterer Grundlagenforschung für das Verständnis der Entstehung von Herzrhythmusstörungen und deren Folgen. Sowohl der Phänotyp der AP Verlängerung als auch der QT Verlängerung der TASK-1 defizienten Maus führten zur Fragestellung, ob sich Besonderheiten in der invasiven intrakardialen Untersuchung zeigen und ob ein arrhythmogenes Potential besteht. Außerdem stellten wir uns die Frage, welche Rolle TASK-1 bei der autonomen kardialen Regulation einnimmt. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur *in vivo* Charakterisierung des kardialen Phänotyps der TASK-1 defizienten Maus leisten, um die bisherigen Erkenntnisse zu spezifizieren und die kardiale Elektrophysiologie bei der Arrhythmogenese besser zu verstehen. Die Experimente wurden im direkten Vergleich an beiden Genotypen TASK-1^{+/+} (Wildtyp) und TASK-1^{-/-} (defiziente Maus) durchgeführt (Abb. 6). Es wurden drei Studienziele formuliert:

- 1) Die Analyse der QT und QTc Zeiten im Oberflächen-EKG in Ruhe in TASK-1^{+/+} und TASK-1^{-/-} Mäusen soll Aufschluss über den Einfluss von verschiedenen Anästhetika auf die QT Zeit Verlängerung geben. Durch Gabe von Isoprenalin wird zudem die Abhängigkeit der QT Zeit Verlängerung von der Herzfrequenz untersucht.
- 2) TASK-1^{+/+} und TASK-1^{-/-} Mäuse werden im Rahmen einer Katheterintervention elektrophysiologisch untersucht, um gezielt Erregungsleitungs-Eigenschaften sowie die elektrische Vulnerabilität für atriale und ventrikuläre Herzrhythmusstörungen vor und nach beta-adrenerger Stimulation zu testen.
- 3) Auf Basis der eingeschränkten HRV bei den TASK-1^{-/-} wird schließlich die *Heart Rate Turbulence* (HRT) nach induzierten ventrikulären Extrasystolen an TASK-1^{+/+} und TASK-1^{-/-} Mäusen studiert, um den Einfluss von TASK-1 auf den Barorezeptorreflex zu prüfen.

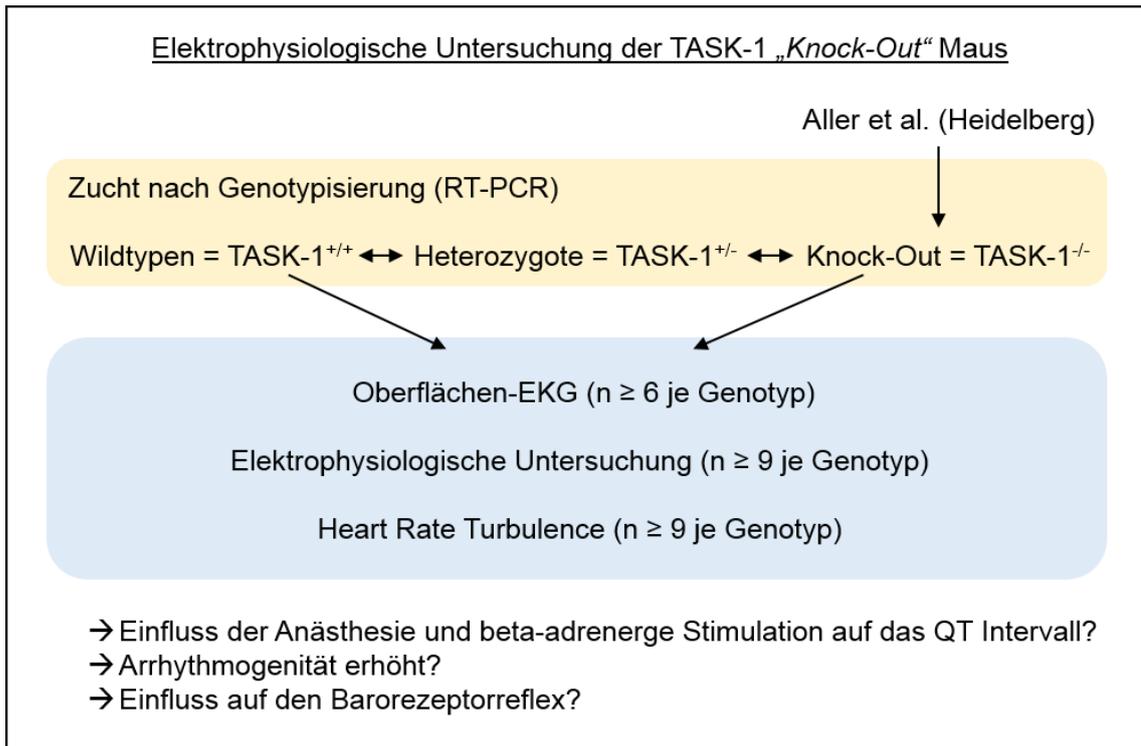


Abb. 6: **Studiendesign im Überblick.**

Die TASK-1 „Knock-Out“-Maus wurde in Heidelberg generiert (Aller 2005) und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt, um TASK-1 im Herzen elektrophysiologisch zu charakterisieren. Beige unterlegt die Genotypisierung nach *real-time* PCR. Hellblau unterlegt die elektrophysiologischen Untersuchungsschritte. n = Anzahl. Eigene Abbildung.

2 Material und Methoden

2.1 Einführung

2.1.1 Die TASK-1 „Knock-Out“ Maus

Für die Experimente wurden TASK-1 defiziente Mäuse verwendet, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. William Wisden am Institut für Klinische Neurobiologie, Universität Heidelberg, generiert worden sind (Aller 2005).

Die Herstellung der „TASK-1 Knock-Out Maus“ (KO) erfolgte durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen. In der TASK-1 kodierenden Sequenz des Mäusegenoms wurde ein klonierender Vektor eingebracht, der aus einem Grundgerüst des TASK-1 Gens und einer lacZ-Kassette „TAG₃IRESlacZpAneoA“ besteht. Bei der homologen Rekombination wurde das Exon-1 des TASK-1 Gens zusätzlich noch um 72 Basenpaare deletiert (Abb. 7).

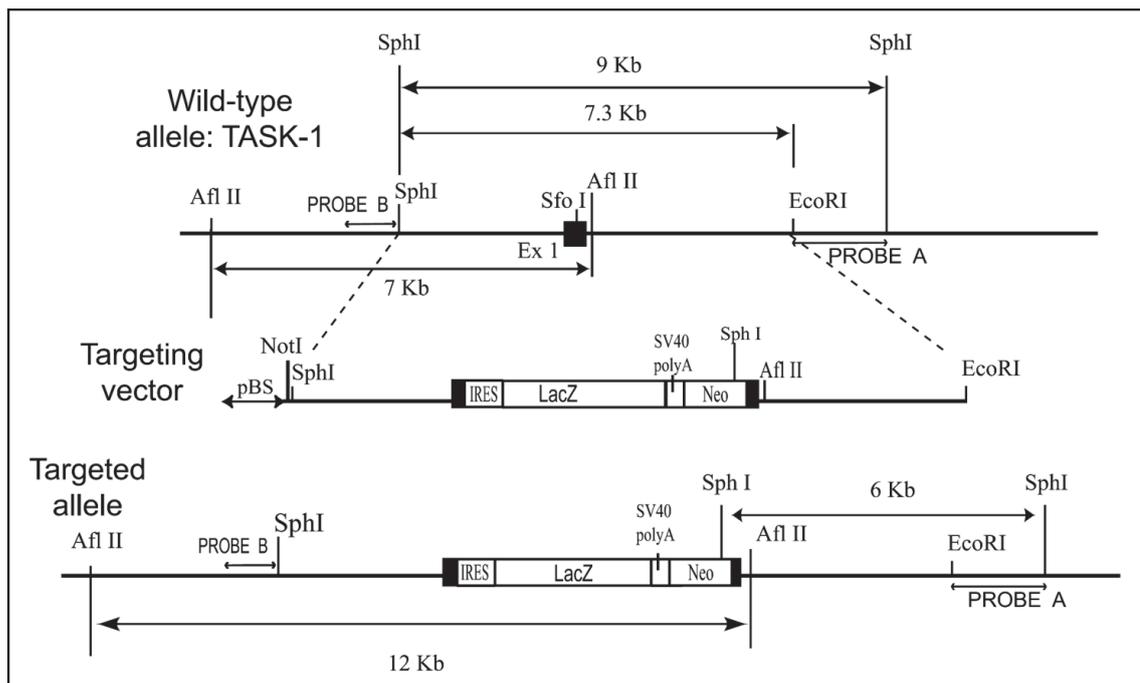


Abb. 7: Herstellung der TASK-1 „Knock-Out“ Maus durch homologe Rekombination von Exon 1 des TASK-1-Gens.

Das erste kodierende Exon (Ex 1, gefüllte Box) der nativen TASK-1 kodierenden Region (oben) wurde nach reverser Transkription in cDNA auf ein bakterielles künstliches Chromosom überführt. Um den Ziel-Vektor (*targeting vector*, Mitte) herzustellen, wurde die 9 Kb große SphI-Region subkloniert und auf ein Plasmid (pBS = pBluescript) übertragen, vom Restriktionsenzym EcoRI zum 7.3 Kb großen SphI-EcoRI-Fragment verdaut und religiert. In die einzigartige SfoI-Region von Ex 1 wurde anschließend die lacZ-Kassette eingefügt. IRES = internal ribosome entry site, lacZ = β -Galaktosidase-Bindeglied, SV40 poly A = Simian virus 40 polyadenylation, Neo = Neomycin. Der so entstandene Ziel-Vektor (unten) wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym NotI linearisiert und in embryonale Mäusestammzellen eingebracht. Mit Genehmigung aus Aller 2005.

Somit wurde die für die erste transmembrane Domäne bis zur ersten porenbildenden Schleife kodierende Region zerstört und das TASK-1 Gen inaktiviert. Anschließend wurde das veränderte Genom in die Blastozysten von C57Bl/6-Mäusen überführt (Aller 2005).

TASK-1 defiziente Mäuse (TASK-1^{-/-}) erscheinen gesund, haben eine typische Lebenserwartung und pflanzen sich normal fort (Aller 2005). Die Größe und Morphologie des Herzens ist normal in den Mutanten (Aller 2005). Mäuse sind derzeit die einzige Spezies, bei der TASK-1 erfolgreich ausgeschaltet werden konnte (Hüning 2010). Unserer Projektgruppe lieferte das Modell der TASK-1^{-/-} Maus die Möglichkeit, gezielt den Einfluss dieses Proteins auf die Herzfunktion zu charakterisieren.

2.1.2 Haltung und Zucht der Versuchstiere

Die Mäuse wurden in der Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf (Leiter Priv.-Doz. Dr. vet-med. Sager) gehalten. Die Käfige für die Zuchtpaare waren 350 bzw. 530 cm³ groß, 14 cm hoch und eingestreut mit Lignocel 3/4-S (J. Rettmaier & Söhne GmbH & Co KG), Tanne und Fichte gemischt. Die Umweltbedingungen wurden bei einer Temperatur von 22 ± 2°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55±5% und einer Beleuchtungszeit von 6 bis 18 Uhr MEZ mit 320 Lux auf konstantem Niveau gehalten. Ein Luftwechsel fand 22-fach pro Stunde statt. Die Mäuse wurden mit 15 mm autoklaviertem Futter „ssniff“ (Spezialdiäten GmbH) nach Belieben gefüttert und bekamen ozonisiertes Stadtwasser, angesäuert mit HCl auf pH 2,8 – 3, aus Trinkflaschen zur freien Verfügung.

Im Alter von drei Wochen wurden die Jungen umgesetzt und die Wurfgeschwister nach Geschlecht getrennt. Dabei wurden die Schwanzspitzen zur DNA Gewinnung für die Genotypisierung gekürzt und die Mäuse mittels Ohrlochung markiert. Die genotypisierten Tiere wurden nach Erlangung ihrer Geschlechtsreife im Alter von acht Wochen weiter verpaart und in das Versuchsprogramm aufgenommen. Verpaarungsstrategie war die Verpaarung heterozygoter Geschwistertiere, um möglichst TASK-1^{-/-} Mäuse und Wildtypen als Kontrollen zu erhalten. Einmal verpaarte Männchen blieben nach der Trennung von den Weibchen einzeln im Käfig. Zur Verbreiterung der Zucht wurden CL57Bl/6 eingekreuzt, die ursprünglich zur Entwicklung der transgenen TASK-1^{-/-} Maus genommen worden sind (Aller 2005). In einem Buch wurden Zucht und Genotypisierung dokumentiert.

2.1.3 Genehmigung für Tierversuche

Die Versuchsvorhaben wurden gemäß §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) NRW genehmigt; Aktenzeichen: 84-02.04.2011.A073 „Elektrophysiologische Untersuchung an Wildtypen und der TASK-1 defizienten Maus“.

Die durchgeführten Tierexperimente erfolgten gemäß der „*Convention of the National Institute of Health Guide for the care and use of Laboratory Animals*“ (Institute for Laboratory Animal Research 2011).

2.2 *In vitro* Analysen

Die Tierzucht erfolgte nach *in vitro* Bestimmung des Genotyps mittels *real-time* PCR.

2.2.1 Geräte

- Minizentrifuge Mini Spin plus, Eppendorf
- PCR Cycler ABI 7500® Real-Time PCR System, Applied Biosystems
- Pipetten Research 10/ 100/ 200 µl, Eppendorf
- Spectrophotometer NanoDrop™, Thermo Scientific Fisher Inc.
- Thermomixer Thermomixer compact, Eppendorf
- Vortex Cenco Instrumenten b.v.
- Zentrifuge Multifuge 3 S-R, Heraeus Holding GmbH

2.2.2 Computer und Software

- NanoDrop™ Thermo Fisher Scientific GmbH ND-1000, Schwerte
Nanodrop 1000 Operating Software, Version 3.7
- Applied Biosystems ABI 7500® Sequence Detection System (SDS)
Version 1.4
- Computer Windows Vista, Lenovo
- Textverarbeitung Word® 2003, Microsoft

2.2.3 Kits und Verbrauchsmaterialien

- DNA-Isolierung DNeasy® Blood & Tissue Kit, QIAGEN, Hilden
- Eppendorf Tubes® Safe Lock Tubes 0,5 ml, Eppendorf

- PCR HotStarTaq PCR Kit (QIAGEN, Hilden); QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit, QIAGEN, Hilden; MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Applied Biosystems; MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, Applied Biosystems
- Pipettenspitzen TipOne 1-200 µl, Starlab GmbH

2.2.4 Chemikalien

- 2,2-Tribromoethanol SIGMA-A. Chemie GmbH
- 2-Methyl-2-butanol SIGMA-A. Chemie GmbH
- Ethanol Für die Mikrobiologie (Merck KgaA)
- Oligonukleotide 0,2 µmol/Oligonukleotid (MWG Biotech)

2.2.5 Genotypisierung

Der Assay zur Genotypisierung mittels PCR wurde in unserem Forschungslabor implementiert (Hüning 2010). Grundlage dieses Assays waren die beschriebenen Basensequenzen von Aller et al. (Aller 2005) und die Erkenntnis, dass der Nachweis von lacZ sowie der deletierten Region eine Zuordnung zum Genotyp erlaubt. Die Träger des defizienten TASK-1 Gens mit eingebrachter lacZ-Kassette sind lacZ positiv (TASK-1^{-/-}, TASK-1^{+/-}) und die deletierte Stelle lässt sich nicht mehr bzw. nur noch bei Heterozygoten (TASK-1^{+/-}) amplifizieren. Dahingegen weisen die Träger des intakten TASK-1 Gens (TASK-1^{+/+}, TASK-1^{+/-}) nach wie vor die 72 Basenpaare lange Basensequenz auf, sind jedoch für lacZ negativ, ausgenommen Heterozygote (TASK-1^{+/-}). Die Genotypisierung wurde im S1-Labor der Kinderkardiologie vorgenommen.

DNA Isolierung

Zur Identifizierung der TASK-1^{-/-} Mäuse, Wildtypen oder Heterozygoten wurde DNA aus den Schwanzspitzen der drei Wochen alten Nachwuchsmäuse mit Hilfe des „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Qiagen GmbH 2006) gewonnen. Im Folgenden ist das Protokoll beschrieben (Abb. 8).

Die bei -70°C gelagerten Schwanzspitzen wurden im Ganzen in ein Reaktionsgefäß mit Gewebs-Lyse-Puffer und Proteinase K versetzt. Das Gemisch wurde über Nacht in einem Thermomixer bei 56°C bei mittlerer Stufe geschüttelt. Nach 6-8 Stunden wurden die lysierten Schwanzspitzen gründlich geschüttelt und mit DNA-Lyse-Puffer sowie 96 – 100 %-igen Ethanol für die Mikrobiologie (Merck KgaA) bei Raumtemperatur vermengt. Anschließend wurden die Proben auf die Silikonmembran der DNeasy Mini spin column von

QIAGEN pipettiert und eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. In den folgenden Schritten wurden die Proben mit zwei Waschpuffern durch Zentrifugation gewaschen und getrocknet. Der Waschvorgang befreit die DNA von Verunreinigungen und Enzymhemmern während die DNA an der Silikonmembran gebunden bleibt. Im letzten Schritt wurde die auf der Silikonmembran verbliebene DNA mit Elutions-Puffer zunächst eine Minute inkubiert und danach einmal eluiert.

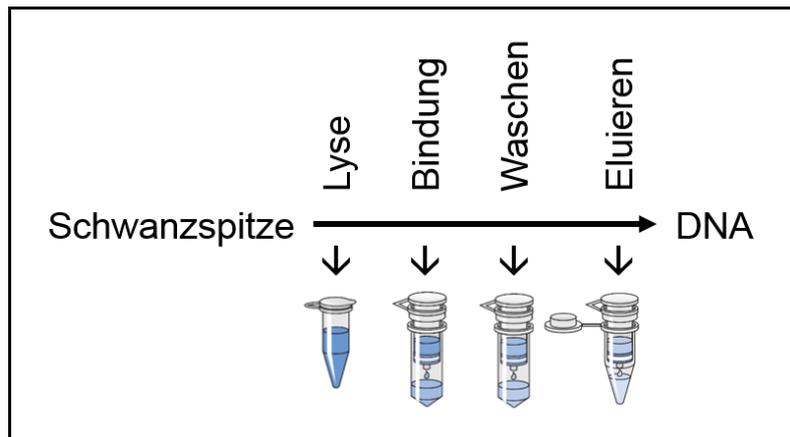


Abb. 8: **DNA Isolierung mit dem DNeasy® Blood&Tissue Kit.**

Die Gewinnung von DNA aus den Schwanzspitzen erfolgte nach der Anleitung des Herstellers. Mit Hilfe des Gewebs-Lyse-Puffers und Proteinase K wurden die Schwanzspitzen für 6-8 Stunden lysiert. Danach wurde dem Gemisch DNA-Lyse-Puffer und Alkohol hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben auf eine Silikonmembran aufgetragen und in zwei Stufen mit Waschpuffern gereinigt. Schließlich wurde die DNA mittels Elutions-Puffer von der Silikonmembran gelöst. Modifiziert nach Qiagen GmbH 2006.

Spektrophotometrie

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die erhaltene Lösung mit einem automatischen Spektrophotometer „Thermo Scientific NanoDrop™ 1000“ und der *Software* „ND-1000“ Version 3.7 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) am Computer quantifiziert. Hierbei wird die Konzentration der Nukleinsäuren mit Hilfe der spektralphotometrischen Messung der optischen Dichte entsprechend einer Formel bestimmt, die sich aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz herleitet:

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = (\text{OD}_{260} \times e_{\lambda}) / d$$

c = Konzentration der Ausgangslösung

OD_{260} = gemessene optische Dichte bei 260 nm

d = Schichtdicke des durchstrahlten Körpers 0.02 - 0.1 cm

e_{λ} = spezifischer Extinktionskoeffizient (RNA: 40 $\mu\text{g/ml}$, DNA: 50 $\mu\text{g/ml}$)

Die sogenannten Extinktionsmessungen erfolgten bei den Wellenlängen $\lambda = 260$ nm (OD_{260}) für Nukleinsäuren, da sich dort jeweils das Absorptionsmaximum befindet. Die OD sollte zwischen 0,1 und 1 liegen, da nur in diesem Bereich

Extinktion und Konzentration proportional zueinander sind. Verunreinigungen der Probe mit Proteinen oder genomischer DNA sind bei einem Koeffizienten aus OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,8 für DNA und 2,0 für RNA (Thermo Scientific 2010) allenfalls gering. Vor jeder Einzelmessung wurde die Glasfaseroptik beider Messkontakte des Spektralphotometers mit RNase- und DNase-freiem Wasser gereinigt und mit einem feinen Tuch abgewischt. Zum Nullabgleich wurde die Pufferlösung genommen. Anschließend wurde die gelöste RNA bzw. DNA jeder Probe quantifiziert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte zum einen als Referenz für eine erfolgreiche DNA-Isolierung und zum anderen für die Berechnung der PCR.

Semi-quantitative real-time PCR

Zur Genotypisierung der Zuchttiere wurde die *real-time* PCR als effizientes Verfahren im Forschungslabor von Martina Schullenberg und Anja Hüning implementiert (Hüning 2010). Somit konnte der *Southern Blot* als Alternativmethode mit Verwendung von radioaktivem Schwefel umgegangen werden.

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) werden selektive DNA-Sequenzen *in vitro* amplifiziert, um sie in messbaren Konzentrationen nachweisen zu können. Für die PCR werden die *template*-DNA, synthetisch hergestellte *primer*, die HotStarTaq-DNA-Polymerase und ein Nukleotid-Mix benötigt. Für die spezifische Amplifizierung der gewünschten Gensequenz ist die Kenntnis von einigen Basenpaaren für das Design der *primer* die Voraussetzung. Die *primer* sind sequenzspezifische Oligonukleotide, welche den Start- und Endpunkt für die Taq-DNA-Polymerase während der DNA-Synthese markieren.

Die Polymerase katalysiert die Reaktion der Substanzen in drei Phasen, die in etwa 40 Zyklen wiederholt werden. Produkte aus den vorherigen Zyklen dienen als Ausgangssubstanz des folgenden Zyklus, so dass die DNA exponentiell vervielfältigt wird. Idealerweise wird ein Amplifikationsprodukt von der Ausgangsmenge multipliziert mit 2^n (n = Anzahl Zyklen) erreicht. Prinzip der Vervielfältigung in drei Phasen (Mullis 1986):

- 1) Denaturierung: Auftrennung des DNA-Doppelstrangs durch Lösung der quervernetzenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Einzelsträngen bei hoher Starttemperatur von etwa 95°C.
- 2) Hybridisierung: Nach Abkühlen auf 60°C bzw. 5°C unter der Schmelztemperatur der *primer* binden die Primer an die komplementäre *template*-Sequenz, als Basis für den neuen DNA-Doppelstrang.

- 3) Elongation: Die DNA-Polymerase verlängert bei einem Temperaturoptimum von etwa 72°C den *primer* entlang der denaturierten Matrizen-DNA durch Anhängen weiterer Nukleotide in 5'-3'-Richtung.

Die hier verwendete sogenannte semi-quantitative *real-time* PCR misst bereits während der Amplifikation die entstehenden PCR-Produkte durch fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide. Bei der Entstehung doppelsträngiger DNA bindet der Farbstoff SYBR Green und emittiert Lichtsignale (blaues Licht $\lambda_{\max} = 494$ nm; grünes Licht $\lambda_{\max} = 521$ nm), die vom Thermocycler gemessen werden können (Qiagen GmbH 2011). Die Signalintensität der nach jedem Zyklus gemessenen Fluoreszenz korreliert in der exponentiellen Phase direkt proportional mit der Konzentration der vervielfältigten doppelsträngigen DNA. Es werden drei Phasen unterschieden (Abb. 9):

- 1) Exponentielle Phase: Je Zyklus verdoppelt sich das Ausgangsprodukt, da die Reaktion sehr spezifisch und präzise ist.
- 2) Lineare Phase: Unter Verbrauch der Reaktionskomponenten entstehen immer weniger Produkte.
- 3) Plateau Phase: Reaktionsende, es entstehen keine weiteren Produkte.

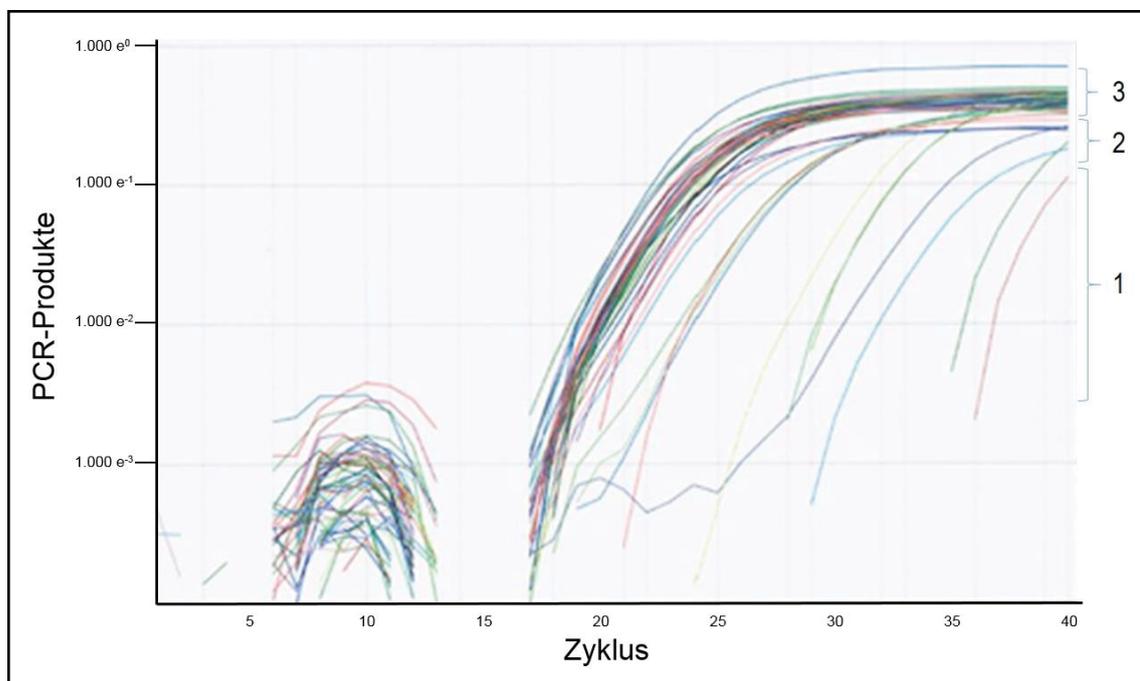


Abb. 9: **Logarithmische Darstellung der Amplifikation mit der *real-time* PCR.**

Exponentielle (1), lineare (2), Plateau- (3) Phase. Zum Prinzip der *real-time* PCR siehe Text. Y-Achse = Logarithmus der PCR-Produkte, X-Achse = Anzahl der Zyklen der *real-time* PCR. Eigene Abbildung.

Bei der Sequenzierung des TASK-1 Gens mit der eingebrachten Kasette „TAG3IRESlacZpAneopA“ zeigte sich eine Deletion von 72 Basenpaaren des Exons 1 (Aller 2005). Aus diesem Grund wurde ein primer Paar ausgewählt, das die lacZ Domäne der neu eingebrachten Kasette in der *Knock-Out*- sowie der heterozygoten Maus erkennt (Vorwärts 5'-ccc att acg gtc aat ccg c-3'). Ein zweites primer Paar wurde für die deletierten Sequenz im Exon-1 von TASK-1 entworfen, welche bei der Wildtyp- und heterozygoten Maus nachweisbar ist (Vorwärts, 5'-aga atg tgc gca cgt tgg c-3'). Der Nachweis der Amplifikation von lacZ in der PCR muss demnach für den Genotyp TASK-1^{-/-} und TASK-1^{+/-} gelingen. Für Träger des Exon-1 des TASK-1 Gens, TASK-1^{+/+} und TASK-1^{+/-} gelingt hingegen der Nachweis der Deletionsstelle (Tabelle 3).

| Genotyp | <i>primer</i> | PCR Nachweis |
|-----------------------|--|---------------------|
| TASK-1 ^{+/+} | 5'-aga atg tgc gca cgt tgg c-3' | Del pos., lacZ neg. |
| TASK-1 ^{+/-} | 5'-aga atg tgc gca cgt tgg c-3' 5'-ccc att acg gtc aat ccg c-3' | Del pos., lacZ pos. |
| TASK-1 ^{-/-} | 5'-ccc att acg gtc aat ccg c-3' | Del neg., lacZ pos. |

Tabelle 3: **Genotypisierung mittels *real-time* PCR.**

Del = deletierte Sequenz im Exon-1 des TASK-1 Gens, lacZ = lacZ-Sequenz, Bestandteil der an der Deletionsstelle von Exon-1 des TASK-1-Gens inserierten Kasette. Heterozygote Merkmalsträger (TASK-1^{+/-}) sind für beide Sequenzen, Del und lacZ, positiv.

Alle *primer* wurden über die Firma Eurofins MWG GmbH (Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg; <http://www.eurofinsgenomics.eu/>) bezogen. Die lyophilisierten *primer* wurden nach Herstellerangaben in einem vorgegebenen Volumen RNase-freien Wasser zur Herstellung einer konzentrierten Stammlösung gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden Aliquots hergestellt, um wiederholtes Auftauen, Einfrieren und Kontaminationen vorzubeugen. Die Lagerung der *primer*-Lösungen erfolgte bei -20°C. Für die *real-time* PCR wurde die HotStarTaq-Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland) gewählt. Sie ist eine modifizierte DNA Polymerase, die bei Raumtemperatur inaktiv ist und einen initialen Aktivierungsschritt bei 95°C benötigt. Dieser „*Hot Start*“ unterscheidet sie von der konventionellen thermostabilen DNA-Polymerase, welche bereits bei niedrigen Temperaturen aktiv ist. Während der Reaktionsvorbereitung bei Raumtemperatur entstehen somit keine falschen *real-time* PCR Produkte oder *primer*-Dimere. Erst nach vollständiger Denaturierung der DNA, startet die PCR. Als Farbstoff für die Signalmessung der *real-time* PCR wurde SYBR Green I, ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, benutzt. Die Durchführung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers (Qiagen GmbH 2011).

Protokoll der *real-time* PCR

Die Proben sowie die Kontrollen wurden als Duplikate angefertigt. Nach Konzentrationsbestimmung der DNA konnte für jede Vertiefung der PCR-Titerplatte eine gleiche Ausgangsmenge von 350 ng entsprechend verdünnt werden. Zur Positivkontrolle wurde die DNA homozygoter Merkmalsträger (TASK-1^{+/+} und TASK-1^{-/-}) und eines heterozygoten Tieres (TASK-1^{+/-}) genommen. Als Negativkontrolle für beide *primer* wurde RNase-freies Wasser an Stelle der *template*-DNA den Proben hinzugefügt. In der Analyse der Dissoziationskurven konnten mögliche Kontaminationen, die zu einem Abweichen von der Kontrollkurve führen, überprüft und von der Wertung ausgeschlossen werden. Jeweils 25 µl pro Vertiefung Reaktionsansatz setzten sich wie folgt zusammen:

| | |
|--|------------------------|
| DNA (verdünnt mit RNase freiem Wasser) | 9,5 µl (350 ng / well) |
| / RNase-freies Wasser (Negativkontrolle) | 9,5 µl |
| <i>primer</i> F (Stammlösung 100 µM) | 0,6 µM = 1,5 µl (1:20) |
| <i>primer</i> R (Stammlösung 100 µM) | 0,6 µM = 1,5 µl (1:20) |
| Master Mix (QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit) | 12,5 µl |

Die Reaktionskomponenten wurden zügig auf Eis pipettiert und bis zum Transfer in die PCR Maschine auf Eis gelagert. Die Proben wurden dann auf die 96-well Platte überführt.

Die *real-time* PCR wurde wie folgt programmiert:

1. 95°C für 15 min (Initialisierung der HotStarTaq-Polymerase)
 2. 94°C für 15 s
 3. 60°C für 30 s
 4. 72°C für 35 s
- } 40 Zyklen
5. Dissoziation (95°C - 15 s; 60°C – 60 s; 95°C – 15 s; 60°C – 15 s)

Auswertung *real-time* PCR

Die Auswertung der *real-time* PCR erfolgte mit der Software SDS v1.4 (Applied Biosystems). Mit Hilfe der *Software* wurden Amplifikationskurven des jeweiligen *primer* lacZ und Del generiert. In den ersten Zyklen bis zum signifikanten Anstieg des Basissignals werden unspezifische Hintergrundsignale gemessen (Qiagen GmbH 2011). Diese erste Phase nennt sich *baseline* und beschreibt den ersten Schwellenwert in der Datenanalyse der PCR üblicherweise zwischen dem 3.-15. PCR-Zyklus. Hier finden sich unspezifische Fluoreszenzschwankungen, die alle unterhalb des ersten eindeutigen Signalanstiegs kompensiert werden. Oberhalb

der Baseline wird die sog. *threshold* adjustiert. Die *cycle threshold* (Ct) entspricht der Zykluszahl, die notwendig ist, um einen Schwellenwert neu synthetisierter DNA zu erreichen. Dieser Schwellenwert wird in der logarithmischen Darstellung des Amplifikationsplots der PCR platziert, bei der eine exponentielle Zunahme der DNA Konzentration zu verzeichnen ist. An diesem Punkt ist ein konstantes Fluoreszenzniveau erreicht. Die Amplifikationskurven oberhalb der Ct sprechen für den positiven Nachweis vom lacZ-Gens bei den *Knock-Out*- (Abb. 10) bzw. von der Deletionsstelle bei den Wildtyp-Mäusen (Abb. 11). Je stärker die DNA-Konzentration desto geringer die Zykluszahl bei der die Ct erreicht wird. Unterhalb der Ct verlaufende Amplifikationskurven ohne lineare Phase sind negativ zu werten (bei *Knock-Out*-Mäusen fehlende Sequenzierung mit *primer* Del und bei Wildtypen keine Sequenzierung mit *primer* lacZ), während ein Amplifikationsbeginn erst bei hoher Zykluszahl für heterozygote Merkmalsträger mit schwach positivem DNA-Anteil sprechen, wenn sowohl die lacZ- als auch die Deletionssequenz nachweisbar ist. Die Spezifität wurde an Hand der Dissoziationskurven, auch Schmelzkurven genannt, überprüft.

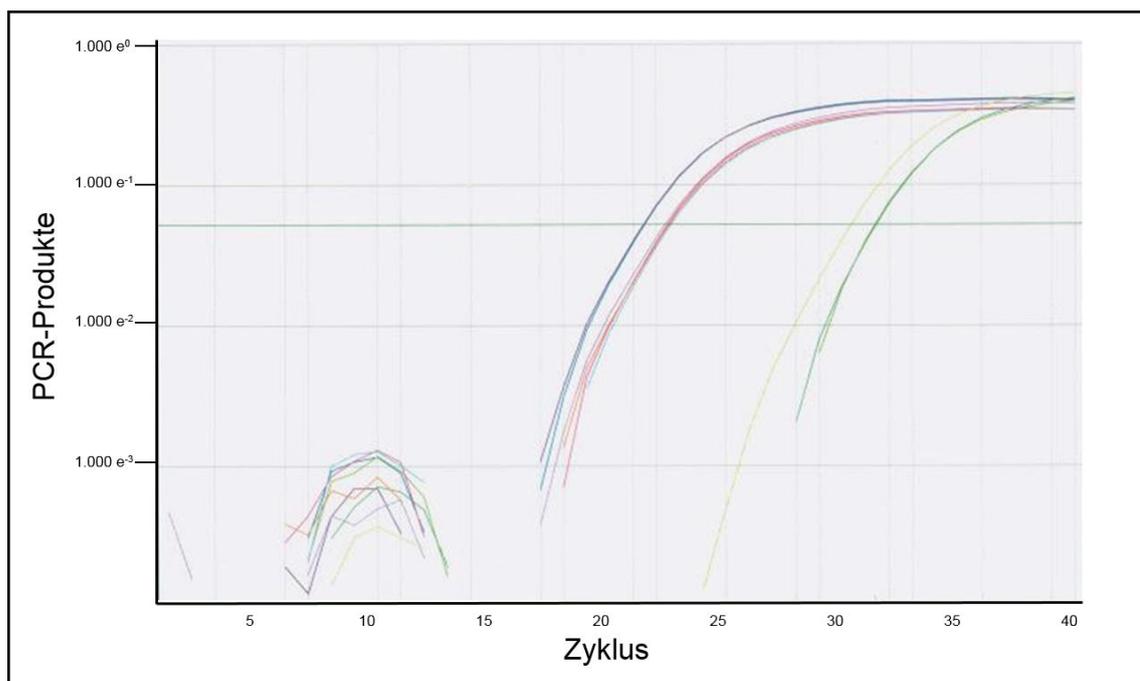


Abb. 10: **Amplifikation mit *primer lacZ* in der *real-time* PCR.**

Logarithmische Darstellung der PCR-Produkte gegen die Anzahl der Zyklen. Die Ct wird im 21. / 22. Zyklus während der exponentielle Amplifikationsphase erreicht, was für einen positiven Nachweis von lacZ spricht. Drei Amplifikationskurven erreichen die Ct erst im 30. / 31. Zyklus, entsprechend einem schwächeren DNA-Anteil beim heterozygoten Merkmalsträger. Unspezifische Signale wurden hier im Bereich der Zyklen 6 – 13 gemessen, von denen einige die Ct nicht erreichen und als negativ gewertet worden sind. Y-Achse = Logarithmus der PCR-Produkte, X-Achse = Anzahl der Zyklen der *real-time* PCR. Eigene Abbildung.

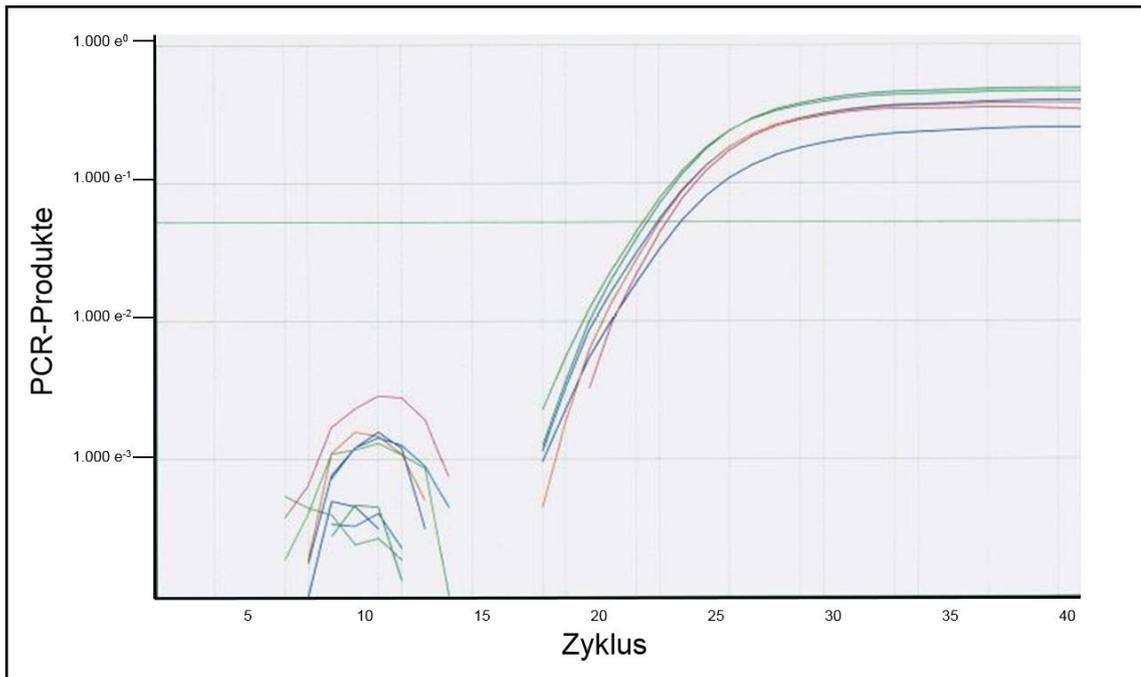


Abb. 11: **Amplifikation mit primer Del in der real-time PCR.**

Logarithmische Darstellung der PCR-Produkte gegen die Anzahl der Zyklen. Die Ct wird im Bereich des 21. – 23. Zyklus erreicht. Diese Amplifikationskurven stehen für das Vorliegen der Deletionsstelle bei den Wildtyp-Tieren. Y-Achse = Logarithmus der PCR-Produkte, X-Achse = Anzahl der Zyklen der *real-time* PCR. Eigene Abbildung.

2.3 *In vivo* Analysen

2.3.1 Geräte

- Animal BioAmp® ML 136, ADInstruments, Spechbach, Deutschland
- Beheizbarer OP-Tisch *Small Operating Table* 816-503001-1, BioScience, Sheerness, UK
- BioAmp Cable® ADInstruments, Spechbach, Deutschland
Maßanfertigung für Pins des Elektrodenkatheters
- Connector Cable™ CIB'ER MOUSE™, NuMED Inc., Hopkinton, USA, PIN 8, 200 cm Länge
- Elektrodenkabel Maus 29 gauge, ADInstruments, Spechbach, Deutschland
- Elektrodenkatheter CIB'ER MOUSE™ Electrophysiology Catheter, NuMED, Inc., Hopkinton, USA
 - Bipolar 1.0 french, 0,5 mm Elektrodenabstand und –länge
 - Oktapolar 2.0 french, 0.5 mm Elektrodenabstand und –länge
- Elektrorasierer Contura, Wella, Darmstadt, Deutschland
- Lichtquelle KL1500 LCD, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

- Mikroskop *Stereo Zoom Microscope*, Modell GZ6, Leica Micro systems GmbH, Wetzlar, Deutschland
- PowerLab 8/30® ML 870, ADInstruments, Spechbach, Deutschland
- PowerLab 26T® ADInstruments, Spechbach, Deutschland
- Pulse Transducer ADInstruments, Spechbach, Deutschland
- STG 4002 Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Deutschland

2.3.2 Computer und Software

- Computer Medion Windows 7
- Lenovo Windows Vista
- LabChart® ADInstruments, Version 7.2
- MC_Stimulus II Multi Channel Systems MCS GmbH, Version 3
- Statistik GraphPad Software, Inc., GraphPad Prism 5.02
- Textverarbeitung Microsoft, Office 2003
- Literaturverwaltung Swiss Academic Software GmbH, Citavi® 3.3.0

2.3.3 Instrumente und Verbrauchsmaterialien

- Aqua destilliert Zum Spülen des Elektrodenkatheters
- Kodan® Tinktur forte, farblos, Schülke, Norderstedt, Deutschland
- Operationsbesteck Anatomische Pinzette
Pinzetten krumm spitz fein
Mikroschere
Gefäßhalter Pinzette manuell vorgebogen
Klemmgewicht/Nahtklemme
- Seidenfaden Fein geflochten, No. 18020-60, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Spritzen Micro-Fine U-100 Insulin, 0,5 ml, BD Medical, Heidelberg, Deutschland
- Transpore™ Transparentes Tape, 3M, Neuss, Deutschland
- Vakuumfiltersystem Corning® 500 ml Vacuum Filter System, 0,45 µm, Tewksbury, USA
- Weiche Tücher Clou Prestige tissues, WEPA Professional GmbH, Arnsberg, Deutschland

2.3.4 Pharmaka

Pentobarbital

Das Barbiturat Pentobarbital ist ein langwirkendes Injektionsnarkotikum mit einer Wirkdauer von 4 – 8 Std. beim Menschen (Karow 2012) und hat die Chirurgie vor 160 Jahren revolutioniert (Zeller 2007). In der Veterinärmedizin wird es noch zur Prämedikation, Allgemeinnarkose sowie Einschläferung genutzt, da seine Latenzzeit bis zur Wirkung lediglich 2 – 3 Min. beträgt (Löscher 2006). Pentobarbital moduliert ein breites Spektrum zentralnervöser Rezeptoren. Dazu gehören die β_3 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (Zeller 2007), nikotinische Acetylcholin-, AMPA-, Kainat- und Glycin – Rezeptoren (Krasowski und Harrison 1999). Nebenwirkungen sind Atemdepression bis Atemstillstand bei Überdosierung, während der Herz-Kreislauf nur schwach gedrosselt wird (Löscher 2006). Bei einer Dosis von 60 mg/kg intraperitoneal (i.p.) werden Intervallverlängerungen von PQ, QRS, QT und RR beschrieben (Zeller 2007). Für die Testung der HRT wurden 30 mg/kg Körpergewicht i.p. verabreicht. Pentobarbital verhindert über eine Reduktion der TDR das Auftreten von spontanen und stimulierten *Torsade-de-pointes*-Tachykardien im LQT-Modell (Shimizu 1999), weswegen es nicht zur EPU verwendet wurde.

Isofluran

Als volatiles Anästhetikum wirkt Isofluran ausgeprägt hypnotisch, muskelrelaxierend und schmerzfreiend durch Bewusstseinsverlust (Karow 2012). Vorteil der Inhalationsanästhetika ist ihre gute Steuerbarkeit im Vergleich zu den i.v.-Anästhetika (Karow 2012). Außerdem ist die Narkoseeinleitung im Narkosekasten mit flüssigem Isofluran einfach und dauert längstens 1 – 2 Min. Es wurde eine Konzentration von 1,5 Vol % *per inhalationem* kontinuierlich verabreicht. Zu den wichtigsten Nebenwirkungen gehören Atemdepression mit Hyperkapnie, Azidose, sowie nach 12 h Anästhesie Anstieg von Herzfrequenz und Körpertemperatur (Cesarovic 2010). Letzteres war für unsere Versuche mit einer Dauer von etwa zwei Stunden unerheblich. Die kardiale Depression ist grundsätzlich minimal (Roth 2002). In *patch-clamp* Untersuchungen konnte die Sensitivität von K_{2P} Kanälen für volatile Anästhetika festgestellt werden. Folglich kommt es während der Anästhesie mit Isofluran zu einer Aktivierung von TASK-1, TREK-1 und TASK-3 (Patel 1999, Lesage und Lazdunski 2000, Lazarenko 2010). Daher war bei den TASK-1 defizienten Mäusen eine mögliche kompensatorische Aktivierung von TREK-1 und TASK-3 durch Isofluran zu berücksichtigen.

2, 2, 2-Tribromoethanol / 2-methyl-2butanol

Für Akutversuche transgener Mäuse in Laboratorien eignet sich Avertin® als Anästhetikum (Hart 2001, Meyer und Fish 2005). Es wurde 250 mg/kg

Körpergewicht intraperitoneal einer 2.5% Lösung verabreicht (Zutphen 1995). Die Narkosetiefe ist innerhalb von 1 – 2 Minuten erreicht und hält 40 – 90 Minuten an (Herstellerangaben). Additive Gaben werden gut toleriert (Weiss und Zimmermann 1999). Beschriebene Langzeitnebenwirkungen in der Literatur sind Serositis, diffuse oberflächliche nekrotisierende Organschäden, Adhäsionen, Strikturen und in 0,1 % Tod (Zeller 1998, Weiss und Zimmermann 1999). In echokardiographischen Studien von Roth et al. hatte Avertin® neben Isofluran nur geringe kardiodepressive Auswirkungen (Roth 2002). Saba et al. verwendeten ebenfalls Avertin® bei elektrophysiologischen Untersuchungen an transgenen Mäusen, sodass vergleichbare Daten vorliegen (Saba 2005).

Zur Herstellung der Stammlösung wird 5 ml 2-Methyl-2-butanol mit 2,5 g Tribromoethanol gemischt und mit Hilfe eines Magnetrührstabs auf einer Wärmeplatte bei 40°C vollständig gelöst. Der Lösung wird destilliertes Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 200 ml hinzugefügt. Im letzten Schritt wird die Lösung durch einen 0,45 µm Filter (Corning® 500 ml Vacuum Filter System, 0,45 µm, Tewksbury, USA) unter sterilen Bedingungen vakuumfiltriert. Der Filterprozess entfernt Mikroorganismen, sowie ungelöste Kristalle (Zeller 1998, Weiss und Zimmermann 1999). Die fertige Stammlösung ist lichtsensitiv und wird dunkel im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt. Es wurden Aliquots in 0,5 ml Eppendorf – Behältnissen hergestellt, um handliche Arbeitslösungen zu erhalten und die Kontaminationen zu vermeiden. Auf Grund der begrenzten Haltbarkeit bedingt durch die Lichtempfindlichkeit, wurden die Arbeitslösungen mit Alufolie umwickelt und bei +4°C kühl gelagert. Vor der Anwendung muss Avertin® vollständig in Lösung gegangen sein.

Isoprenalin

Das Sympathomimetikum Isoprenalin hat eine spezifische Wirkung auf die kardialen beta₁- und beta₂-Rezeptoren. Dem Adrenalin ähnlich wirkt es positiv chronotrop, positiv inotrop, steigert die AV-Überleitungsgeschwindigkeit (Karow 2012). Die Wirkung tritt nach etwa 1 – 5 Minuten ein (VanderBrink 1999). An isolierten Kardiomyozyten zeigten Priori und Corr die Induktion von EAD und DAD durch beta-adrenerger Stimulation (Priori und Corr 1990). In pharmakologischen Modellen des LQTS1 und LQTS2 konnten nur unter beta₁-adrenerger Stimulation *Torsade-de-pointes*-Tachykardien ausgelöst werden. Isoprenalin wurde zur EPU in einer Dosis von 2 mg/kg i.p. gewählt, um die Erregungsüberleitung zu beschleunigen und katecholamin-sensitive Tachyarrhythmien zu provozieren. Bei fehlendem Frequenzanstieg um mindestens 30% oder Verkürzung der Zykluslänge auf unter 100 ms erfolgte die erneute Gabe von Isoprenalin (Brunner 2001). Das QT und QT_c Intervall wurde unmittelbar vor und nach der Gabe von Isoprenalin gemessen, um den Einfluss beta-adrenerger Stimulation auf diese Parameter vergleichen zu können.

2.3.5 Arbeitsplatz und Dokumentation

Laborräumlichkeiten der Sicherheitsstufe 1 standen uns mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Herz-Kreislaufphysiologie der Heinrich Heine Universität zur Verfügung. Die Tierversuche fanden zu ruhigen Laborzeiten statt, um Störfaktoren wie benachbarte Elektronikgeräte und Funkinterferenzen einer Baustelle zu vermeiden.

Die Aufzeichnungspflicht jedes Tierversuchs wurde eingehalten und die erforderlichen Meldungen an die Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf erstattet. Jedes Tier war mit einer Begleitkarte ausgestattet, auf der Herkunft, Nummer des Versuchsvorhabens und Verwendung registriert waren. Alle Versuche wurden in einem Versuchsbuch protokolliert und die aufgezeichneten Rohdaten mit den jeweiligen Auswertungen elektronisch gesichert. Das geführte Protokoll enthielt Tiernummer, Geschlecht, Alter, Gewicht, Narkosemenge und Versuchsdauer und die durchgeführte Untersuchungsmodalität.

2.3.6 Vorgehen

Die *in vivo* Experimente basieren auf routinemäßig in der Klinik eingesetzte Untersuchungen zur Abklärung von Herzrhythmusstörungen, Indikationsstellungen von Schrittmacher bzw. Defibrillatorsystemen und zur Risikostratifizierung des SCD. Hier dienen die Experimente zur elektrophysiologischen Charakterisierung der TASK-1 defizienten Maus. Sie lassen sich unterteilen in extrakardiale Untersuchungen (Oberflächen-EKG) und intrakardiale Untersuchungen (Elektrodenkatheter). Zu den intrakardialen Tests gehören die Funktion des Barorezeptorreflexes durch die HRT, zusammengesetzt aus *Turbulence Onset* (TO) und *Turbulence Slope* (TS), und die umfassende elektrophysiologische Untersuchung, jeweils mit ausgearbeiteten Protokollen. Nur *in vivo* besteht die Möglichkeit, Oberflächen-EKGs und intrakardiale Elektrogramme abzuleiten und die Erregungsleitung sowie das Risiko für Arrhythmien durch intrakardiale elektrische Stimulation zu untersuchen.

Für die Versuche dieser Arbeit wurde ein standardisiertes Vorgehen eingehalten. Es wurden die Wildtypen bzw. TASK-1^{+/+} und ihre nicht merkmalttragenden Wurfgeschwister (TASK-1^{-/-}) gleichen Alters und Geschlechts ausgewählt. Während der elektrophysiologischen Studien war dem Untersucher der Genotyp des Versuchstiers nicht bekannt, um einen *Bias* bei der Analyse zu vermeiden (s. statistische Auswertung). Die zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Versuchen wurden so gering wie möglich gehalten und zu jedem Versuchszeitpunkt wurden Tiere beider Gruppen genommen, um Umwelteinflüsse auszuschließen. Alle verwendeten Geräte wurden zur

Autokalibrierung mindestens zehn Minuten vor Versuchsbeginn in Betrieb genommen.

2.3.7 Oberflächen-Elektrokardiogramm

Hintergrund

Das Oberflächen-Elektrokardiogramm (EKG) an den Extremitäten gibt Aufschluss über die elektrische Erregungsausbreitung im Erregungsleitungssystem des Herzens. Es stellt das größte ableitbare Biosignal der Maus und des Menschen dar.

Versuchsaufbau

Die verwendeten Geräte, Powerlab 8/30® und Animal BioAmp® von der Firma ADInstruments, wurden mit dem Arbeitsrechner verbunden und die Software LabChart® (ADInstruments, Version 7.2) zeichnete das EKG auf.

Durchführung

Von jedem Versuchstier wurde ein Oberflächen-EKG gleich nach dem Anlegen der Elektroden abgeleitet. Die analgosedierte Versuchsmaus wurde auf eine ca. 30°C warme Unterlage gelegt (*Small Operating Table*, BioScience). Zur Ableitung wurden drei 29 Gauge Elektrodennadeln an den beiden Vorderpfoten und der linken Hinterpfote subkutan eingebracht (Abb. 12).

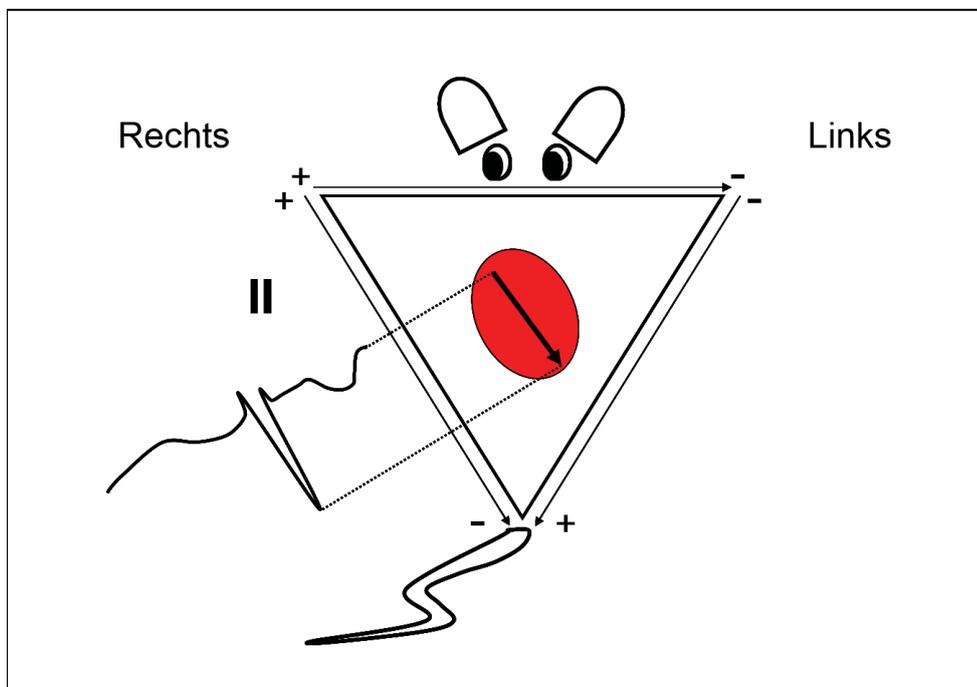


Abb. 12: **Oberflächen-EKG der Maus.**

Die Ableitung des Oberflächen-EKG erfolgte in Ableitung II nach Einthoven über subkutan eingebrachte Elektroden an den beiden Vorderpfoten sowie der linken Hinterpfote. Eigene Abbildung.

Für die Betäubung wurden versuchsabhängig eines der drei oben beschriebenen Anästhetika Isofluran, Pentobarbital und Avertin verwendet. Die Mäuse wurden flach narkotisiert, damit sie die Rückenlagerung auf einer Wärmeplatte tolerieren und die gemessenen Potentialdifferenzen nicht durch Muskelbewegungen gestört werden. Während der Zeit wurde die Narkosetiefe in regelmäßigen Abständen anhand von Sinneshaar- und Pfotenreflexen überprüft und die Augen und Zunge feucht gehalten. Da die Mäuse während der Versuchszeit nicht erwachten, kam es zu keinen bewusst wahrnehmbaren Schmerzen oder Leiden (Zutphen 1995, Kohn 2007). Der bekannten Problematik des Schmerz-Monitorings wurde durch sorgfältigen und aufmerksamen Umgang mit den Versuchstieren, sowie unter der Aufsicht von Frau Petric als Tierärztin, Rechnung getragen (Hawkins 2002). Da das Oberflächen-EKG immer auch Bestandteil der EPU und der HRT war, gelten die beschriebenen Verhaltensmaßnahmen stellvertretend auch dort.

Analyse

Zur EKG Auswertung zählten die Herzfrequenz, P Welle und P Amplitude (Erregungsausbreitung vom Sinusknoten über das Vorhofmyokard) PR (Dauer der Erregungsausbreitung vom Vorhof- zum Kammermyokard), QRS, R Amplitude (Erregungsausbreitung über das Kammerseptum und -myokard), QT (Erregungsrückbildung über das Kammermyokard) und QT_c Intervall. Dabei wurde das Ende der T Welle definiert als der Bereich, wo die langsame Komponente der biphasischen T Welle zur isoelektrischen Linie zurückkehrt. Das QT_c Intervall wurde mit Hilfe der modifizierten Bazettformel nach Mitchell et al. für die Durchschnittsfrequenz von 600/min berechnet: $QT_c = QT_o / (RR_o / 100)^{1/2}$ (Mitchell 1998). Alle Daten wurden aus mindestens 50 Schlägen je Maus von zwei unabhängigen Untersuchern, denen der Genotyp verblindet war, persönlich vermessen und gemittelt. Im Vorfeld der Auswertung wurde jedes EKG auf atriale und ventrikuläre Ektopien untersucht. Um die Interaktion der Anästhesie auf die EKG-Parameter nachvollziehen zu können, wurden bereits vorhandene Daten aus Aufzeichnungen von Oberflächen-EKGs während Isoflurannarkose mit denen während Avertin® und Pentobarbital verglichen.

2.3.8 Elektrophysiologische Untersuchung

Hintergrund und Ablauf

Es stehen standardisierte EPU-Protokolle für den Menschen zur Verfügung, die dem Josephson-Protokoll folgen (Josephson 1978). Für die EPU bei der Maus orientierten wir uns an der Arbeitsgruppe von Charles Berul, die ein elektrophysiologisches Protokoll für die Maus in Anlehnung an das für den Menschen entwickelt hat (Berul 1996). Einzelne Untersuchungsschritte wurden aus den Arbeiten von Kreuzberg et al., Schrickel et al. und Bevilacqua et al. wie

unten näher erläutert ergänzt (Bevilacqua 2000, Kreuzberg 2006, Schrickel 2007). So entstand ein modifiziertes Protokoll für die elektrophysiologische Charakterisierung der TASK-1 defizienten Maus (Tabelle 4).

Zur Maus-EPU wird ein Katheter transjugulär eingebracht, der mit seinen acht Ringelektroden (Oktapolarkatheter) in Kontakt zum rechten Vorhof (Sinusknoten), der AV-Klappen-Ebene (AV-Knoten, His-Bündel-Region) und zum rechten Ventrikel (Purkinje-Fasern) steht (Abb 13). Der Oktapolarkatheter ist speziell für elektrophysiologische Testungen an Mäusen konzipiert (CIB'ER MOUSE™ Electrophysiology Catheter, NuMED Inc.). Sein Durchmesser beträgt 2.0 french, entsprechend einem Außendurchmesser von 0,65 mm. An seiner Spitze enthält er acht Ringelektroden aus Platin mit jeweils einer Breite von 0,5 mm im Abstand von 0,5 mm. Zwischen den jeweiligen Ringelektroden ist eine bipolare Erregungs-Ableitung möglich, was als „*sensing*“ bezeichnet wird. So können Störungen der Erregungsleitung und –ausbreitung vom Ursprungsort über den Ausbreitungsweg verfolgt werden. Die beiden distalen Elektrodenpaare 1-2 und 3-4 erfassen ventrikuläre Aktivitäten, das Elektrodenpaar 5-6 zeichnet auf Höhe der AV-Klappen-Ebene auf, und das Elektrodenpaar 7-8 registriert die Aktivität im Vorhof. Neben seiner *sensing*-Funktion kann der Oktapolarkatheter über die Ringelektroden das Myokard bipolar stimulieren wie ein Schrittmacher. So können beispielsweise die Ringelektroden 1-2 den rechten Ventrikel apikal stimulieren während die Ringelektroden 5-6 auf AV-Klappen-Ebene die Erregungsausbreitung als bipolares Elektromyogramm ableitet.

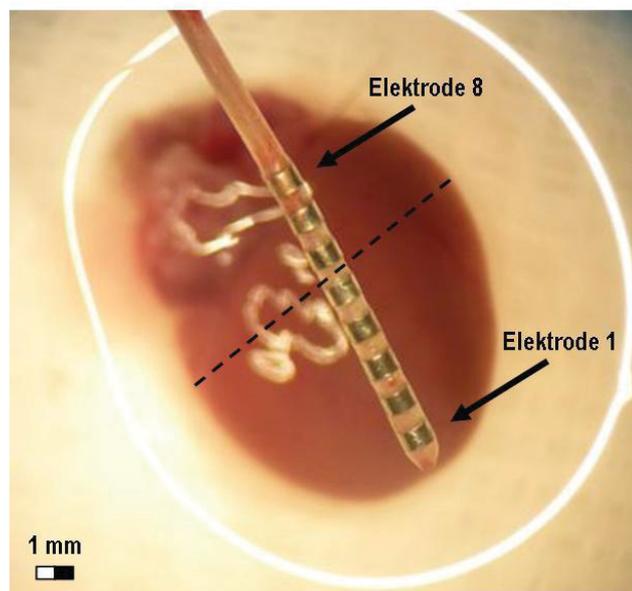


Abb. 13: **Oktapolarkatheter in Relation zum Mäuseherz.**

Das Mäuseherz in einer flüssigkeitsgefüllten Petrischale unter ca. 5-facher Vergrößerung. Der Oktapolarkatheter projiziert sich mit der Ringelektrode 1 auf den Apex und mit Ringelektrode 8 auf die Basis des Herzens. Intrakardial liegen die Ringelektroden 1-4 in der rechten Kammer, 5-6 auf die Höhe der AV-Klappen-Ebene (gestrichelte Linie) und 7-8 im rechten Vorhof. Der Abstand der 0,5 mm breiten Ringelektroden beträgt 0,5 mm. mm = Millimeter. Eigene Abbildung.

Eine vollständige EPU dauert etwa 90 min (Abb. 14). Als Erstes wird das Versuchstier mit Avertin® sediert (Einleitung). Zweitens wird ein Oberflächen-EKG in Ruhe (s.o.) und drittens, nach Präparation bzw. Katheterisierung, ein intrakardiales EKG abgeleitet. Bei Letzterem werden folgende Basiswerte in Zykluslängen gemessen: AV (Atrium-Ventrikel Intervall), AH (Atrium-His Intervall), HV (His-Ventrikel Intervall) und RR (Intervall zwischen zwei R Zacken). Das AV Intervall umfasst das atriale Elektrogramm bis zum ersten negativen Ausschlag des QRS Komplexes. Weiter wird das AV-Intervall durch die His-Zacke in AH und HV Intervall unterteilt.

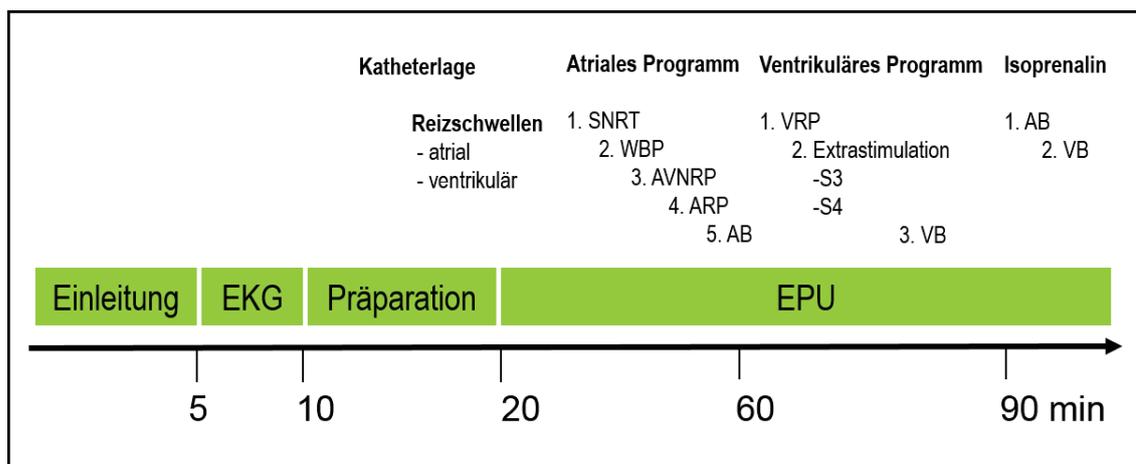


Abb. 14: **Zeitliche Abfolge der EPU bei der Maus.**

Nach der Narkoseeinleitung wird ein Ruhe-EKG aufgezeichnet bevor die Präparation der rechten V. jugularis interna erfolgt. Der Oktapolar-katheter wird inseriert und seine Lage im rechten Ventrikel mit Hilfe der *sensing*-Funktion bestätigt. Während der Überprüfung der Katheterlage werden alle Ringelektroden bipolar gegeneinander abgeleitet. Anschließend beginnt die atriale und ventrikuläre Reizschwellentestung, um mit der doppelten Reizschwelle stimulieren zu können. Dann beginnt das atriale Programm mit Sinusknotenerholungszeit (SNRT), Wenckebachperiodik (WBP), AV-nodaler Refraktärzeit (AVNRP), Atrialer Refraktärzeit (ARP) und Atrialer Burststimulation (AB). Es folgt das ventrikuläre Programm mit Ventrikulärer Refraktärzeit (VRP), programmierter Extrastimulation mit 2 (S3) oder 3 (S4) Extrastimuli und Ventrikulärer Burststimulation (VB). Schließlich wird die AB und VB nach beta-adrenerger Stimulation mit Isoprenalin wiederholt. min = Minuten. Eigene Abbildung.

Als Viertes folgt das elektrophysiologische Stimulationsprogramm, welches mit der Bestimmung der atrialen und ventrikulären Reizschwelle beginnt. Ein Stimulus wird als Rechteckimpuls mit einer Dauer von 1 ms und der doppelten diastolischen Reizschwelle programmiert (MC_Stimulus II, Multi Channel Systems GmbH) (Berul 1996, Kreuzberg 2006, Schrickel 2007). Atrial wird bevorzugt mit dem Elektrodenpaar 7/8 und ventrikulär mit dem Elektrodenpaar 1/2 stimuliert.

Das atriale Stimulationsprogramm enthält die Analyse der Sinusknotenerholungszeit (*sinus node recovery time*, SNRT), definiert als maximales Intervall vom letzten stimulierten Impuls bis zur ersten eigenen Sinuserregung. Es wurden 30 Stimuli mit den Zykluslängen von 120, 100 und 80

ms appliziert und jeder Wert doppelt bestimmt (Kreuzberg 2006). Die frequenzkorrigierte SNRT ($SNRT_c$) ist bestimmt durch die Differenz von SNRT und der Sinuszykluslänge (SCL) ($SNRT_c = SNRT - SCL$) (Kreuzberg 2006). Des Weiteren wurde die relative SNRT als Quotient $SNRT/SCL$ in Prozent errechnet (Kreuzberg 2006). Weiter umfasst das atriale Stimulationsprogramm die Wenckebachperiodik, welche die Zykluslänge ist, bei der erstmalig ein AV-Block auftritt, d.h. keine 1:1 Überleitung vom Vorhof auf die Kammer erfolgt. Zur Annäherung werden 12 Stimuli mit einer Zykluslänge abgegeben, die 20 ms unter der SCL liegt. Anschließend wird die Zykluslänge um 2 ms verkürzt bis erstmalig eine 2:1 Überleitung auftritt, die durch Wiederholung bestätigt wird (Abb. 15) (Bevilacqua 2000, Kreuzberg 2006). Nächste Schritte des atrialen Stimulationsprotokolls sind die Untersuchung der AV-nodalen Refraktärzeit (AVNRP) und der atrialen Refraktärzeit (ARP). Die ARP ist definiert als die längste Zykluslänge, bei der keine atriale Erregung mehr durch einen Extrastimulus (S2) ausgelöst wird. Dahingegen entspricht die AVNRP der längsten Zykluslänge, bei der eine Vorhoferregung nicht mehr auf die Ventrikel

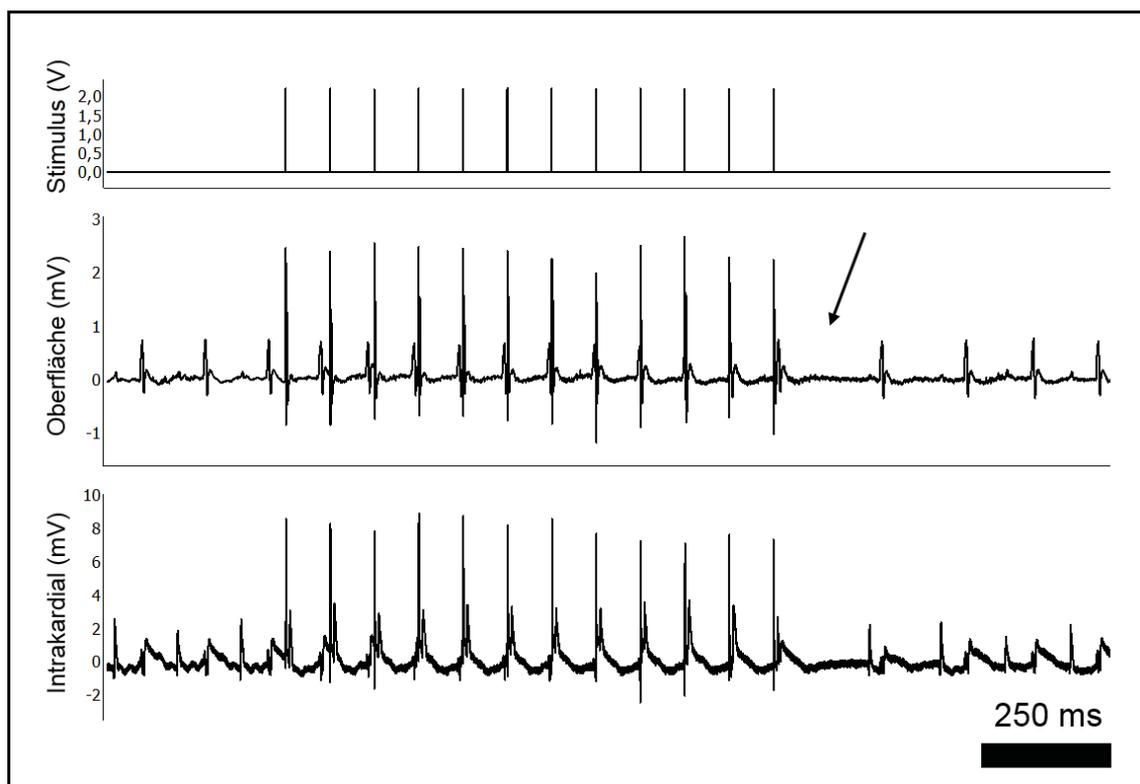


Abb. 15: **Wenckebachperiodik. Ansicht in LabChart®.**

LabChart® Version 7.2 (ADI, Spechbach Deutschland). Dargestellt sind drei Kanäle von oben nach unten: Stimulus, Oberflächen-EKG (Ableitung II) und intrakardiales Elektrogramm. Unter Analogsedierung mit Avertin® beträgt die Ruhefrequenz 487 min^{-1} , entsprechend einem RR Intervall von 123 ms. Der Wenckebachpunkt beträgt in diesem Fall 86 ms, da eine AV-Überleitung nach dem letzten atriale Stimulationsimpuls ausfällt (Pfeil). Die Wenckebachperiodik ist definiert als diejenige Zykluslänge, bei der erstmalig eine AV-Blockierung auftritt, d.h. keine 1:1 Überleitung vom Vorhof auf die Kammer erfolgt. mV = Millivolt, V = Volt, ms = Millisekunden. Eigene Abbildung.

übergeleitet wird. Dafür werden für die S1-Stimuli die Zykluslängen 120, 110 und 100 ms festgelegt und ein Extrastimulus S2 programmiert, der 10 ms kürzer ist als die S1-Zykluslänge und sukzessive um 2 ms verkürzt wird. Abschluss des atrialen Stimulationsprogramms ist die Burststimulation zum Auslösen von Vorhofflimmern. Vorhofflimmern ist definiert als schnelle atriale Aktion mit unregelmäßiger AV-Überleitung, die mindestens 1 s andauert (Kreuzberg 2006, Schrickel 2007). Zur Burststimulation werden Stimulationsimpulse mit einer Stimulationszykluslänge von 50 ms absteigend in 10er Schritten bis 10 ms (Kreuzberg 2006) für die Dauer von jeweils 5 s abgegeben (Schrickel 2007). Jeder Stimulations-Schritt wird mit der doppelten und vierfachen diastolischen Reizschwelle ausgeführt. Zur Erholung wird zwischen den Testungen ein stimulationsfreies Intervall von 10 s eingehalten (Schrickel 2007).

Anschließend folgt das ventrikuläre Stimulationsprogramm. Die Bestimmung der ventrikulären Refraktärzeit (VRP) erfolgt wie atrial durch S1-Stimulation mit den Zykluslängen 120, 110 und 100 ms und S2-Extrastimulation mit einem Stimulus, der 10 ms kürzer ist als S1 und schrittweise um 2 ms reduziert wird. Zur Testung der ventrikulären Vulnerabilität erfolgen die programmierte Extrastimulation und die ventrikuläre Burststimulation. Dabei handelt es sich um die Induzierbarkeit von ventrikulären Extrasystolen (Einzelschlag), Couplets (doppelte Extrasystole), Triplets (dreifache Extrasystole) und ventrikulären Tachykardien (≥ 4 Extrasystolen) (Schrickel 2007). Ventrikuläre Tachykardien haben eine regelmäßige Frequenz, während das Kammerflimmern von Schlag zu Schlag unterschiedliche Morphologien annimmt ohne definierbare Frequenz (Berul 2003). Bei der programmierten Extrastimulation werden acht S1 Stimuli bei den Zykluslängen 120, 110 und 100 ms mit zwei (S2-S3) bis zu drei Extrastimuli (S2-S3-S4) mit sukzessiv kürzeren Ankopplungsintervallen bis zur Refraktärzeit kombiniert. Die ventrikuläre Burststimulation erfolgt in Analogie zur atrialen Burststimulation beginnend mit einer Stimulationszykluslänge von 50 ms und schrittweise Reduktion um 10 ms bis 10 ms für die Dauer von jeweils 5 s (Abb. 16) (Schrickel 2007). Jeder Stimulations-Schritt wird mit der doppelten und vierfachen diastolischen Reizschwelle ausgeführt. Zur Erholung wird zwischen den Testungen ein stimulationsfreies Intervall von 10 s eingehalten (Schrickel 2007). Bei Patienten mit LQTS kommt es nach beta-adrenerger Stimulation zur Verlängerung des QT_c Intervalls bedingt durch die Zunahme der Dispersion der Repolarisation und damit zum Auftreten von *Torsade-de-pointes*-Tachykardien. Um die Neigung zu ventrikulären Arrhythmien zu provozieren wird deshalb beta-adrenerges Isoprenalin (2 mg/kg) intraperitoneal gegeben (Bevilacqua 2000). Sollte es nicht zu einem Ansteigen der Herzfrequenz um mindestens 30 % bzw. einer Verkürzung des RR-Intervalls unter 100 ms kommen, wird die Hälfte der Startdosis von Isoprenalin nachgegeben (Brunner 2001). Nach einigen Minuten wird anschließend die

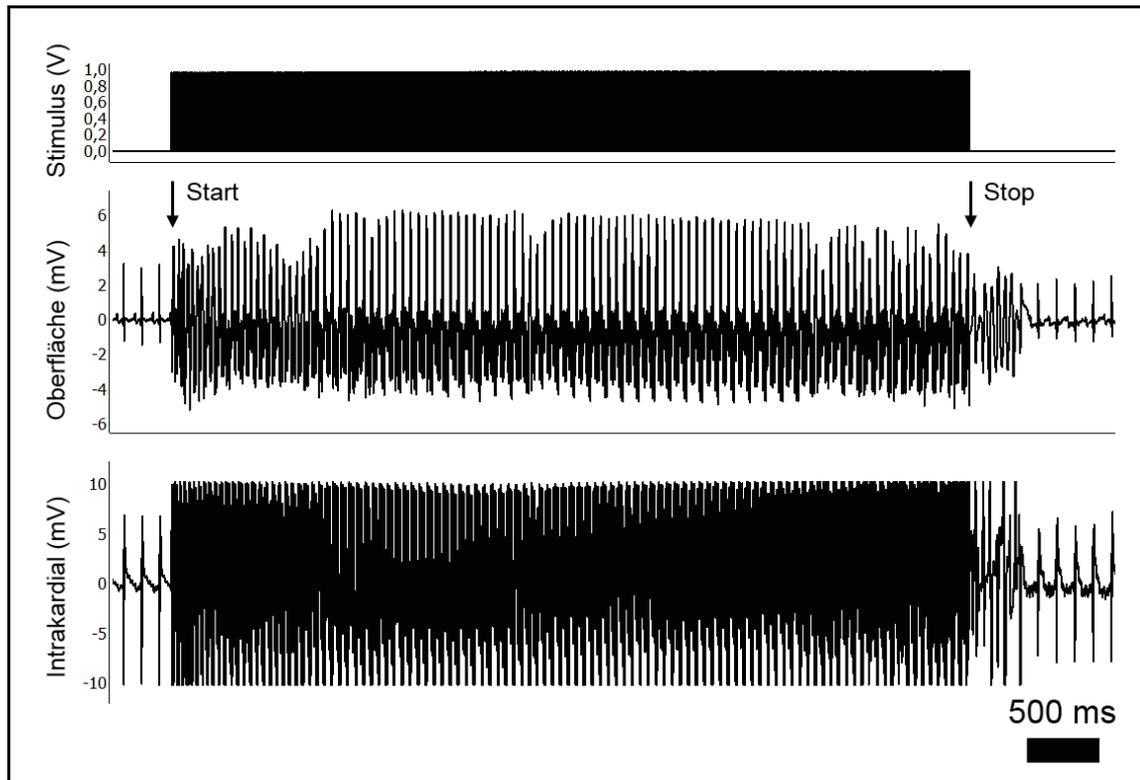


Abb. 16: **Ventrikuläre Burststimulation.**

Die LabChart® (ADI, Spechbach Deutschland) Darstellung zeigt drei Kanäle wie in Abb. 15 beschrieben. Die Ruhedefrequenz unter Analgosedierung mit Avertin® beträgt zum gezeigten Zeitpunkt 483 min^{-1} , entsprechend einem RR Intervall von 124 ms. Getriggert wurde die R-Zacke im Oberflächen-EKG und die Stimulation erfolgte mit einer Zykluslänge von 10 ms für die Dauer von 5 s (Pfeil „Start“ bis Pfeil „Stop“). Anschließend kommt es zu einer ventrikulären Tachykardie über 6 Schläge. mV = Millivolt, V = Volt, ms = Millisekunden. Eigene Abbildung.

atriale und ventrikuläre Burststimulation wiederholt. Die Anzahl induzierter Arrhythmien pro Tier, die Dauer der Arrhythmien sowie die Zykluslänge der Tachykardien werden aufgezeichnet. Das QT und QT_c Intervall wird unmittelbar vor und nach der Gabe von Isoprenalin gemessen, um den Einfluss beta-adrenerger Stimulation auf diese Parameter vergleichen zu können.

Versuchsaufbau

Der Aufbau des Arbeitsplatzes ermöglicht die parallele Aufzeichnung intrakardialer Signale und vom Oberflächen-EKG. Die Elektroden werden hierzu mit dem PowerLab 26T® (ADInstruments) verbunden. Bei der Entwicklung des Geräteaufbaus wurden zunächst ein Powerlab 8/30®, zwei BioAmps® und der Stimulusgenerator verwendet (Abb. 17). Zur Minimierung von Störsignalen wurde schließlich ein vereinfachter Geräteaufbau mit weniger Schnittstellen verwendet, der im Folgenden erklärt wird. Das PowerLab 26T® enthält einen Input für zwei Ableitungen, entsprechend zwei Animal BioAmps®. Für die Elektrodenpins des Katheters wurden gelötete Kontakte zum EKG-Kabel des PowerLab 26T® maßgefertigt. Neben der intrakardialen Ableitung werden die subkutanen

Elektroden als zweite Ableitung angeschlossen, um eine kontinuierliche Überwachung in der II. Ableitung des Oberflächen-EKG zu gewährleisten. Der Stimulusgenerator STG 4002 (Multi Channel Systems GmbH) wird mit Krokodilklemmen parallel zum PowerLab 26T® geschaltet (Abb. 18). Für das Aufzeichnen von Arrhythmien dient das Oberflächen-EKG neben der intrakardialen Ableitung als Kontrolle. Die *Sampling Rate* des Oberflächen-EKGs beträgt 2 kHz, des intrakardialen Elektrogramms 5 – 400 Hz und der Filter wird auf 1 – 50 Hz gestellt (Berul 2003).

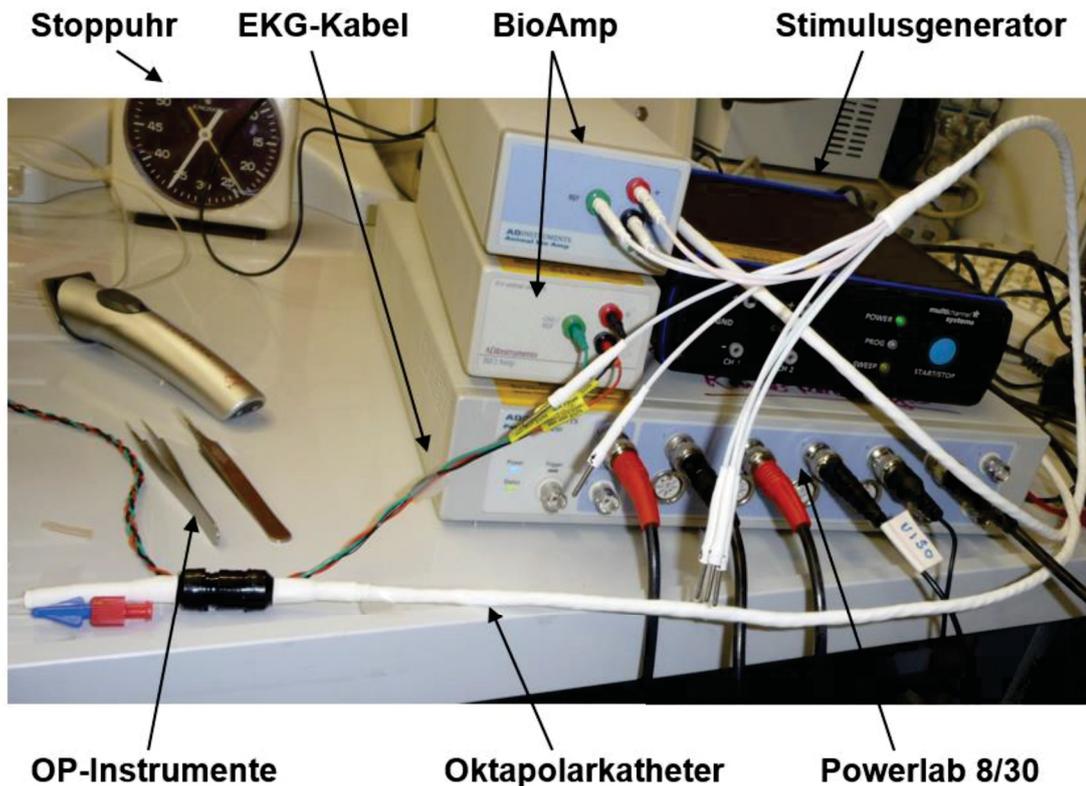


Abb. 17: Versuchsaufbau der EPU mit zwei BioAmps®.

Für die ersten elektrophysiologischen Messungen mit dem Oktapolarkatheter dienten zwei BioAmps® (links oben), ein Powerlab 8/30 (unten) (ADI, Spechbach Deutschland), sowie der Stimulusgenerator (rechts oben) (Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen Deutschland). Rechts außerhalb des Bildes stand der Arbeitsrechner, links der Kathetertisch. Eigene Abbildung.

Durchführung

Für die EPU wurden die Versuchstiere mit 2, 2, 2-Tribromoethanol (Avertin®) analgosediert, welches für diese Art von Untersuchung häufig genutzt wird (Berul 2003).

Die sedierte Versuchsmaus wurde auf eine ca. 30°C warme Unterlage gelegt (*Small Operating Table*, BioScience). Nach Ableitung eines Oberflächen-EKG, wurde die Maus im Bereich des rechten Halses mit einem elektrischen Haarschneidegerät (Contura, Wella) rasiert und mit farblosen Kodan® (Schülke) desinfiziert. Es erfolgte ein ovalförmiger etwa drei Millimeter langer Hautschnitt

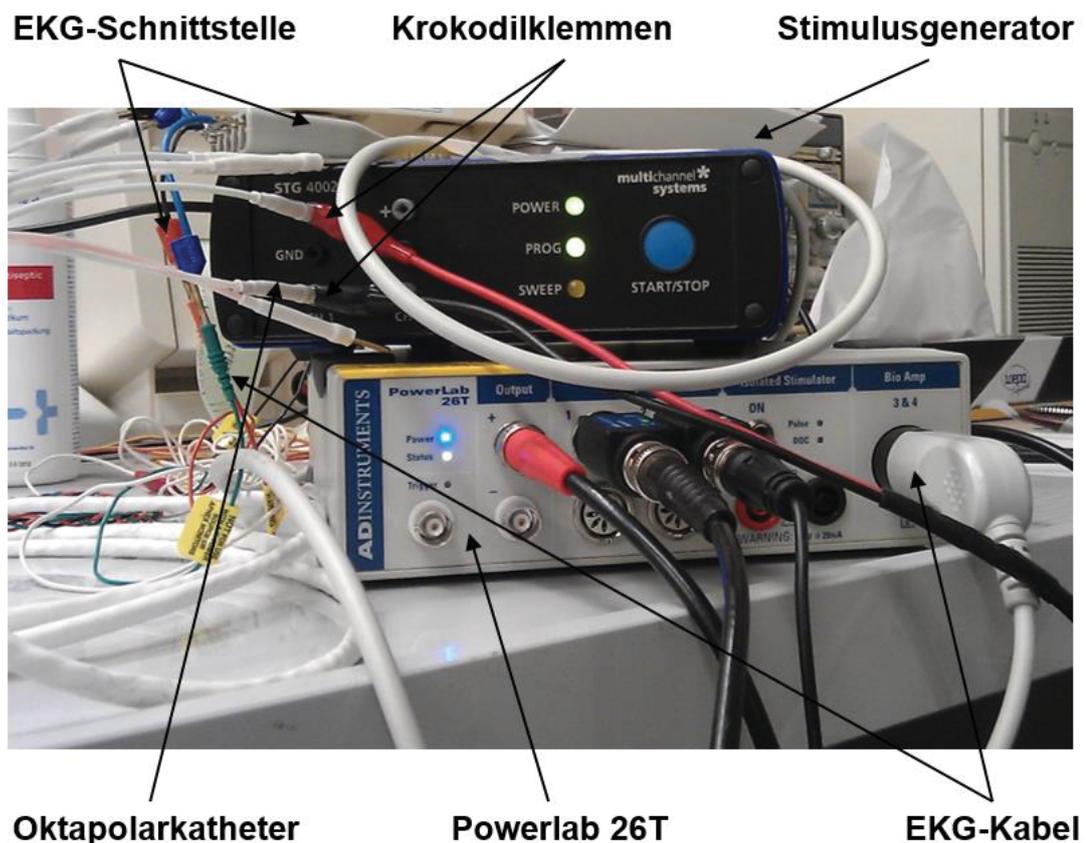


Abb. 18: Versuchsaufbau der EPU mit einem Powerlab T26®.

Dieser alternative Geräteaufbau lieferte schließlich das beste Signal zu Rausch Verhältnis. Abgebildet sind unten das Powerlab T26® (ADI, Spechbach Deutschland) und oben der Stimulusgenerator (Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen Deutschland). Eigene Abbildung.

oberhalb der erwarteten Vena jugularis interna. Unter binokulärer Vergrößerung spreizten wir atraumatisch die subkutanen Hautschichten mit Hilfe von zwei feinen an der Spitze gebogenen Pinzetten, um das Gefäß von seiner Fetteinbettung zu befreien. Die Vene wurde kranial und kaudal der gewählten Punktionsstelle mit Seidenfäden umschlungen und kranial ligiert. Die Katheterlänge bis zum Herzen wurde zuvor geschätzt und an der Stelle markiert, um eine Fehllage etwa in der Vena cava inferior zu vermeiden. Mit einer feinen Präparierschere wurde dann unter dem Binokular das Gefäß eröffnet, mit einer spitzen Pinzette offen gehalten und der Oktapolar-katheter (CIB'ER MOUSE™) vorsichtig zum rechten Ventrikel vorgeschoben. Das Vorschieben des 2 french Katheters zum Herzen gebot besondere Vorsicht wegen der großen Gefahr für Gefäßdissektionen oder Organrupturen. Mit Hilfe der *sensing*-Funktion wurden die Elektroden im rechten Ventrikel platziert, wo sich typischerweise breitkomplexige Potentiale in Höhe von ca. 5 mV ableiten lassen (Abb. 19 A). In Höhe des Atriums zeigen sich schmalkomplexige Ausschläge von niedrigerer Amplitude, etwa 2 mV. Bei genauer Betrachtung kann ein sog. „far field Phänomen“ erkennbar sein, bei dem sich unmittelbar nach dem ersten steilen

Vorhofspike ein zweiter breitbasiger Komplex entsprechend der Ventrikelerrregung darstellt (Abb. 19 B). Zur Sicherung der Katheterlage wurde der Katheter nun mit dem kaudal der Insertion angebrachten Seidenfaden fixiert. Um jeweils die elektrischen Potentiale zweier Elektroden gegeneinander abzuleiten, wurden die jeweils zugehörigen Pins an den Steckplätzen des BioAmp® durchgewechselt. Zu Beginn jedes Versuchs wurde auf diese Weise die intrakardiale Erregungsausbreitung vom Sinusknoten über das His-Bündel zur Kammer aufgezeichnet und simultan die Katheterlage bestätigt.

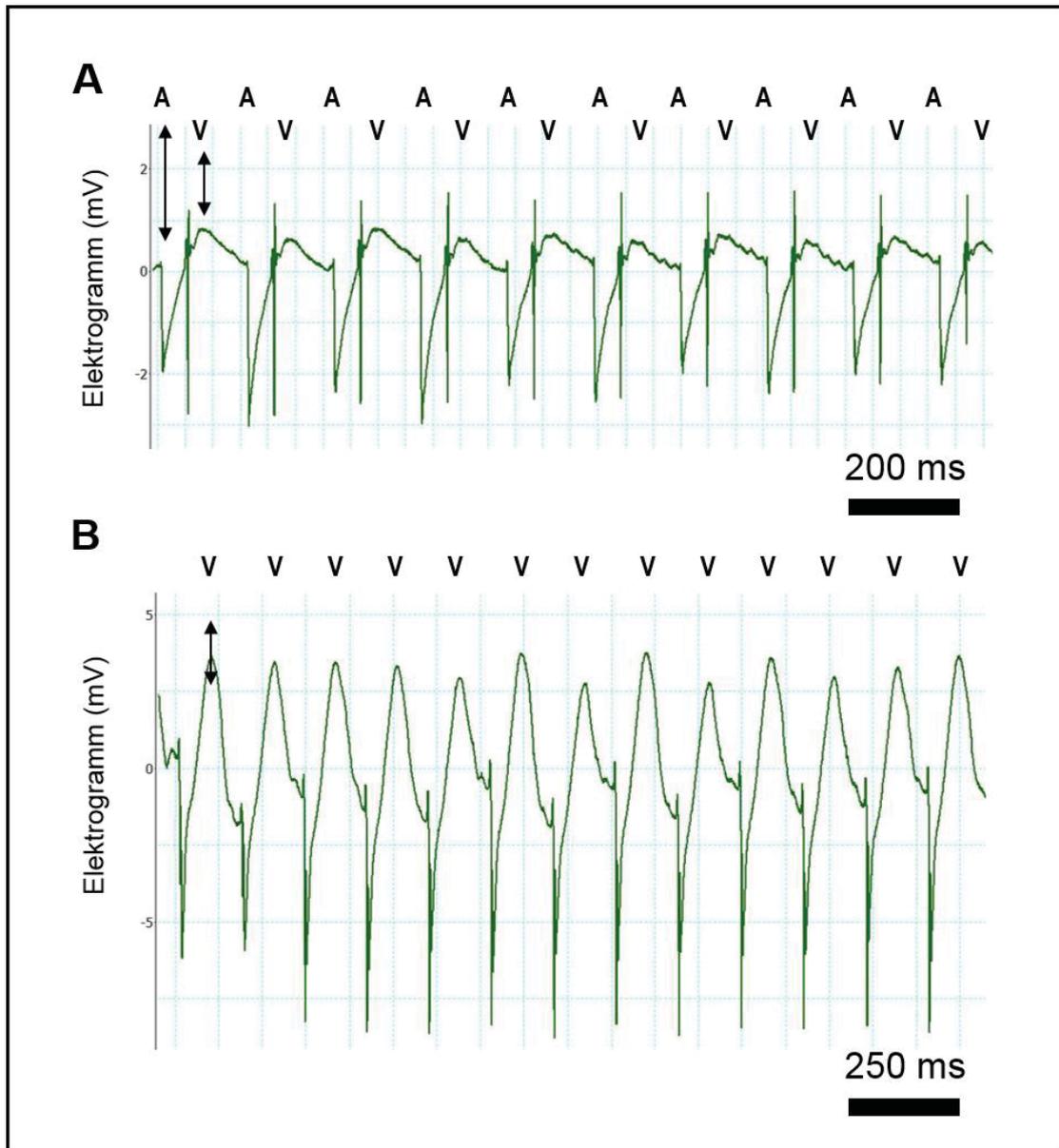


Abb. 19: **Intrakardiales Elektrogramm der Maus.**

Das intrakardiale Elektrogramm wurde über den Oktapolar-katheter bipolar abgeleitet. Das Vorhofsignal, abgeleitet über Elektrodenpaar 7/8, hat eine Amplitude von ca. 2 mV (hier negativ) und wird gefolgt vom „*far field-sensing*“ der Kammer (A). Das Kammer-signal, abgeleitet über Elektrodenpaar 1/2, ist typischerweise breit mit einer Amplitude von ≥ 5 mV (B). A = atriale Erregung, V = Ventrikelerrregung, mV = Millivolt, ms = Millisekunden. Eigene Abbildung.

Die atriale und ventrikuläre Stimulation wurde mit einem rechteckigen Stimulusimpuls bei doppelter Reizschwellenintensität mit dem Stimulusgenerator (Multi Channel Systems GmbH) in Synchronität mit den gemessenen Potentialen des PowerLab 26T® appliziert. Dauer, Länge, Intensität und Anzahl der Stimulation wurden schrittweise mit der Software MClI Stimulus Version 3.0 (Multi Channel Systems GmbH) programmiert. Die Durchführung der EPU erfolgte an Hand des oben näher ausgeführten Protokolls (Tabelle 4). Das Oberflächen-EKG und das intrakardiale Elektrogramm wurden gleichzeitig aufgezeichnet und mit der LabChart *Software* 7.2 (ADInstruments) analysiert (Abb. 30, Kapitel 3.2).

Während der gesamten Prozedur wurden Atmung, Herzfrequenz sowie Reflexe der Maus kontinuierlich überwacht, um Schmerzen und Leiden des Versuchstieres auf ein Minimum zu begrenzen. Zum Ende des Versuchs wurden die Tiere zervikoluxiert und über die Tierkörperbeseitigungsanlage entsorgt.

| Versuchsprotokoll Maus-EPU | | | | | | | |
|---|------------------|--------|------------------|-----------------------|--------------|-------------|-------------|
| Datum | | | | | | | |
| Untersucher: | | | | | | | |
| Experiment Nr: | | | | | | | |
| Maus/Nr, Geschlecht, Gewicht | | | | | | | |
| Narkose Art, Medikament, Dosierung | | | | | | | |
| Atemfrequenz | | | | | | | |
| Bemerkungen | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Intrakardiales Elektrogramm | | | | | | | |
| | Qualität | AV | AH | HV | Zeitsignatur | Bemerkungen | |
| Ableitung 1/2 | | | | | | | |
| Ableitung 2/3 | | | | | | | |
| Ableitung 3/4 | His ? | | | | | | |
| Ableitung 4/5 | His ? | | | | | | |
| Ableitung 5/6 | His ? | | | | | | |
| Ableitung 6/7 | His ? | | | | | | |
| Ableitung 7/8 | | | | | | | |
| Atrium: P7/8, S5/6, Ventrikel: P1/2, S5/6 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Atriales Stimulationsprotokoll | | | | | | | |
| Reizschwelle (RS) | | | | | | | |
| 30 Stimuli | Atriale RS = ARS | | | Ventrikuläre RS = VRS | | | |
| | mV @ ms | A @ ms | | mV @ ms | A @ ms | | |
| CL: | | | | | | | |
| Sensing E | | | Sensing E | | | | |
| Pacing E | | | Pacing E | | | | |
| Bemerkungen: | | | | | | | |
| SNRT | SNRT S1S1 120 ms | | SNRT S1S1 100 ms | | | | |
| 30 atriale Stimuli | | | | | | | |
| SCL | | | | | | | |
| MW SNRT | | | | | | | |
| MW SCL | | | | | | | |
| SNRTc (SNRT - SCL) | | | | | | | |
| SNRT/SCL x 100% | | | | | | | |
| Sensing E | | | | | | | |
| Pacing E | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Wenckebach Punkt | | | | | | | |
| 8 Stimuli x CL - 20ms der SCL | Start | | | | | | |
| Verkürzung um 2 ms | WBP | | | | | | |
| | | | | | | | |
| AVNRP + ARP | | | | | | | |
| 12 atriale Stimuli S1 | | | | S1S1 120 ms | | S1S1 110 ms | S1S1 100 ms |
| S2 - 10 ms von CL | | | | Start | | Start | Start |
| reduzieren um 10ms bis Überleitung ausfällt, dann auf 2 ms genau bestimmen = AVNRT | | | | AVNRP | | AVNRP | AVNRP |
| reduzieren um 10ms bis Vorhoferregung ausfällt, | | | | ARP | | ARP | ARP |
| Sensing E | | | | | | | |
| Pacing E | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Atriale Burst Stimulation zum Auslösen von AF | | | | | | | |
| 5 s Dauer | 2x Reizschwelle | | 4x Reizschwelle | | | | |
| 50 ms / 100 Stimuli | | | | | | | |
| 40 ms / 125 Stimuli | | | | | | | |
| 30 ms / 166 Stimuli | | | | | | | |
| 20 ms / 250 Stimuli | | | | | | | |
| 10 ms / 500 Stimuli | | | | | | | |
| wird Tachykardie ausgelöst, wird sie reproduziert | | | | | | | |

| Ventrikuläres Stimulationsprotokoll | | | | | | | |
|--|-----------------|-----------------|-------------|--|-------------|--|--------------|
| VRP | | | | | | | |
| 8 ventrikuläre Stimuli S1: | | | S1S1 120 ms | | S1S1 110 ms | | S1S1 100 ms |
| plus: S2 -10 ms von CL, reduzieren um 10ms bis VRP, dann auf 2ms genau | | | Start | | Start | | Start |
| | | | VRP | | VRP | | VRP |
| Pacing 1/2 | | | | | | | |
| Cave! retrograde VA Leitung | | | | | | | |
| Programmierte Extrastimulation S2-S4 zum Auslösen von VT | | | | | | | |
| 8 ventrikuläre Stimuli S1 | | | S1S1 120 ms | | S1S1 110 ms | | S1S1 100 ms |
| a) S2 VRP+20 ms, S3 - 2 ms von SCL bis VRP | | | S2: S3: | | S2: S3: | | S2: S3: |
| | | | Event: 0 | | Event: 0 | | Event: 0 |
| b) S2 VRP+20 ms, S3 VRP+20 ms, S4 - 2 ms von SCL bis VRP | | | S2: S3: S4: | | S2: S3: S4: | | S2: S3: S4: |
| | | | Event: 0 | | Event: 0 | | Event: 0 |
| Ventrikuläre Burst Stimulation zum Auslösen von VT | | | | | | | |
| 5 s Dauer | 2x Reizschwelle | 4x Reizschwelle | | | | | |
| 50 ms / 100 Stimuli | | | | | | | |
| 40 ms / 125 Stimuli | | | | | | | |
| 30 ms / 166 Stimuli | | | | | | | |
| 20 ms / 250 Stimuli | | | | | | | |
| 10 ms / 500 Stimuli | | | | | | | |
| wird Tachykardie ausgelöst, wird sie reproduziert | | | | | | | |
| Isoprenalin | | | | | | | |
| Atriale Burst Stimulation zum Auslösen von AF nach Isoprenalin | | | | | | | |
| 5 s Dauer | 2x Reizschwelle | 4x Reizschwelle | | | | | Bemerkungen: |
| 50 ms / 100 Stimuli | | | | | | | |
| 40 ms / 125 Stimuli | | | | | | | |
| 30 ms / 166 Stimuli | | | | | | | |
| 20 ms / 250 Stimuli | | | | | | | |
| 10 ms / 500 Stimuli | | | | | | | |
| wird Tachykardie ausgelöst, wird sie reproduziert | | | | | | | |
| Ventrikuläre Burst Stimulation zum Auslösen von VT nach Isoprenalin | | | | | | | |
| 5 s Dauer | 2x Reizschwelle | 4x Reizschwelle | | | | | Bemerkungen: |
| 50 ms / 100 Stimuli | | | | | | | |
| 40 ms / 125 Stimuli | | | | | | | |
| 30 ms / 166 Stimuli | | | | | | | |
| 20 ms / 250 Stimuli | | | | | | | |
| 10 ms / 500 Stimuli | | | | | | | |
| wird Tachykardie ausgelöst, wird sie reproduziert | | | | | | | |

Tabelle 4: **Versuchsprotokoll der EPU bei der Maus.**

Als Standard wurde dieses Protokoll für jede EPU geführt. Die freien Spalten lassen Platz für Anmerkungen während des Versuchs. SNRT = Sinusknotenerholungszeit, WBP = Wenckebachperiodik, AVNRP = AV-nodale Refraktärzeit, ARP = Atriale Refraktärzeit, AB = Atriale Burststimulation. VRP = Ventrikuläre Refraktärzeit, S1S1 = Zykluslänge der ersten Stimuli, S2 = erster Extrastimulus, S3 = zweiter Extrastimulus, S4 = dritter Extrastimulus, VB = Ventrikuläre Burststimulation, CL = Zykluslänge, SCL = Sinuszykluslänge, ms = Millisekunden, s = Sekunden. Eigene Abbildung.

2.3.9 Heart Rate Turbulence

Hintergrund

Die HRT ist ein elektrophysiologisches Phänomen, das durch eine isolierte vorzeitige ventrikuläre Kontraktion (VPC) zu einer zeitweiligen physiologischen Modulation der Hämodynamik führt. Dabei kommt es zu einem frühen Anstieg der Herzfrequenz, quantifiziert als TO, gefolgt von einer graduellen Frequenzverlangsamung, quantifiziert als TS, bis auf das präektopische Niveau der Herzfrequenz (Bauer 2008). Vermittelt wird dies durch den Barorezeptorreflex, welcher ein Teil des autonomen Nervensystems ist. Die HRT gilt als wichtiger Parameter in der klinischen Untersuchung und Risikostratifizierung nach Myokardinfarkten, als Verlaufsparemeter der Herzinsuffizienz sowie als prädiktiver Marker für den SCD (Bauer 2008).

Physiologisch gesehen geben die aortalen und karotidalen Barorezeptorafferenzen infolge der hämodynamisch ineffizienten VPC weniger Signale ab, was zu einer vagalen Hemmung und damit zu einem Überwiegen des Sympathikus führt. Folglich kommt es zu einem Anstieg der Herzfrequenz (*early acceleration*). Nach etwa acht Schlägen kommt es zu einer Verlangsamung der Herzfrequenz (*late deceleration*), bevor sie anschließend allmählich das präektopische Niveau wieder erreicht (Abb. 20). Die verzögerte Abnahme der Herzfrequenz begründet sich in der verzögerten vasomotorischen Antwort des Vagus auf den sympathisch bedingten erhöhten arteriellen Blutdruck (Bauer 2008).

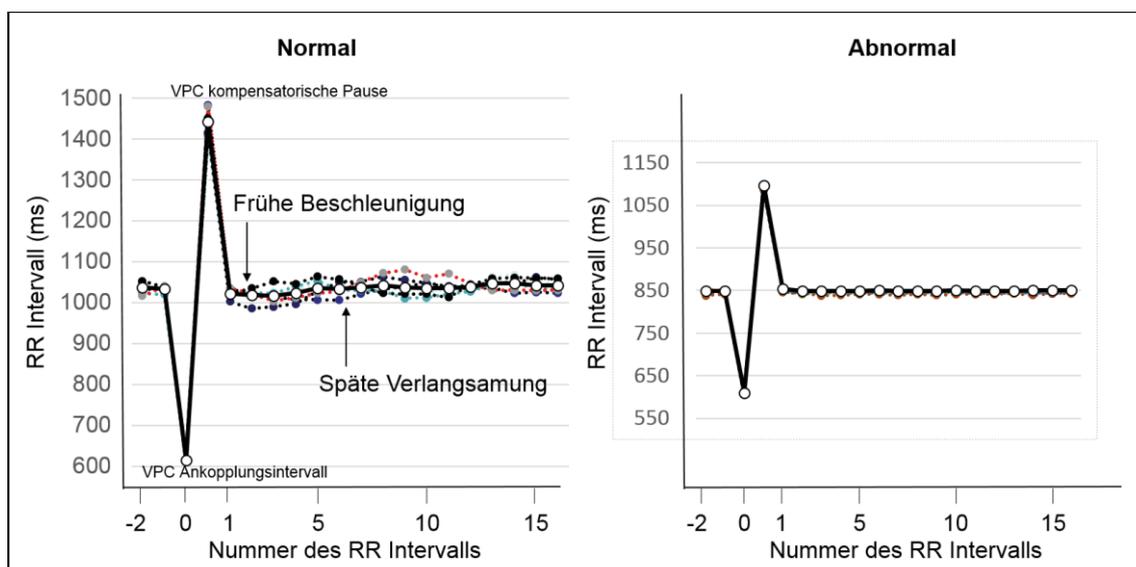


Abb. 20: HRT Muster nach einer vorzeitigen ventrikulären Extrasystole.

Physiologischerweise führt die vorzeitige ventrikuläre Extrasystole (VPC) zur initialen Beschleunigung mit konsekutiver Verlangsamung der Herzfrequenz (links, Einzelheiten im Text). Ist diese physiologische Reaktion nach einem Myokardinfarkt oder bei Herzinsuffizienz gestört, bleibt der gegenregulatorische Effekt auf die Herzfrequenz nach einer vorzeitigen ventrikulären Extrasystole aus (rechts). ms = Millisekunden. Eigene Abbildung.

Nach einem Myokardinfarkt oder bei Herzinsuffizienz ist die gegenregulatorische Antwort auf die VPC über den Barorezeptorreflex gestört und eine Veränderung der Herzfrequenz bleibt aus (Abb. 20).

Versuchsaufbau

Zum Versuchsaufbau gehören das Oberflächen EKG, der Stimulusgenerator 4002 (Multi Channel Systems GmbH) und ein Powerlab 8/30 (ADInstruments), welche mit dem Arbeitsrechner verbunden wurden. Zur Aufzeichnung und Analyse des EKG wurde die Software LabChart® 7.2 (ADInstruments) verwendet. Mit dem Programm MCII Stimulus (Multi Channel Systems GmbH) wurden die Dauer, Länge, Intensität und Anzahl der Stimuli eingestellt.

Durchführung

Die HRT wurde zur Verringerung der Versuchsdauer getrennt von der EPU durchgeführt und unterschied sich von der EPU durch die Verwendung eines Bipolarkatheters und der verwendeten Anästhesie. Die Sedierung wurde mit Pentobarbital 30 mg/kg i.p. geführt, weil höhere Dosierungen Intervallverlängerungen von PQ, QRS, QT und RR bewirken (s.o.) (Zeller 2007). Die sedierte Versuchsmaus wurde auf eine ca. 30°C warme Unterlage gelegt (Small Operating Table, BioScience). Die Vorgehensweise zum Einbringen und Verschieben des Katheters war dieselbe wie bei der EPU (s. EPU Durchführung). Das Oberflächen EKG wurde mit dem BioAmp® verbunden und die Pins des bipolaren Katheters in den Stimulusgenerator gesteckt. Während der gesamten Prozedur wurden Atmung, Herzfrequenz sowie Reflexe der Maus kontinuierlich überwacht, um Schmerzen und Leiden des Versuchstieres auf ein Minimum zu begrenzen. Zum Ende des Versuchs wurden die Tiere zervikoluxiert und über die Tierkörperbeseitigungsanlage entsorgt.

Zur HRT wurde eine programmierte ventrikuläre Stimulation an $n = 9$ Mäusen jeweils TASK-1^{+/+} und TASK-1^{-/-} durchgeführt. Nach Protokoll wurde der rechte Ventrikel mit vorzeitigen Ankopplungsintervallen (70, 60 und 50 ms) vor und nach der Gabe von Isoprenalin 2 mg/kg i.p. stimuliert. Kriterien für eine stimulierte VPC ist ein ventrikulärer Schlag mit >20% Vorzeitigkeit, gefolgt von einer kompensatorischen Pause >120% der fünf RR-Abstände vor der VPC (Bauer 2008). Mindestens 10 VPCs der jeweiligen Ankopplungsintervalle wurden gemittelt, da die HRT weiteren vegetativ-physiologischen Frequenzschwankungen unterliegt. Sollte es nicht zu einem Ansteigen der Herzfrequenz um mindestens 30 % bzw. einer Verkürzung des RR-Intervalls unter 100 ms kommen, wurde die Hälfte der Startdosis von Isoprenalin nachgegeben (Brunner 2001).

Analyse

Mittels einer standardisierten Berechnungsformel für TO und TS kann der Barorezeptorreflex quantifiziert werden (Abb. 21). Zur Berechnung wurden nach dem Consensus der „Internationalen Gesellschaft für Holter und nicht-invasive Elektrophysiologie“ (Bauer 2008) folgende Formeln verwendet:

$$TO = (RR_1 + RR_2) - (RR_{-2} + RR_{-1}) / (RR_{-2} + RR_{-1}) \cdot 100 [\%]$$

$$TS = \text{STEIGUNG}(\text{RR}_{x1} \text{ bis } \text{RR}_{x2}) \cdot 1000$$

RR₋₁ und RR₋₂ sind die beiden RR-Intervalle, die der VPC vorangehen. RR₁ und RR₂ sind die beiden RR-Intervalle, die der VPC folgen. RR₃ bis RR₇ beziehen sich auf die Nummer der RR Intervalle nach der VPC. Der TS ist definiert als die Steigung der steilsten Regression von fünf RR-Intervallen innerhalb der ersten 15 Schläge nach der VPC. Physiologischerweise spiegelt sich die anfängliche Frequenzsteigerung nach einer VPC als negative TO wider und die Frequenzverlangsamung als positive TO (Bauer 2008). Eine HRT Messung enthält die Herzaktionen von 17 RR Intervallen im Zeitintervall von 2,5 – 3 s (Abb. 22).

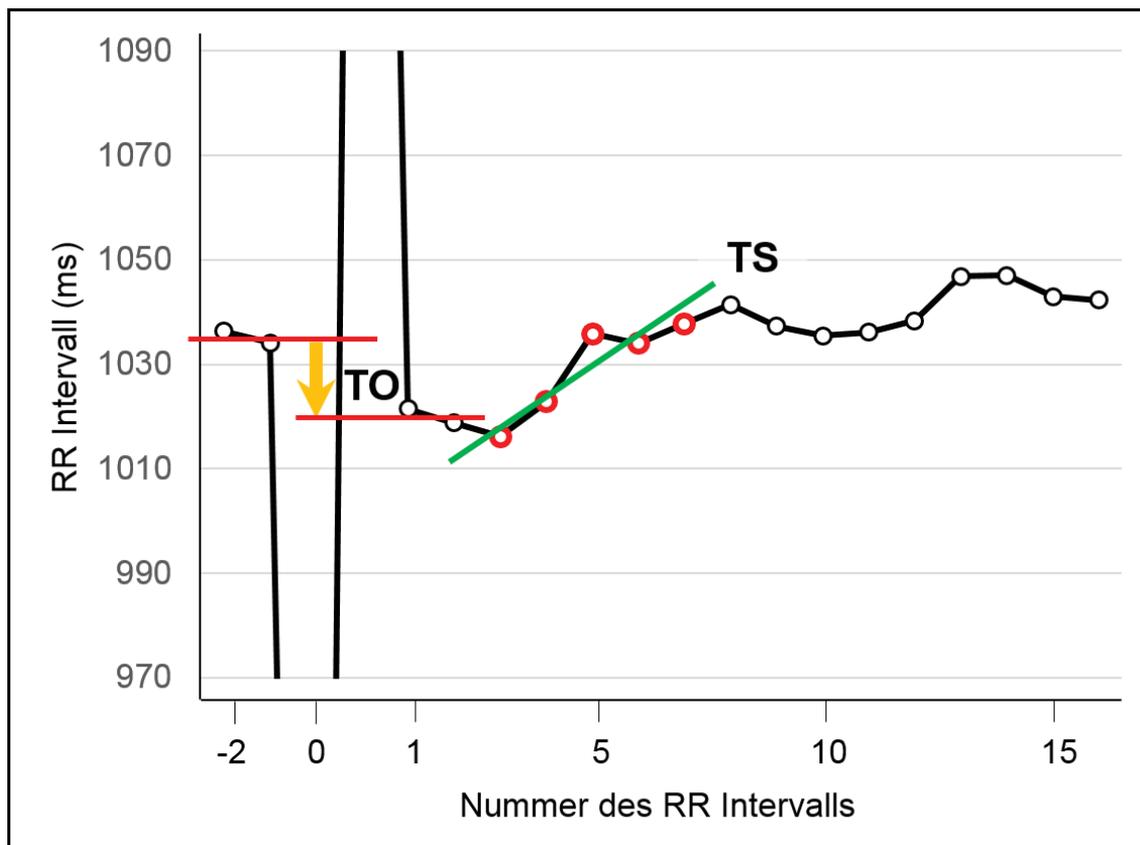


Abb. 21: **Berechnung von TO und TS als Parameter für die HRT.**

Die y-Achse zeigt die entsprechenden RR-Intervalle beim Menschen. Auf der x-Achse ist die Anzahl der RR-Intervalle vor und nach der VPC (Nullpunkt) angegeben. Der TO berechnet sich prozentual aus dem RR-Intervall nach der VPC bezogen auf das RR-Intervall vor der. Der TS wird ermittelt aus der Steigung der steilsten Regression von fünf RR-Intervallen innerhalb der ersten 15 Schläge nach der VPC. ms = Millisekunden. Eigene Abbildung.

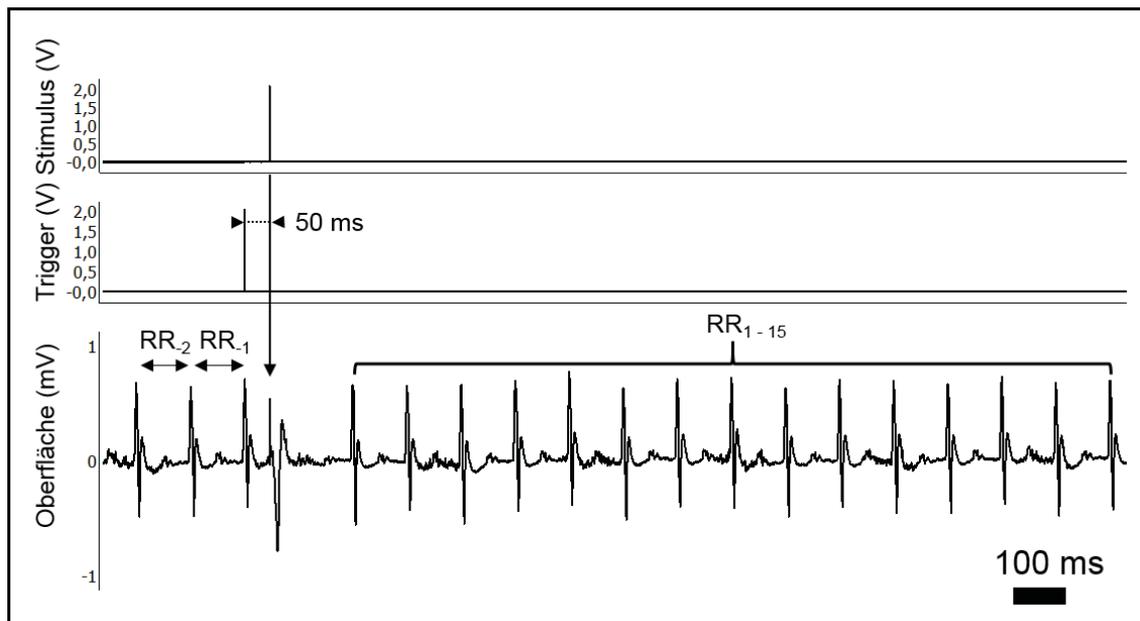


Abb. 22: HRT Ansicht in LabChart®.

LabChart® Version 7.2 (ADI, Spechbach Deutschland). Drei Kanäle sind dargestellt. Von oben nach unten: Stimulus, Trigger und Oberflächen-EKG. Es ist eine VPC mit einer Vorzeitigkeit von 50 ms zu sehen, die eine kompensatorische elektrische Pause verursacht. Bei dem physiologischen Phänomen der HRT kommt es zum frühen Anstieg, gefolgt von einer verzögerten Abnahme der Herzfrequenz bis schließlich das präektotische Frequenzniveau wieder erreicht wird (Einzelheiten im Text). mV = Millivolt, V = Volt, ms = Millisekunden. Eigene Abbildung.

2.3.10 Analyse und Statistische Auswertung

Zwei Untersucher analysierten unabhängig voneinander die aufgezeichneten EKGs jeweils verblindet bezüglich des Genotyps. Die ermittelten Werte wurden anschließend gemittelt.

Zur statistischen Auswertung diente die Software GraphPadPrism® (La Jolla, CA, USA). Gruppenunterschiede wurden mit dem ungepaarten t-Test, einseitiger ANOVA und linearer Regression ermittelt. Alle Daten wurden als Mittelwerte mit einfacher Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der Versuchstiere rangiert zwischen $n=6$ bis $n=16$ abhängig vom Untersuchungsmodus und ist an erklärter Stelle gekennzeichnet. Als Signifikanzniveau wurde ein p -Wert <0.05 festgelegt.

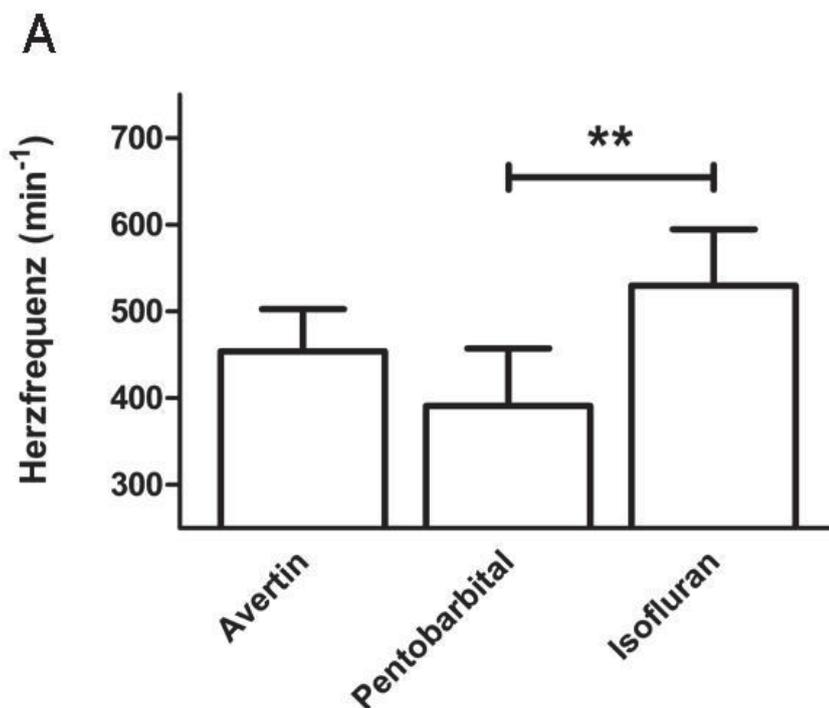
3 Ergebnisse

3.1 Besonderheiten im Oberflächen-EKG der TASK-1^{-/-} Maus

3.1.1 Einfluss der Anästhesie auf die Herzfrequenz bei der TASK-1^{+/+} und TASK-1^{-/-} Maus

Unter verschiedenen Sedierungsarten wurde die Herzfrequenz zunächst bei den Wildtypen (TASK-1^{+/+}) verglichen (n = 6-16). Bei der Anästhesie mit Pentobarbital war die Herzfrequenz signifikant niedriger als die bei Isofluran (Abb. 23A). Während Avertin® eine Mittelposition in Bezug zur mittleren Herzfrequenz einnimmt ist die Herzfrequenz unter Pentobarbital niedrig und unter Isofluran hoch.

Im nächsten Schritt erfolgte ein Vergleich beider Genotypen. Für das TASK-1 defiziente Mausmodell in Narkose fanden wir insgesamt höhere Herzfrequenzen als bei den Wildtypen. Jedoch konnte lediglich bei Isofluran eine statistische Signifikanz (p = 0.0011, jeweils n = 6) errechnet werden (Abb. 23B). Bei der Anästhesie mit Avertin® (p = 0,2679, n = 13 bzw. 16) und Pentobarbital (p = 0,2676, jeweils n = 7) präsentieren sich die Genotypen ohne bedeutsamen Frequenzunterschied, obwohl eine Tendenz zu einer höheren Frequenz bei den TASK-1^{-/-} im Vergleich zu den TASK-1^{+/+} gegeben ist.



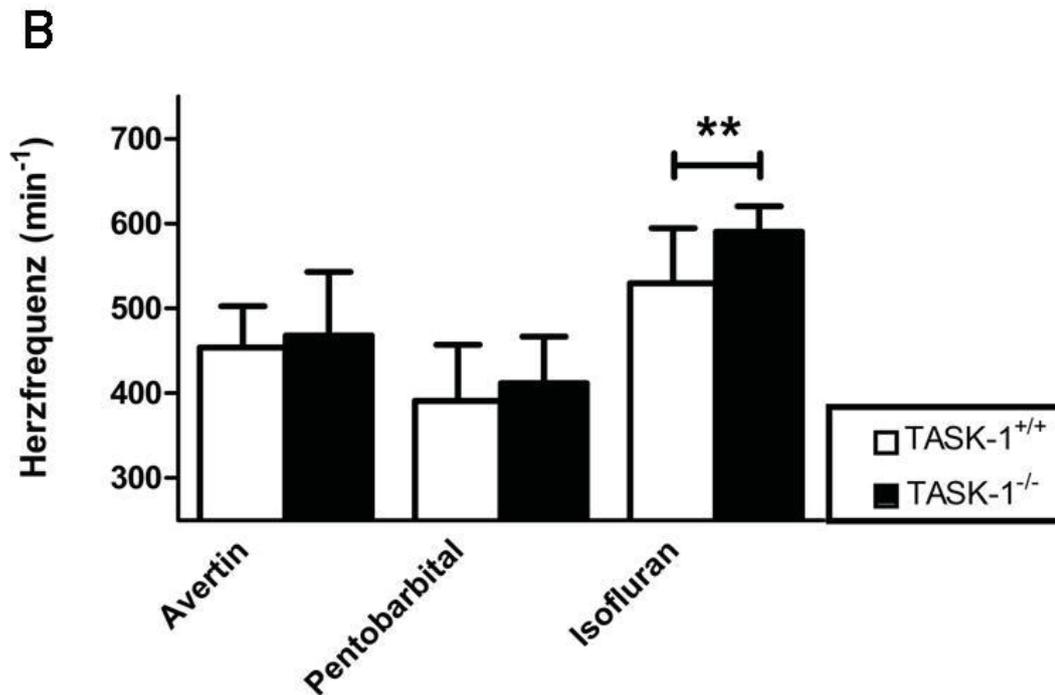


Abb. 23: **Herzfrequenzen im Oberflächen-EKG: Sedierungsarten im Vergleich.**

Zunächst wurde der Einfluss der Anästhesie auf die Herzfrequenz bei den Wildtyp-Mäusen (TASK-1^{+/+}) untersucht. Die Anästhesien im Vergleich zeigen eine niedrige Herzfrequenz bei Avertin® (n = 16) und Pentobarbital (n = 7), während die Herzfrequenz unter Isofluran (n = 6) eher hoch ist. Der Herzfrequenz-Unterschied zwischen Isofluran und Pentobarbital war statistisch relevant (einseitiger ANOVA, ** p<0.005) (A). Die mittlere Herzfrequenz liegt bei den TASK-1^{-/-} Mäusen höher als bei den Wildtypen (ungepaarter t-Test, ** p<0.005). Unter Avertin® und Pentobarbital ist die Herzfrequenz bei den TASK-1^{-/-} höher (n = 13 für Avertin, 7 für Pentobarbital), jedoch nicht statistisch signifikant. Dahingegen ist die mittlere Herzfrequenz unter Isofluran höher bei den TASK-1^{-/-} als bei den TASK-1^{+/+} Mäusen (ungepaarter t-Test, ** p<0.005, je Genotyp n = 6) (B). min⁻¹ = pro Minute.

3.1.2 Erregungsbildung und –ausbreitung der TASK-1 defizienten Maus im Vergleich zu den Wildtypen

Die Erregungsbildung und Erregungsausbreitung über das Myokard, elektrokardiographisch gemessen in Ableitung II nach Einthoven, sind unauffällig. Im Oberflächen-EKG der C57Bl/6 Maus lassen sich klar P, QRS und T voneinander abgrenzen (Abb. 24). Im Vergleich zum menschlichen EKG weist das EKG der Maus Unterschiede auf, die bereits an anderer Stelle beschrieben wurden (s. Einleitung). Die erhobenen EKG-Parameter P-Welle, PR- bzw. AV-Zeit, QRS Intervall sind nicht signifikant verschieden zwischen den Genotypen (Tabelle 5).

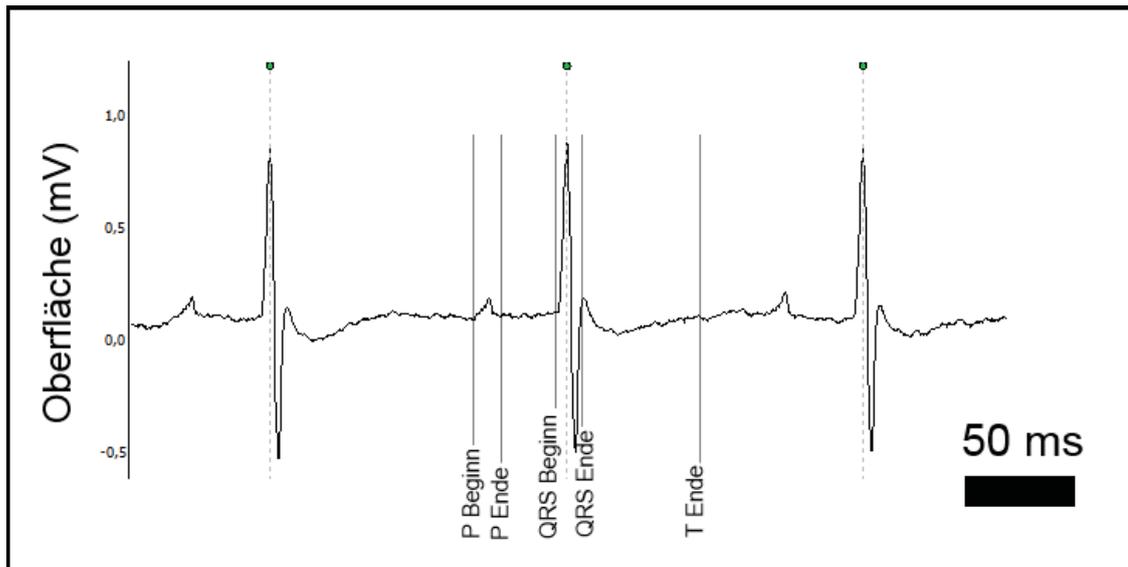


Abb. 24: **EKG-Auswertung mit LabChart®.**

Die von der *Software* LabChart® (ADI, Spechbach Deutschland) vorgeschlagenen Messpunkte wurden manuell unabhängig von zwei Untersuchern, verblindet bezüglich des Genotyps, korrigiert. Die Abweichung der beiden Untersuchungen war nicht signifikant. Nicht dargestellt ist die Amplitudenmessung, welche das Programm zuverlässig selbst bestimmt. mV = Millivolt, ms = Millisekunden.

| | Avertin® | | | Pentobarbital | | | Isofluran | | |
|-------------------------|-----------------|-----------------|----|-----------------|-----------------|----|-----------------|-----------------|----|
| | WT | KO | p | WT | KO | p | WT | KO | p |
| n | 16 | 13 | | 7 | 7 | | 6 | 6 | |
| RR (ms) | 133,7 ± 14,3 | 125,7 ± 22,4 | ns | 156,9 ± 24,0 | 147,8 ± 19,0 | ns | 108,7 ± 6,2 | 104,3 ± 7,1 | ns |
| HF (min ⁻¹) | 454 ± 48,7 | 390,8 ± 74,6 | ns | 391,7 ± 66,3 | 412,9 ± 56,1 | ns | 553,5 ± 31,9 | 579,3 ± 40,2 | ns |
| P (ms) | 9,3 ± 1,7 | 8,6 ± 1,7 | ns | 7,1 ± 0,8 | 8,2 ± 1,7 | ns | 9,2 ± 1,7 | 9,6 ± 1,5 | ns |
| P Amp (mV) | 0,10 ± 0,03 | 0,09 ± 0,02 | ns | 0,10 ± 0,01 | 0,09 ± 0,02 | ns | 0,09 ± 0,01 | 0,11 ± 0,04 | ns |
| PR (ms) | 42,2 ± 3,7 | 45,2 ± 6,2 | ns | 39,6 ± 2,9 | 40,5 ± 2,1 | ns | 42,1 ± 4,5 | 44,3 ± 5,2 | ns |
| QRS (ms) | 9,6 ± 0,9 | 10,1 ± 1,4 | ns | 9,1 ± 1,8 | 10,3 ± 1,2 | ns | 9,9 ± 1,4 | 10,5 ± 1,7 | ns |
| R Amp (mV) | 0,88 ± 0,22 | 0,58 ± 0,15 | ns | 0,94 ± 0,18 | 0,58 ± 0,16 | ns | 0,72 ± 0,21 | 0,72 ± 0,16 | ns |

Tabelle 5: **EKG-Parameter im Oberflächen-EKG unter Avertin®, Pentobarbital und Isofluran.**

Unterschiedliche Herzfrequenzen konnten in Abhängigkeit vom Anästhetikum dokumentiert werden. Insbesondere unter Pentobarbital wurde eine niedrige Herzfrequenz verzeichnet, während sie unter Isofluran relativ hoch war (s. Kapitel 3.1.3). WT = Wildtyp (TASK-1^{+/+}), KO = *Knock-Out* (TASK-1^{-/-}); n = Anzahl; ms = Millisekunden, min⁻¹ = pro Minute, mV = Millivolt, p = p-Wert, ns = nicht significant, p < 0.05 = signifikant.

3.1.3 QT Verlängerung unter Berücksichtigung des Einfluss der Anästhesie bei der TASK-1^{-/-} und TASK-1^{+/+} Maus

Das TASK-1^{-/-} Modell zeigt den Phänotyp einer QT Verlängerung unter Anästhesie mit Ketamin und Xylazin (30). Um zu differenzieren, ob die Narkose zur QT Verlängerung bei der TASK-1 defizienten Maus beiträgt, wurden die QT Intervalle beider Genotypen unter verschiedenen Anästhetika verglichen.

In Narkose mit den labormedizinisch gängigen Anästhetika Avertin® und Pentobarbital war das QT und QT_c Intervall der TASK-1^{-/-} signifikant verlängert. Bei Isofluran hingegen konnte der QT-verlängernde Effekt nicht gefunden werden (Tabelle 6). Die deutliche Differenz des QT Intervalls im Vergleich zu den Wildtypen zeigt Abb. 25. Die Abb. 26 – 28 skizzieren die QT Analyse im Oberflächen-EKG der Wildtypen und *Knock-Out*-Mäuse. Als Beispiel wurde je einer von mindestens 50 Schlägen ausgewählt.

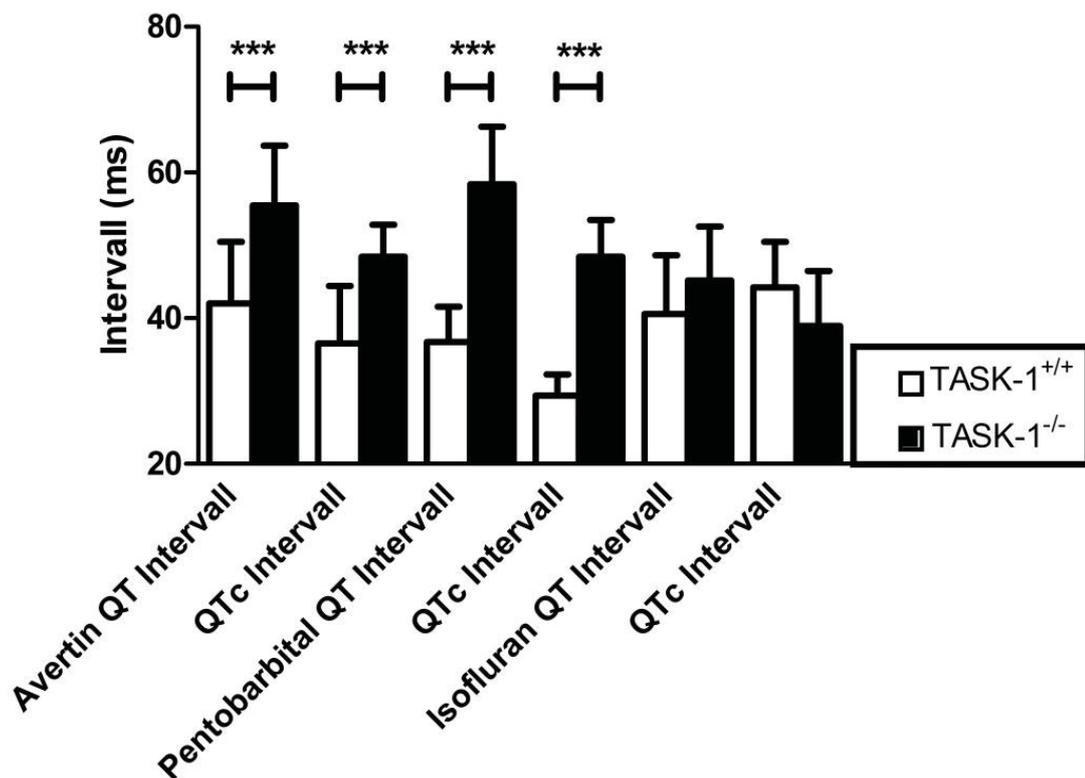


Abb. 25: QT und QT_c im Oberflächen-EKG unter verschiedenen Anästhetika.

Avertin® und Pentobarbital sedierte TASK-1^{-/-} zeigen verlängertes QT und QT_c Intervall. Im Gegensatz dazu hebt Isofluran diesen Effekt auf. Es wurden mindestens 50 QT und QT_c Intervalle pro Versuchstier analysiert. Für Mittelwerte und Anzahl (n) siehe Tabelle 5. Ungepaarter t-Test, *** p<0.0002 bzw. p<0.0001. ms = Millisekunden.

| | QT Intervall | | | | |
|----------------------|----------------------------|----|----------------------------|----|---------|
| | TASK-1 ^{+/+} (ms) | n | TASK-1 ^{-/-} (ms) | n | p-Wert |
| Avertin® | 42,0 ± 8,4 | 16 | 55,5 ± 8,2 | 13 | <0.0002 |
| Pentobarbital | 36,7 ± 4,9 | 7 | 58,4 ± 7,9 | 7 | <0.0001 |
| Isofluran | 40,6 ± 8,0 | 6 | 45,2 ± 7,4 | 6 | ns |
| | QT _c Intervall | | | | |
| | TASK-1 ^{+/+} (ms) | n | TASK-1 ^{-/-} (ms) | n | p-Wert |
| Avertin® | 36,5 ± 7,9 | 16 | 48,4 ± 4,4 | 13 | <0.0001 |
| Pentobarbital | 29,4 ± 2,9 | 7 | 48,4 ± 5,1 | 7 | <0.0001 |
| Isofluran | 38,9 ± 7,5 | 6 | 44,2 ± 6,3 | 6 | ns |

Tabelle 6: Analyse von QT und QT_c bei TASK-1^{-/-} und TASK-1^{+/+} unter verschiedenen Anästhetika.

In Narkose mit Avertin® und Pentobarbital waren die QT und QT_c Intervalle der TASK-1^{-/-} Mäuse verlängert ($p < 0.0001$ bzw. 0.0002). Isofluran hingegen führte zu einer nicht signifikanten Verlängerung von QT und QT_c. $p < 0.05$ = signifikant. n = Anzahl, ns = nicht signifikant, ms = Millisekunden.

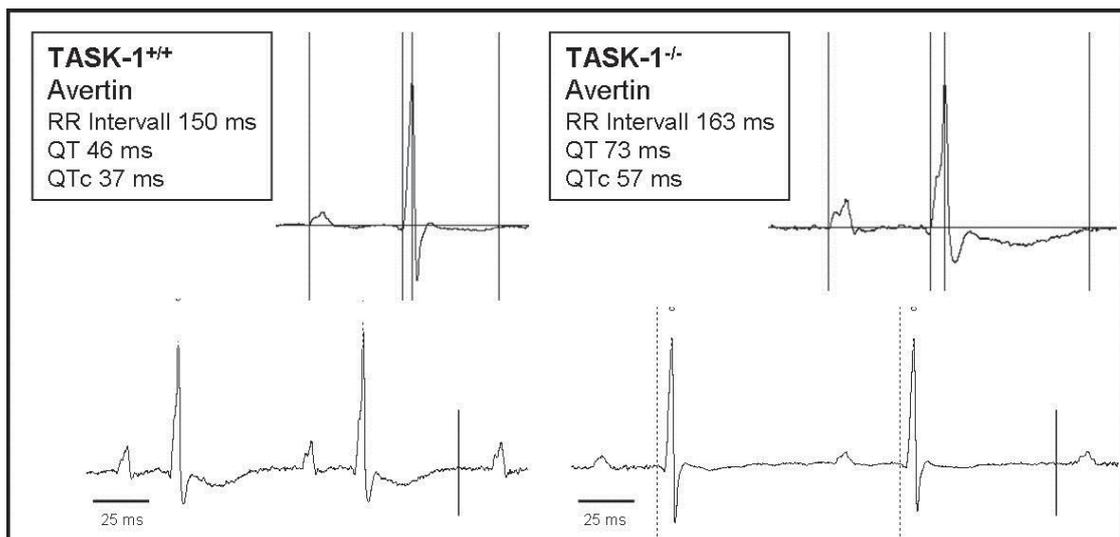


Abb. 26: Analyse des QT Intervalls im Oberflächen-EKG unter Avertin®.

Beispielhaft dargestellt einer von mindestens 50 EKG-Komplexe zur Analyse des QT Intervalls mit der LabChart Software. Die Intervalle wurden manuell und unabhängig von zwei Untersuchern, verblindet bezüglich des Genotyps, korrigiert. Die Abweichung der beiden Untersuchungen war nicht signifikant. ms = Millisekunden.

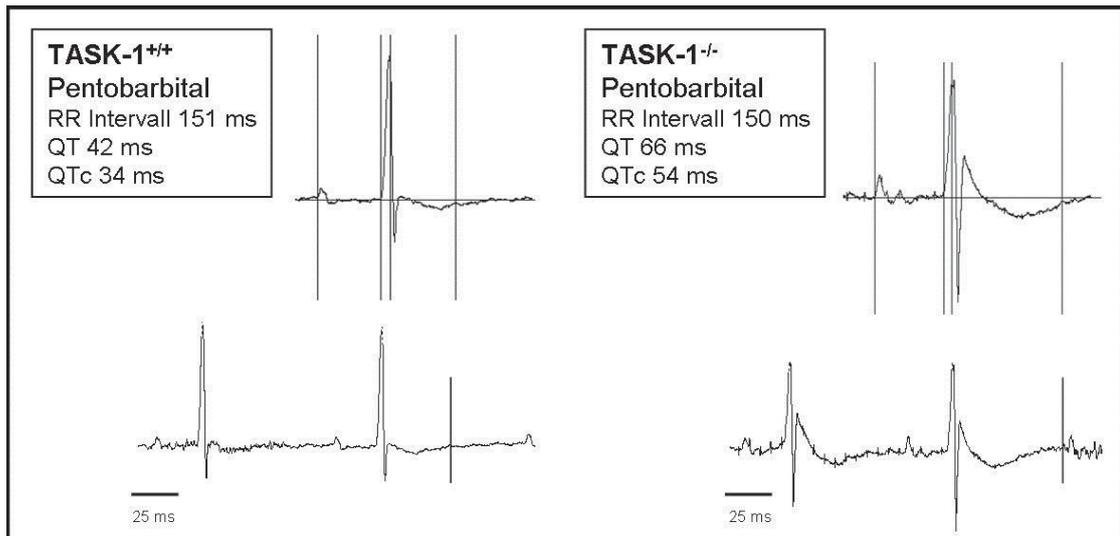


Abb. 27: **Analyse des QT Intervalls im Oberflächen-EKG unter Pentobarbital.**

Beispielhaft dargestellt einer von mindestens 50 EKG-Komplexe zur Analyse des QT Intervalls mit der LabChart Software. Die Intervalle wurden manuell und unabhängig von zwei Untersuchern, verblindet bezüglich des Genotyps, korrigiert. Die Abweichung der beiden Untersuchungen war nicht signifikant. ms = Millisekunden.

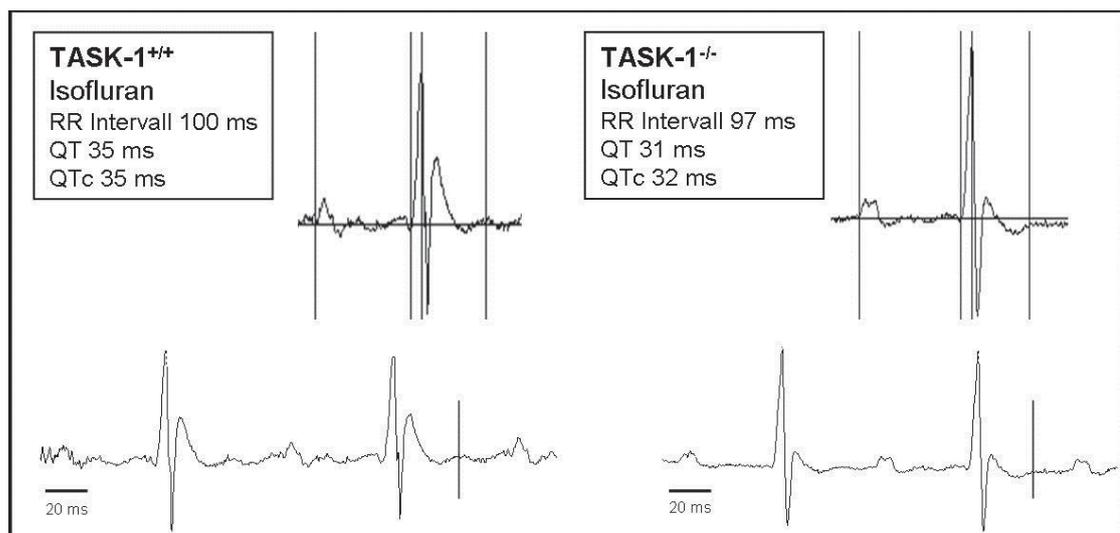


Abb. 28: **Analyse des QT Intervalls im Oberflächen-EKG unter Isofluran.**

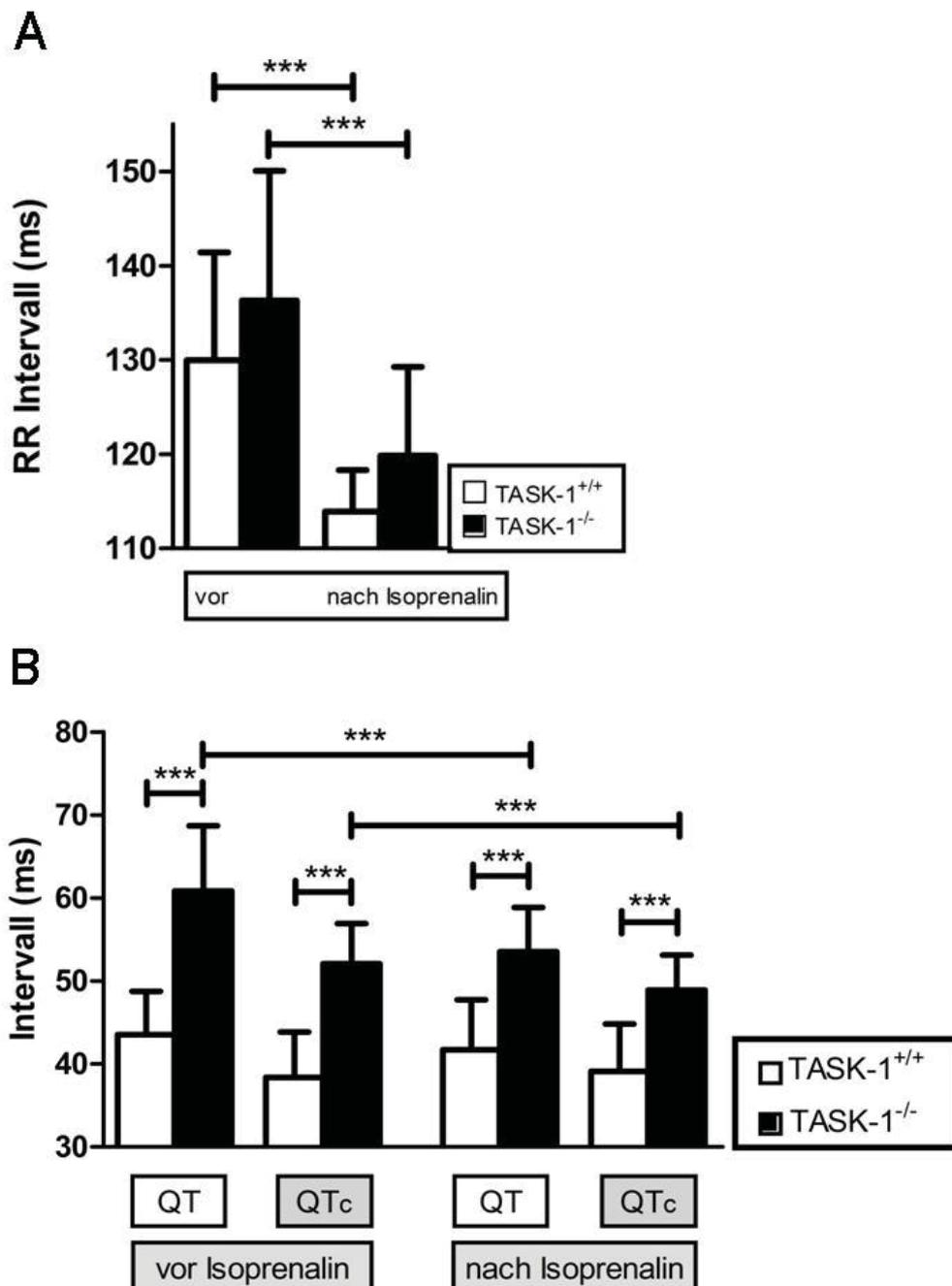
Beispielhaft dargestellt einer von mindestens 50 EKG-Komplexe zur Analyse des QT Intervalls mit der LabChart Software. Die Intervalle wurden manuell und unabhängig von zwei Untersuchern, verblindet bezüglich des Genotyps, korrigiert. Die Abweichung der beiden Untersuchungen war nicht signifikant. ms = Millisekunden.

3.1.4 Einfluss der beta-adrenergen Stimulation mit Isoprenalin auf das QT und QT_c Intervall der TASK-1^{-/-} und der TASK-1^{+/+} Maus

Charakteristisch für ein Long QT Syndrom (LQTS) hat die TASK-1 defizienten Maus ein signifikant verlängertes QT Intervall. Um diesem Verdacht weiter nach zu gehen, wurde der Einfluss von beta-adrenergem Isoprenalin auf die QT und QT_c Intervalle untersucht (s.u.). Isoprenalin, intraperitoneal gegeben, wirkt positiv

chronotrop sowohl auf die TASK-1 defizienten Tiere als auch auf die TASK-1-Träger (Abb. 29A).

Eine Verlängerung des QT Intervalls unter steigender Herzfrequenz wie sie typischerweise beim LQTS 1 vorkommt, kann bei der TASK-1^{-/-} nicht nachgewiesen werden. Das QT und QT_c Intervall verkürzt sich unter Isoprenalin bei den TASK-1^{-/-} Mäusen, nicht aber bei den Wildtypen (p<0.001). Dennoch bleibt das QT und QT_c Intervall im direkten Vergleich länger bei den TASK-1 defizienten Mäusen (p<0.001, n = 6) (Abb. 29B). Abb. 29C veranschaulicht eine Annäherung beider Genotypen hinsichtlich des QT und QT_c Intervalls unter betaadrenerger Stimulation mit Isoprenalin.



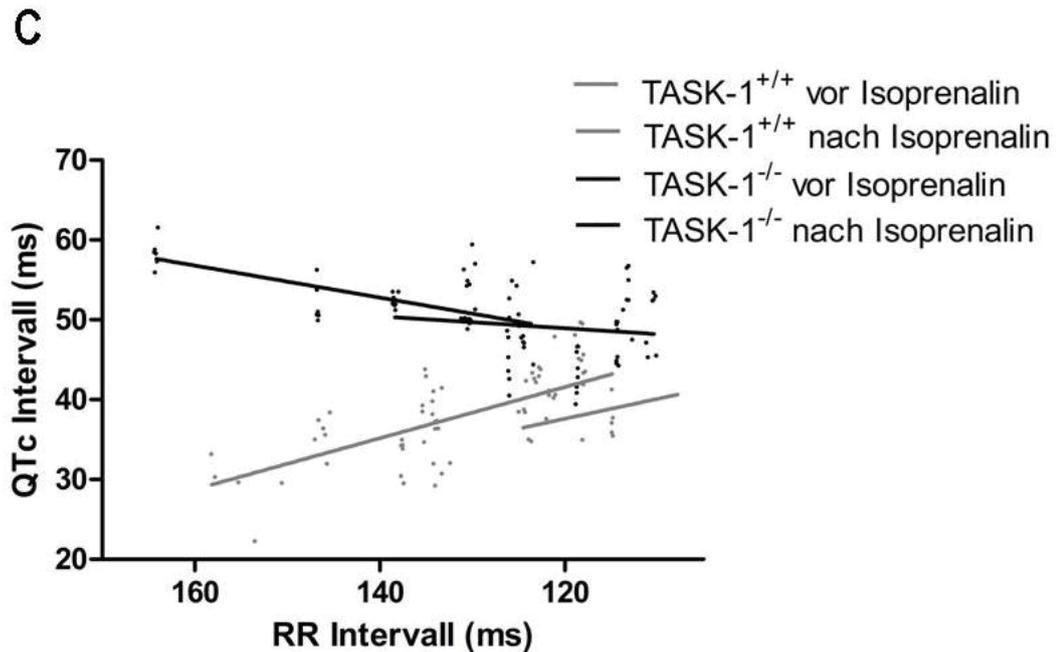


Abb. 29: Einfluss von Isoprenalin auf RR, QT und QT_c.

Nach Isoprenalingabe ist ein positiv chronotroper Effekt bei TASK-1^{+/+} und TASK-1^{-/-} Mäusen unter Narkose mit Avertin® nachweisbar ($p < 0.001$, $n = 6$) (A). Vor und nach Isoprenalin sind die QT und QT_c Intervalle bei den TASK-1^{-/-} Mäusen länger als bei den TASK-1^{+/+} Mäusen (t-Test, $p < 0.001$, $n = 6$). Nach der Gabe von Isoprenalin zeigt sich eine Verkürzung des QT und QT_c Intervalls bei den TASK-1^{-/-} Mäusen (t-Test, $p < 0.001$, $n = 6$), nicht jedoch bei den TASK-1^{+/+} Mäusen (B). Im Streudiagramm, RR- gegen QT_c Intervall, ist eine Annäherung beider Genotypen bei zunehmend niedrigeren RR-Intervallen zu sehen. TASK-1^{+/+} vor Isoprenalin $y = -0,3x + 80$, TASK-1^{+/+} nach Isoprenalin $y = 0,2x + 67$, $n = 72$. TASK-1^{-/-} vor Isoprenalin: $y = 0,2x + 25$, TASK-1^{-/-} nach Isoprenalin: $y = 0,08x + 40$, $n = 40$ (C). ms = Millisekunden, n = Anzahl.

3.2 Elektrophysiologische Untersuchung der TASK-1^{-/-} Maus

Analog zu klinischen Protokollen erfolgte die invasive EPU mit einem Oktapolar-katheter zur weiteren Charakterisierung und Lokalisation von TASK-1 im Herzen. Die EPU wurde an $n = 16$ TASK-1^{+/+} und $n = 12$ TASK-1^{-/-} Mäusen durchgeführt. Die Hypothese lautete, TASK-1 Defizienz führt zu Repolarisationsstörungen und trägt zur ventrikulären Arrhythmogenese bei.

Die Sinusknotenfunktion wurde über die SNRT ermittelt. Obwohl die SNRT bei einer Zykluslänge von 100 ms signifikant verkürzt ist bei den TASK-1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen, wird der Unterschied nach Frequenzkontrolle aufgehoben. Die SNRT_c und die relative SNRT bei den Zykluslängen 120, 100 und 80 ms zeigen bei den TASK-1^{-/-} und TASK-1^{+/+} Mäusen keinen signifikanten Unterschied.

In etwa einem Drittel der Fälle konnte ein His Signal identifiziert werden. Mit dem Elektrodenpaar 5-6 auf Höhe der AV-Klappen-Ebene konnte in der Regel das His-Signal abgeleitet werden. Das Aufzeichnen gelang durch manuelle Rotations-Manöver während der intrakardialen Lagekontrolle des Katheters zu

Beginn einer jeden EPU. Das Anlegen der Messpunkte für AH und HV erfolgte, sobald eine klare Abweichung von der isoelektrischen Linie als bi- oder triphasischer Ausschlag sichtbar wurde (Abb. 30). AH entspricht der Dauer der atrialen Erregungsausbreitung bis zum His-Bündel, HV der Überleitungsdauer vom His-Bündel auf das ventrikuläre Myokard. Je Versuchstier wurde der Mittelwert aus fünf aufeinander folgenden Messungen bestimmt. Die gemessene AV-Überleitungszeit sowie die Wenckebachperiodik ergeben keine bedeutsamen Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Tabelle 6).

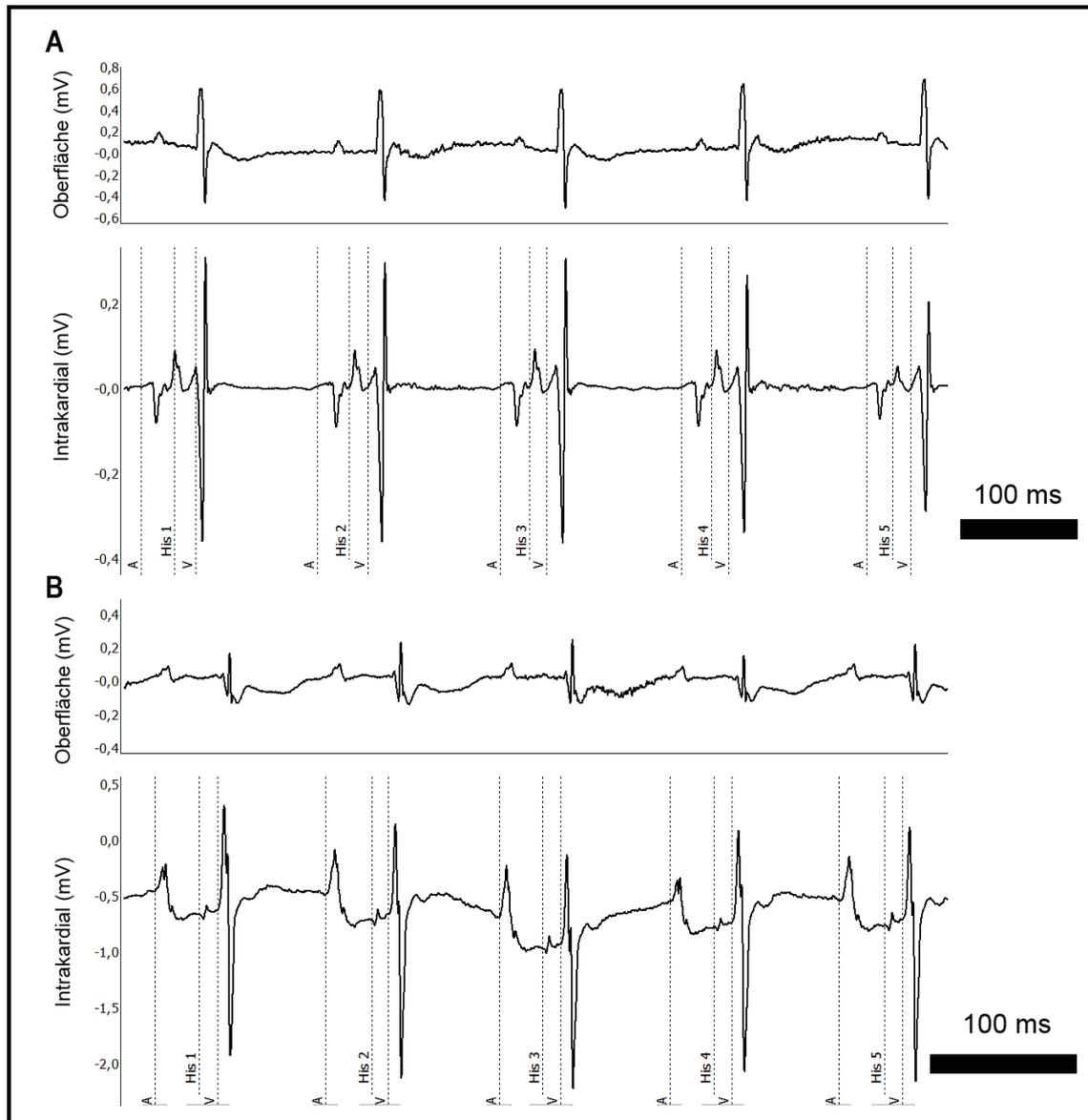


Abb. 30: His Signal Messung intrakardial während der EPU.

Dargestellt sind His Signal Messungen bei einer TASK-1^{+/+} (A) und bei einer TASK-1^{-/-} Maus (B). Es wurden jeweils fünf aufeinander folgende Messungen gemittelt. A = Beginn der atrialen Erregung, His1 – His5 = Beginn des His Signals, V = Beginn der ventrikulären Erregung. ms = Millisekunden.

Die atrioventrikuläre (AV) Überleitung wurde mit Hilfe der Wenckebachperiodik des AV-Knotens und der AV-nodalen Refraktärperiode analysiert. Weiterhin wurden die Refraktärperioden von Atrium und Ventrikel durch programmierte Extrastimulation untersucht. Keine Unterschiede im statistischen Vergleich von TASK-1^{-/-} und TASK-1^{+/+} können hierbei gefunden werden. Die erhobenen Daten fasst Tabelle 7 zusammen.

Die atriale und ventrikuläre Vulnerabilität wurde mit Hilfe einer repetitiven Stimulation bei unterschiedlichen Zykluslängen (Burststimulation) bestimmt (Abb. 16, Kapitel 2.3.8). Die Messungen erfolgten erst vor und dann nach der

| | TASK-1 ^{+/+} | n | TASK-1 ^{-/-} | n | p-Wert |
|--------------------------------------|-----------------------|----|-----------------------|----|--------|
| Sinus Knoten Funktion | | | | | |
| SNRT 120 ms | 180 ± 29 | 14 | 174 ± 33 | 9 | n.s. |
| SNRT 100 ms | 179 ± 33 | 15 | 156 ± 23 | 12 | < 0.05 |
| SNRT 80 ms | 168 ± 37 | 7 | 153 ± 25 | 11 | n.s. |
| SNRTc (bei 100 ms) | 44 ± 22 | 15 | 40 ± 14 | 10 | n.s. |
| SNRT/SCL*100 (bei 100 ms) | 133 ± 14 | 15 | 122 ± 17 | 12 | n.s. |
| Atrioventrikuläre Überleitung | | | | | |
| AV Intervall | 39 ± 6 | 5 | 41 ± 1 | 5 | n.s. |
| AH Intervall | 26 ± 7 | 5 | 29 ± 3 | 5 | n.s. |
| HV Intervall | 12 ± 2 | 5 | 12 ± 3 | 5 | n.s. |
| Wenckebach Punkt | 81 ± 7 | 13 | 81 ± 6 | 12 | n.s. |
| Refraktärperioden | | | | | |
| AV-Knoten RP 120 ms | 57 ± 11 | 9 | 55 ± 7 | 7 | n.s. |
| AV-Knoten RP 110 ms | 56 ± 10 | 14 | 55 ± 8 | 11 | n.s. |
| AV-Knoten RP 100 ms | 62 ± 9 | 14 | 57 ± 10 | 11 | n.s. |
| ARP 120 ms | 50 ± 12 | 10 | 54 ± 6 | 5 | n.s. |
| ARP 110 ms | 50 ± 9 | 14 | 51 ± 9 | 10 | n.s. |
| ARP 100 ms | 54 ± 10 | 14 | 51 ± 9 | 10 | n.s. |
| VRP 120 ms | 62 ± 17 | 9 | 55 ± 7 | 5 | n.s. |
| VRP 110 ms | 57 ± 15 | 12 | 59 ± 7 | 6 | n.s. |
| VRP 100 ms | 58 ± 16 | 12 | 58 ± 7 | 8 | n.s. |

Tabelle 7: *In vivo* elektrophysiologische Daten nach programmierter elektrischer Stimulation.

SNRT = *sinus node recovery time*, SNRTc = *rate corrected sinus node recovery time*, SNRT/SCL = *sinus node recovery time/sinus cycle length*, AV Intervall = Atrioventrikuläres Intervall, ARP = Atriale Refraktärperiode, VRP = Ventrikuläre Refraktärperiode. ms = Millisekunden, n = Anzahl.

| | TASK-1 ^{+/+} [n=16] | TASK-1 ^{-/-} [n=12] |
|---------------------------|---|------------------------------|
| Ereignis | Absolute Ereignisse / Anzahl Tiere mit Ereignis | |
| AF | 3/3 | 0/0 |
| Ventrikuläre Extrasystole | 10/4 | 11/4 |
| Couplet, Triplet | 6/3 | 7/3 |
| VT | 3/2 | 4/3 |

Tabelle 8: **Arrhythmien nach Burststimulation im Vorhof und im Ventrikel.**

Die Burststimulation wurde zur Testung der atrialen und ventrikulären Vulnerabilität für Herzrhythmusstörungen durchgeführt. Auf ventrikulärer Ebene traten bei beiden Genotypen gleichermaßen Arrhythmien auf. Im Gegensatz zu den TASK-1^{-/-} Mäusen, konnte bei drei Wildtyp-Mäusen auf atrialer Ebene Vorhofflimmern (AF) ausgelöst werden. n = Anzahl, AF = Vorhofflimmern, VT = Ventrikuläre Tachykardie.

intraperitonealen Gabe von Isoprenalin, um das Auftreten von Arrhythmien zu provozieren. Als Resultat der ventrikulären Burststimulation zeigen beide Genotypen eine vergleichbare Vulnerabilität. Dahingegen konnte im Gegensatz zu den TASK-1^{-/-} bei drei Wildtyp-Mäusen Vorhofflimmern ausgelöst werden (Tabelle 8).

3.3 **Heart Rate Turbulence bei der TASK-1^{-/-} Maus**

TASK-1 defiziente Mäuse zeigten in der Studie von Donner et al. eine eingeschränkte *Heart Rate Variability* (Donner 2011). Um die autonome kardiale Funktion von TASK-1 genauer zu untersuchen, diente die HRT als spezifische Untersuchung der Barorezeptorreflexsensibilität.

Der TO ist bei den TASK-1^{-/-} Mäusen signifikant reduziert verglichen mit den TASK-1^{+/+} Mäusen. In sechs RR-Abständen nach der VPC ist der TO verkürzt (Abb. 31). Hingegen zeigt sich keine Veränderung des TS (Abb. 32). Die positiven Werte der TO in allen RR-Abständen nach der VPC weist auf eine vegetative Störung der Regulation der Herzfrequenz bei den TASK-1^{-/-} Mäusen hin. Durch das Fehlen von TASK-1 bleibt ein Frequenzanstieg aus, um die kompensatorische Pause der hämodynamisch wirksamen VPC auszugleichen. Stattdessen kommt es sogar zu einer Absenkung der Herzfrequenz unter die initiale Grundfrequenz. Die verminderte Auswurfleistung wird somit nicht kompensiert, wie es physiologisch wäre am Beispiel der TASK-1^{+/+} Mäuse.

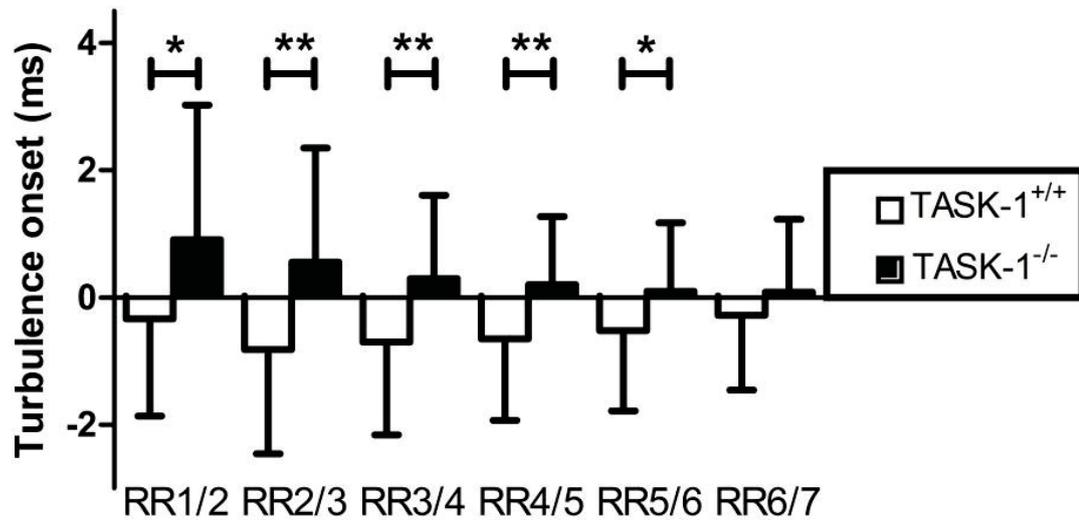


Abb. 31: TO nach elektrisch stimulierter VPC im Vergleich beider Genotypen.

TASK-1 Defizienz führt zu einem reduzierten TO. In den ersten sechs RR-Abständen nach der elektrisch stimulierten VPC zeigen sich bei der TASK-1^{-/-} Maus höhere Werte als bei den Wildtypen (n=30 VPC in n=9 je Genotyp, *p<0.05, **p<0.005). ms = Millisekunden.

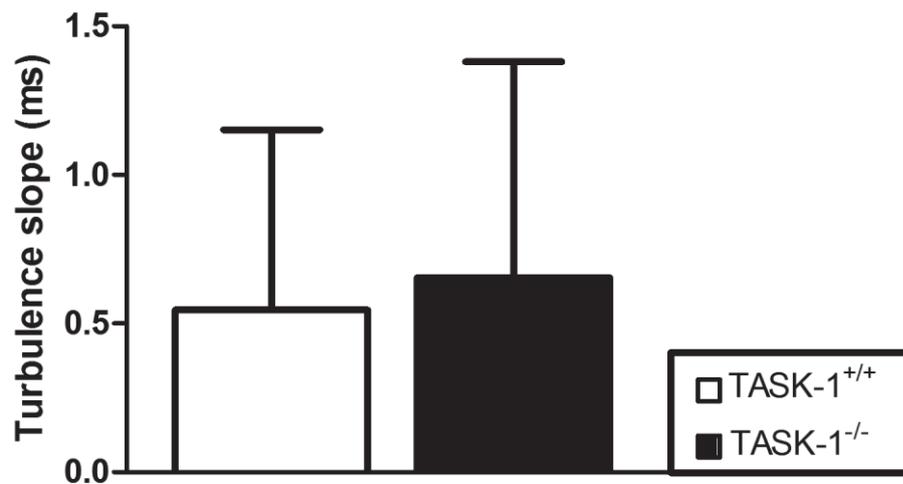


Abb. 32: TS nach elektrisch stimulierter VPC im Vergleich beider Genotypen.

Der TS, als Parameter für die späte Abnahme der Herzfrequenz im Anschluss an den TO nach der elektrisch stimulierten VPC, ist statistisch nicht verschieden. n=30 VPC in n=9 je Genotyp. ms = Millisekunden.

4 Diskussion

4.1 Befunde im Oberflächen-EKG der TASK-1^{-/-} Maus

4.1.1 Einfluss der Anästhesie auf die Herzfrequenz der TASK-1^{-/-} und TASK-1^{+/+} Maus

Die Herzfrequenz bei Mäusen ist etwa zehn Mal höher als bei Menschen. Dies liegt einerseits an der kürzeren AP Dauer bei fehlender Plateauphase (Nilles und London 2007) und andererseits an der kleineren Größe sowie dem geringeren Gewicht des Organismus (Berul 2003).

Die mittlere Herzfrequenz der Wildtyp-Mäuse unter Anästhesie mit Avertin®, und Pentobarbital erwies sich als niedrig normal im physiologischen Bereich im Vergleich zu den wachen Mäusen (Petric 2012). Nur im direkten Vergleich mit Pentobarbital zeigten die Tiere unter der Sedierung mit Isofluran eine signifikant höhere Herzfrequenz in Ruhe (Petric 2012). Im Ruhe-EKG unter Sedierung ist die Herzfrequenz der TASK-1^{-/-} Maus höher als bei den Wildtyp-Mäusen (Petric 2012). Signifikant höhere Herzfrequenzen waren unter der Sedierung mit Isofluran bei der TASK-1^{-/-} Maus im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen zu sehen. Bekannt ist die Aktivierung der Ionen-Kanäle der K_{2P}-Familie durch Isofluran, was zur Frequenzsteigerung führen könnte (Patel 1999, Lesage und Lazdunski 2000, Lazarenko 2010). Die Ergebnisse zeigen ebenfalls unter der Sedierung mit Avertin und Pentobarbital eine höhere Herzfrequenz der TASK-1^{-/-} Maus als bei den Wildtyp-Mäusen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Ein ähnlicher Effekt mit Aktivierung TASK-verwandter Kanäle ist für Avertin® und Pentobarbital nicht beschrieben. Im Vergleich der Anästhesien untereinander haben die Tiere unter Sedierung mit Avertin® und Pentobarbital niedrigere Herzfrequenzen, während die Herzfrequenz der Mäuse mit Isofluran-Sedierung eher hoch ist und verglichen mit der Herzfrequenz der Pentobarbital sedierten Mäuse sogar signifikant höher. Noch niedrigere Herzfrequenzen werden unter Ketamin und Xylazin beschrieben und dennoch zeigten die TASK-1^{-/-} Mäuse eine höhere Herzfrequenz als die TASK-1^{+/+} Mäuse (Donner 2011).

Der Herzfrequenzunterschied beider Genotypen deckt sich mit vorangegangenen Erkenntnissen aus der Telemetrie an wachen Mäusen, wobei die TASK-1^{-/-} Mäuse vor allem unter Aktivität höhere Herzfrequenzen aufweisen als die Wildtyp-Mäuse (Donner 2011). Die telemetrisch gemessenen Ruhfrequenzen ohne Narkose, zeigen ebenfalls einen signifikanten Frequenzunterschied zwischen beiden Genotypen (Petric 2012). Die insgesamt höhere Herzfrequenz bei den TASK-1^{-/-} Mäusen könnte mit einem gesteigerten Sympathikotonus zusammenhängen, da auch eine eingeschränkte HRT gezeigt werden konnte (s.u.).

4.1.2 Erregungsbildung und -ausbreitung der TASK-1 defizienten Maus im Vergleich zu den Wildtypen

Im Oberflächen-EKG ergab der direkte Vergleich der Erregungsbildung und -ausbreitung beider Genotypen keinen Unterschied.

Die hier erhobenen Intervalle und Amplituden im Oberflächen-EKG für P, PQ bzw. PR liegen im Referenzbereich bisher publizierter EKG-Werte von Mäusen (Bevilacqua 2000, Wehrens 2000, Schrickel 2002, Kreuzberg 2006). Die intrakardial gemessenen AH und HV Intervalle liegen im Referenzbereich von einem Drittel der menschlichen Werte (AH = 50 – 150 ms und HV = 35 – 55 ms) (VanderBrink 1999). Die QRS Dauer bei den Wildtypen (Pentobarbital n = 7: $9,1 \pm 1,8$ ms; Avertin n = 16: $9,6 \pm 0,9$; Isofluran n = 6: $9,9 \pm 1,4$ ms) liegt unter den Angaben anderer Arbeitsgruppen zum gleichen Mausstamm C57Bl/6 unter Narkose mit Isofluran (Kreuzberg 2006 n = 11: $12,7 \pm 2,1$ ms; Schrickel 2002 n = 39: $14,5 \pm 1,7$ ms). Nur Speerschneider und Thomsen kommen auf kürzere QRS Intervalle ($8,7 \pm 0,7$ ms, n = 4) (Speerschneider und Thomsen 2013). In *Basic Research in Cardiology* publizierte unsere Arbeitsgruppe längere QRS Messwerte im Oberflächen-EKG, wobei hier die Tiere mittels Ketamin/Xylazin mild sediert waren (Donner 2011: $11,9 \pm 0,7$ ms, n = 7). Unter Anästhesie mit Avertin fanden Decher et al. in TASK-1^{-/-} Mäusen des gleichen Stamms eine QRS Verbreiterung von ca. 20 ms (Decher 2011). Für die unterschiedlichen Angaben zum QRS Intervall ist daher am ehesten die Narkosewirkung zu sehen.

Die Anästhesie hatte keinen Einfluss auf die EKG-Parameter P, PR und QRS-Dauer, was der Vergleich zu den wachen Mäusen beider Genotypen verdeutlicht (Donner 2011). In einer Medikamentenstudie zu Pentobarbital von Zeller et al. wird von einer Verlängerung des PQ und QT Intervalls berichtet (Zeller 2007). Dabei wurde allerdings die doppelte Medikamentendosis (60 mg/kg) an einer anderen Mauslinie von einem genetisch-gemischtem Hintergrund (129/SV (12,5%) x 129/SvJ (87,5%)) angewendet.

4.1.3 QT Verlängerung unter Berücksichtigung des Einfluss der Anästhesie bei der TASK-1^{-/-} und TASK-1^{+/+} Maus

Bereits unter Ketamin und Xylazin konnte eine QT_c Verlängerung bei TASK-1^{-/-} Mäusen festgestellt werden (Donner 2011). Da diese Medikamentenkombination allerdings relative Bradykardien hervorrief, wurden nun Ruhe-EKGs unter Verwendung von anderen weniger negativ chronotropen Sedativa (Avertin®, Pentobarbital und Isofluran) abgeleitet. Hierbei stellt sich heraus, dass die Verlängerung des QT und QT_c Intervalls bei der TASK-1^{-/-} Maus unter Avertin®, Pentobarbital und Isofluran unabhängig von der Herzfrequenz ist (Petric 2012).

Währenddessen wurden bei der Anästhesie mit Isofluran keine signifikanten Unterschiede des QT oder QT_c Intervalls zwischen TASK-1^{-/-} und TASK-1^{+/+} Mäusen festgestellt. Es ist bekannt, dass Isofluran die Ionen-Kanäle der K_{2P} Familie wie TASK-1, TREK-1, TASK-3 u.a. aktiviert (Patel 1999, Lesage und Lazdunski 2000, Lazarenko 2010). In den früheren Untersuchungen der Projektgruppe wurden TASK-1, TREK-1 und TASK3 im Mäuseherzen nachgewiesen. Eine kompensatorische Hochregulation dieser Kanäle in der TASK-1^{-/-} Maus konnten mit Hilfe von *real-time* PCR und Westernblot jedoch ausgeschlossen werden (Donner 2011). Unter Isofluran erreicht die QT-Verlängerung bei der TASK-1^{-/-} Maus allerdings möglicherweise daher keine statistische Signifikanz, da andere K_{2P} Kanäle aktiviert werden.

Die QT und QT_c Verlängerung der TASK-1^{-/-} Maus zeigt sich auch ohne Narkose im telemetrisch aufgezeichneten 24h-EKG (Petric 2012). Etwa 25% der getesteten TASK-1^{-/-} Mäuse hatten ein längeres QT_c Intervall als alle TASK-1^{+/+} Mäuse und jede Maus mit einer QT_c Zeit >27 ms war eine TASK-1^{-/-} Maus (Donner 2011).

Insbesondere bei niedrigen Herzfrequenzen konnte der Unterschied des QT und QT_c Intervalls zwischen den Genotypen beobachtet werden. Je niedriger die Herzfrequenz desto länger das QT und QT_c Intervall bei der TASK-1^{-/-} Maus im Vergleich zu den Wildtypen. Es existieren mehrere Berechnungsformeln zur Bestimmung des frequenzunabhängigen QT Intervalls. Die in der Klinik häufig verwendete Bazett-Formel überschätzt jedoch das QT Intervall bei Herzfrequenzen über 60 min⁻¹ mit zu langen Werten (Umetan 1999) und unterschätzt sie bei Herzfrequenzen unter 60 min⁻¹ (Karjalainen 1994). Mit anderen Worten verlängert sich das mit der Bazett-Formel errechnete QT_c Intervall mit steigender Herzfrequenz über 60 min⁻¹. Diese Diskrepanz des Verhältnis QT_c zu QT muss bedacht werden, wenn das frequenzkorrigierte QT Intervall beurteilt wird. Für Mäuse wurde die modifizierte Bazett-Formel nach Mitchell entworfen, um die hohe Herzfrequenz in Ruhe zu berücksichtigen (Mitchell 1998). Verglichen mit der Framingham-Formel, die beim menschlichen Frequenzprofil akkurate QT_c Werte bestimmt (Umetani 1999), berechnet die Mitchell-Formel bei niedrigen Herzfrequenzen der Maus kürzere QT_c Werte als die Framingham-Formel (Petric 2012). Daher ist die signifikante QT_c Verlängerung der TASK-1^{-/-} bei niedrigen Herzfrequenzen nicht bedingt durch eine Überschätzung der Korrekturformel, sondern eine intrinsische Eigenschaft des Genotyps. Bei einer Beschleunigung der Herzfrequenz unter Isoprenalin kam es durch eine relative Verkürzung der QT Intervalle bei den TASK-1^{-/-} Mäusen zu einer Annäherung der QT_c Intervalle beider Genotypen, was für katecholaminerge Aktivierung von I_{Ks} spricht (Volders 2003). Die vorliegenden Ergebnisse stützen die Hypothese, dass I_{TASK-1} bei der Repolarisation unter Ruhebedingungen wichtiger wird. Das Fehlen von I_{TASK-1} führt demnach dazu,

dass es insbesondere bei niedrigen Herzfrequenzen zu einer Verlängerung des QT Intervalls kommt.

Zur Identifikation des Endes der T Welle im EKG der Maus gibt es neue Erkenntnisse. Während früher das T Ende mit dem ersten deutlichen Schnittpunkt der isoelektrischen Linie gewählt wurde (Acker 1996), wird heutzutage die sich daran anschließende niedrige Amplitudenschwankung noch in die T Welle mit einbezogen (Mitchell 1998, VanderBrink 1999, London 2001). Im Gegensatz zum EKG des Menschen verschmilzt bei der Maus die frühe Repolarisationsphase bereits mit dem QRS-Komplex, sodass nur noch die späte Repolarisationsphase als niedrige Amplitude in einigen Ableitungen sichtbar bleibt (VanderBrink 1999, Mitchell 1998, London 2001) (Abb. 3 in Kap. 1.1.7). Das T Ende entspricht dem Schnittpunkt der niedrigen Amplitude mit der isoelektrischen Linie. Auf diese Art und Weise messen Mitchell et al. QT Intervalle von $54,9 \pm 4,0$ ms Dauer ($n = 6$ FVB) (Mitchell 1998), Schrickel et al. messen QT Intervalle von $40,9 \pm 4,4$ ms ($n = 39$ C57Bl/6) (Schrickel 2002) bzw. $38,9 \pm 4,2$ ms, $n = 14$ 129SV (Schrickel 2007). Mit derselben Methode kommen Kreuzberg et al. auf ähnliche Werte (QT = $36,6 \pm 5,3$ ms, $n = 11$ C57Bl/6) (Kreuzberg 2006). Die vorliegende Auswertung wurde nach dem aktuellen Kenntnisstand vorgenommen, wobei vergleichbare Messwerte unter Isofluran-Narkose erhoben wurden (QT = 41 ± 8 ms, $n = 6$ C57Bl/6) (Petric 2012). Die sichere Identifikation des T Ende ist entscheidend für die korrekte QT Dauer.

4.1.4 Einfluss der beta-adrenergen Stimulation mit Isoprenalin auf das QT und QT_c Intervall der TASK-1^{-/-} und TASK-1^{+/+} Maus

Höhere Herzfrequenzen reduzieren den Unterschied der QT und QT_c Verlängerung in TASK-1^{-/-} Mäusen verglichen mit TASK-1^{+/+} Mäusen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früher publizierten Daten, die bei höheren Herzfrequenzen eine Verkürzung des längeren monophasischen AP in Langendorff perfundierten TASK-1^{-/-} Herzen zeigten (Donner 2011). Diese Aussage korrespondiert mit den Ergebnissen von Decher et al., die zeigen, dass Isoprenalin die Unterschiede in den QT, QT_c und QRS Intervallen der TASK-1^{-/-} Mäuse im Oberflächen-EKG aufhebt (Decher 2011). Ein verborgenes LQTS Typ 1 lässt sich durch einen genetischen Test, aber auch durch Katecholamingabe oder im Rahmen eines Belastungstests diagnostizieren (Shimizu und Antzelevitch 2000, Ackerman 2002). Normalerweise führen Beta-Agonisten unter physiologischen Bedingungen zu einem Anstieg des Nettoauswärtsstrom durch direkte Aktivierung der Ca²⁺ aktivierten, langsamen Komponente des verzögerten Auswärtsgleichrichter-kanals I_{Ks} (Volders 2003). Beim LQTS1 führt das mutierte korrespondierende KCNQ1-Gen zu einem paradoxen Anstieg des QT Intervalls unter beta-adrenerger Stimulation (Ackerman 2002). Diesen Zusammenhang gibt es beim LQTS2 und LQTS3 nicht (Shimizu und Antzelevitch 2000, Ackerman

2002). Obwohl das QT und QT_c Intervall in den verschiedenen experimentellen Ansätzen signifikant verlängert ist, konnte keine paradoxe Reaktion auf Isoprenalin bei den TASK-1^{-/-} Mäusen beobachtet werden. Vielmehr ist die QT Intervall Verlängerung im Gegenteil bei niedrigeren Herzfrequenzen ausgeprägter. Diese Beobachtung könnte auf eine relevante Funktion von I_{TASK-1} bei der Repolarisation unter Ruhebedingungen hindeuten, bei der I_{Ks} nicht aktiviert ist. Der direkte Zusammenhang zwischen der QT und QT_c Verlängerung und niedrigeren Herzfrequenzen bei TASK-1^{-/-} Mäusen könnte das Fehlen von Arrhythmien und tödlichen Ereignissen während Belastungsphasen wie Schwimmen, Laufrad, sowie pharmakologische Stimulation mit Beta-Agonisten (Donner 2011) erklären. Der enge Zusammenhang zwischen QT Verlängerung und Herzfrequenz ähnelt möglicherweise den klinischen Charakteristika von Patienten mit LQTS3, die im Schlaf tödliche Arrhythmien entwickeln (Schwartz 1997, Schwartz 2001). TASK-1^{-/-} Mäuse zeigen in der Zucht allerdings keine Übersterblichkeit. In Untersuchungen am LQTS 3 Modell zeigten Shimizu et al. unter beta-adrenerger Stimulation eine verkürzte QT Zeit und eine reduzierte TDR, was das Auftreten von *Torsade-de-pointes*-Tachykardien verhinderte (Shimizu 1999). Wie eingangs geschildert, gilt die TDR als Substrat für die Entstehung von Tachyarrhythmien. Durch die regional inhomogene Verteilung der AP Dauer über die drei myokardialen Wandschichten ist das Epikard gegenüber dem Endokard vorzeitig wieder erregbar, was die Entstehung eines unidirektionalen Blocks und kreisende Erregungen begünstigt. Kreisende Erregungen führen dann zur *Torsade-de-pointes*-Tachykardien (Shimizu 1999, Baker 2000, Yap und Camm 2003, Salama 2009).

4.2 Elektrophysiologische Untersuchung der TASK-1^{-/-} Maus

Mittels Katheterintervention wurden die intrakardiale Erregungsleitungseigenschaften, Refraktärzeiten und die kardiale Vulnerabilität erfasst. Das Anästhetikum Avertin® wurde verwendet, da es wegen geringer kardialer Nebenwirkungen für kardiovaskuläre Untersuchungen bei Mäusen geeignet ist (Hart 2001, Roth 2002). Pentobarbital wurde nicht ausgewählt, da es die transmurale Verteilung der Repolarisation reduziert und somit *Torsade-de-pointes*-Tachykardien in Modellen von erworbenen und angeborenen LQTS verhindert (Shimizu 1999). Auf Grund seiner aktivierenden Effekte auf K_{2P} Kanäle entschieden wir uns gegen eine Anästhesie mit Isofluran (Patel 1999, Lesage und Lazdunski 2000, Lazarenko 2010).

Die Sinusknotenfunktion der TASK-1^{-/-} Mäuse war unverändert im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Zudem konnten Chandler et al. zeigen, dass im menschlichen Sinusknoten kaum TASK-1 mRNA exprimiert wird (Chandler 2009). Die Überleitungszeiten gemessen im rechten Atrium zum rechten Ventrikel (AV-Zeiten und Wenckebach-Punkt) waren ebenso wie die Refraktärperioden (ARP,

AVNRP, VRP) bei beiden Genotypen vergleichbar. Unter Anästhesie mit Avertin®, Pentobarbital und Isofluran zeigten sich keine Veränderungen der PQ Zeit. Die gemessenen His Signale bestätigen keine zeitlichen Änderungen der AV-Überleitung.

Sowohl in den Atrien als auch den Ventrikeln konnte TASK-1-mRNA nachgewiesen werden (Kim 1999, Donner 2011, Limberg 2011). TASK-1 scheint also nicht im Erregungsleitungssystem exprimiert zu werden. Es gibt sogar Hinweise, dass TASK-1 bei Vorhofflimmern hochreguliert wird (Barth 2005) und somit durch Verkürzung der AP Dauer am elektrischen *remodeling* beim erworbenen Vorhofflimmern beteiligt sein könnte. Wenn diese Hypothese stimmt, dürften TASK-1^{-/-} Mäuse sogar resistent gegen die Entstehung von Vorhofflimmern sein. Diese Einschätzung können die hier vorliegenden Ergebnisse nicht stützen, da das Auftreten von Vorhofflimmern bei den TASK-1^{+/+} Mäusen zu selten war (n = 3/16 TASK-1^{+/+} vs. n = 0/12 TASK-1^{-/-}; n.s.).

TASK-1 wird im Herzen vor allem in den Ventrikeln exprimiert (Donner 2011, Putzke 2007). Als Hintergrund-Kaliumkanal trägt TASK-1 zur Stabilisierung des AP und der Repolarisationsphase bei. Wird TASK-1 gehemmt oder im *Knock-Out*-Maus-Modell ausgeschaltet, kann auf zellulärer und organischer Ebene eine Verlängerung der AP Dauer gemessen werden (Putzke 2007, Donner 2011, Decher 2011, Schiekel 2013). Die Repolarisation ist verzögert, was das Auftreten von EAD begünstigen könnte (Barbuti 2002, Besana 2004). Die signifikante QT Verlängerung bei der TASK-1^{-/-} Maus lässt eine vermehrte Auftretenswahrscheinlichkeit von ventrikulären Arrhythmien vermuten. Trotz der verlängerten Repolarisationszeit fand sich bei der TASK-1^{-/-} Maus keine höhere Inzidenz für ventrikuläre Tachykardien im Vergleich zu den Wildtypen (Donner 2011, Petric 2012). Bei beiden Genotypen war die atriale und ventrikuläre Vulnerabilität nach Burststimulation weder vor noch nach beta-adrenerger Provokation erhöht. Ein beschriebener Mechanismus zur Entstehung von ventrikulären Tachyarrhythmien basiert auf einem *reentry*-mechanismus durch EAD und Extrasystolen in der vulnerablen Phase. Die Tachyarrhythmien werden begünstigt, wenn die Kardiomyozyten im Rahmen einer Repolarisationsstörung eine Verlängerung der Plateauphase des AP und eine erhöhte transmurale Dispersion der Repolarisation (TDR) aufweisen (Baker 2000, Yap und Camm 2003, Salama 2009, Martin 2012). Zur Klärung, ob Letzteres auch im TASK-1^{-/-} Mausmodell zutrifft, wären elektroanatomische Mapping Untersuchungen notwendig (Baker 2000). Milberg et al. konnten durch eine gesteigerte TDR an Langendorff-perfundierten Herzen von Hasen den Phänotyp des LQTS Typ 3 abbilden und *Torsade-de-pointes*-Tachykardien auslösen (Milberg 2005). Es existieren mittlerweile mehrere Mausmodelle für eine QT Verlängerung, welche mit der Mutation von K⁺ Kanälen assoziiert sind (Nerbonne 2001). Beispielsweise ist bei Kv1.1N206-transgenen Mäuse der langsame Auswärts-Kaliumstrom I_{K,slow}

selektiv reduziert, was in einer Verlängerung der AP Dauer, einer QT-Verlängerung und dem Auftreten von spontanen sowie stimulierten ventrikuläre Arrhythmien resultiert (London 1998, Jeron 2000). Jedoch präsentieren nicht alle Mausmodelle einer QT Verlängerung per se Arrhythmien. Im gekreuzten Mausmodell $K_v4.2W362F \times K_v1.1N206$ finden sich z.B. keine spontanen oder stimulierten Arrhythmien, obwohl die AP Dauer und das QT Intervall sogar noch länger sind als in der $K_v1.1N206$ -transgenen Maus (Brunner 2001). Auch hier führte diese Beobachtung zusätzliche Faktoren für eine verlängerte Repolarisation in Betracht, die neben einem reduzierten Kaliumkanalstrom in Folge einer Mutation bei der Entstehung von anhaltenden Arrhythmien eine Rolle spielen. So konnte in *optical mapping* Untersuchungen im Mausmodell $K_v1.1N206$ ebenfalls eine gesteigerte räumliche Verteilung der Repolarisation gefunden werden (London 1998). Im Gegensatz dazu war die räumliche Verteilung der Repolarisation im Mausmodell $K_v4.2W362F \times K_v1.1N206$ reduziert (Brunner 2001).

Die beiden Mechanismen zur Entstehung von *Torsade-de-pointes*-Tachykardien sind zum einen die QT Verlängerung und zum anderen eine gesteigerte TDR (Surawicz und Knoebel 1984, Schwartz 1997, Shimizu 1999, Baker 2000, Yap und Camm 2003, Salama 2009). Es gibt 13 verschiedene Subtypen des LQTS, welche sich mit unerwarteten Synkopen bis hin zum SCD infolge von anhaltenden *Torsade-de-pointes*-Tachykardien manifestieren. Die Manifestationszeitpunkte sind unterschiedlich abhängig von der Mutation und hier wurden junge Mäuse im Alter von zwei bis drei Monaten untersucht. Zusätzlich ist in Folge der geringen Herzgröße das Auftreten von anhaltenden Arrhythmien im Mausmodell im Allgemeinen seltener als beim Menschen und wenn Arrhythmien durch Provokation auftreten, konvertieren sie häufig spontan in den Sinusrhythmus (London 2001). An Hand der Diagnosekriterien nach Schwartz und Crotti und einer genetischen Testung ergeben sich neue Möglichkeiten frühzeitig das Krankheitsbild zu sichern und eine präventive Behandlung einzuleiten. Aktuell stellen für manche Unterformen des LQTS Betablocker, die Implantation eines ICD oder die linkskardiale sympathische Denervierung eine Therapieoption dar. Ein kurativer Therapieansatz ist bislang nicht bekannt, wäre aber mittels „*targeted therapy*“ auf molekular-genetischer Ebene denkbar. So könnte die Entwicklung spezifischer Medikamente helfen, in LQTS Familien Familienangehörige frühzeitig zu therapieren, um lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen von Beginn an zu verhindern. Diverse Regulationsmechanismen zur Hemmung von TASK-1 sind bereits bekannt wie z.B. ein saurer pH-Wert, A293, der α_1 -adrenerge Agonist Methoxamine, PAF oder Endothelin-1 (Barbuti 2002, Putzke 2007, Schiekel 2013). Von klinisch-therapeutischer Relevanz könnte somit die Modulation der Signalwege für die Regulation von TASK-1 im Herzen sein, um arrhythmogene

Effekte durch eine Über- oder Unterfunktion von TASK-1 zu verhindern (Mubagwa 2013).

Sowohl in Ruhe als auch unter körperlicher Belastung beim Schwimmen bzw. Ergometrie konnte unsere Arbeitsgruppe weiterhin keine erhöhte arrhythmogene Vulnerabilität bei TASK-1 defizienten Mäusen nachweisen (Donner 2011). Unter Epinephrintestung traten allerdings bei beiden Genotypen vermehrt spontane ventrikuläre Extrasystolen, Couplets und Triplets auf, sowie in wenigen Fällen AV-Blockierungen II° (Donner 2011). Zum Vergleich konnte in einem anderen Mausmodell mit Deletion von *Csx/Nkx2.5* reproduzierbar Vorhofflimmern ausgelöst werden (Berul 2003). In der Pannexin-1 defizienten (*Panx-1*) Maus gelang es der Arbeitsgruppe mit derselben Methode ebenfalls regelhaft Vorhofflimmern zu induzieren. Bei *Panx-1* handelt es sich um einen ubiquitär vorkommenden connexin-ähnlichen Hemikanal, der zytosolisches ATP und Nukleotide transmembranär in den extrazellulären Raum schleust (Dubyak 2009). Das Vorhofflimmern trat durch atriale Burststimulation auf. Eine strukturelle Herzerkrankung konnte in echokardiographischen Untersuchungen bislang nicht festgestellt werden (Donner persönliche Mitteilung). An Hand des Versuchsaufbaus der EPU und des modifizierten Stimulationsprotokolls ist es durchaus möglich Vorhofflimmern auszulösen, wenn die entsprechende Disposition bei der Maus vorliegt.

Die vorliegende Arbeit belegt, dass TASK-1 Defizienz im Mausmodell zum Phänotyp einer QT Verlängerung ohne Erhöhung der ventrikulären Vulnerabilität führt.

4.3 Eingeschränkte *Heart Rate Turbulence* bei der TASK-1^{-/-} Maus

TASK-1^{-/-} Mäuse weisen im Vergleich zu den Wildtypen signifikant höhere TO-Werte auf. Der TS war im Gegensatz dazu bei beiden Genotypen vergleichbar. Während die Wildtypen das typische Bild einer intakten Barorezeptorreflex nach programmierter Katheterstimulation zeigen, ist diese bei den TASK-1^{-/-} Mäusen vermindert. Die autonome kardiale Regulation ist bei TASK-1^{-/-} Mäusen gestört, da der initiale physiologische Anstieg der Herzfrequenz ausbleibt und es sogar zu einer Abnahme der Herzfrequenz kommt. Dies führt zur Messung von positiven Werten für den TO, obwohl negative Werte physiologisch wären. Anschließend kommt es über den TS zu einer langsamen Abnahme der Herzfrequenz auf die präektopische Ausgangsfrequenz, wobei beide Genotypen vergleichbare Werte zeigen. Der signifikant höhere TO bei den TASK-1^{-/-} Mäusen in Relation zu den TASK-1^{+/+} Mäusen zeigt, dass TASK-1 den autonomen kardialen Baroreflex beeinflusst.

Unsere Arbeitsgruppe berichtete bereits von einer signifikant reduzierten HRV und sympathischen Überstimulation bei der TASK-1^{-/-} Maus *in vivo* (Donner

2011). An isoliert perfundierten Herzen hingegen war die HRV beider Genotypen nicht verschieden (Donner 2011). Außerdem deutete die Epinephrintestung auf einen gestörten Barorezeptorreflexes bei der TASK-1^{-/-} Maus hin, weil im Gegensatz zu den Wildtypen die Herzfrequenz nach Epinephrininjektion hoch und die HRV Parameter weiter signifikant reduziert blieben (Donner 2011). Weiterhin war das spontane Auftreten von ventrikulären Extrasystolen unter Epinephrintestung bei den TASK-1^{-/-} Mäusen seltener als bei den Wildtypen (Donner 2011). Zur Überprüfung der Hypothese bietet sich HRT im Rahmen einer programmierten elektrischen Stimulation an (Raj 2005, Roach 2002).

Es gibt eine Reihe von Erkrankungen, bei denen ein Zusammenhang mit einer reduzierten HRT hergestellt werden konnte. Insbesondere nach einem Herzinfarkt sind TO und TS im Langzeit-EKG über 24 Stunden gemessen, die stärksten elektrokardiographischen Parameter für die Vorhersage des Mortalitätsrisikos (Schmidt 1999, Baur 2008). Dies gilt auch für die koronare Herzerkrankung ohne vorherigen Herzinfarkt. Dabei verbessert sich der Vorhersagewert, wenn Prediktoren wie die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (<30%), QRS Dauer, ein vorbestehender Diabetes mellitus oder das Alter mit einbezogen werden. Die autonome Dysregulation nach einem Myokardinfarkt verbessert sich über die Zeit (Billman 2009, Huikuri 2010). Auf Basis dieser Kenntnis beurteilte 2009 die Veröffentlichung von Huikuri et al. in *Heart Rhythm* die Veränderung der HRV und HRT nach Myokardinfarkt der Studienkohorten von CARISMA (*Cardiac Arrhythmia and Risk Stratification after Myocardial Infarction*) und REFINE (*Risk Evaluation After Infarction, Noninvasive Evaluation*) (Huikuri 2010). Als Ergebnis ist eine abgeschwächte Erholung der autonomen Funktion nach einem Myokardinfarkt assoziiert mit dem Risiko für tödliche oder lebensbedrohliche Arrhythmien. Spezifischer Marker für ernsthafte arrhythmische Ereignisse ist ein Ausbleiben der Verbesserung der HRT unmittelbar nach einem Myokardinfarkt (Huikuri 2010, Li-na 2012). In der FINGER Studie (*Finnland and Germany post-infarction trial*) zeigte sich die HRT als zuverlässiger Prädiktor für den Endpunkt SCD (Makikallio 2005).

Im Rahmen einer Herzinsuffizienz kommt es zur neurohumoralen Aktivierung des Sympathikus und progressiven hämodynamischen Verschlechterung, was zur eingeschränkten HRV und HRT führt. Hierbei korreliert die HRT eng mit dem Stadium der Erkrankung und verbessert sich unter effektiver medikamentöser Therapie unbeeinflusst von der Betablockade. Daher bietet sich die HRT auch zum Therapiemonitoring an (Bauer 2008).

Bei Diabetikern reflektiert die HRT die kardiale autonome Dysfunktion und insbesondere nach einem Herzinfarkt ist die HRT ein starker Prediktor für die Mortalität (Barthel 2000; Balcioglu 2007).

Weitere Erkrankungen, bei denen die HRT mit der Krankheitsschwere korreliert, sind der Mitralklappenprolaps (Gunduz 2006) und die Mitralklappenstenose (Yalta 2007). Ebenfalls korreliert die HRT mit dem Apnoe-Hypopnoe-Index des obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndroms (Yang 2005). Mögliche Zusammenhänge mit der Chagas-Krankheit (Ribeiro 2003) oder der Dilatativen Kardiomyopathie bei Kindern werden noch untersucht (Karakurt 2007). TO und TS können unabhängig voneinander als Parameter genutzt werden, um das klinische Risiko einer Erkrankung zu beurteilen. Zum Beispiel ist bei Patienten mit myotoner Dystrophie Typ 1 ein veränderter TO bei normaler TS assoziiert mit einem höheren Auftreten einer ventrikulären Tachykardie (Casella 2006). Obwohl das LQTS über polymorphen ventrikulären Tachykardien mit dem SCD assoziiert ist, zeigt eine kleine Studie mit vier jungen LQTS-Patienten keinen prognostischen Vorhersagewert durch die HRT (Onrat 2003).

Die autonome Funktionstestung mittels HRT hat eine autonome kardiale Dysregulation bei den TASK-1^{-/-} Mäusen gezeigt, während die Wildtyp-Mäuse über eine normale autonome Regulationsfähigkeit verfügen. Der reduzierte TO unterstreicht die Hypothese des Überwiegens des Sympathikus in TASK-1^{-/-} Mäusen. Eine Assoziation mit einer der o.g. Erkrankungen oder dem Risiko für den SCD konnte bei der TASK-1^{-/-} Mäuse bei fehlender Übersterblichkeit und indifferenter EPU-Testung gegenüber den Wildtypen nicht gefunden werden. Mit dem Wissen, dass TASK-1 den Barorezeptorreflex beeinflusst, können weiterhin neuronale Regulationsmechanismen durch TASK-1 auf Ebene der Kardiomyozyten oder Neurozyten untersucht werden.

5 Schlussfolgerungen

Die elektrophysiologische *in vivo* Untersuchung der TASK-1^{-/-} Maus liefert einen Beitrag zum besseren Verständnis der kardiovaskulären Funktion des TASK-1 Kalium Kanals. Erkenntnisse der Studie sind der Einfluss von TASK-1 auf die Repolarisation einerseits sowie auf die autonome kardiale Regulation durch den Barorezeptorreflex andererseits.

Die TASK-1^{-/-} Maus präsentiert den Phänotyp eines LQTS mit der Verlängerung der QT und QT_c Intervalle. Die Verlängerung der QT Intervalle bei der TASK-1^{-/-} Maus war umso eindrücklicher je niedriger die Herzfrequenz war in Relation zu den Kontrolltieren. Auch unter Verwendung weniger bradykardisierender Sedativa wie Avertin® und Pentobarbital konnte die QT_c Verlängerung bei TASK-1^{-/-} Mäusen im Vergleich zur Narkose mit Ketamin und Xylazin nachgewiesen werden. Ebenfalls war unter der Narkose mit Isofluran war die QT Zeit bei den TASK-1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen verlängert, wenn auch nicht statistisch signifikant. Dennoch ist die QT Verlängerung auch nach beta-adrenerger Stimulation mit Isoprenalin messbar.

TASK-1 defiziente Mäuse zeigen den Phänotyp einer QT Verlängerung wie ein LQTS, ohne dass bisher der Nachweis einer erhöhten Vulnerabilität für Herzrhythmusstörungen erbracht ist. Für künftige Untersuchungen stellt die TASK-1 „Knock-Out“ Maus mit der nachweislichen Dysfunktion der Repolarisation eine vielversprechende Gelegenheit dar, um die Repolarisation mittels Multielektrodenmapping zu studieren.

Auf dem Boden der eingeschränkten HRV und der höheren Ruhfrequenzen der TASK-1^{-/-} Mäuse wurde der Einfluss von TASK-1 auf den Barorezeptorreflex deutlich. Mit dem Nachweis der signifikant eingeschränkten HRT, weist die TASK-1^{-/-} Maus ein Überwiegen des Sympathikotonus hin. Beim Menschen gilt ein erhöhter Sympathikotonus allerdings als klinischer Prädiktor für eine Reihe von Erkrankungen wie den SCD nach Myokardinfarkt oder die Herzinsuffizienz. In den vorliegenden Tierversuchen konnte keine Assoziation zwischen TASK-1 Defizienz und einer erhöhten Morbidität und Mortalität gefunden werden.

Die hier durchgeführten elektrophysiologischen Untersuchungen dienten der näheren Charakterisierung von TASK-1 im Herzen. In Therapiestudien könnte in Zukunft die Ionenkanal-Funktion von TASK-1 mit berücksichtigt werden.

6 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-------|
| Abb. 1: | Pathomechanismen der Arrhythmogenese | 4 |
| Abb. 2: | Elektrische Pathomechanismen beim LQTS im Mausmodell | 7 |
| Abb. 3: | EKG von Maus und Mensch im Vergleich | 10 |
| Abb. 4: | Schema und Dendrogramm der K_{2P} Kanäle..... | 12 |
| Abb. 5: | mRNA-Expressionsanalyse von K_{2P} Kanälen in TASK-1 ^{+/+} Mäusen..... | 13 |
| Abb. 6: | Studiendesign im Überblick..... | 16 |
| Abb. 7: | Herstellung der TASK-1 „Knock-Out“ Maus durch homologe Rekombination von Exon 1 des TASK-1-Gens | 17 |
| Abb. 8: | DNA Isolierung mit dem DNeasy® Blood&Tissue Kit..... | 21 |
| Abb. 9: | Logarithmische Darstellung der Amplifikation mit der <i>real-time</i> PCR..... | 23 |
| Abb. 10: | Amplifikation mit <i>primer</i> LacZ in der <i>real-time</i> PCR..... | 26 |
| Abb. 11: | Amplifikation mit <i>primer</i> Del in der <i>real-time</i> PCR | 27 |
| Abb. 12: | Oberflächen-EKG der Maus | 32 |
| Abb. 13: | Oktapolar-katheter in Relation zum Mäuseherz | 34 |
| Abb. 14: | Zeitliche Abfolge der EPU bei der Maus..... | 35 |
| Abb. 15: | Wenckebachperiodik. Ansicht in LabChart® | 36 |
| Abb. 16: | Ventrikuläre Burststimulation..... | 38 |
| Abb. 17: | Versuchsaufbau der EPU mit zwei BioAmps®..... | 39 |
| Abb. 18: | Versuchsaufbau der EPU mit einem Powerlab T26®..... | 40 |
| Abb. 19: | Intrakardiales Elektrogramm der Maus..... | 41 |
| Abb. 20: | HRT Muster nach einer vorzeitigen ventrikulären Extrasystole . | 45 |
| Abb. 21: | Berechnung von TO und TS als Parameter für die HRT | 47 |
| Abb. 22: | HRT Ansicht in LabChart®..... | 48 |
| Abb. 23: | Herzfrequenzen im Oberflächen-EKG: Sedierungsarten im Vergleich | 49-50 |

| | | |
|----------|--|-------|
| Abb. 24: | EKG-Auswertung mit LabChart® | 51 |
| Abb. 25: | QT und QT _c im Oberflächen-EKG unter verschiedenen Anästhetika. | 52 |
| Abb. 26: | Analyse des QT Intervalls im Oberflächen-EKG unter Avertin®. | 53 |
| Abb. 27: | Analyse des QT Intervalls im Oberflächen-EKG unter Pentobarbital. | 54 |
| Abb. 28: | Analyse des QT Intervalls im Oberflächen-EKG unter Isofluran. | 54 |
| Abb. 29: | Einfluss von Isoprenalin auf RR, QT und QT _c | 55-56 |
| Abb. 30: | His Signal Messung intrakardial während der EPU. | 57 |
| Abb. 31: | TO nach elektrostimulierter VPC im Vergleich beider Genotypen..... | 60 |
| Abb. 32: | TS nach elektrostimulierter VPC im Vergleich beider Genotypen..... | 60 |

7 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-------|
| Tabelle 1: Die Hauptvertreter der Gruppe der Long QT Syndrome..... | 6 |
| Tabelle 2: Diagnose Kriterien für das LQTS..... | 9 |
| Tabelle 3: Genotypisierung mittels <i>real-time</i> PCR. | 24 |
| Tabelle 4: Versuchsprotokoll der EPU bei der Maus..... | 43-44 |
| Tabelle 5: EKG-Parameter im Oberflächen-EKG unter Avertin®, Pentobarbital und Isofluran. | 51 |
| Tabelle 6: Analyse von QT und QT _c bei TASK-1 ^{+/+} und TASK-1 ^{-/-} unter verschiedenen Anästhetika. | 53 |
| Tabelle 7: <i>In vivo</i> elektrophysiologische Daten nach programmierter elektrischer Stimulation | 58 |
| Tabelle 8: Arrhythmien nach Burststimulation im Vorhof und im Ventrikel. | 59 |

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

ACKER, S.A.B.E. VAN; KRAMER, K.; VOEST, E.E.; GRIMBERGEN, J.A.; ZHANG, J.; VAN DER VIJGH, W.J.F.; BAST, A. (1996): Doxorubicin-induced cardiotoxicity monitored by ECG in freely moving mice. A new model to test potential protectors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 38 (1), 95–101.

ACKERMAN, M.J.; KHOSITSETH, A.; TESTER, D.J.; HEJLIK, J.B.; SHEN, W.K.; PORTER, C.J. (2002): Epinephrine-induced QT interval prolongation: a gene-specific paradoxical response in congenital long QT syndrome. *Mayo Clinic Proceedings* 77 (5), 413–421.

ADABAG, A.S.; PETERSON, G.; APPLE, F.S.; TITUS, J.; KING, R.; LUEPKER, R.V. (2010): Etiology of sudden death in the community: results of anatomical, metabolic, and genetic evaluation. *American Heart Journal* 159 (1), 33–39.

ALLER, M.I.; VEALE, E.L.; LINDEN, A.M.; SANDU, C.; SCHWANINGER, M.; EVANS, L.J.; KORPI, E.R.; MATHIE, A.; WISDEN, W.; BRICKLEY, S.G. (2005): Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. *The Journal of Neuroscience* 25 (49), 11455–11467.

ALLER, M.I.; WISDEN, W. (2008): Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice. *Neuroscience* 151 (4), 1154–1172.

BAKER, L.C.; LONDON, B.; CHOI, B.R.; KOREN, G.; SALAMA, G. (2000): Enhanced dispersion of repolarization and refractoriness in transgenic mouse hearts promotes reentrant ventricular tachycardia. *Circulation Research* 86, 396–407.

BARBUTI, A.; ISHII, S.; SHIMIZU, T.; ROBINSON, R.B.; FEINMARK, S.J. (2002): Block of the background K⁺ channel TASK-1 contributes to arrhythmogenic effects of platelet-activating factor. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 282 (6), 2024–2030.

BAREL, O.; SHALEV, S.A.; OFIR, R.; COHEN, A.; ZLOTOGORA, J.; SHORER, Z.; MAZOR, G.; FINER, G.; KHATEEB, S.; ZILBERBERG, N.; BIRK, O.S. (2008): Maternally inherited Birk Barel mental retardation dysmorphism syndrome caused by a mutation in the genomically imprinted potassium channel *KCNK9*. *The American Journal of Human Genetics* 83 (2), 193–199.

BARTH, A.S.; MERK, S.; ARNOLDI, E.; ZWERMANN, L.; KLOOS, P.; GEBAUER, M.; STEINMEYER, K.; BLEICH, M.; KÄÄB, S.; HINTERSEER, M.; KARTMANN, H.; KREUZER, E.; DUGAS, M.; STEINBECK, G.; NABAUER, M. (2005): Reprogramming of the human atrial transcriptome in permanent atrial fibrillation: expression of a ventricular-like genomic signature. *Circulation Research* 96 (9), 1022–1029.

BARTHEL, P.; SCHMIDT, G.; MALIK, M.; SCHNEIDER, R.; HIERL, A.; CAMM, A.J.; SCHÖMIG, A. (2000): Heart rate turbulence in post-MI patients with and without diabetes (abstr). *Journal of the American College of Cardiology* (35) 144.

BALCIOGLU, S.; ARSLAN, U.; TURKOGLU, S.; OZDEMIR, M.; CENGEL, A. (2007): Heart rate variability and heart rate turbulence in patients with type 2 diabetes mellitus with versus without cardiac autonomic neuropathy. *American Journal of Cardiology* 100 (5), 890–893.

BAUER, A.; MALIK, M.; SCHMIDT, G.; BARTHEL, P.; BONNEMEIER, H.; CYGANKIEWICZ, I.; GUZIK, P.; LOMBARDI, F.; MÜLLER, A.; OTO, A.; SCHNEIDER, R.; WATANABE, M.; WICHTERLE, D.; ZAREBA, W. (2008): Heart rate turbulence: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use: International Society for Holter and Noninvasive Electrophysiology Consensus. *Journal of the American College of Cardiology* 52 (17), 1353–1365.

BAYLISS, D.A.; SIROIS, J.E.; TALLEY, E.M. (2003): The TASK family: two-pore domain background K⁺ channels. *Molecular Interventions* 3 (4), 205–219.

- BERUL, C.I.; ARONOVITZ, M.J.; WANG, P.J.; MENDELSON, M.E. (1996): In vivo cardiac electrophysiology studies in the mouse. *Circulation* 94 (10), 2641–2648.
- BERUL, C.I. (2003): Electrophysiological phenotyping in genetically engineered mice. *Physiological Genomics* 13 (3), 207–216.
- BESANA, A.; BARBUTI, A.; TATEYAMA, M.A.; SYMES, A.J.; ROBINSON, R.B.; FEINMARK, S.J. (2004): Activation of protein kinase C epsilon inhibits the two-pore domain K⁺ channel, TASK-1, inducing repolarization abnormalities in cardiac ventricular myocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (32), 33154–33160.
- BEVILACQUA, L.M.; SIMON, A.M.; MAGUIRE, C.T.; GEHRMANN, J.; WAKIMOTO, H.; PAUL, D.L.; BERUL, C.I. (2000): A targeted disruption in connexin40 leads to distinct atrioventricular conduction defects. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology* 4 (3), 459–467.
- BILLMAN, G.E.; SCHWARTZ, P.J.; GAGNOL, J.P. (1985): The cardiac response to submaximal exercise in dogs susceptible to sudden cardiac death. *Journal of Applied Physiology* 59, 890–897
- BILLMAN, G.E. (2009): Cardiac autonomic neural remodeling and susceptibility to sudden cardiac death: effect of endurance exercise training. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 297 (4), 1171-1193.
- BLOCK, M.; BORGGREFE, M.; GOEDEL-MEINEN, L.; HOHNLOSER, S.H.; KALUSCHE, D.; KUCK, K.H.; MEINERTZ, T.; OEFF, M.; PITSCHNER, H.; VOLKMANN, H.J. (1998): Richtlinien für die Durchführung invasiver elektrophysiologischer Untersuchungen. *Zeitschrift für Kardiologie* 87, 502-512.
- BOCKENHAUER, D.; ZILBERBERG, N.; GOLDSTEIN, S.A.N. (2001): KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel. *Nature Neuroscience* 4 (5), 486–491.
- BOS, J.M.; BOS, K.M.; JOHNSON, J.N.; MOIR, C.; ACKERMAN, M.J. (2013): Left Cardiac Sympathetic Denervation in Long QT Syndrome: Analysis of Therapeutic Non-Responders. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 6 (4), 705-711.
- BRUNNER, M.; GUO, W.; MITCHELL, G.F.; BUCKETT, P.D.; NERBONNE, J.M.; KOREN, G. (2001): Characterization of mice with a combined suppression of I(to) and I(K,slow). *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 281 (3), 1201-1209.
- BRYAN, R.M.; JOSEPH, B.K.; LLOYD, E.; RUSCH, N.J. (2007): Starring TREK-1: the next generation of vascular K⁺ channels. *Circulation Research* 101 (2), 119–121.
- BUXTON, A.E.; CALKINS, H.; CALLANS, D.J.; DIMARCO, J.P.; FISHER, J.D.; GREENE, H.L.; HAINES, D.E.; HAYES, D.L.; HEIDENREICH, P.A.; MILLER, J.M.; POPPAS, A.; PRYSTOWSKY, E.N.; SCHOENFELD, M.H.; ZIMETBAUM, P.J.; HEIDENREICH, P.A.; GOFF, D.C.; GROVER, F.L.; MALENKA, D.J.; PETERSON, E.D.; RADFORD, M.J.; REDBERG, R.F.; AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY; AMERICAN HEART ASSOCIATION TASK FORCE ON CLINICAL DATA STANDARDS; (ACC/AHA/HRS WRITING COMMITTEE TO DEVELOP DATA STANDARDS ON ELECTROPHYSIOLOGY) (2006): ACC/AHA/HRS 2006 key data elements and definitions for electrophysiological studies and procedures: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Data Standards (ACC/AHA/HRS Writing Committee to Develop Data Standards on Electrophysiology). *Journal of the American College of Cardiology* 48 (11), 2360-2396.
- BYRNE, R.; CONSTANT, O.; SMYTH, Y.; CALLAGY, G.; NASH, P.; DALY, K.; CROWLEY, J. (2008): Multiple source surveillance incidence and aetiology of out-of-hospital sudden cardiac death in a rural population in the West of Ireland. *European Heart Journal* 29 (11), 1418-1423.
- CASELLA, M.; DELLO RUSSO, A.; PACE, M.; PELARGONIO, G.; IERARDI, C.; SANNA, T.; MESSANO, L.; BENCARDINO, G.; VALSECCHI, S.; MANGIOLA, F.; LANZA, G.A.; ZECCHI, P.; CREA, F.; BELLOCCI, F. (2006): Heart rate turbulence as a noninvasive risk predictor of ventricular tachyarrhythmias in myotonic dystrophy type 1. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 17 (8), 871–876.

- CESAROVIC, N.; NICHOLLS, F.; RETTICH, A.; KRONEN, P.; HÄSSIG, M.; JIRKOF, P.; ARRAS, M. (2010): Isoflurane and sevoflurane provide equally effective anaesthesia in laboratory mice. *Laboratory Animals* 44 (4), 329–336.
- CHANDLER, N.J.; GREENER, I.D.; TELLEZ, J.O.; INADA, S.; MUSA, H.; MOLENAAR, P.; DIFRANCESCO, D.; BARUSCOTTI, M.; LONGHI, R.; ANDERSON, R.H.; BILLETER, R.; SHARMA, V.; SIGG, D.C.; BOYETT, M.R.; DOBRZYNSKI, H. (2009): Molecular architecture of the human sinus node: insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation* 119 (12), 1562–1575.
- CHIUVE, S.E.; FUNG, T.T.; REXRODE, K.M.; SPIEGELMAN, D.; MANSON, J.E.; STAMPFER, M.J.; ALBERT, C.M. (2011): Adherence to a low-risk, healthy lifestyle and risk of sudden cardiac death among women. *The Journal of the American Medical Association* 306 (1), 62–69.
- CHUGH, S.S.; JUI, J.; GUNSON, K.; STECKER, E.C.; JOHN, B.T.; THOMPSON, B.; ILIAS, N.; VICKERS, C.; DOGRA, V.; DAYA, M.; KRON, J.; ZHENG, Z.J.; MENSAH, G.; MCANULTY, J. (2004): Current burden of sudden cardiac death: multiple source surveillance versus retrospective death certificate-based review in a large U.S. community. *Journal of the American College of Cardiology* 44 (6), 1268–1275.
- CHUGH, S.S.; REINIER, K.; TEODORESCU, C.; EVANADO, A.; KEHR, E.; AL SAMARA, M.; MARIANI, R.; GUNSON, K.; JUI, J. (2008): Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications. *Progress in Cardiovascular Diseases* 51 (3), 213–228.
- CURRAN, M.E.; SPLAWSKI, I.; TIMOTHY, K.W.; VINCENT, G.M.; GREEN, E.D.; KEATING, M.T. (1995): A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80 (5), 795–803.
- CZIRJÁK, G.; FISCHER, T.; SPÄT, A.; LESAGE, F.; ENYEDI, P. (2000): TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Molecular Endocrinology* 14 (6), 863–874.
- CZIRJÁK, G.; ENYEDI, P. (2002): Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (7), 5426–5432.
- DAGRES, N.; HINDRICKS, G. (2013): Risk stratification after myocardial infarction: is left ventricular ejection fraction enough to prevent sudden cardiac death? *European Heart Journal* 34 (26), 1964–1971.
- DECHER, N.; WEMHÖNER, K.; RINNÉ, S.; NETTER, M.F.; ZUZARTE, M.; ALLER, M.I.; KAUFMANN, S.G.; LI, X.T.; MEUTH, S.G.; DAUT, J.; SACHSE, F.B.; MAIER, S.K.G. (2011): Knock-out of the potassium channel TASK-1 leads to a prolonged QT interval and a disturbed QRS complex. *Cellular Physiology and Biochemistry* 28 (1), 77–86.
- DONNER, B.C.; SCHULLENBERG, M.; GEDULDIG, N.; HÜNING, A.; MERSMANN, J.; ZACHAROWSKI, K.; KOVACEVIC, A.; DECKING, U.; ALLER, M.I.; SCHMIDT, K.G. (2011): Functional role of TASK-1 in the heart: studies in TASK-1-deficient mice show prolonged cardiac repolarization and reduced heart rate variability. *Basic Research in Cardiology* 106 (1), 75–87.
- DUBYAK, G.R. (2009): Both sides now: multiple interactions of ATP with pannexin-1 hemichannels. Focus on "A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP". *American Journal of Physiology Cell Physiology* 296 (2), 235–241.
- DUPRAT, F.; LESAGE, F.; FINK, M.; REYES, R.; HEURTEAUX, C.; LAZDUNSKI, M. (1997): TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *The EMBO Journal* 16 (17), 5464–5471.
- ENYEDI, P.; CZIRJÁK, G. (2010): Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiological Reviews* 90 (2), 559–605.
- FAZIO, G.; VERNUCCIO, F.; GRUTTA, G.; RE, G.L. (2013): Drugs to be avoided in patients with long QT syndrome: Focus on the anaesthesiological management. *World Journal of Cardiology* 5 (4), 87–93.

- FINK, M.; DUPRAT, F.; LESAGE, F.; REYES, R.; ROMÉY, G.; HEURTEAUX, C.; LAZDUNSKI, M. (1996): Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *The EMBO Journal* 15, 6854-6862.
- FISCH, C. (1973): Relation of electrolyte disturbances to cardiac arrhythmias. *Circulation* 47 (2), 408-419.
- FISHMAN, G.I.; CHUGH, S.S.; DIMARCO, J.P.; ALBERT, C.M.; ANDERSON, M.E.; BONOW, R.O.; BUXTON, A.E.; CHEN, P.S.; ESTES, M.; JOUVEN, X.; KWONG, R.; LATHROP, D.A.; MASCETTE, A.M.; NERBONNE, J.M.; O'ROURKE, B.; PAGE, R.L.; RODEN, D.M.; ROSENBAUM, D.S.; SOTOODEHNIA, N.; TRAYANOVA, N.A.; ZHENG, Z.J. (2010): Sudden cardiac death prediction and prevention: report from a National Heart, Lung, and Blood Institute and Heart Rhythm Society Workshop. *Circulation* 122 (22), 2335-2348.
- FORTUIN, N.J.; WEISS, J.L. (1977): Exercise stress testing. *Circulation* 56, 699-712.
- FREEDMAN, R.A.; SWERDLOW, C.D.; SODERHOLM-DIFATTE, V.; MASON, J.W. (1988): Prognostic significance of arrhythmia inducibility or noninducibility at initial electrophysiologic study in survivors of cardiac arrest. *American Journal of Cardiology* 61 (8), 578-582.
- GOLDBERGER, J.J.; CAIN, M.E.; HOHNLOSER, S.H.; KADISH, A.H.; KNIGHT, B.P.; LAUER, M.S.; MARON, B.J.; PAGE, R.L.; PASSMAN, R.S.; SISCOVICK, D.; STEVENSON, W.G.; ZIPES, D.P. (2008): American Heart Association/American College of Cardiology Foundation/Heart Rhythm Society scientific statement on noninvasive risk stratification techniques for identifying patients at risk for sudden cardiac death. A scientific statement from the American Heart Association council on clinical cardiology committee on electrocardiography and arrhythmias and council on epidemiology and prevention. *Circulation* 118, 1497-1518.
- GOLDBERGER, J.J.; BUXTON, A.E.; CAIN, M.; COSTANTINI, O.; EXNER, D.V.; KNIGHT, B.P.; LLOYD-JONES, D.; KADISH, A.H.; LEE, B.; MOSS, A.; MYERBURG, R.; OLGIN, J.; PASSMAN, R.; ROSENBAUM, D.; STEVENSON, W.; ZAREBA, W.; ZIPES, D.P. (2011): Risk stratification for arrhythmic sudden cardiac death: identifying the roadblocks. *Circulation* 123 (21), 2423-2430.
- GOLDENBERG, I.; MOSS, A.J.; BRADLEY, J.; POLONSKY, S.; PETERSON, D.R.; MCNITT, S.; ZAREBA, W.; ANDREWS, M.L.; ROBINSON, J.L.; ACKERMAN, M.J.; BENHORIN, J.; KAUFMAN, E.S.; LOCATI, E.H.; NAPOLITANO, C.; PRIORI, S.G.; QI, M.; SCHWARTZ, P.J.; TOWBIN, J.A.; VINCENT, G.M.; ZHANG, L. (2008): Long-QT syndrome after age 40. *Circulation* 117 (17), 2192-2201.
- GOLDSTEIN, S.A.N.; BOCKENHAUER, D.; O'KELLEY, I.; ZILBERBERG, N. (2001): Potassium leak channels with 2 P domains. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 175-184.
- GOLDSTEIN, S.A.N.; BAYLISS, D.A.; KIM, D.; LESAGE, F.; PLANT, L.D.; RAJAN, S. (2005): International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacological Reviews* 57 (4), 527-540.
- GRAHAM, V.; ZHANG, H.; WILLIS, S.; CREAZZO, T.L. (2006): Expression of a two-pore domain K⁺ channel (TASK-1) in developing avian and mouse ventricular conduction systems. *Developmental Dynamics* 235 (1), 143-151.
- GUNDUZ, H.; ARINC, H.; KAYARDI, M.; AKDEMIR, R.; OZYILDIRIM, S.; UYAN, C. (2006): Heart rate turbulence and heart rate variability in patients with mitral valve prolapse. *Europace* 8 (7), 515-520.
- HART, C.Y.; BURNETT, J.C.; REDFIELD, M.M. (2001): Effects of avertin versus xylazine-ketamine anesthesia on cardiac function in normal mice. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 281 (5), 1938-1945.
- HAWKINS, P. (2002): Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. *Laboratory Animals* 36 (4), 378-395.

- HEKKALA, A.M.; VIITASALO, M.; VÄÄNÄNEN, H.; SWAN, H.; TOIVONEN, L. (2010): Abnormal repolarization dynamics revealed in exercise test in long QT syndrome mutation carriers with normal resting QT interval. *Europace* 12 (9), 1296-1301.
- HILL, I.G. (1932): Human heart in anaesthesia: electrocardiographic study. *Edinburgh Med Journal* 39, 533-553.
- HISS, R.G.; LAMB, L.E. (1962): Electrocardiographic findings in 122,043 individuals. *Circulation* 25, 947-961.
- HONORÉ, E. (2007): The neuronal background K_{2P} channels: focus on TREK1. *Nature Reviews Neuroscience* 8 (4), 251-261.
- HUIKURI, H.V.; EXNER, D.V.; KAVANAGH, K.M.; AGGARWAL, S.G.; MITCHELL, L.B.; MESSIER, M.D.; BECKER, D.; SHELDON, R.S.; BLOCH THOMSEN, P.E.; CARISMA AND REFINE INVESTIGATORS (2010): Attenuated recovery of heart rate turbulence early after myocardial infarction identifies patients at high risk for fatal or near-fatal arrhythmic events. *Heart Rhythm* 7 (2), 229-235.
- HUMMEL, J.D.; STRICKBERGER, S.A.; DAOUD, E.; NIEBAUER, M.; BAKR, O.; MAN, K.C.; WILLIAMSON, B.D.; MORADY, F. (1994): Results and efficiency of programmed ventricular stimulation with four extrastimuli compared with one, two, and three extrastimuli. *Circulation* 90 (6), 2827-2832.
- HÜNING, A. (2010): Kardiale Phänotypisierung der TASK-1 „Knock-out“-Maus. Heinrich-Heine-Universität.
- Ilan, N.; Goldstein, S.A.N. (2001): KCNK0: single, cloned potassium leak channels are multi-ion pores. *Biophysical Journal* 80, 241-254.
- INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH (2011): The guide for the care and use of laboratory animals, 8th ed. Washington (DC). Washington (DC): National Academies Press.
- JAMES, J.F.; HEWETT, T.E.; ROBBINS, J. (1998): Cardiac physiology in transgenic mice. *Circulation Research* 82 (4), 407-415.
- JANUARY, C.T.; RIDDLE, J.M.; SALATA, J.J. (1988): A model for early afterdepolarizations: induction with the Ca^{2+} channel agonist Bay K 8644. *Circulation Research* 62, 563-571.
- JERON, A.; MITCHELL, G.F.; ZHOU, J.; MURATA, M.; LONDON, B.; BUCKETT, P.; WIVIOTT, S.D.; KOREN, G. (2000): Inducible polymorphic ventricular tachyarrhythmias in a transgenic mouse model with a long Q-T phenotype. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 278 (6), 1891-1898.
- JERVELL, A.; LANGE-NIELSEN, F. (1957): Congenital deaf mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *American Heart Journal* 54, 59-68.
- JIANG, D.; WANG, R.; XIAO, B.; KONG, H.; HUNT, D.J.; CHOI, P.; ZHANG, L.; CHEN, S.R.W. (2005): Enhanced store overload-induced Ca^{2+} release and channel sensitivity to luminal Ca^{2+} activation are common defects of RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death. *Circulation Research* 97, 1173-1181.
- JOSEPHSON, M.E.; HOROWITZ, L.N.; FARSHIDI, A.; SPEAR, J.F.; KASTOR, J.A.; MOORE, E.N. (1978): Recurrent sustained ventricular tachycardia. 1. Mechanisms. *Circulation* 57 (3), 431-440.
- JUNG, W.; ANDRESEN, D.; BLOCK, M.; BÖCKER, D.; HOHNLOSER, S.H.; KUCK, K.H.; SPERZEL, J. (2006): Leitlinien zur Implantation von Defibrillatoren. *Clinical Research in Cardiology* 95 (12), 696-708.
- KARAKURT, C.; AYTEMIR, K.; KARADEMIR, S.; SUNGUR, M.; OGUZ, D.; OCAL, B.; SENOCAK, F. (2007): Prognostic value of heart rate turbulence and heart rate variability in children with dilated cardiomyopathy. *Acta Cardiologica* 62 (1), 31-37.

- KARJALAINEN, J.; VIITASALO, M.; MANTTARI, M.; MANNINEN, V. (1994): Relation between QT intervals and heart rates from 40 to 120 beats/min in rest electrocardiograms of men and a simple method to adjust QT interval values. *Journal of the American College of Cardiology* 23 (7), 1547–1553.
- KAROW, T. (2012): Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Aufl. 21, Pulheim: Karow, T., 9; 505; 507; 989.
- KETCHUM, K.A.; JOINER, W.J.; SELLERS, A.J.; KACZMAREK, L.K.; GOLDSTEIN, S.A.N. (1995): A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376 (6542), 690–695.
- KIM, Y.; BANG, H.; KIM, D. (1999): TBAK-1 and TASK-1, two-pore K⁺ channel subunits: kinetic properties and expression in rat heart. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 277 (5 Pt 2), 1669-78.
- KIM, D.; CAVANAUGH, E.J.; KIM, I.; CARROLL, J.L. (2009): Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K⁺ channel in rat carotid body glomus cells. *Journal of Physiology* 587 (Pt 12), 2963–2975.
- KOHN, D.F.; MARTIN, T.E.; FOLEY, P.L.; MORRIS, T.H.; SWINDLE, M.M.; VOGLER, G.A.; WIXSON, S.K. (2007): Public statement: guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 46 (2), 97–108.
- KRASOWSKI, M.D.; HARRISON, N.L. (1999): General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55 (10), 1278–1303.
- KREUZBERG, M.M.; SCHRICKEL, J.W.; GHANEM, A.; KIM, J.S.; DEGEN, J.; JANSSEN-BIENHOLD, U.; LEWALTER, T.; TIEMANN, K.; WILLECKE, K. (2006): Connexin30.2 containing gap junction channels decelerate impulse propagation through the atrioventricular node. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (15), 5959–5964.
- KULLER L H. (1980): Sudden death-definition and epidemiologic considerations. *Progress in Cardiovascular Diseases* 23 (1), 1-12.
- LAZARENKO, R.M.; WILLCOX, S.C.; SHU, S.; BERG, A.P.; JEVTOVIC-TODOROVIC, V.; TALLEY, E.M.; CHEN, X.; BAYLISS, D. (2010): Motoneuronal TASK channels contribute to immobilizing effects of inhalational general anesthetics. *The Journal of Neuroscience* 30 (22), 7691–7704.
- LEONOUKAKIS, D.; GRAY, A.T.; WINEGAR, B.D.; KINDLER, C.H.; HARADA, M.; TAYLOR, D.M.; CHAVEZ, R.A.; FORSAYETH, J.R.; YOST, C.S. (1998): An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. *The Journal of Neuroscience* 18 (3), 868–877.
- LESAGE, F.; LAZDUNSKI, M. (2000): Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 279 (5), 793-801.
- LIMBERG, S.H.; NETTER, M.F.; ROLFES, C.; RINNÉ, S.; SCHLICHTHÖRL, G.; ZUZARTE, M.; VASSILIOU, T.; MOOSDORF, R.; WULF, H.; DAUT, J.; SACHSE, F.B.; DECHER, N. (2011): TASK-1 channels may modulate action potential duration of human atrial cardiomyocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry* 28 (4), 613–624.
- LI-NA, R.; XIN-HUI, F.; LI-DONG, R.; JIAN, G.; YONG-QUAN, W.; GUO-XIAN, Q. (2012): Ambulatory ECG-based T-wave alternans and heart rate turbulence can predict cardiac mortality in patients with myocardial infarction with or without diabetes mellitus. *Cardiovascular Diabetology* 11, 104.
- LONDON, B.; JERON, A.; ZHOU, J.; BUCKETT, P.; HAN, X.; MITCHELL, G.F.; KOREN, G. (1998): Long QT and ventricular arrhythmias in transgenic mice expressing the N terminus and first transmembrane segment of a voltage-gated potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (6), 2926–2931
- LONDON, B. (2001): Cardiac Arrhythmias: From (Transgenic) Mice to Men. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 12 (9), 1089–1091.
- LÖSCHER, W.; UNGEMACH, F.R.; KROKER, R. (2006): Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Aufl. 7, Stuttgart: Enke, 75 – 77.

- MAINGRET, F.; PATEL, A.J.; LESAGE, F.; LAZDUNSKI, M.; HONORÉ, E. (1999): Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (38), 26691-26696.
- MAINGRET, F.; PATEL, A.J.; LESAGE, F.; LAZDUNSKI, M.; HONORÉ, E. (2000): Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K⁺ channels TREK-1 and TRAAK. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (14), 10128-10133.
- MÄKIKALLIO, T.H.; BARTHEL, P.; SCHNEIDER, R.; BAUER, A.; TAPANAINEN, J.M.; TULPPU, M.P.; SCHMIDT, G.; HUIKURI, H.V. (2005): Prediction of sudden cardiac death after acute myocardial infarction: role of Holter monitoring in the modern treatment era. *European Heart Journal* 26, 762–769.
- MARTIN, C.A.; MATTHEWS, G.D.K.; HUANG, C.L.H. (2012): Sudden cardiac death and inherited channelopathy: the basic electrophysiology of the myocyte and myocardium in ion channel disease. *Heart* 98 (7), 536–543.
- MEYER, R.E.; FISH, R.E. (2005): A review of tribromoethanol anesthesia for production of genetically engineered mice and rats. *Laboratory Animals (NY)* 34 (10), 47–52.
- MILBERG, P.; REINSCH, N.; WASMER, K.; MÖNNIG, G.; STYPMANN, J.; OSADA, N.; BREITHARDT, G.; HAVERKAMP, W.; ECKARDT, L. (2005): Transmural dispersion of repolarization as a key factor of arrhythmogenicity in a novel intact heart model of LQT3. *Cardiovascular Research* 65 (2), 397–404.
- MITCHELL, G.F.; JERON, A.; KOREN, G. (1998): Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *American Journal of Physiology* 274 (3 Pt 2), 747-751.
- MUBAGWA, K. (2013): Signalling between G-protein-coupled receptors and TASK1 channels. *Cardiovascular Research* 97 (1), 10–12.
- NAPOLITANO, C.; BLOISE, R.; MONTEFORTE, N.; PRIORI, S.G. (2012): Sudden cardiac death and genetic ion channelopathies: long QT, Brugada, short QT, catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, and idiopathic ventricular fibrillation. *Circulation* 125 (16), 2027–2034.
- NATTEL, S.; MAGUY, A.; LE BOUTER, S.; YEH, Y.H. (2007): Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiological Reviews* 87 (2), 425–456.
- NERBONNE, J.M.; NICHOLS, C.G.; SCHWARZ, T.L.; ESCANDE, D. (2001): Genetic manipulation of cardiac K⁺ channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? *Circulation Research* 89 (11), 944–956.
- NEYROUD, N.; TESSON, F.; DENJOY, I.; LEIBOVICI, M.; DONGER, C.; BARHANIN, J.; FAURÉ, S.; GARY, F.; COUMEL, P.; PETIT, C.; SCHWARTZ, K.; GUICHENEY, P. (1997): A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nature Genetics* 15, 186–189.
- NILLES, K.M.; LONDON, B. (2007): Knockin Animal Models of Inherited Arrhythmogenic Diseases: What Have We Learned From Them? *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 18 (10), 1117–1125.
- OLIVER, M.F. (2002): Metabolic causes and prevention of ventricular fibrillation during acute coronary syndromes. *The American Journal of Medicine* 112 (4) 305-311.
- ONRAT, E.; KAYA, D.; CELIK, A.; MELEK, M.; KERPETEN, K.; KILIT, C.; BARUTCU, I.; ESEN, A.M. (2003): Heart rate turbulence does not seem to be a good predictor in Long QT syndrome. *Archives of the Turkish Society of Cardiology* 31, 770-775.
- Pastore, J.M.; Girouard, S.D.; Laurita, K.R.; Akar, F.G.; Rosenbaum, D.S. (1999): Mechanism linking T-wave alternans to the genesis of cardiac fibrillation. *Circulation* 99, 1385-1394.

- PATEL, A.J.; HONORÉ, E.; LESAGE, F.; FINK, M.; ROMÉY, G.; LAZDUNSKI, M. (1999): Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nature Neuroscience* 2 (5), 422–426.
- PETRIC, S.; CLASEN, L.; VAN WESSEL, C.; GEDULDIG, N.; DING, Z.; SCHULLENBERG, M.; MERSMANN, J.; ZACHAROWSKI, K.; ALLER, M.I.; SCHMIDT, K.G.; DONNER, B.C. (2012): In vivo electrophysiological characterization of TASK-1 deficient mice. *Cellular Physiology and Biochemistry* 30 (3), 523–537.
- PRIORI, S.G.; CORR, P.B. (1990): Mechanisms underlying early and delayed afterdepolarizations induced by catecholamines. *American Journal of Physiology* 258 (6 Pt 2), 1796–805.
- PRIORI, S.G.; SCHWARTZ, P.J.; NAPOLITANO, C.; BLOISE, R.; RONCHETTI, E.; GRILLO, M.; VICENTINI, A.; SPAZZOLINI, C.; NASTOLI, J.; BOTTELLI, G.; FOLLI, R.; CAPPELLETTI, D. (2003): Risk stratification in the long-QT syndrome. *The New England Journal of Medicine* 348 (19), 1866–1874.
- PRIORI, S.G. (2010): The fifteen years of discoveries that shaped molecular electrophysiology: time for appraisal. *Circulation Research* 107 (4), 451–456.
- PUTZKE, C.; WEMHÖNER, K.; SACHSE, F.B.; RINNÉ, S.; SCHLICHTHÖRL, G.; LI, X.T.; JAÉ, L.; ECKHARDT, I.; WISCHMEYER, E.; WULF, H.; PREISIG-MÜLLER, R.; DAUT, J.; DECHER, N. (2007): The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. *Cardiovascular Research* 75 (1), 59–68.
- QIAGEN GMBH (2006): DNeasy® Blood & Tissue Handbook: For purification of total DNA from animal blood, animal tissue, rodent tails, ear punches, cultured cells, fixed tissue, bacteria, insects. Qiagen.
- QIAGEN GMBH (2011): QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Handbook: For quantitative, real-time one-step RT-PCR using SYBR Green I. Qiagen.
- RAJ, S.R.; SHELDON, R.S.; KOSHMAN, M.; ROACH, D.E. (2005): Role of hypotension in heart rate turbulence physiology. *Heart Rhythm* 2 (8), 820–827.
- RAJAN, S.; PLANT, L.D.; RABIN, M.L.; BUTLER, M.H.; GOLDSTEIN, S.A.N. (2005): Sumoylation silences the plasma membrane leak K⁺ channel K2P1. *Cell* 121 (1), 37–47.
- RIBEIRO, A.L.P.; SCHMIDT G.; SOUSA, M.R.; LOMBARDI, F.; GOMES, M.E.D.; PEREZ, A.A.; BARROS, M.V.L.; MACHADO, F.S.; ROCHA, M.O.C. (2003): Heart rate turbulence in Chagas disease. *Pacing And Clinical Electrophysiology* 26, 406–410.
- ROACH, D.; KOSHMAN, M.L.; DUFF, H.; SHELDON, R. (2002): Induction of heart rate and blood pressure turbulence in the electrophysiologic laboratory. *American Journal of Cardiology* 90 (10), 1098–1102.
- RODEN, D.M. (2008): Clinical practice. Long-QT syndrome. *The New England Journal of Medicine* 358 (2), 169–176.
- ROMANO, C.; GEMME, G.; PONGIGLIONE, R. (1963): Aritmie cardiache rare in età pediatrica. *Clinical Pediatrics (Bologna)* 45, 656–683.
- ROSENBAUM, D.S.; JACKSON, L.E.; SMITH, J.M.; GARAN, H.; RUSKIN, J.N.; COHEN, R.J. (1994): Electrical alternans and vulnerability to ventricular arrhythmias. *The New England Journal of Medicine*. 330 (4), 235–241.
- ROTH, D.M.; SWANEY, J.S.; DALTON, N.D.; GILPIN, E.A.; ROSS, J. (2002): Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 282 (6), 2134–2140.
- RUAN, Y.; LIU, N.; NAPOLITANO, C.; PRIORI, S.G. (2008): Therapeutic strategies for long-QT syndrome: does the molecular substrate matter? *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 1 (4), 290–297.
- RUDY, B. (1988): Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 25 (3), 729–749.

- SABA, S.; JANCZEWSKI, A.M.; BAKER, L.C.; SHUSTERMAN, V.; GURSOY, E.C.; FELDMAN, A.M.; SALAMA, G.; MCTIERNAN, C.F.; LONDON, B. (2005): Atrial contractile dysfunction, fibrosis, and arrhythmias in a mouse model of cardiomyopathy secondary to cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 289 (4), 1456-1467.
- SALAMA, G.; BAKER, L.; WOLK, R.; BARHANIN, J.; LONDON, B. (2009): Arrhythmia phenotype in mouse models of human long QT. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology* 24 (2), 77-87.
- SCHIEKEL, J.; LINDNER, M.; HETZEL, A.; WEMHÖNER, K.; RENIGUNTA, V.; SCHLICHTHÖRL, G.; DECHER, N.; OLIVER, D.; DAUT, J. (2013): The inhibition of the potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle by endothelin-1 is mediated by phospholipase C. *Cardiovascular Research* 97 (1), 97-105.
- SCHMIDT, G.; MALIK, M.; BARTHEL, P.; SCHNEIDER, R.; ULM, K.; ROLNITZKY, L.; CAMM, J.; BIGGER, T.; SCHÖMIG, A. (1999): Heart-rate turbulence after ventricular premature beats as a predictor of mortality after acute myocardial infarction. *Lancet* 353 (9162), 1390-1396.
- SCHRICKEL, J.W.; BIELIK, H.; YANG, A.; SCHIMPF, R.; SHLEVKOV, N.; BURKHARDT, D.; MEYER, R.; GROHÉ, C.; FINK, K.; TIEMANN, K.; LÜDERITZ, B.; LEWALTER, T. (2002): Induction of atrial fibrillation in mice by rapid transesophageal atrial pacing. *Basic Research in Cardiology* 97 (6), 452-460.
- SCHRICKEL, J.W.; BRISIUS, K.; HERR, C.; CLEMEN, C.S.; SASSE, P.; REETZ, K.; GROHÉ, C.; MEYER, R.; TIEMANN, K.; SCHRÖDER, R.; BLOCH, W.; NICKENIG, G.; FLEISCHMANN, B.K.; NOEGEL, A.A.; SCHWINGER, R.H.G.; LEWALTER, T. (2007): Enhanced heterogeneity of myocardial conduction and severe cardiac electrical instability in annexin A7-deficient mice. *Cardiovascular Research* 76 (2), 257-268.
- SCHULZE-BAHR, E.; WANG, Q.; WEDEKIND, H.; HAVERKAMP, W.; CHEN, Q.; SUN, Y.; RUBIE, C.; HORDT, M.; TOWBIN, J.A.; BORGGREFE, M.; ASSMANN, G.; QU, X.; SOMBERG, J.C.; BREITHARDT, G.; OBERTI, C.; FUNKE, H. (1997): KCNE1 mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nature Genetics* 17, 267-268.
- SCHWARTZ, P.J.; LOCATI, E.H.; MOSS, A.J.; CRAMPTON, R.S.; TRAZZI, R.; RUBERTI, U. (1991): Left cardiac sympathetic denervation in the therapy of congenital long QT syndrome. A worldwide report. *Circulation* 84 (2), 503-511.
- SCHWARTZ, P.J. (1997): The long QT syndrome. *Current Problems in Cardiology* 22 (6), 297-351.
- SCHWARTZ, P.J.; PRIORI, S.G.; SPAZZOLINI, C.; MOSS, A.J.; VINCENT G.M.; NAPOLITANO, C.; DENJOY, I.; GUICHENEY, P.; BREITHARDT, G.; KEATING, M.T.; TOWBIN, J.A.; BEGGS, A.H.; BRINK, P.; WILDE, A.A.M.; TOIVONEN, L.; ZAREBA, W.; ROBINSON, J.L.; TIMOTHY, K.W.; CORFIELD, V.; WATTANASIRICHAIGOON, D.; CORBETT, C.; HAVERKAMP, W.; SCHULZE-BAHR, E.; LEHMANN, M.H.; SCHWARTZ, K.; COUMEL, P.; BLOISE, R. (2001): Genotype-phenotype correlation in the long QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 103 (1), 89-95.
- SCHWARTZ, P.J.; STRAMBA-BADIALE, M.; CROTTI, L.; PEDRAZZINI, M.; BESANA, A.; BOSI, G.; GABBARINI, F.; GOULENE, K.; INSOLIA, R.; MANNARINO, S.; MOSCA, F.; NESPOLI, L.; RIMINI, A.; ROSATI, E.; SALICE, P.; SPAZZOLINI, C. (2009): Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation* 120 (18), 1761-1767.
- SCHWARTZ, P.J.; CROTTI, L. (2011): QTc behavior during exercise and genetic testing for the long-QT syndrome. *Circulation* 124 (20), 2181-2184.
- SELZER, A.; WRAY, H.W. (1964): Quinidine syncope, paroxysmal ventricular fibrillation occurring during treatment of chronic atrial arrhythmias. *Circulation* 30, 17-26.
- SHIMIZU, W.; MCMAHON, B.; ANTZELEVITCH, C. (1999): Sodium pentobarbital reduces transmural dispersion of repolarization and prevents torsades de Pointes in models of acquired and congenital long QT syndrome. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 10 (2), 154-164.

- SHIMIZU, W.; ANTZELEVITCH, C. (2000): Differential effects of beta-adrenergic agonists and antagonists in LQT1, LQT2 and LQT3 models of the long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 35 (3), 778–786.
- SHIMIZU, W.; NODA, T.; TAKAKI, H.; KURITA, T.; NAGAYA, N.; SATOMI, K.; SUYAMA, K.; AIHARA, N.; KAMAKURA, S.; SUNAGAWA, K.; ECHIGO, S.; NAKAMURA, K.; OHE, T.; TOWBIN, J.A.; NAPOLITANO, C.; PRIORI, S.G. (2003): Epinephrine Unmasks Latent Mutation Carriers With LQT1 Form of Congenital Long-QT Syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 41 (4), 633–642.
- SPEERSCHNEIDER, T.; THOMSEN, M. B. (2013): Physiology and analysis of the electrocardiographic T wave in mice. *Acta Physiologica* 209 (4), 262–271.
- SURAWICZ, B.; KNOEBEL, S. B. (1984): Long QT: good, bad or indifferent? *Journal of the American College of Cardiology* 4 (2), 398–413.
- SY, R.W.; WERF, C.; CHATTA, I.S.; CHOCKALINGAM, P.; ADLER, A.; HEALEY, J.S.; PERRIN, M.; GOLLOB, M.H.; SKANES, A.C.; YEE, R.; GULA, L.J.; LEONG –SIT, P.; VISKIN, S.; KLEIN, G.J.; WILDE, A.A.; KRAHN, A.D. (2011): Derivation and validation of a simple exercise-based algorithm for prediction of genetic testing in relatives of LQTS probands. *Circulation* 124, 2187–2194.
- TAN, H.L.; HOU, C.J.; LAUER, M.R.; SUNG, R.J. (1995): Electrophysiologic mechanisms of the long QT interval syndromes and torsade de pointes. *Annals of Internal Medicine* 122 (9), 701-714.
- TEODORESCU, C.; REINIER, K.; DERVAN, C.; UY-EVANADO, A.; SAMARA, M.; MARIANI, R.; GUNSON, K.; JUI, J.; CHUGH, S.S. (2010): Factors associated with pulseless electric activity versus ventricular fibrillation: the Oregon sudden unexpected death study. *Circulation* 122 (21), 2116-2122.
- TESTER, D.J.; WILL, M.L.; HAGLUND, C.M.; ACKERMAN, M.J. (2006): Effect of clinical phenotype on yield of long QT syndrome genetic testing. *Journal of the American College of Cardiology* 47 (4), 764-768.
- Thermo Scientific Inc. (2010): NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual, Revised 9/11. Thermo Scientific Inc.
- THOMAS, K.E.; JOSEPHSON, M.E. (2008): The role of electrophysiology study in risk stratification of sudden cardiac death. *Progress in Cardiovascular Diseases* 51 (2), 97–105.
- UMETANI, K.; KOMORI, S.; ISHIHARA, T.; SAWANOBORI, T.; KOHNO, I.; IJIRI, H.; TAMURA, K. (1999): Relation between QT interval dispersion and heart rate. *American Journal of Cardiology* 84 (9), 1135-1137.
- VANDERBRINK, B.A.; LINK, M.S.; ARONOVITZ, M.J.; SABA, S.; SLOAN, S.B.; HOMOUD, M.K.; ESTES III, N.A.M.; WANG, P.J. (1999): Assessment of atrioventricular nodal physiology in the mouse. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology* 3 (3), 207–212.
- VAILLANCOURT, C.; STIELL, I.G., BRIEN, S. (2004): Cardiac arrest care and emergency medical services. *Canadian Journal of Cardiology* 20, 1081–1090.
- VOLDERS, P.G.; STENGL, M.; VAN OPSTAL, J.M.; GERLACH, U.; SPÄTJENS, R.L.; BEEKMAN, J.D.; SIPIDO, K.R.; VOS, M.A. (2003): Probing the contribution of IKs to canine ventricular repolarization: key role for beta-adrenergic receptor stimulation. *Circulation* 107 (21), 2753-2760.
- WANG, Q.; SHEN, J.; SPLAWSKI, I.; ATKINSON, D.; LI, Z.; ROBINSON, J.L.; MOSS, A.J.; TOWBIN, J.A.; KEATING, M.T. (1995): SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 80 (5), 805–811.
- WANG, Q.; CURRAN, M.E.; SPLAWSKI, I.; BURN, T.C.; MILLHOLLAND, J.M.; VANRAAY, T.J.; SHEN, J.; TIMOTHY, K.W.; VINCENT, G.M.; JAGER, T.; SCHWARTZ, P.J.; TOWBIN, J.A.; MOSS, A.J.; ATKINSON, D.L.; LANDES, G.M.; CONNORS, T.D.; KEATING, M.T. (1996): Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Genetics* 12 (1), 17–23.
- WARD, O.C. (1964): New familial cardiac syndrome in children. *Journal of Irish Medical Association* 54, 103–106.

- WEHRENS, X.H.; KIRCHHOFF, S.; DOEVENDANS, P.A. (2000): Mouse electrocardiography: an interval of thirty years. *Cardiovascular Research* 45 (1), 231–237.
- WELLENS, H.J.; SCHUILENBURG, R.M.; DURRER, D. (1972): Electrical Stimulation of the Heart in Patients with Ventricular Tachycardia. *Circulation* 46, 216-226.
- WEISS, J.; ZIMMERMANN, F. (1999): Tribromoethanol (Avertin) as an anaesthetic in mice. *Laboratory Animals* 33 (2), 192–193.
- WILBER, D.J.; GARAN, H.; FINKELSTEIN, D.; KELLY, E.; NEWELL, J.; MCGOVERN, B.; RUSKIN, J.N. (1988): Out-of-hospital cardiac arrest. Use of electrophysiologic testing in the prediction of long-term outcome. *The New England Journal of Medicine* 318 (1), 19-24.
- WINKEL, B.G.; HOLST, A.G.; THEILADE, J.; KRISTENSEN, I.B.; THOMSEN, J.L.; OTTESEN, G.L.; BUNDGAARD, H.; SVENDSEN, J.H.; HAUNSØ, S.; Tfelt-HANSEN, J. (2011): Nationwide study of sudden cardiac death in persons aged 1-35 years. *European Heart Journal* 32 (8), 983–990.
- YALTA, K.; ERDEM, A.; YILMAZ, A.; TURGUT, O.O.; YILMAZ, M.B.; YONTAR, C.; TANDOGAN, I. (2007): Heart rate turbulence: an additional parameter in determining the need for mechanical relief of mitral stenosis? *The Journal of Heart Valve Disease* 16, 255–259.
- YANG, A.; SCHAFFER, H.; MANKA, R.; ANDRIÉ, R.; SCHWAB, J.O.; LEWALTER, T.; LÜDERITZ, B.; TASCI, S. (2005): Influence of obstructive sleep apnea on heart rate turbulence. *Basic Research in Cardiology* 100, 439–445.
- YAP, Y.G.; CAMM, A.J. (2003): Drug induced QT prolongation and torsades de pointes. *Heart* 89 (11), 1363–1372.
- ZAREBA, W.; MOSS, A.J.; SCHWARTZ, P.J.; VINCENT, G.M.; ROBINSON, J.L.; PRIORI, S.G.; BENHORIN, J.; LOCATI, E.H.; TOWBIN, J.A.; KEATING, M.T.; LEHMANN, M.H.; HALL, W.J.; ANDREWS, M.L.; NAPOLITANO, C.; TIMOTHY, K.; ZHANG, L.; MEDINA, A.; MACCLUER, J.W. FOR THE INTERNATIONAL LONG-QT-SYNDROME REGISTRY RESEARCH GROUP (1998): Influence of genotype on the clinical course of the long-QT syndrome. International Long-QT Syndrome Registry Research Group. *The New England Journal of Medicine* 339 (14), 960–965.
- ZELLER, W.; MEIER, G.; BÜRKI, K.; PANOUSSIS, B. (1998): Adverse effects of tribromoethanol as used in the production of transgenic mice. *Laboratory Animals* 32 (4), 407–413.
- ZELLER, A.; ARRAS, M.; JURD, R.; RUDOLPH, U. (2007): Identification of a molecular target mediating the general anesthetic actions of pentobarbital. *Molecular Pharmacology* 71 (3), 852–859.
- ZHANG, L.; TIMOTHY, K.W.; VINCENT, G.M.; LEHMANN, M.H.; FOX, J.; GIULI, L.C.; SHEN, J.; SPLAWSKI, I.; PRIORI, S.G.; COMPTON, S.J.; YANOWITZ, F.; BENHORIN, J.; MOSS, A.J.; SCHWARTZ, P. J.; ROBINSON, J.L.; WANG, Q.; ZAREBA, W.; KEATING, M.T.; TOWBIN, J.A.; NAPOLITANO, C.; MEDINA, A. (2000): Spectrum of ST-T-wave patterns and repolarization parameters in congenital long-QT syndrome: ECG findings identify genotypes. *Circulation* 102 (23), 2849–2855.
- ZHENG, Z.J.; CROFT, J.B.; GILES, W.H.; MENSAH, G.A. (2001): Sudden cardiac death in the United States, 1989 to 1998. *Circulation* 104, 2158-2163.
- ZIPES, D.P.; CAMM, A.J.; BORGGREFE, M.; BUXTON, A.E.; CHAITMAN, B.; FROMER, M.; GREGORATOS, G.; KLEIN, G.; MOSS, A.J.; MYERBURG, R., J.; PRIORI, S.G.; QUIONES, M.A.; RODEN, D.M.; SILKA, M.J.; TRACY, C. (2006): ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (writing committee to develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation* 114 (10), 385-484.
- ZUTPHEN, L.F.M.; HACKBARTH, H. (1995): Grundlagen der Versuchstierkunde. Ein Beitrag zum tierschutzgerechten Umgang mit Versuchstieren und zur Qualität tierexperimenteller Ergebnisse ; mit 38 Tabellen. Aufl. 1, Stuttgart, Jena, New York: G. Fischer, 229 – 237; 251 – 253.

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. em. Dr. med. Klaus G. Schmidt, ehemaliger Direktor der Klinik für Kinderkardiologie und Pneumologie und Herrn Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek, Direktor der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie, in deren Klinik ich meine Promotionsarbeit im kardiovaskulären Forschungslabor bei Frau Prof. Dr. med. Birgit Donner anfertigen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Birgit Donner für die Anregung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit, das wissenschaftliche Arbeiten zu erlernen. Ihr herzliches Engagement als Betreuerin und ihre persönlichen Ratschläge waren eine große Bereicherung für mich.

Herrn Prof. Dr. med. Tienush Rassaf danke ich für die zügige Erstellung des Zweitgutachtens.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. William Wisden der Abteilung Klinische Neurobiologie der Universität Heidelberg danke ich für die freundliche Bereitstellung der TASK-1 *Knock-Out* Maus.

Danken möchte ich den Mitarbeitern des Instituts für Herzkreislaufphysiologie der Universität Düsseldorf für die Bereitstellung des elektrophysiologischen Messplatzes. Insbesondere danke ich stellvertretend Herrn Dr. Zhaoping Ding und Herrn Dr. Gerald Große, für deren wertvolle Tipps bei der technischen Durchführung der Tierversuche. Gleiches gilt für Herrn Sven Haupt von der Firma ADInstruments, mit dessen Hilfe wir den Versuchsaufbau erarbeiten konnten.

Gleichermaßen danke ich den Mitarbeitern des Forschungslabors der Kinderklinik des Universitätsklinikum Düsseldorf, vor allem Frau Martina Müller für ihre hilfreichen Tipps bei der Genotypisierung.

Frau Stella Petric möchte ich für die wirklich nette Zusammenarbeit am TASK-1 Projekt danken. Als Tierärztin war sie eine wertvolle fachliche Ergänzung bei der Arbeit mit den Mäusen.

All den Versuchstieren ist zu danken, die den Fortschritt in der molekularen Erforschung bedeutender kardiovaskulärer Erkrankungen ermöglichen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Pia und Dr. med. Wolfgang Clasen, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben und mich jederzeit während der Promotion unterstützten. Ebenso danke ich meiner Frau Sabrina Clasen und meinen Geschwistern für ihre liebevolle Unterstützung.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, 10. Juli 2014