

Interaktionen am hERG-Kanal

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Anne Friemel

aus

Hoyerswerda

Bonn 2010

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Bernd Joachim Zünkler

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Klaus Mohr

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2010

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2010

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Bernd Joachim Zütkler für die interessante Themenstellung sowie die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr danke ich vielmals für die freundliche Übernahme des Korreferats und die Möglichkeit an seinen Kolloquien teilnehmen zu können.

Bei Maria Wos-Maganga und Maria Inmaculada Garcia-Moreno möchte ich mich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor und Büro und für alle freundschaftlichen und fachlichen Gespräche bedanken.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern in den Laboren des BfArM für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Florian Kleinau für die Unterstützung und Geduld, die das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglichten.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Ionenkanäle	1
1.2 Erregungsausbreitung im Herzen	2
1.3 Entstehung von QT-Intervall-Verlängerungen und TdP-Arrhythmien	4
1.4 Das Lange QT-Syndrom (LQTS)	7
1.4.1 Das angeborene LQTS	7
1.4.2 Das erworbene LQTS	9
1.5 Der hERG (human-ether-à-go-go-related-gene)-Kanal	9
1.5.1 Physiologische Bedeutung des hERG-Kanals im Herzen	10
1.5.2 Molekularer Aufbau des hERG-Kanals	12
1.5.3 Pharmakologie des hERG-Kanals.....	13
1.6 Regulatorische Richtlinien für die Abschätzung des kardiotoxischen Potentials von Substanzen	16
1.7 Arzneimittelinteraktionen	18
1.8 Zielsetzung der Arbeit	19
2 Material und Methodik	23
2.1 Chemikalien	23
2.2 Strukturformeln der untersuchten Testsubstanzen	24
2.3 Lösungen	25
2.3.1 Medien für die Zellkultur.....	25
2.3.2 Materialien für die Transformation.....	26
2.3.3 Lösungen für die Patch-Clamp-Experimente.....	26
2.3.4 Testsubstanz-Lösungen.....	27
2.4 Plasmide	27
2.5 Zellkultur	27
2.6 Transformation und Plasmidgewinnung	29
2.7 Transiente Transfektion	32
2.8 Patch-Clamp-Experimente	34
2.8.1 Prinzip der Patch-Clamp-Technik.....	34

2.8.2	Aufbau des Patch-Clamp-Messplatzes	39
2.8.3	Herstellung der Patch-Pipetten	41
2.8.4	Durchführung der elektrophysiologischen Messungen	42
2.8.5	Bestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen	45
2.8.6	Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Aktivierung.....	46
2.8.7	Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Inaktivierung	47
2.8.8	Erholung von der Inaktivierung und Deaktivierung	47
2.8.9	„Envelope of Tails“-Test	48
2.8.10	Langes Puls-Protokoll.....	49
2.8.11	Die Spannungsrampe	50
2.8.12	Korrektur um die Leckströme.....	50
2.8.13	Datenauswertung und Statistik für die elektrophysiologischen Messungen	51
2.9	Kombinationsuntersuchungen.....	53
2.9.1	Der Kombinationsindex CI.....	55
2.10	Intrazelluläre Applikation von Testsubstanzen.....	56
3	Ergebnisse.....	57
3.1	Untersuchung der Wirkungen von Terfenadin, Fluvoxamin, Chlorbutanol, Dofetilid und CnErg1 auf hERG-Ströme.....	57
3.1.1	Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Hemmung der hERG- Spitzen-Tail-Ströme durch Terfenadin, Fluvoxamin, Chlorbutanol, Dofetilid und CnErg1.....	57
3.1.2	Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Hemmung von hERG- Aktivierungsströmen durch Terfenadin, Fluvoxamin, Chlorbutanol, Dofetilid und CnErg1.....	59
3.2	Untersuchung von Interaktionen am hERG-Kanal	61
3.2.1	Untersuchung der Wirkungen der Kombinationen von Terfenadin einerseits mit Fluvoxamin, Dofetilid, Chlorbutanol und CnErg1 andererseits auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme	61
3.2.2	Der Kombinationsindex CI.....	64
3.2.3	Untersuchung der Interaktion zwischen Terfenadin und CnErg1.....	65
3.2.3.1	Applikation steigender CnErg1-Konzentrationen in Anwesenheit von Terfenadin.....	65
3.2.3.2	Applikation steigender Terfenadin-Konzentrationen in Anwesenheit von CnErg1	66
3.2.4	Untersuchung der Interaktion zwischen Terfenadin und Chlorbutanol.....	68
3.2.4.1	Applikation steigender Terfenadin-Konzentrationen in Anwesenheit von Chlorbutanol	68
3.2.4.2	Applikation steigender Chlorbutanol-Konzentrationen in Anwesenheit von Terfenadin.....	71

3.3	Untersuchungen des Einflusses von Terfenadin, Chlorbutanol und der Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol auf hERG Ströme	74
3.3.1	Untersuchungen der Spannungsabhängigkeit der hERG-Strom-Reduktion durch Chlorbutanol, durch Terfenadin und durch die Kombination der beiden Substanzen	75
3.3.1.1	Einfluss der Dauer des Aktivierungspulses auf die halbmaximale Aktivierungsspannung	75
3.3.1.2	Untersuchungen der Wirkungen von Terfenadin, Chlorbutanol und der Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol auf die Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Aktivierung.....	77
3.3.1.3	Untersuchungen der Wirkungen von Terfenadin, Chlorbutanol und der Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol auf die Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Inaktivierung	80
3.3.1.4	Untersuchungen der Wirkungen von Terfenadin, Chlorbutanol und der Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol auf die Deaktivierung und die Erholung der hERG-Ströme von der Inaktivierung	83
3.3.2	Untersuchungen der Zeitabhängigkeit der hERG-Strom-Reduktion durch Chlorbutanol, durch Terfenadin und durch die Kombination der beiden Substanzen.....	87
3.3.2.1	„Envelope of Tails“-Test	87
3.3.2.2	Langes Puls-Protokoll.....	89
3.3.2.3	Zeitverlauf und Reversibilität der hERG-Strom-Reduktion	91
3.3.3	Intrazelluläre Applikation	94
3.3.4	Untersuchung des Einflusses von Membrantransportern	98
3.3.5	Untersuchung der hERG-Strom-Blockade durch Chlorbutanol mit Hilfe einer Spannungsrampe	100
3.3.6	Untersuchung der Wirkungen von Terfenadin und Chlorbutanol auf Tyr652Ala-hERG-Kanäle	102
4	Diskussion	105
4.1	Wirkungen von Terfenadin, Fluvoxamin, Chlorbutanol, Dofetilid und CnErg1 auf hERG-Ströme	105
4.2	Kombinationsuntersuchungen.....	108
4.3	Untersuchung der Mechanismen der hERG-Strom-Blockade durch Terfenadin, Chlorbutanol und die Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination	115
4.4	Untersuchungen an der Tyr652Ala-hERG-Mutante.....	122
4.5	Untersuchungen mit Hilfe der Spannungsrampe	123
4.6	Klinische Relevanz der Chlorbutanol-Effekte	124
4.7	Intrazelluläre Applikation.....	125
5	Zusammenfassung	131

6	Literaturverzeichnis	134
7	Veröffentlichungen	146

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AD	Analog / Digital
C	Kapazität
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CHO	Chinesische Hamster-Ovarial-Zellen
CI	Kombinationsindex
C _m	Membrankapazität
CPMP	Commitee for Proprietary Medicinal Products
CYP	Cytochrom P450
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
EAG	ether-a-go-go-gene
EGFP	enhanced green fluorescent protein (verstärkt grün fluoreszierendes Protein)
EKG	Elektrokardiogramm
ELK	eag-like K ⁺ -Kanal-Gen
E _m	Ruhemembranpotential
F	Farad
FDA	Food and Drug Administration (US-amerikanische Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde)
FKS	fetales Kälberserum
g	Leitfähigkeit
Gly	Glycerin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
hERG	human ether-a-go-go-related gene
Hz	Hertz
I	Strom

Abkürzungsverzeichnis

IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
I _{CaL}	Strom durch L-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle
ICH	International Conference on Harmonisation
I _f	Kompensationsstrom
Ile	Isoleucin
I _{Kr}	Strom durch schnell einwärtsgerichtende K ⁺ -Kanäle
I _{Ks}	Strom durch langsam einwärtsgerichtende K ⁺ -Kanäle
I _m	Ionenströme, die über Ionenkanäle der Zellmembran fließen
I _{Na}	Ströme durch spannungsabhängige Na ⁺ -Kanäle
K ⁺	Kalium-Ion
KI	Konfidenzintervall
K _{ir}	einwärtsgerichtender K ⁺ -Kanal
K _v	spannungsabhängiger K ⁺ -Kanal
LB	Luria-Bertani
LQTS	Langes QT-Syndrom
MEM	minimal essential medium (Minimalmedium)
M-Zellen	midmyokardiale Zellen
n	Anzahl der Messdaten
Na ⁺	Natrium-Ion
Ω	Ohm
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	-log [H ⁺]
P	Porenregion
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
R	elektrischer Widerstand
R _f	Rückkopplungswiderstand

R_m	Membranwiderstand
RNA	Ribonucleinacid
R_{pip}	Pipettenwiderstand
R_S	Serienwiderstand
Ser	Serin
TdP	Torsades de Pointes
Thr	Threonin
TM	Transmembrandomäne
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Spannung
U_{aus}	Spannung am Ausgang des Operationsverstärkers
U_m	Membranpotential der Zelle bzw. Pipettenpotential
U_{soll}	Kommandospannung
V	Volt
$V_{1/2}$	halbmaximale Aktivierungs- bzw. Inaktivierungsspannung
Val	Valin
V_M	Membranpotential
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind transmembranäre Glykoproteine, welche Poren bilden, die es Ionen ermöglichen, die Lipiddoppelschicht zu durchqueren. Grundsätzlich unterscheidet man Anionen- und Kationenkanäle. Kationenkanäle weisen häufig eine hohe Selektivität für eine bestimmte Kationensorte auf. Die Richtung der Diffusion wird durch die elektrochemische Triebkraft bestimmt, die sich aus dem Konzentrationsgradienten und der Membranpotentialdifferenz zusammensetzt. Ströme durch Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle sind Einwärtsströme, Ströme durch K^+ -Kanäle sind Auswärtsströme. Ionenkanäle können durch spezifische Konformationsänderungen zwischen Offen- und Geschlossen-Zuständen hin- und herschalten, eine Eigenschaft, die man als Kanalschalteverhalten („Gating“) bezeichnet. Dieses Schalteverhalten kann durch verschiedene Stimuli, wie Änderung der Membranspannung (spannungsabhängige Kanäle) oder Änderung von Transmitterkonzentrationen (Liganden-gesteuerte Kanäle), gesteuert werden. Die Funktion von Ionenkanälen ist die Generierung des Membranpotentials, welches über Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration für die Signaltransduktion genutzt wird (Bernard & Shevell 2008).

Kaliumkanäle bilden unter den Ionenkanälen die umfangreichste Gruppe mit über 80 Genen im menschlichen Genom (Recanatini et al. 2005). Sie sind unter anderem beteiligt an der Kalium-Homöostase, an sekretorischen Prozessen und der Signalübertragung an elektrisch erregbaren Membranen. Die Familie der Kaliumkanäle wird nach der Anzahl der Transmembrandomänen (TM) und der Porenregionen (P) unterteilt (siehe Abb. 1). Sie lassen sich aufgrund der Topologie der α -Untereinheit in Subfamilien einteilen. Die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle (K_v) sind Tetramere und eine Untereinheit besteht aus 6 transmembranären Domänen und einer porenbildenden Region. Sie werden durch eine Depolarisation der Membran aktiviert. Die einwärtsgleichrichtenden K^+ -Kanäle (K_{ir}) sind Tetramere, und eine Untereinheit besteht aus 2 transmembranären Domänen und einer porenbildenden Region. Sie werden durch intrazelluläre Faktoren, wie G-Proteine, Nukleotide und Polyamine reguliert. Die 2-Poren K^+ -Kanäle (K_{2p}) sind Dimere und eine Untereinheit besteht aus 4 transmembranären Domänen und 2 porenbildenden Regionen (Review in Tamargo et al. 2004).

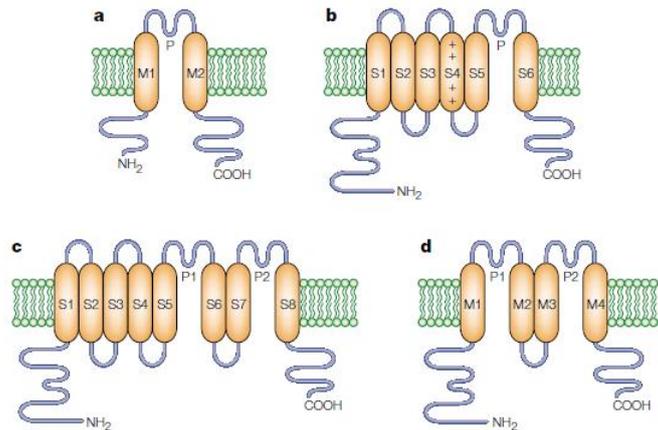


Abb. 1: Die vier Hauptklassen von Kaliumkanälen (Choe 2002). **a:** 2 TM/P Kanäle bestehend aus 2 transmembranären Domänen und einer Porenschleife, z.B. einwärtsgleichrichtende Kir-Kanäle. **b:** 6TM/P Kanäle, spannungsabhängige Kaliumkanäle, z.B. hERG **c:** 8TM/2P-Kanäle, sind wahrscheinlich Hybride aus 6TM/P und 2TM/P **d:** 4TM/2P-Kanäle, die aus zwei Wiederholungen des 2TM/P-Musters bestehen.

Das menschliche Genom kodiert für 40 spannungsabhängige Kalium-Kanäle (K_v -Kanäle), welche an vielfältigen physiologischen Prozessen beteiligt sind, wie der Repolarisation neuronaler und kardialer Aktionspotentiale, der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und des Zellvolumens, der Zellproliferation und -migration (Wulff et al. 2009).

1.2 Erregungsausbreitung im Herzen

Die kardiale Erregung (Abb. 2) basiert auf der spontanen Bildung von Aktionspotentialen im Sinusknoten (primärer Schrittmacher). Von hier breiten sich Erregungen radiär über die Vorhöfe aus und gelangen zum Atrioventrikular (AV)-Knoten. Der Impuls wird dann über das His-Bündel, die Kammerschenkel und die Purkinjefasern auf die Ventrikel übertragen. Die ventrikuläre Erregung breitet sich vom Endokard zum Epikard aus und ist mit der Kontraktion der Herzkammer gekoppelt, welche den systolischen Blutdruck generiert (Clancy & Kass 2005). Das kardiale Aktionspotential ist das Ergebnis des komplexen zeitlichen Zusammenspiels verschiedener Ionenkanäle. Es gliedert sich in fünf Phasen (Phase 0 bis 4). Während der Phase 0 (Aufstrichphase) kommt es infolge der Depolarisation zur Öffnung spannungsabhängiger Natriumkanäle und zu einem Natrium-Einwärtsstrom. In der sich anschließenden Phase 1 kommt es in einigen Myozyten zur frühen partiellen Repolarisation. Diese wird durch die Inaktivierung der Na^+ -Kanäle und die Aktivierung von I_{to} (transienter Kalium-Auswärtsstrom) bedingt. Dieser Kaliumauswärtsstrom induziert eine charakteristische Kerbe („Notch“) während der frühen Repolarisation des Aktionspotentials. Während der Plateauphase (Phase 2) kommt es zu einem langsamen, depolarisierenden Ca^{2+} -

Einstrom in die Muskelfasern durch langsam inaktivierende L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (L - long lasting). Ausgelöst durch diesen Ca^{2+} -Einstrom kommt es zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Die Kontraktion der Herzmuskelzelle resultiert aus der Bindung von Ca^{2+} an kontraktile Proteine. Nach der Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen kommt es zur Aktivierung von schnell einwärtsgerichtenden K^+ -Kanälen (I_{Kr} – rapid delayed rectifier K^+ -Kanal, schnell verzögernd einwärtsgleichrichtend).

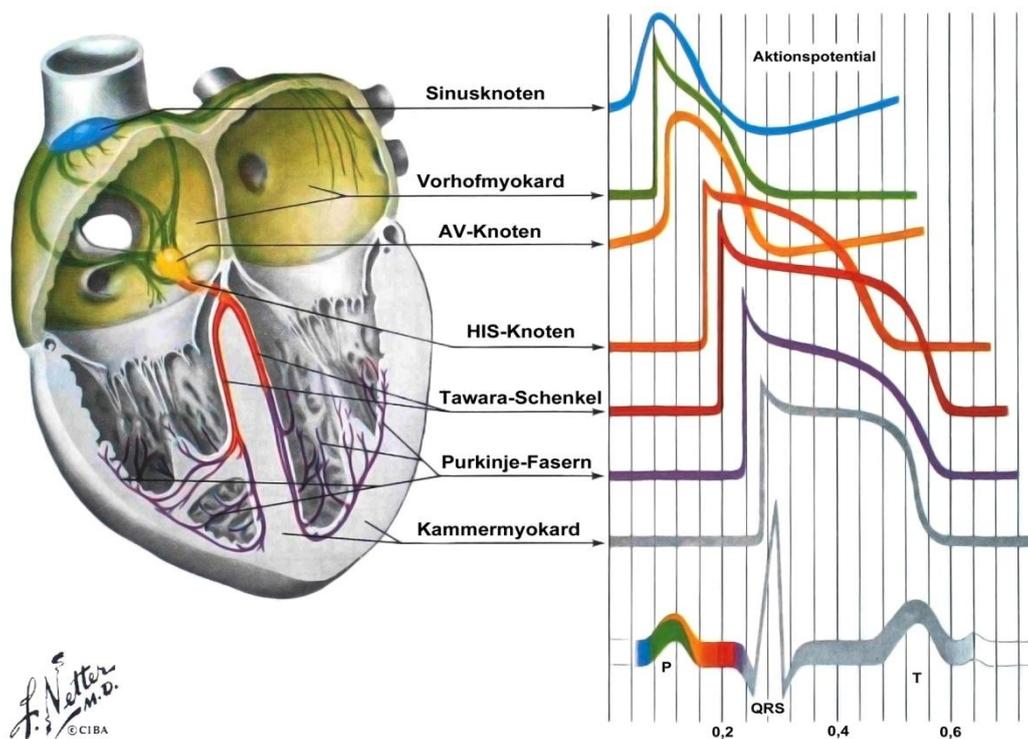


Abb. 2: Erregungsbildungs- und leitungssystem des menschlichen Herzen (F. Netter, *Farbatlanten der Medizin, Band 1, Herz, 3. Auflage, Stuttgart - New York, Thieme-Verlag*). Zugeordnet zu den einzelnen Erregungs- und Leitungsstrukturen (links) finden sich die entsprechenden Aktionspotentiale synchron zum Oberflächen-EKG (rechts).

Aufgrund der verzögerten (delayed) Öffnung der einwärtsgleichrichtenden K^+ -Kanäle kommt es zu der für das Herz typischen langen Dauer des Aktionspotentials (200-400 ms, Rees & Curtis 1996). Eine lang andauernde Plateauphase (mehrere 100 ms) der Muskelzellen der Herzkammer ist aus zwei Gründen essentiell: zum einen ist es für die Kontraktion des Herzens wichtig, dass die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle lange genug geöffnet sind, um eine ausreichende Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum einzuleiten; zum anderen hält eine lang andauernde Plateauphase die Herzmuskelzellen in einer Refraktärphase, da sich die Na^+ -Kanäle bei der andauernden Depolarisation der Membran im inaktivierten Kanalzustand befinden und die Herzmuskelzellen somit vor einer vorzeitigen Erregung geschützt sind. Wenn die Calciumkanäle inaktivieren und die Wirkung

repolarisierender Ströme überwiegt, beginnt die Phase 3 des Aktionspotentials. Sie wird als Repolarisationsphase bezeichnet. Die Ca^{2+} -Kanäle sind nun geschlossen, die Repolarisation wird vor allem durch die einwärtsgerichteten K^+ -Kanäle hervorgerufen. Dabei kann eine schnelle und eine langsame Komponente (rapid delayed rectifier I_{Kr} und slow delayed rectifier I_{Ks}) unterschieden werden (Sanguinetti & Jurckiewicz, 1990). Der Anteil von I_{Kr} und I_{Ks} an der Repolarisation des Aktionspotentials ist jedoch nicht konstant. Während unter Ruhebedingungen beide Ströme etwa gleich groß sind, kann der I_{Ks} -Anteil bei hohen Herzfrequenzen und unter sympathischem Einfluss um das Zehnfache des I_{Kr} gesteigert werden. In Phase 4 des kardialen Aktionspotentials ist der I_{K1} (einwärtsgerichteter K^+ -Kanal) an der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials beteiligt (Tristani-Firouzi et al. 2001, Roden et al. 2002, Clancy et al. 2003, Sanguinetti & Tristani-Firouzi 2006).

Mit dem Elektrokardiogramm (EKG) werden Potentialdifferenzen zwischen definierten Körperstellen in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt (Abb. 3, rechts unten). Die erfassten Spannungsänderungen sind Folge des Erregungsablaufes im Herzen. Der Überleitungszeit zwischen Vorhof und Ventrikel entspricht das PQ-Intervall. Der QRS-Komplex spiegelt die Depolarisation der Ventrikel wider. Die Repolarisation der Ventrikel formt das ST-Intervall und die T-Welle. Die Zeit vom Beginn der Depolarisation bis zum Ende der Repolarisation der Ventrikel stellt das QT-Intervall dar.

1.3 Entstehung von QT-Intervall-Verlängerungen und TdP-Arrhythmien

Eine Verlängerung des QT-Intervalls wird vor allem durch eine Verzögerung der ventrikulären Repolarisation hervorgerufen, die entweder durch eine Zunahme von Einwärtsströmen (Ca^{2+} -oder Na^+ -Ströme, „gain of function“) oder durch eine Abnahme von K^+ -Auswärtsströmen („loss of function“) induziert wird. Die folgende Abbildung zeigt den Mechanismus der Entstehung von QT-Intervall-Verlängerungen und Torsades de Pointes (TdP)-Arrhythmien, wobei jeweils die kardialen Aktionspotentiale (oben) mit den dazugehörenden EKG-Ableitungen (unten) überlagert sind. Der linke Bereich der Abbildung 3 zeigt ein normales kardiales Aktionspotential mit dem zugehörigen EKG. Infolge der Blockade des repolarisierenden K^+ -Stromes (I_{Kr}) kann es zu einer Verzögerung der Repolarisation und damit zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer (APD) sowie zu einer Abflachung der Plateauphase 2 kommen (Abb. 3 oben Mitte).

Die Verlängerung des Aktionspotentials ist im EKG als QT-Intervall-Verlängerung sichtbar. QT_c -Intervalle¹ von > 450 ms bei Männern und > 470 ms bei Frauen sind mit einem erhöhtem kardiovaskulären Risiko verbunden.

Aktionspotential

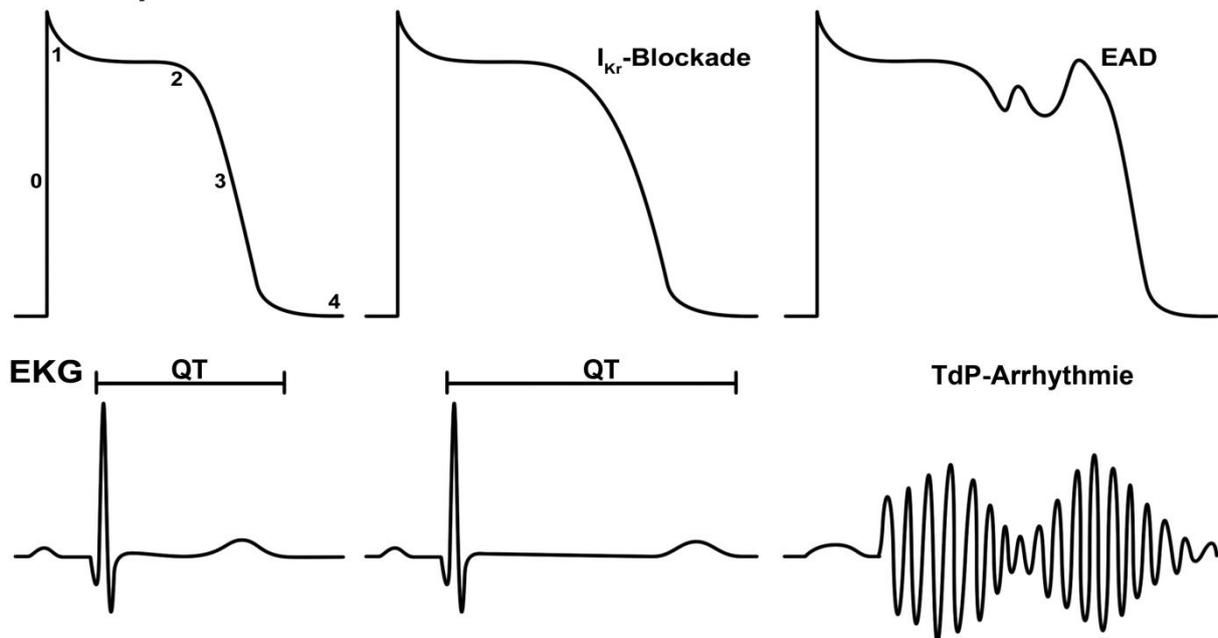


Abb. 3: Kardiale Aktionspotentiale mit den zugehörigen Elektrokardiogrammen (nach Sanguinetti & Keating 1995). **Oben links:** Kardiales Aktionspotential (AP). Das kardiale Aktionspotential gliedert sich in 5 Phasen: Phase 0: rasche Depolarisation; Phase 1: Beendigung des Aufstriches des AP und frühe Repolarisation (Kerbe); Phase 2: Plateauphase; Phase 3: Repolarisation; Phase 4: Ruhephase. **Unten links:** Elektrokardiogramm (EKG) mit QT-Intervall. **Oben Mitte:** Verlängertes Aktionspotential infolge der Blockade des I_{kr} . **Unten Mitte:** EKG mit verlängerter QT-Intervall. **Oben rechts:** AP mit EAD (Early Afterdepolarisation = frühe Nachdepolarisationen) infolge einer AP-Verlängerung. **Unten rechts:** Typisches EKG bei TdP-Arrhythmie mit „Tänzeln“ des QRS-Komplexes um die isoelektrische Linie.

Als Folge der APD-Verlängerung wird der Spannungsbereich zwischen -10 und -20 mV langsamer durchlaufen, sodass es zu einer Reaktivierung von Ca^{2+} -Kanälen und/oder von Na^+/Ca^{2+} -Austauschern kommen kann. Dieser führt zu erneuten Depolarisationen, so genannten frühen Nachdepolarisationen (EAD, Early Afterdepolarisation, Abbildung 3 rechts oben). Als frühe Nachdepolarisation wird eine Depolarisation der Membran vor Ende der Repolarisation, also während der Phasen 2 oder 3 des Aktionspotentials, bezeichnet. Überschreiten die frühen Nachdepolarisationen die Schwelle für die Auslösung neuer Aktionspotentiale, entsteht getriggerte Aktivität (repetitive elektrische Aktivität), die zu einer

¹ Aufgrund der Abhängigkeit des QT-Intervalls von der Herzfrequenz wird das QT-Intervall auf diese normalisiert und als korrigiertes QT-Intervall (= QT_c -Intervall) angegeben. Das QT-Intervall wird häufig mit der Formel nach Bazett ($QT_c = QT/RR^{0.5}$) oder mit der Formel nach Fridericia ($QT_c = QT/RR^{0.33}$) korrigiert.

bestimmten Form einer ventrikulären polymorphen Tachykardie, der TdP-Arrhythmie (Spitzenumkehrtachykardie) führen kann (Review in Keating 1996). TdP-Arrhythmien zeigen sich im EKG als „Tänzeln“ der Kammerkomplexe um die isoelektrische Linie und haben eine Frequenz von 150 bis 250 min^{-1} (Dessertenne 1996). In den meisten Fällen terminieren TdP-Arrhythmien spontan, charakteristische Symptome sind Schwindel und Synkopen (Bewusstlosigkeit infolge der Minderdurchblutung des Gehirns) (Vandenberg et al. 2004). In ca. 20 % der Fälle kann eine TdP-Arrhythmie zu Kammerflimmern degenerieren (Raschi et al. 2008), welches zum plötzlichen Herztod führt.

Neben der Verlängerung des QT-Intervalls ist die QT-Dispersion ein Kriterium zur Beurteilung von Veränderungen der Repolarisation. Die QT-Dispersion stellt die Differenz zwischen dem kürzesten und dem längsten QT-Intervall in den unterschiedlichen EKG-Ableitungen dar und entsteht aufgrund der Heterogenität der Repolarisation innerhalb der Herzkammer (transmurale Heterogenität). Im Myokard lassen sich subepikardiale, mittlere bzw. „midventrikuläre“ (sog. M-Zellen) und subendokardiale Schichten mit unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften abgrenzen (Antzelevitch 2008). Diese sind für den geregelten Ablauf der Erregungsausbreitung und -rückbildung essentiell. Die Depolarisation verläuft von endokardial nach epikardial, die Erregungsrückbildung erfolgt in umgekehrter Richtung. Die drei ventrikulären myokardialen Zelltypen unterscheiden sich vor allem hinsichtlich ihrer Phase 1 und Phase 3 Repolarisationen. Im Vergleich zu den subendokardialen und den subepikardialen Zellen weisen M-Zellen während der Phasen 2 und 3 einen kleineren I_{Ks} -Strom und einen größeren späten Natriumeinstrom auf. Daraus resultiert eine stärkere Zunahme der Aktionspotentialdauer in den M-Zellen als in den subendokardialen und den subepikardialen Zellen (Antzelevitch 2007, Review in Raschi et al. 2008). Es entsteht eine Heterogenität in der Aktionspotentialdauer innerhalb der Herzwand der Herzkammer. Als möglicher Index für die transmurale Heterogenität und damit als wichtiger Parameter zur Einschätzung des TdP-Risikos wird das $T_{\text{peak}}-T_{\text{end}}$ -Intervall, also die Zeit vom Maximum der T-Welle bis zum Ende der T-Welle, diskutiert (Antzelevitch 2007). Das Maximum der T-Welle fällt mit der Repolarisation des Epikards zusammen, am Ende der T-Welle findet die Repolarisation der M-Zellen statt. Da angesichts der relativ geringen I_{Ks} -Aktivität die Repolarisation der M-Zellen stark vom I_{Kr} abhängt, macht sich im Falle eines reduzierten I_{Kr} eine Verzögerung der Repolarisation in den M-Zellen stärker bemerkbar. Dieses resultiert zum einen in einer ausgeprägten Verlängerung der Aktionspotentialdauer in den M-Zellen und zum anderen in einer Zunahme der Heterogenität der Repolarisation

innerhalb der Herzkammer. Eine Vergrößerung der Heterogenität der Repolarisation erhöht dabei die Gefahr der Entstehung von kreisenden (Reentry-) Tachykardien, welche TdP-Arrhythmien aufrechterhalten können (January und Riddle 1989, Reviews in Surawicz 1989, Antzelevitch et al. 1991, Fenichel et al. 2004, Antzelevitch und Olivia 2006, Roden und Anderson 2006, Sanguinetti und Tristani-Firouzi 2006).

1.4 Das Lange QT-Syndrom (LQTS)

1.4.1 Das angeborene LQTS

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems stehen in den westlichen Industriestaaten an der Spitze der Todesursachenstatistik. 2008 starben in Deutschland 363.785 Menschen an den Folgen einer Herz-Kreislauf-Erkrankung (Statistisches Bundesamt). Jährlich sterben etwa 80 – 100.000 Menschen (Huikuri et al. 2001) in Deutschland am plötzlichen Herztod (SCD: **Sudden Cardiac Death**). Bei 10-15 % der Betroffenen können keine ursächlichen strukturellen Herzerkrankungen erfasst werden. Zu dieser Gruppe gehören genetisch bedingte Arrhythmiesyndrome, wie das Lange QT-Syndrom (LQTS), das Brugada-Syndrom, das Kurze QT-Syndrom (SQTS) und die Catecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie (CPVT) (Tester & Ackermann 2009). Dabei handelt es sich um „kardiale Ionenkanalerkrankungen“ („Channelopathies“), denen Mutationen in Genen zugrunde liegen, die für myokardiale Ionenkanäle kodieren (El-Sherif et al. 2009, Hedley et al. 2009). Diese Mutationen können zu Funktionsbeeinträchtigungen oder sogar zum Funktionsverlust der Ionenkanäle führen. Es sind 12 Mutationen in Genen, die für Ionenkanäle kodieren, bekannt, die zum Langen QT-Syndrom (LQT 1-12) führen (Lehnart et al. 2007, Newton-Cheh & Shah 2007, Morita et al. 2008, Antzelevitch 2008, Webster & Berul 2008, El-Sherif et al. 2009, Shah 2010). In Tabelle 1 sind die einzelnen Formen des LQTS mit dem betroffenen mutierten Gen und dem Protein, für das das jeweilige Gen kodiert, aufgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde der hERG-Kanal (KCNH2) untersucht. Sein molekulares Korrelat ist der einwärtsgerichtete K^+ -Kanal in den Kardiomyozyten. Es sind über 300 Mutationen des Gens KCNH2 bekannt, die zum LQT2 führen (Hedley et al. 2009).

Das Lange QT-Syndrom ist durch eine im Oberflächen-EKG nachweisbare Verlängerung des QT-Intervalls und rezidivierend auftretende Synkopen, sowie ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von TdP-Arrhythmien mit plötzlichem Herztod charakterisiert. Das angeborene Lange QT-Syndrom weist eine Inzidenz von 1:2000 auf (Roden 2008). Beim angeborenen

LQTS unterscheidet man das Romano-Ward-Syndrom (autosomal-dominante Form, Romano et al. 1963, Ward 1964) und das Jervell und Lange-Nielsen-Syndrom (autosomal-rezessive Form, Jervell & Lange-Nielsen 1957). Die erste Beschreibung des Syndroms erfolgte 1957 und geht auf Jervell und Lange-Nielsen zurück. Bei 75 % der Patienten mit einem klinisch nachgewiesenen Langes QT-Syndrom kann eine genetische Ursache gefunden werden. Dabei treten die einzelnen Formen des LQTS mit der folgenden Häufigkeit auf: 30-35 % LQT1, 25-30 % LQT2, 5-10 % LQT3, 1 % LQT5, und <1 % LQT6-11 (Lehnart et al. 2007). Patienten mit einem LQT1 scheinen nahezu ausschließlich unter erhöhter sympathischer Stimulation (physische oder psychische Belastung) Synkopen zu entwickeln, bei Patienten mit LQT3 treten die Ereignisse bevorzugt in Ruhe auf, bei LQT2-Patienten treten Synkopen sowohl in Ruhe als auch unter Belastung auf, typischerweise bei akustischen Signalen wie Alarmgeräuschen (Webster & Berul 2008).

Form des LQTS	Gen	Protein
<u>Romano-Ward-Syndrom (autosomal dominante Formen)</u>		
LQT1	KCNQ1 (KvLQT1)	α -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks}
LQT2	KCNH2 (hERG)	α -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Kr}
LQT3 (Brugada-Syndrom)	SCN5A	α -Untereinheit des Natriumkanals I_{Na}
LQT4	ANKB (ANK2)	Ankyrin-B
LQT5	KCNE1 (minK)	β -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks}
LQT6	KCNE2 (MiRP1)	β -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Kr}
LQT7 (Anderson -Tawil Syndrom)	KCNJ2	Kaliumkanal Kir 2.1
LQT8 (Timothy-Syndrom)	CACNA1C	α -1C-Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ-Calcium-Kanals $Ca_v1.2$
LQT9	CAV3	Caveolin 3
LQT10	SCN4B	β -Untereinheit des Natriumkanals ($Na_v\beta4$)
LQT11	AKAP9	A-Kinase anchor Protein (yotiao) 9
LQT12	SNTA1	α -Syntrophin
<u>Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom (autosomal rezessive Formen verbunden mit Taubheit)</u>		
JLN1	KCNQ1 (KvLQT1)	α -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks}
JLN2	KCNE1 (minK)	β -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks}

Tab. 1: Auflistung der Formen des LQTS mit den zugrunde liegenden mutierten Genen und den von diesen Genen kodierten Proteinen.

Die Mutationen können zu Abnormalitäten in der Proteinsynthese führen, der intrazelluläre Transport („Trafficking“) kann gestört sein, das Öffnungsverhalten („Gating“) des Kanals

kann verändert sein oder die Selektivität des Kanals kann durch die Mutation verändert sein (Delisle et al. 2004, Lehnart et al. 2007).

1.4.2 Das erworbene LQTS

Beim erworbenen Lungen QT-Syndrom handelt es sich vor allem um eine Arzneimittel-induzierte QT-Intervall-Verlängerung, die ebenfalls zu TdP-Arrhythmien führen kann (Reviews in Keating & Sanguinetti 1996, Roden et al. 1996, Redfern et al. 2003, Vandenberg et al. 2004, Saenen et al. 2007, Antzelevich 2008). QT-Intervall-Verlängerungen waren für etwa ein Drittel der Marktrücknahmen von Arzneimitteln zwischen 1990 und 2006 verantwortlich (Review in Pollard et al. 2010). Vermutlich beinhalten ca. 2-3 % der ärztlichen Verordnungen Arzneimittel, die zum LQTS führen können (Review in Recanatini et al. 2005). Die meisten Arzneimittel blockieren den repolarisierenden I_{Kr} durch Bindung an die hERG- α -Untereinheit.

Eine klinisch relevante QT-Intervall-Verlängerung tritt vor allem bei Patienten mit zusätzlichen Risikofaktoren auf. Zu diesen Risikofaktoren gehören weibliches Geschlecht, Elektrolytstörungen (Hypokaliämie, Hypomagnesiämie, Hypocalciämie), Herzerkrankungen (kardiale Hypertrophie, Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz), die gleichzeitige Einnahme mehrerer QT-Intervall-verlängernder Arzneimittel, Fälle von familiärem angeborenem LQTS, ein verlängertes QTc-Intervall (>450 ms), Leberfunktionsstörungen, Komedikation mit Arzneimitteln, welche die Metabolisierung von QT-Intervall verlängernden Arzneimitteln hemmen und Bradykardie. In diesen Fällen (Ausnahme: pharmakokinetische Interaktionen) ist die „Repolarisationsreserve“ reduziert, so dass die Patienten bei Reduktion des I_{Kr} durch Arzneimittel anfälliger für die Entstehung von TdP-Arrhythmien sind. Der Begriff der „Repolarisationsreserve“ beinhaltet, dass die Repolarisation des kardialen Aktionspotentials nicht nur durch den I_{Kr} , sondern auch durch den I_{Ks} und andere Auswärtsströme während der Repolarisation bestimmt wird. Das Auftreten eines einzelnen Risikofaktors bleibt wahrscheinlich ohne klinischen Effekt. Erst bei einem Zusammenspiel von mehreren Faktoren kommt es zu klinisch relevanten QT-Intervall-Verlängerungen und zur Entstehung von TdP-Arrhythmien (Roden 1998).

1.5 Der hERG (human-ether-à-go-go-related-gene)-Kanal

Das human ether-à-go-go-related gene (hERG) ist ein auf Chromosom 7 lokalisiertes Gen, das für die α -Untereinheit des hERG-Kalium-Kanals kodiert. hERG gehört zur EAG-Familie,

welche sich in drei Subfamilien einteilen lässt: EAG (ether-à-go-go Gen), ELK (ether-à-go-go-like Gen) und ERG (ether-à-go-go related Gen). hERG wurde erstmals 1994 von Warmke und Ganetzky beschrieben. Sie identifizierten das zur ERG-Familie gehörende Gen bei der Suche nach einem Gen, das dem Maus-Homologon des Drosophila EAG-K⁺-Kanals ähnlich ist. Die Namensgebung erfolgte aufgrund eines „Go-Go-Tanz“ ähnlichen Beinschlagens, das Drosophila-Fliegen, die Mutationen in ERG-Kanälen aufwiesen, unter Ethernarkose zeigten (Kaplan 1969). hERG kodiert für spannungsabhängige Kalium-Kanäle (K_v 11.1), welche vor allem in Herzmuskelzellen (Wang et al. 1994, Li et al. 1996), aber auch in Neuronen, in glatten Muskelzellen, in Tumorzellen, in β -Zellen des Pankreas und in chromaffinen Zellen (Review in Sanguinetti & Tristani-Firouzi 2006, Arcangeli et al. 1995, Raschi et al. 2008) exprimiert werden. Im Herzen kodiert hERG die porenbildende α -Untereinheit des schnell verzögernden einwärtsgerichteten K⁺-Kanals (rapid delayed rectifier K⁺-Kanal, I_{Kr}) (Sanguinetti et al. 1995, Trudeau et al. 1995).

1.5.1 Physiologische Bedeutung des hERG-Kanals im Herzen

Gegenüber anderen spannungsabhängigen Kaliumkanälen besitzt der hERG-Kanal eine ungewöhnliche Kinetik. Er aktiviert und deaktiviert langsam (100 -1000 ms), wohingegen er sehr schnell inaktiviert und sich sehr schnell von der Inaktivierung erholt (1-10 ms). Aufgrund der sehr schnellen und spannungsabhängigen Inaktivierung ist die Auswärtsleitfähigkeit bei positiven Membranpotentialen reduziert (Trudeau et al. 1995, Schönherr und Heinemann 1996, Smith et al. 1996, Spector et al. 1996). Die Abbildung 4 stellt ein kardiales ventrikuläres Aktionspotential mit überlagertem Stromverlauf des I_{Kr} dar. Der hERG-Kanal kann in einem von drei Kanalzuständen existieren: im geschlossenen (c), im offenen (o) oder im inaktivierten (i) Zustand (Kiehn 1999, Abb. 5). Durch eine Depolarisation der Membran wird der hERG-Kanal langsam aktiviert, so dass die Kanäle während der Plateauphase des Aktionspotentials (Phase 2) langsam öffnen (c \rightarrow o). Bei Membranspannungen > 0 mV fließt nur ein geringer K⁺-Strom aufgrund der sehr schnellen Inaktivierung der Kanäle (o \rightarrow i), und die meisten Kanäle befinden sich in einem nicht-leitenden, inaktivierten Zustand. Während der Repolarisation (Phase 3) kommt es zu einer schnellen Erholung der Kanäle von der Inaktivierung (i \rightarrow o). Da die Erholung von der Inaktivierung im Vergleich zur Deaktivierung (o \rightarrow c) sehr schnell ist, resultiert ein großer K⁺-Auswärtsstrom, welcher zur Repolarisation der Membran entscheidend beiträgt.

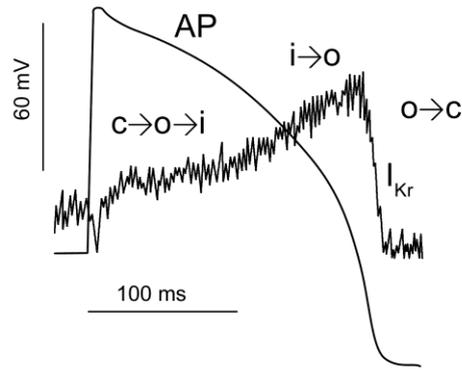


Abb. 4: Kardiales ventrikuläres Aktionspotential mit überlagertem Stromverlauf des I_{Kr} (verändert nach Clancy et al. 2003). Der I_{Kr} wurde im Aktionspotential Clamp-Modus aufgenommen. Dabei wird ein kardiales ventrikuläres Aktionspotential, welches vorher vom Ventrikel abgeleitet wurde, als Spannungssignal verwendet, um den I_{Kr} zu aktivieren (Hancox et al. 1998). Die Buchstaben und Pfeile symbolisieren die Übergänge der einzelnen Kanalzustände; dabei bedeutet „c“ geschlossen, „o“ offen und „i“ inaktiviert. Da die Erholung von der Inaktivierung ($i \rightarrow o$) sehr schnell im Vergleich zur Deaktivierung ($o \rightarrow c$) ist, kommt es zu einem großen K^+ -Auswärtsstrom während der Repolarisation.

Dieser K^+ -Auswärtsstrom nimmt anschließend aufgrund der Annäherung des Membranpotentials an das K^+ -Umkehrpotential und der Deaktivierung der Kanäle ab (Reviews in Clancy et al. 2003, Vandenberg et al. 2004, Sanguinetti und Tristani-Firouzi 2006).

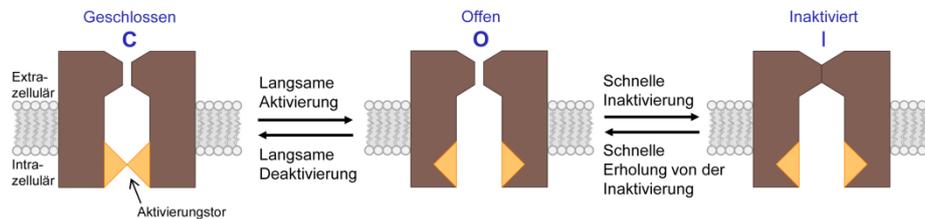


Abb. 5: Spannungsabhängige Konformation des hERG-Kanals. Der hERG-Kanal existiert in drei Zuständen: geschlossen „C“ (links), offen „O“ (Mitte) und inaktiviert „I“ (rechts). Membrandepolarisationen führen zur langsamen Aktivierung des Kanals (Öffnung), welcher schnell inaktiviert. Infolge der Repolarisation erholen sich die hERG-Kanäle schnell von der Inaktivierung und deaktivieren anschließend langsam.

Die verzögerte Aktivierung, die sehr schnelle Inaktivierung und die daraus resultierende Einwärtsgleichrichtung bei depolarisierenden Membranpotentialen sowie die sehr schnelle Erholung von der Inaktivierung und die langsame Deaktivierung der hERG-Kanäle sind für die kardiale Erregbarkeit von großer Bedeutung, da diese Eigenschaften für die verlängerte Plateauphase (Phase 2) und für die Dauer der Repolarisation (Phase 3) in der Herzkammer verantwortlich sind (Sanguinetti et al. 1995, Spector et al. 1996, Sanguinetti und Tristani-Firouzi 2006).

1.5.2 Molekularer Aufbau des hERG-Kanals

Die folgende Abbildung (Abb. 6) zeigt den schematischen Aufbau des hERG-Kanals. Der Kanal besteht, wie alle K_v -Kanäle (Prototyp ist der *Drosophila* Shaker- K^+ -Kanal), aus vier identischen Untereinheiten (Homotetramer). Jede der vier Untereinheiten besteht aus 1159 Aminosäuren und besitzt sechs transmembranäre Domänen (Warmke und Ganetzky 1994, Trudeau et al. 1995). Die Domänen 1 bis 4 bilden den Spannungssensor und die Domänen 5 und 6 mit der dazwischen liegenden Schleife formen die Pore und den Selektivitätsfilter des Kanals. Die S4-Domäne weist eine hohe Dichte positiver Aminosäurereste auf und wird bei Depolarisationen der Membran nach außen verschoben. Aufgrund dieser Bewegung kommt es zur Verschiebung der S4-S5-Schleife und der Kanal öffnet.

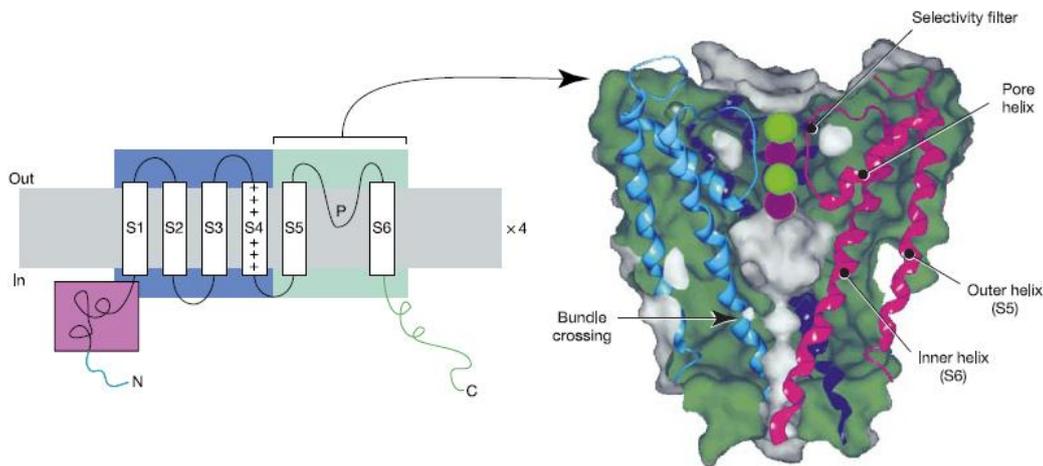


Abb. 6: Struktur des hERG-Kanals (aus Yellen 2002). Spannungsabhängige K^+ -Kanäle existieren als Homotetramere. Jede Untereinheit besteht aus 6 transmembranären Domänen mit einer Porenhelix zwischen der 5. und 6. Domäne. Die ersten vier transmembranären Domänen mit einer Anreicherung positiver Ladungen in der 4. Domäne bilden den Spannungssensor des Kanals. Die 5. und die 6. Domäne mit der dazwischen liegenden Porenschleife bilden die Pore und den Selektivitätsfilter des Kanals. Das C- und das N-terminale Ende liegen auf der intrazellulären Seite.

Röntgenkristallographische Untersuchungen an prokaryotischen K^+ -Kanälen ergaben ein genaueres Bild vom strukturellen Aufbau der Porendomäne (Morais-Cabral 2001; Doyle et al. 1998). Als Modell für das Porenmodul von spannungsabhängigen 6TM-Kaliumkanälen wird der topologische Aufbau des aus vier α -Untereinheiten aufgebauten, pH-kontrollierten, 2TM Kaliumkanals KcsA (*Streptomyces lividans*) verwendet (Doyle et al. 1998, Roderick MacKinnon: Nobelpreis für Chemie 2003). Die Pore besteht aus einem engen Selektivitätsfilter auf der extrazellulären Seite, einem darunter befindlichen wassergefüllten Hohlraum und dem Öffnungs-/Aktivierungstor auf der intrazellulären Seite. Die Aktivierung und die Deaktivierung des hERG-Kanals finden auf der intrazellulären Seite statt, die

Inaktivierung des hERG-Kanals erfolgt auf der extrazellulären Seite (Review in Vandenberg et al. 2004). Im geschlossenen Zustand ist der innere Hohlraum sehr klein, die S6-Helices bündeln sich und bilden einen engen Durchlass, der eng genug ist, die Passage von Kaliumionen zu unterbinden. Im geöffneten Zustand bewegen sich die S6-Helices auseinander, wobei es zu einer Vergrößerung des Durchlasses kommt, was die Passage von Kaliumionen ermöglicht (Mitcheson 2008). Die Kaliumionen verlieren beim Eintritt in den engen Ionenleitungsweg des Selektivitätsfilters ihre Hydrathülle, werden aber durch die polaren Carbonyl-Sauerstoffatome des Selektivitätsfilters stabilisiert, bevor sie im extrazellulären Raum wieder in ein wässriges Milieu eintreten (Morais-Cabral 2001). In der Inaktivierung und der daraus resultierenden Einwärtsgleichrichtung des Kanals unterscheidet sich der hERG-Kanal von den anderen Mitgliedern der EAG-Familie, bei denen es sich um auswärtsgerichtete K^+ -Kanäle handelt (Trudeau et al. 1995, Schönherr und Heinemann 1996, Smith et al. 1996, Spector et al. 1996).

Der hERG-Kanal weist gegenüber anderen K_v -Kanälen einen ungewöhnlich langen S5-P-Linker auf, der das äußere Ende der fünften transmembranären Domäne mit der Porenhelix verbindet (40 Aminosäuren, bei anderen K_v -Kanälen 10 – 12 Aminosäuren). Der S5-P-Linker enthält eine amphipatische α -Helix (Reste 583 – 597), die für die normale spannungsabhängige Inaktivierung wichtig ist. Es wird angenommen, dass sich das N-terminale Ende dieser α -Helix in der Nähe der Pore und das C-terminale Ende in der Nähe der Spannungsdomäne befindet. Diese α -Helix könnte der Kommunikation zwischen Pore und Spannungssensor dienen (Zhang et al. 2003 A). Die durch Depolarisation hervorgerufene Auswärtsbewegung der S4-Domäne führt entweder zu einer Änderung der Orientierung der α -Helix oder die α -Helix wird infolge der Depolarisation in Richtung der Pore verschoben. Dies führt zum Verschließen des äußeren Eingangs der Pore und verursacht die C-Typ-Inaktivierung. Während der Repolarisation kehrt die S4-Spannungsdomäne dann in ihre ursprüngliche Position zurück und verliert ihren Einfluss auf die α -Helix, wodurch es wieder zum Öffnen der Pore kommt (Liu et al. 2002).

1.5.3 Pharmakologie des hERG-Kanals

Es sind über 160 kardiale und nicht-kardiale, strukturell sehr verschiedene Arzneimittel bekannt, die zu einer hERG-Kanal-Blockade führen und somit ein erworbenes LQTS auslösen können (Shah 2010). Einige Beispiele sind in der folgenden Tabelle 2 aufgeführt. Aufgrund ihres torsadogenen Potentials wurden die folgenden nicht-antiarrhythmischen Arzneistoffe

vom Markt genommen bzw. in ihrer Indikation eingeschränkt: Prenylamin (Antianginosum, 1988), Terodilin (Antianginosum, 1991), Terfenadin (Antihistaminikum, 1998), Sertindol (Antipsychotikum, 1998), Astemizol (Antihistaminikum, 1999), Grepafloxacin (Antibiotikum, 1999), Cisaprid (Gastroprokinetikum, 2000), Droperidol (Antiemetikum und Antipsychotikum, 2001), Levacetylmethadol (Opiod-Analgetikum, 2001) und Clobutinol (Antitussivum, 2008).

Antiarrhythmika	
Klasse IA	Disopyramid, Procainamid, Chinidin
Klasse III	Amiodaron, Dofetilid, Ibutilid, Sotalol
Neuropsychiatrische Arzneimittel	Amitriptylin, Citalopram, Clomipramin, Clozapin, Doxepin, Felbamat, Fluoxetin, Fluvoxamin, Haloperidol, Imipramin, Lithium, Methylphenidat, Nortriptylin, Paroxetin, Pimozid, Risperidon, Thioridazin, Venlafaxin, Ziprasidon
Antibiotika	Fluorchinolone (Gatifloxacin, Moxifloxacin, Sparfloxacin, Grepafloxacin), Makrolide (Clarithromycin, Erythromycin), Azolantimykotika (Fluconazol, Ketoconazol), Antimalariamittel (Chloroquin, Halofantrin, Mefloquin, Chinin)
Antihistaminika	Astemizol, Terfenadin
Gastroprokinetika	Cisaprid, Domperidon, Dolasetron, Ondansetron, Granisetron
Opioide	Methadon, Levacetylmethadol
Zytostatika	Arsentrioxid, Tamoxifen

Tab. 2: Beispiele bekannter hERG-blockierender Arzneistoffe

Quelle: <http://www.torsades.org/medical-pros/drug-lists/drug-lists.html>, 04.01.08

Für viele Arzneistoffe, die den hERG-Kanal blockieren, existieren überlappende Bindungsstellen im Inneren der Pore, welche erstmals von Mitcheson et al. (2000 B) mit Hilfe von Alanin-Mutagenese-Studien identifiziert wurden. Die meisten Substanzen weisen eine Bindungsstelle im Inneren der Pore auf (Porenblocker). Zu den Porenblockern gehören unter anderem folgende Substanzen: Terfenadin (Antihistaminikum, Mitcheson et al. 2000, Fernandez et al. 2004), Cisaprid (Gastroprokinetikum, Mitcheson et al. 2000, Chen et al. 2002, Fernandez et al. 2004), Chloroquin (Antimalariamittel, Sanchez-Chapula et al. 2002), Dofetilid (Antiarrhythmikum, Lees-Miller et al. 1999, Ficker et al. 1999), Chinidin (Antiarrhythmikum, Sanchez-Chapula et al. 2003). Verapamil (Antiarrhythmikum, Zhang et al. 1999), Halofantrin (Antimalariamittel, Sanchez-Chapula et al. 2004), Ibutilid und Clofilium (Antiarrhythmika, Perry et al. 2004), Ziprasidon (Neuroleptikum, Su et al. 2006), Propafenon (Antiarrhythmikum, Witchel et al. 2004) und Maprotilin (Antidepressivum, Ferrer-Villada et al. 2006).

Im Vergleich zu anderen K_v -Kanälen weist der hERG-Kanal ein größeres Volumen der inneren Pore auf. Die meisten K^+ -Kanäle weisen ein Pro-X-Pro Motiv in der S6-Domäne auf, welches zum Einknicken der inneren Porenhelix führt. An dieser Position besitzt der hERG-Kanal ein Ile-Phe-Glu Motiv, damit fehlt der Knick in der Porenhelix, die Pore ist weiter und erlaubt auch den Zugang größerer Moleküle (Mitcheson et al. 2000 A, Milnes et al. 2003, Fernandez et al. 2004, Sanguinetti & Mitcheson. 2005, Recanatini et al. 2005, Du 2007). Ein weiterer Unterschied gegenüber anderen K_v -Kanälen ist das Vorhandensein zweier aromatischer Reste am C-terminalen Ende von S6 des hERG-Kanals (Tyr652 und Phe656). An diesen Positionen weisen andere K_v -Kanäle aliphatische Reste, wie Isoleucin oder Valin, auf (Mitcheson 2008). Je Untereinheit gibt es also zwei aromatische Reste, d.h. acht je Kanal, damit stehen potentielle Stellen für elektrostatische Interaktionen mit aromatischen Gruppen von Substanzen zur Verfügung (π - π -Interaktionen oder π -Kation-Interaktionen) (Recanatini et al. 2005, Sanguinetti & Mitcheson 2005, Du et al. 2007, Mitcheson 2008). In der folgenden Abbildung 7 ist der schematische Aufbau des hERG-Kanals dem allgemeinen Aufbau spannungsabhängiger Kaliumkanäle gegenübergestellt.

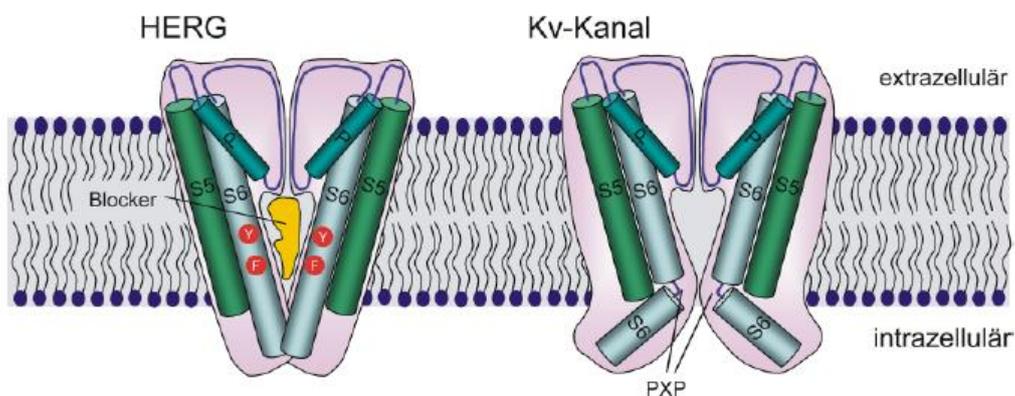


Abb. 7: Vergleich der Struktur von hERG- und K_v -Kanälen. hERG fehlt das PXP-Motiv in der S6-Helix, von dem vermutet wird, dass es zu einem Knick in der S6-Helix führt. Daher besitzen hERG-Kanäle einen größeren Hohlraum unterhalb der Pore, in dem Substanzen binden können (nach Ion Channel Questionnaire Participants 2004).

Die aromatischen Aminosäuren Tyr652 und Phe656 sind für die hochaffine Bindung der Porenblocker essentiell (Mitcheson 2000 B, Sanguinetti & Mitcheson 2005, Jiang et al. 2005, Aronov 2008). Tyr652 scheint an π -Kation-Interaktionen mit dem protonierten Stickstoff beteiligt zu sein, der in vielen hERG-Kanal-Blockern vorhanden ist. Mitcheson et al. (2000 B) und Fernandez et al. (2004) konnten zeigen, dass für die hochaffine hERG-Strom-Blockade durch Cisaprid und Terfenadin ein aromatischer Rest in Position 652 essentiell ist.

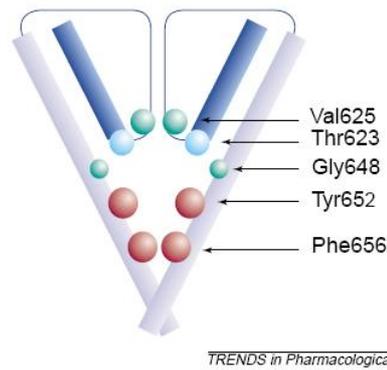


Abb. 8: Die für die Bindung von Porenblockern wichtigen Aminosäuren (Vandenberg et al. 2001). Die aromatischen Aminosäuren Tyr652 und Phe656 ragen ins Poreninnere, Thr623 und Val625 sind an der Basis der Porenhelix lokalisiert und Gly648 liegt ebenfalls in der S6-Domäne.

Neben Tyr652 und Phe656 gibt es weitere Aminosäuren, die für die Bindung von Porenblockern wichtig sind: Gly648, welches in der S6-Domäne lokalisiert ist, sowie Thr623 und Ser624, welche an der Basis der Porenhelix lokalisiert sind (Mitcheson et al. 2000 B). Thr623 und Ser624 liegen nahe am Selektivitätsfilter, sie scheinen besonders wichtig für die Bindung von Arzneistoffen zu sein, die einen polaren oder elektronegativen Substituenten in p-Position des Aromaten besitzen (Mitcheson 2008).

1.6 Regulatorische Richtlinien für die Abschätzung des kardiotoxischen Potentials von Substanzen

Die durch Arzneimittel ausgelöste QT-Intervall-Verlängerung kann zu TdP-Arrhythmien führen, die zu Kammerflimmern degenerieren und so zum plötzlichen Herztod führen können. Damit ist die QT-Intervall-Verlängerung eine potentiell lebensbedrohliche Nebenwirkung. Ein solches Risiko ist für Arzneimittel zur Behandlung nicht-lebensbedrohlicher Erkrankungen nicht akzeptabel.

Das CPMP (Committee for Proprietary Medicinal Products) war die erste regulatorische Instanz, welche eine Richtlinie zur Untersuchung der Wirkung neuer Substanzen auf das QT-Intervall herausgab. Diese Richtlinie („Points to consider: the assessment of the potential for QT interval prolongation by non-cardiovascular medicinal products“, CPMP 1997) schlug präklinische und klinische Testmethoden zur Beurteilung der Wirkung von Testsubstanzen auf das QT-Intervall vor. Jede neue Testsubstanz sollte in präklinischen und klinischen Studien auf seine kardiovaskuläre Sicherheit hin untersucht werden. Neben EKG-Messungen (insbesondere QT-Intervall-Messungen) am Hund sollten gemäß dieser Richtlinie in vitro elektrophysiologische Untersuchungen (z. B. an Papillarmuskelzellen oder an Purkinjefasern

von Kaninchen, Meerschweinchen, Hunden oder Schweinen) vor der ersten Anwendung am Menschen durchgeführt werden. In klinischen Studien sollte anschließend der Effekt der neuen Substanz auf das EKG (vor allem auf das QT-Intervall) untersucht werden (CPMP 1997). Die International Conference on Harmonisation (ICH) ist eine gemeinsame Initiative der Europäischen Union, Japans und der USA. Sie besteht aus Repräsentanten der regulatorischen Einrichtungen sowie der Industrieverbände der jeweiligen Regionen. Im Rahmen dieser Expertengruppe wurde die Problematik des torsadogenen Potentials von Arzneimitteln erneut aufgegriffen. Es wurden zwei Richtlinien (ICH S7B und ICH E14) zur Beurteilung der Wirkung neuer Substanzen auf das QT-Intervall erstellt, die im Jahr 2005 implementiert wurden. Die ICH S7B-Richtlinie benennt präklinische und die ICH E14-Richtlinie klinische Strategien zur Beurteilung des kardiotoxischen Potentials von Arzneimitteln. In der ICH S7B-Richtlinie („The Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarisation (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals“) werden vor allem Untersuchungen an hERG-Kanälen als ein wichtiges Versuchsmodell vorgeschlagen. Da manche Arzneimittel durch zusätzliche Wirkungen auf andere kardiale Ionenkanäle (Blockade von Na⁺- und Ca²⁺-Kanälen) sowie auf α_1 - und β -adrenerge Rezeptoren protektive Mechanismen hinsichtlich der Auslösung von TdP-Arrhythmien besitzen können, werden weiterhin Messungen der Aktionspotentialdauer an isolierten kardialen Zellpräparationen und QT-Intervall-Messungen am Hund empfohlen. Die Ergebnisse der in vitro-Untersuchungen besitzen eine große Bedeutung in der Risiko-Beurteilung, können aber nicht alleine zur adäquaten Abschätzung des kardiotoxischen Potentials herangezogen werden. In vitro- und in vivo-Versuche sind als komplementäre Untersuchungen zu verstehen. Das bedeutet, dass zur präklinischen Beurteilung der Kardiotoxizität einer Substanz mehrere Versuchsmodelle gewählt und ausgewertet werden müssen. Die abschließende Bewertung sollte vor allem im Hinblick auf die Indikation und die therapeutischen Alternativen, also der Nutzen zu Risiko Abwägung, erfolgen (ICH S7B). Die ICH E14-Richtlinie („The Clinical Evaluation of QT/QT_c Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Nonantiarrhythmic Drugs“) beschreibt eine ausführliche („thorough“) QT/QT_c-Studie zur klinischen Evaluierung der QT-Intervall-Verlängerung durch Arzneistoffe. Es ist keine genaue Beziehung zwischen dem Ausmaß der Verlängerung des QT-Intervalls und der Auslösung von ventrikulären Arrhythmien etabliert, aber das Risiko zur Entstehung einer TdP-Arrhythmie scheint mit dem Ausmaß der Verlängerung des QT-Intervalls anzusteigen (Reviews in Moss 1993, Viskin 1999). Eine nach Gabe einer Substanz bei Probanden beobachtete mittlere QT_c-Intervall-Verlängerung um über 5 ms und eine

Verlängerung um über 10 ms als oberste Grenze des 95 % Konfidenzintervalls stellen die Grenzen für eine Erhöhung des Risikos zur Auslösung von TdP-Arrhythmien dar (ICH E14; Review in Wallis 2010).

1.7 Arzneimittelinteraktionen

Arzneimittelinteraktionen, die aus pharmakologischen Effekten an unterschiedlichen Zielstrukturen resultieren, werden häufig als therapeutischer Vorteil genutzt, beispielsweise werden ACE (Angiotensin-Converting Enzyme)-Hemmer häufig zusammen mit β -Blockern zur Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt. Dagegen sind Interaktionen an derselben pharmakologischen Zielstruktur eine wesentliche Ursache für unerwünschte Arzneimittelwirkungen (Shah 2005). Anhand einer Kohortenstudie konnten Curtis et al. (2003) zeigen, dass die gleichzeitige Anwendung mehrere QT-Intervall-verlängernder Arzneimittel häufig ist. Von 4,4 Mio. Verschreibungen enthielten 9,4 % zwei oder mehrere QT-Intervall-verlängernde Arzneistoffe oder einen QT-Intervall-verlängernden Arzneistoff und einen Arzneistoff, der dessen Abbau hemmt.

Die durch Arzneimittel ausgelöste QT-Intervall-Verlängerung wird in der Regel durch die Blockade von hERG-Kanälen hervorgerufen. hERG-Kanäle besitzen unterschiedliche Bindungsstellen für Substanzen. Zwei strukturell verschiedene Liganden können um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren (kompetitive Interaktion) oder sie können mit unterschiedlichen Bindungsstellen interagieren. Bei der Kombination zweier Substanzen, die mit der gleichen Bindungsstelle interagieren, sind additive Effekte zu erwarten, da jeweils nur eine der beiden Substanzen gebunden sein kann. Bei der simultanen Interaktion mehrerer gleichzeitig vorhandener Arzneimittel mit unterschiedlichen Bindungsstellen sind neben additiven Effekten auch superadditive (synergistische) und subadditive (antagonistische) Effekte denkbar. Die Bindung des einen Liganden könnte die Assoziation oder Dissoziation des anderen Liganden über konformationale Änderungen der Bindungsstelle oder durch Änderung des Kanalschaltungsverhaltens so verändern, dass es zu sub- oder superadditiven Effekten zwischen diesen beiden Substanzen kommt.

Eine solche Interaktion zwischen verschiedenen hERG-Kanal-Blockern konnte 2003 von Kornick et al. (2003) nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Konservierungsmittel Chlorbutanol, welches selbst hERG-Strom-hemmende Eigenschaften besitzt, die hERG-Strom-hemmende Wirkung von Methadon verstärkt.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob Interaktionen zwischen verschiedenen hERG-Strom-Blockern existieren. Da hERG-Kanäle von verschiedenen Arzneistoffgruppen (Antipsychotika, Antidepressiva, Antibiotika) und strukturell sehr unterschiedlichen Substanzen gehemmt werden, ist diese Fragestellung v.a. für multimorbide Patienten von Relevanz, da bei ihnen die Wahrscheinlichkeit der gleichzeitigen Einnahme mehrerer QT-Intervall-verlängernder Arzneistoffe besonders hoch ist. Des Weiteren ist diese Untersuchung sehr wichtig, da es sich bei der QT-Intervall-Verlängerung um eine potentiell lebensbedrohliche Nebenwirkung handelt. Wie bereits dargestellt, binden die meisten hERG-Kanal-Blocker im Inneren der Pore. Es gibt aber auch hERG-Kanal-Blocker, die mit anderen Bindungsstellen am hERG-Kanal interagieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde Terfenadin als Vertreter der Porenblocker untersucht. Das nicht-sedierende H₁-Antihistaminikum Terfenadin wird über das Cytochrom P450 (CYP) 3A4 Isoenzym zum pharmakologisch aktiven Metaboliten Terfenadincarboxylat (Fexofenadin) abgebaut. Bei Terfenadinüberdosierungen oder Komedikation mit CYP 3A4-hemmenden Arzneistoffen (Itraconazol, Ketoconazol, Erythromycin oder Clarithromycin) kumuliert Terfenadin im Plasma und kann in seltenen Fällen QT-Intervall-Verlängerungen und lebensbedrohliche TdP-Arrhythmien induzieren. Der Mechanismus der QT-Intervall-Verlängerung ist die Blockade des hERG-Stroms (Woosley et al. 1993, Suessbrich et al. 1996, Roy et al. 1996). Terfenadin hemmt zusätzlich den Transport des hERG-Kanalproteins vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zur Plasmamembran („Trafficking“-Defekt, Yeung et al. 2008). 1997 erfolgte die Rücknahme von Terfenadin (Teldane[®]) durch die FDA (Food and Drug Administration) vom US-amerikanischen Markt, in Deutschland wurde Terfenadin der Verschreibungspflicht unterstellt. Terfenadin war einer der ersten Arzneistoffe, dessen Bindungsstelle am hERG-Kanal mit Hilfe von Alanin-Mutagenese-Studien identifiziert wurde, wobei gezeigt wurde, dass Terfenadin eine einfache Bindungsstelle an Tyr652 und Phe656 aufweist (Mitcheson et al. 2000 A).

Zur Untersuchung von Interaktionen wurde Terfenadin mit den folgenden Substanzen kombiniert (Abb. 9):

- mit dem Klasse III Antiarrhythmikum Dofetilid, das ebenfalls Bindungsstellen im Poreninneren aufweist, die mit denen von Terfenadin überlappen
- mit dem Skorpiontoxin CnErg1, welches eine nachgewiesene Bindungsstelle an der extrazellulären Öffnung des Kanals besitzt
- mit dem selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI) Fluvoxamin, von dem angenommen wird, dass es den Kanal von der extrazellulären Seite aus blockiert und
- mit dem Konservierungsmittel Chlorbutanol, dessen Bindungsstelle bisher nicht bekannt ist.

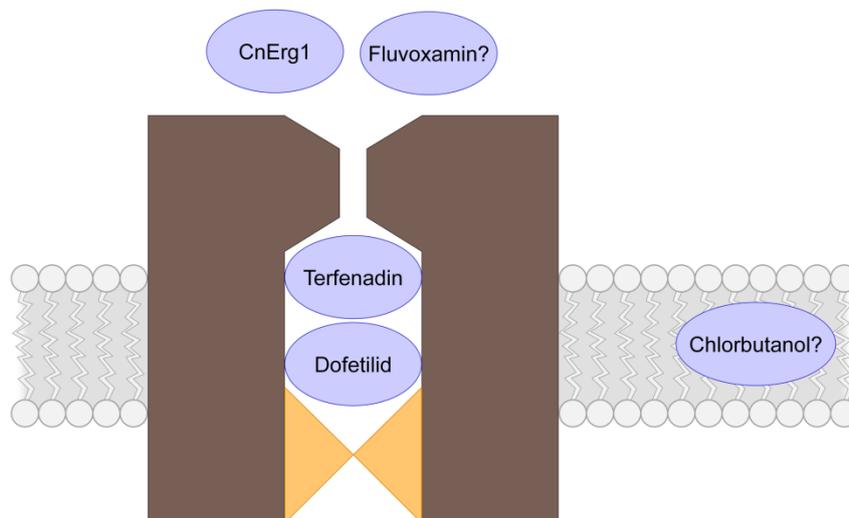


Abb. 9: Nachgewiesene/vermutete Bindungsstellen von hERG-Strom-Blockern.

Das Klasse III Antiarrhythmikum Dofetilid wird in den USA zur Behandlung von Vorhofflattern und -flimmern eingesetzt und gehört wie Terfenadin zur Gruppe der Porenblocker.

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte CnErg1 weist im Vergleich zu den Porenblockern einen völlig anderen Mechanismus der hERG-Strom-Blockade auf. Bei CnErg1 handelt es sich um den ersten selektiven Peptidinhibitor des hERG-Kanals, der 1999 im Gift des mexikanischen Skorpions *Centruroides noxius* (Abb.10) identifiziert wurde. Das Peptidtoxin ist aus 42 Aminosäuren und vier Disulfidbrücken aufgebaut. CnErg1 wirkt nicht auf andere Kaliumkanäle, sondern blockiert selektiv den hERG-Kanal.



Abb. 10: Aus dem mexikanischen Skorpion *Centruroides noxius* wurde das CnErg1 isoliert.

Im Gegensatz zu den Porenblockern, die von der intrazellulären Seite aus Zugang zu ihrer Bindungsstelle im Inneren der Pore erhalten, blockiert CnErg1 den hERG-Kanal von der extrazellulären Seite aus und bindet dabei an den S5-P-Linker (Position 571 – 613). Mutationen an drei Positionen im S5-P-Linker (Trp-585, Gly-590 und Ile-593) und an einer Position im P-S6-Linker (Pro-632) sind kritisch für die CnErg1-Bindung. Andauernde Depolarisation destabilisiert die CnErg1-Bindung. Als Ursache dafür werden konformative Änderungen im S5-P-Linker während der Depolarisation diskutiert (Pardo-Lopez 2002 B). Es wird angenommen, dass die Aminosäuren in den Positionen 583 – 597 im S5-P-Linker („Turret“) eine amphipatische α -Helix bilden, die die hydrophobe Bindungsstelle von CnErg1 enthält, weshalb man CnErg1 auch als „Turret“-Blocker bezeichnet. Die „Turret“-Helix scheint außerdem für die Inaktivierungseigenschaften des hERG-Kanals wichtig zu sein (Torres et al. 2003).

Des Weiteren wurde die Interaktion zwischen Terfenadin und Fluvoxamin untersucht. Bei den meisten bisher bekannten hERG-Kanal-Blockern führten die Mutationen der Aminosäuren Tyr652 und Phe656 zu einer dramatischen Affinitätsabnahme am hERG-Kanal. Eine Ausnahme stellt der Block durch Fluvoxamin dar, der relativ insensitive für Mutationen an den Positionen Tyr652 und Phe656 ist. Fluvoxamin gehört zur Gruppe der SSRI, den selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmern. Besonders im Zusammenhang mit hohen Fluvoxamin-Konzentrationen sind Fälle von QT_c-Intervall-Verlängerungen und ventrikulären Arrhythmien bekannt (Milnes 2003). Fluvoxamin gehört zu den niedrig potenten hERG-Kanal-Blockern, wobei die halbmaximale Hemmkonzentration (IC₅₀) im μ M-Bereich liegt. Da der Block durch Fluvoxamin extrem schnell (innerhalb von 10 ms) einsetzt und unabhängig von der Inaktivierung ist, wurde vermutet, dass Fluvoxamin, ähnlich wie die Skorpiontoxine, an der äußeren Öffnung des Kanals bindet (Milnes 2003, Kommentar in Mitcheson 2003).

Darüber hinaus wurde die Interaktion zwischen Terfenadin und dem Konservierungsmittel Chlorbutanol untersucht. Chlorbutanol wurde untersucht, da Kornick et al. (2003) gezeigt

haben, dass Chlorbutanol selbst hERG-Strom-hemmende Eigenschaften besitzt und die hERG-Strom-hemmenden Wirkungen des Opioids Methadon potenziert. Die Wirkung von Methadon auf den Chlorbutanol-Block wurde nicht untersucht. Die Bindungsstellen von Chlorbutanol und Methadon sind bisher nicht bekannt. Daher wurde Chlorbutanol in der vorliegenden Arbeit zusammen mit dem bekannten Porenblocker Terfenadin untersucht.

Die Untersuchung der Interaktionen an hERG-Kanälen erfolgte mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik an stabil-transfizierten hERG-Kanal-exprimierenden HEK-293 Zellen.

2 Material und Methodik

2.1 Chemikalien

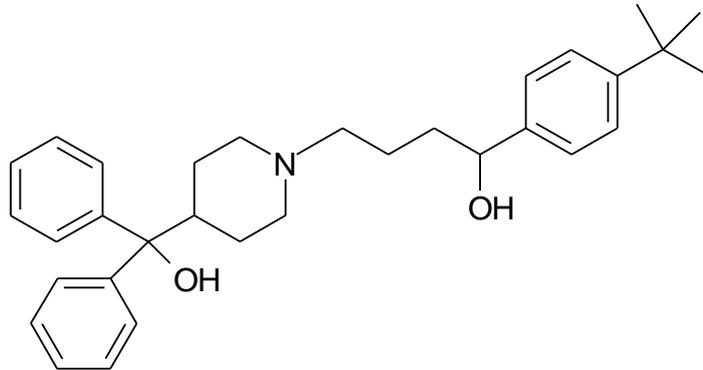
<u>Chemikalien / Reagenzien</u>	<u>Artikelnummer</u>	<u>Firma</u>
Agar	A-7002	Sigma
Ampicillin	13075-015	Gibco
Adenosin-5'-triphosphat di-natrium Salz (ATP)	A-3377	Sigma
Calciumchlorid CaCl ₂	C-7902	Sigma
Chlorbutanol	11 205-4	Sigma
CnErg1	RTE-450	Alomone Labs
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	F 0415	Biochrom
Dimethylsulfoxid (DMSO)	20385	Serva
Dofetilid	SRP045723d	Sequoia
Fluvoxamin	F-2802	Sigma
Glutamin	K 0283	Biochrom
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)	H-3375	Sigma
Fetales Kälberserum (FKS)	F 0115	Biochrom
Kaliumchlorid KCl	4933	Merck
Kaliumhydroxid KOH	437C478332	Merck
Lipofectamin 2000	11668-019	Invitrogen
Luria-Bertani (LB)-Agar	22700-025	Gibco
LB-Base	12780-052	Gibco
Natriumchlorid NaCl	106406	Merck
Natriumhydroxid NaOH	C538782	Merck
Magnesiumchlorid MgCl ₂	M-8266	Sigma
OptiMEM	31985-047	Gibco
Poly-L-Lysin-Lösung	P-4832	Sigma
Phosphate Buffered Saline (PBS)	L 1825	Biochrom
Penicillin / Streptomycin	A 2213	Biochrom
SOC-Medium	15544-034	Gibco
Terfenadin	T-9652	Sigma
Tris-Base (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	108382	Merck

<u>Firma</u>	<u>Ort</u>	<u>Land</u>
Alomone	Jerusalem	Israel
Biochrom	Berlin	Deutschland
Gibco	Karlsruhe	Deutschland
Merck	Darmstadt	Deutschland
Molecular Probes	Paisley	U.K.
Sequoia	Pangbourne	U.K.
Serva	Heidelberg	Deutschland
Sigma	St. Louis, Mo	USA

2.2 Strukturformeln der untersuchten Testsubstanzen

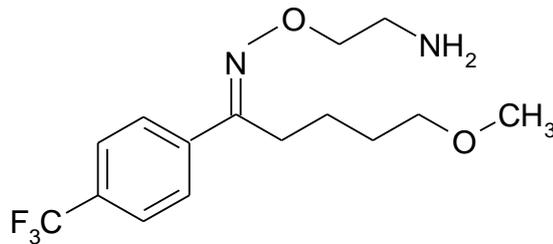
Terfenadin

1-(4-*tert*-Butylphenyl)-4-[4-(α -hydroxybenzhydryl)-piperidino]butan-1-ol



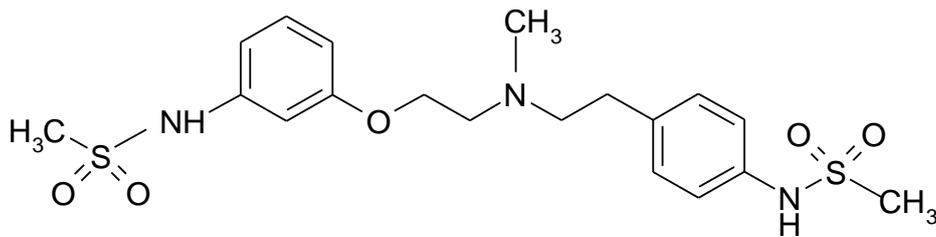
Fluvoxamin

5-Methoxy-4'--(trifluoromethyl)-valerophenon-O-(2-aminoethyl)oxim



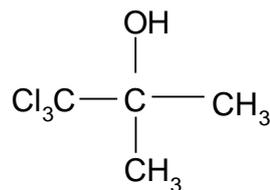
Dofetilid

4'-{2-[(4-Methylsulfonylamino)phenethyl)methylamino]ethoxy}methansulfonanilid



Chlorbutanol

1,1,1-Trichlor-2-methyl-2-propanol



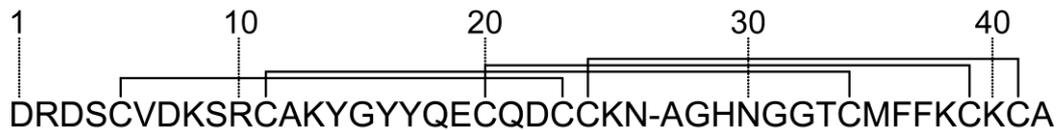
CnErg1

Abb. 11: Strukturformeln der untersuchten Testsubstanzen: Terfenadin, Fluvoxamin, Dofetilid, Chlorbutanol und CnErg1

2.3 Lösungen

2.3.1 Medien für die Zellkultur

Medium für die Kultur von hERG-exprimierenden HEK 293-Zellen

DMEM (= Dulbecco's modified Eagle's medium)

+ 10 % inaktiviertes, fetales Kälberserum (FKS)

+ 2 mM Glutamin

+ 100 U/ml Penicillin

+ 100 µg/ml Streptomycin

+ 400 µg/ml Geneticin

Medium für elektrophysiologische Untersuchungen von hERG-exprimierenden HEK 293-Zellen:

DMEM

+ 10 % inaktiviertes FKS

+ 2 mM Glutamin

Medium für die Transfektion und die Kultur von transfizierten HEK 293-Zellen (Vollmedium ohne Penicillin / Streptomycin):

DMEM

+ 10 % inaktiviertes FKS

+ 2 mM Glutamin

Einfriermedium:

Kulturmedium

+ 20 % inaktiviertes FKS

+ 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

2.3.2 Materialien für die Transformation

Lennox L Broth Base (LB)-Medium: Zur Kultivierung der E. coli XL1-Blue-Bakterien wurde das LB-Medium hergestellt, indem 8 g des LB-Base-Fertigpulvers in 400 ml destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert (1 bar, 121°C, 20 min) wurden. Unmittelbar vor dem Start der Bakterienkultur wurde das Medium mit 2 ml Ampicillin-Lösung (20 mg/ml) (Endkonzentration: 100 µg/ml Ampicillin) zur Selektion der Bakterien versetzt.

LB-Agarplatten: Die LB-Agar-Platten dienen der Selektion erfolgreich transformierter E. coli XL1-Blue-Bakterien. Für jeden Ansatz aufgetauter Bakterien wurden 2 Platten bereitet. Im Folgenden wird die Herstellung von LB-Agar für 8 Platten beschrieben. Für 200 ml LB-Agar wurden 6,4 g des Fertigpulvers in 200 ml destilliertem Wasser eingerührt und autoklaviert (1 bar, 121°C, 20 min). Nach dem Abkühlen der Lösung auf ~ 50°C wurden dem LB-Agar 1 ml Ampicillin-Lösung (20 mg/ml) (Endkonzentration: 100 µg/ml Ampicillin) zugesetzt und unter Vermeidung von Schaumbildung gut vermischt. Sterile Petrischalen mit einem Durchmesser von 100 mm (TPP, Biochrom, Berlin, Deutschland) wurden jeweils mit 20 ml LB-Agar beschickt, der sich bei Raumtemperatur in den Schalen verfestigte. Die Agarplatten wurden dann über Nacht kopfüber (zur Vermeidung der Entstehung von Kondenswasser) im Kühlschrank (4°C) ausgehärtet und bis zur Verwendung dort gelagert.

Ampicillin-Lösung: Es wurde eine Stammlösung (20 mg/ml) in destilliertem Wasser angesetzt. Damit eine Endkonzentration von 100 µg Ampicillin/ml LB-Medium resultierte, wurden 0,005 ml Stammlösung pro ml Medium hinzugegeben.

Quiagen Endofree Plasmid Maxi Kit: (12143, Quiagen GMBH, Hilden, Deutschland)

2.3.3 Lösungen für die Patch-Clamp-Experimente

Badlösung (extrazelluläre Lösung) für Whole-Cell-Messungen: Es wurde eine wässrige Lösung mit 140 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, 2,6 mM CaCl₂ und 10 mM HEPES hergestellt. Die extrazelluläre Lösung wurde mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Pipettenlösung (intrazelluläre Lösung) für Whole-Cell-Messungen: Es wurde eine wässrige Lösung mit 140 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 2 mM CaCl₂, 5 mM ATP und 5 mM HEPES hergestellt. Die intrazelluläre Lösung wurde mit 1 M KOH auf einen pH-Wert von 7,15 eingestellt.

Pipettenlösung ohne ATP (intrazelluläre Lösung) für Whole-Cell-Messungen: Es wurde eine wässrige Lösung mit 140 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 2 mM CaCl₂ und 5 mM HEPES hergestellt. Die intrazelluläre Lösung wurde mit 1 M KOH auf einen pH-Wert von 7,15 eingestellt.

2.3.4 Testsubstanz-Lösungen

Terfenadin: Es wurde eine 30 mM Stammlösung in DMSO hergestellt und mit extrazellulärer Lösung (Kap. 2.3.3) auf die jeweiligen Testkonzentrationen verdünnt.

Fluvoxamin: Es wurde eine 30 mM Stammlösung in extrazellulärer Lösung hergestellt und mit extrazellulärer Lösung (Kap. 2.3.3) auf die jeweiligen Testkonzentrationen verdünnt.

Chlorbutanol: Es wurde eine 30 mM Stammlösung in extrazellulärer Lösung (Kap. 2.3.3) hergestellt und mit extrazellulärer Lösung auf die jeweilige Testkonzentration verdünnt.

Dofetilid: Es wurde eine 3 mM Stammlösung in DMSO hergestellt und mit extrazellulärer Lösung (Kap. 2.3.3) auf die jeweilige Testkonzentration verdünnt.

CnErg1: Es wurde eine 1 µM Stammlösung in extrazellulärer Lösung (Kap. 2.3.3) hergestellt und mit extrazellulärer Lösung auf die jeweiligen Testkonzentrationen verdünnt.

2.4 Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit kamen folgende Plasmide zur Transfektion eukaryotischer Zellen zur Anwendung:

<u>Plasmid</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Resistenzgene</u>	<u>Zielprotein</u>
pSP64-Tyr652Ala-hERG	Prof. Dr. Christoph A. Karle Universitätsklinikum Heidelberg, Deutschland	Ampicillin	Tyr652Ala-hERG-Kanal
pHyg-EGFP	Clontech®, Heidelberg, Deutschland Art.-Nr. 6014-1	Ampicillin / Hygromycin	EGFP

2.5 Zellkultur

Die Untersuchung der hERG-Kanäle erfolgte an einer mit hERG-cDNA stabil transfizierten menschlichen embryonalen Nierenzelllinie (HEK 293) aus der Arbeitsgruppe von Prof. Craig January, University of Wisconsin (Zhou et al. 1998). Die Zellen wachsen als Monolayer einschichtig. Alle Zellkultur-Arbeiten mit stabil transfizierten HEK 293-Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom (Herasafe, Heraeus)

durchgeführt. Die Zellen wurden in 75 cm²-Kulturflaschen (TPP, Biochrom) in einem Brutschrank (Heraeus) mit einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre aus 90 % O₂ und 10 % CO₂ bei 37°C kultiviert.

Zweimal pro Woche wurden die Zellen bei Erreichen einer 80-90 %igen Konfluenz passagiert und im Verhältnis 1:20 neu ausgesät. Dazu wurde das alte Medium abgenommen, und die haftenden Zellen wurden zweimal mit 7 ml PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml Kulturmedium vom Boden abgelöst und in diesem Volumen resuspendiert und vereinzelt. 1 ml dieser Zellsuspension wurde mit 19 ml Kulturmedium in eine neue 75 cm²-Kulturflasche überführt und kultiviert. Das Kulturmedium wurde jeweils einen Tag nach dem Passagieren erneuert.

Auftauen und Einfrieren von HEK 293-Zellen

Zur Aufnahme der Zellkultur wurde ein Kryoröhrchen mit stabil transfizierten HEK 293-Zellen in einem auf 37°C temperiertem Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium in einem 50 ml Falcon-Gefäß (TPP, Biochrom) suspendiert und mit der Tischkühlzentrifuge bei 10°C und 216 x g für 5 Minuten zentrifugiert, um das DMSO auszuwaschen. Das überschüssige Medium wurde abgesaugt und das sedimentierte Zellpellet in 20 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Die jeweils erste Aussaat nach dem Auftauen der Zellen wurde als Passage 1 gezählt.

Ein Teil der Zellen der Passagen 3 - 7 wurden zur Aufbewahrung wieder eingefroren. Die Zellen wurden in 75 cm²-Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von ~ 80 % kultiviert und, wie oben beschrieben, abgelöst und 5 Minuten mit 216 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem entsprechenden Volumen Einfriermedium (Kap. 2.3.1) resuspendiert. Das Volumen des Mediums wurde so berechnet, dass 3 x 10⁶ Zellen pro Kryoröhrchen (Volumen 1,8 ml, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) eingefroren werden konnten (Bestimmung der Zellzahl s. unten). Aus einer 75 cm²-Kulturflasche wurden die Zellen in 9 ml Medium resuspendiert und in 5 Röhrchen eingefroren. Um schonendes Einfrieren der Zellen zu gewährleisten, wurden diese zunächst für 2 Stunden bei -20°C, dann über Nacht bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Zellzahl-Bestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Kammer bestimmt. 20 µl der Zellsuspension, die nach Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets in 10 ml Medium vorlag, wurden auf die Neubauer-Kammer aufgebracht. Die Zellen wurden in 4 Großquadraten, die jeweils in 16 kleinere Quadrate unterteilt waren, unter dem Mikroskop (Axiovert 40 C, Zeiss, Jena, Deutschland, CP-Achromat-Objektiv 10x) ausgezählt. Dabei ließ sich die Zellzahl folgendermaßen berechnen:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Zellzahl pro Großquadrat} \times 10^4 \qquad \text{Gleichung 1}$$

Anhand der ermittelten Zellzahl konnte das Volumen der Zellsuspension für eine definierte Zellzahl bestimmt werden.

2.6 Transformation und Plasmidgewinnung

Transformation

Die Tyr652Ala- hERG-Mutante wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christoph A. Karle (Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Als Vektor für die mutierten hERG-DNAs diente das Plasmid pSP64.

In der Molekularbiologie versteht man unter Transformation die Aufnahme freier DNA in Bakterien. Die für die Transfektion benötigte DNA wurde durch Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Bakterien (200249, Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande) eingebracht, in der Bakterienkultur amplifiziert und anschließend aufgereinigt. Die verwendeten Bakterien sind aufgrund einer entsprechenden Vorbehandlung in der Lage, DNA aufzunehmen, weshalb man sie als kompetent bezeichnet.

Die Transformation erfolgte nach dem Prinzip des Hitzeschocks. Nach dem Auftauen der Bakterien auf Eis wurden jeweils 100 µl der Bakteriensuspension in eisgekühlte Eppendorf-Gefäße (1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert. Zu der Bakteriensuspension wurde 1 µl DNA-Plasmid (entspricht je nach Verdünnung ~ 65 ng DNA) gegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte die Transformation durch Hitzeschock: die vorbereiteten Ansätze wurden exakt 45 s in ein auf 42°C temperiertes Wasserbad gehalten und anschließend wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von jeweils 900 µl SOC-Medium (auf 42°C vorgewärmt) wurde jeder Reaktionsansatz 60 min bei 150 rpm und 37°C

Inkubationstemperatur geschüttelt (Schüttelinkubator 3032/3033, GLF, Burgwedel, Deutschland). Das pSP64-Plasmid trägt ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Jeweils 100 µl eines Ansatzes wurden mit einer Eppendorf-Pipette auf bereits vorbereitete Ampicillin-haltige LB-Agarböden aufgebracht und mit einem Glasstab ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. In Anwesenheit der Antibiotika konnten nur erfolgreich transformierte Bakterien wachsen und Kolonien bilden.

Plasmidamplifikation durch Bakterienkultur

Nach Inkubation über Nacht zeigten die Agarplatten der einzelnen Probenansätze weiße Kolonien. Zur Vermehrung der Plasmide wurde von jeder Agarplatte mit Ausstrich eines Probenansatzes eine Kolonie mit Hilfe eines Zahnstochers gepickt und in 50 ml Wassermann-Röhrchen (Schott, Mainz, Deutschland) überführt. Diese waren zuvor mit je 2 ml Ampicillin-haltigem LB-Nährmedium beschickt worden. Die Röhrchen wurden durch lockeres Aufsetzen der Deckel nur lose verschlossen und über Nacht bei 37°C und 150 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. 100 µl der über Nacht kultivierten Bakteriensuspension wurden zu 50 ml Antibiotikum-haltigem LB-Medium (steril) in einen sterilen 500 ml Erlenmeyerkolben gegeben. Die Kulturen verblieben zum Zweck der Vermehrung (Amplifikation) der Bakterien sowie der DNA-Plasmide über Nacht bei 37°C und 150 rpm im Schüttelinkubator und dienten am nächsten Tag der Gewinnung von Glycerolkulturen und Plasmiden.

Glycerolkulturen

Neben der direkten Gewinnung der amplifizierten Plasmide aus der Übernachtskultur wurde ein Teil als Glycerolkulturen zur Aufbewahrung der erfolgreich transformierten Bakterien hergestellt und eingefroren. Hierzu wurden 850 µl der Übernachtskultur und 150 µl 99 %iges Glycerol kurz mit Hilfe eines Rotationsvermischers (Vortex, Reax 1DR, Heidolph, Schwabach, Deutschland) vermischt und in Kryoröhrchen (Volumen 1,8 ml, Kat. Nr. 343958, Nunc) bei -80°C gelagert.

Die Bakterien einer Glycerolkultur wurden bei Bedarf wieder reaktiviert, indem sie aufgetaut wurden. Dabei trennten sich die Phasen, wobei die Glycerolschicht oberhalb lag und die Übernachtskultur abpipettiert und in das Antibiotikum-haltige LB-Nährmedium überführt wurde. Zur Amplifikation wurde der Ansatz über Nacht bei 37°C und 150 rpm im Schüttelinkubator geschüttelt und diente am nächsten Tag der Plasmidgewinnung.

Plasmidgewinnung

Nach Inkubation über Nacht wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert (15 min, 3770 x g, 4°C, Zentrifuge 5403, Eppendorf). Die Aufreinigung und die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgten mit Hilfe des Quiagen Endofree Plasmid Maxi Kits.

Im folgenden Abschnitt wird auf das Prinzip der Aufreinigung eingegangen. Das erhaltene Pellet wurde in RNase A-haltigem TE-Puffer resuspendiert. Durch Zusatz von NaOH-Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Puffer (Lysispuffer) wurde eine alkalische Lyse der Bakterienzellen eingeleitet, wobei die RNase A in diesem Prozess freierwerdende RNA verdaut. Phospholipide und Proteinbausteine der bakteriellen Zellmembran wurden durch SDS solubilisiert und das Zellinnere daraufhin freigesetzt. Chromosomale und Plasmid-DNA sowie Proteine wurden durch NaOH denaturiert. Um Plasmid-DNA möglichst ohne Verunreinigung durch zellwandgebundene chromosomale DNA zu gewinnen, wurde die im Protokoll angegebene Lysezeit genau eingehalten (5 min), da sie die optimale Freisetzung von Plasmid-DNA aus der Zelle garantiert. Bei Einhaltung der Lysezeit war die Lyse beendet, bevor die zellwandgebundene chromosomale DNA freigesetzt werden konnte und bevor die Plasmid-DNA durch zu lange Einwirkung von NaOH irreversibel denaturiert wurde. Durch die Zugabe von Kaliumacetat-Puffer wurde das Lysat neutralisiert. Die hohe Salzkonzentration ließ das Kaliumdodecylsulfat und die in Salz-Detergenz-Komplexen eingeschlossenen denaturierten Proteine, die chromosomale DNA und sonstige Zellbestandteile ausfallen. Durch die kleine und ringförmige Gestalt der Plasmid-DNA blieb sie in Lösung und renaturierte. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und der klare Überstand auf eine präequilibrierte Anionenaustauscherharz-Säule gegeben. Das Anionenaustauscherharz trug positive Ladungen und war in der Lage, die Nukleinsäuren, welche bei den gegebenen pH-Bedingungen anionisch vorlagen, zu binden. Die Salzkonzentration und der pH-Wert des Lysates waren so eingestellt, dass ausschließlich die gelöste Plasmid-DNA durch das Harz zurückgehalten wurde. Alle anderen gelösten Bestandteile liefen durch die Säule hindurch. Die Säule wurde anschließend mit einem Puffer mittlerer Salzkonzentration zur Entfernung von Verunreinigungen gewaschen. Nachfolgend wurde die durch das Harz gebundene Plasmid-DNA durch einen Puffer hoher Salzkonzentration eluiert und durch Zugabe von Isopropanol ausgefällt. Durch Zentrifugation wurde ein Plasmid-Pellet erhalten, welches mit 70 %igem Ethanol salzfrei gewaschen, an der Luft getrocknet und in 200 µl sterilfiltriertem TE-Puffer bei -20°C aufbewahrt wurde.

Alle Übernachtskulturen der einzelnen Schritte wurden jeweils am folgenden Morgen zur Aufbewahrung in den Kühlschrank gestellt und erst am Nachmittag zur weiteren Präparation wieder herausgeholt.

Bestimmung von Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA

Die Konzentration und die Reinheit der gewonnenen Plasmid-DNA wurden photometrisch (UV-Spektrometer, NBA 2000, Perkin Elmer, Boston, USA) bestimmt. Die Absorptionsmessung für die Gehaltsbestimmung erfolgte bei 260 nm. Diese Wellenlänge entspricht dem Absorptionsmaximum für doppelsträngige Nukleinsäuren. Die DNA wurde in einem Verhältnis von 1:50 mit TE-Puffer verdünnt und in 100 µl Einmalküvetten (Kat. Nr. 759015, Brand, Wertheim, Deutschland) unter Verwendung von TE-Puffer als Referenz vermessen. Die Berechnung der Konzentration einer wässrigen DNA-Lösung auf Basis der Absorptionsmessung (A_{260}) erfolgte nach der unten angegebenen Gleichung. Dieser Berechnung liegt zugrunde, dass bei einer gemessenen Absorption A_{260} von 1 ungefähr 50 µg doppelsträngige DNA pro 1 ml Probe vorliegen. Aufgrund des vor der Messung durchgeführten Verdünnungsschrittes ist in der Gleichung der Faktor 50 eingetragen.

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g} / \mu\text{l}) = A_{260} \times 0,05 \times 50 \qquad \text{Gleichung 2}$$

Eine zusätzliche Absorptionsmessung bei 280 nm wurde zur Bestimmung des Reinheitsgrades der DNA durchgeführt. In DNA-Proben vorkommende Verunreinigungen, wie Proteine, zeigen bei 280 nm eine starke Absorption. Das Verhältnis der Absorptionen (A_{260}/A_{280}) als ein Maß für die Reinheit liegt bei reinen DNA-Proben zwischen 1,8 und 2,0 und fällt bei Verunreinigungen der DNA mit Proteinen deutlich ab.

2.7 Transiente Transfektion

Durch Transfektion ist es möglich, fremde DNA in lebende eukaryotische Zellen einzubringen. Die in dieser Arbeit benutzte Methode der Transfektion war die Lipofektion. Das verwendete Reagenz Lipofektamin besitzt kationisch lipophile Eigenschaften. Die Lipofektamin-Liposomen gehen mit der negativ geladenen DNA einen Komplex ein, der wahrscheinlich durch Endocytose in die Zelle aufgenommen wird. Die transiente Transfektion der HEK 293-Zellen erstreckte sich über drei Tage, so dass die Zellen ab dem vierten Tag für die elektrophysiologischen Versuche genutzt werden konnten.

Die Zellen wurden an **Tag 1** mit einer Dichte von $\sim 5 \times 10^5$ Zellen (s. Zellzahl-Bestimmung; Kap. 2.5) in eine Petri-Schale von 35 mm Durchmesser (Nunc) ausgesät.

An **Tag 2** erreichten die Zellen eine Konfluenz von $\sim 40-50\%$ in der Schale. Das entsprach einer Zellzahl von $\sim 8 \times 10^5$ Zellen pro Schale. Die Tyr652Ala-hERG-cDNA wurde mit EGFP-cDNA, die auf dem pHyg-Vektor kodiert war, kotransfiziert. EGFP diente als Transfektionsmarker, um erfolgreich transfizierte Zellen unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskopes zu identifizieren.

Ansatz:

1-2 μg Tyr652Ala-hERG-DNA + 0,09 μg EGFP-DNA

Jeweils 7 μl Lipofektamin wurden in 100 μl OptiMEM für 5 min in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß inkubiert. Anschließend wurde das entsprechende Volumen Plasmid-DNA (Gehalt jeweils berechnet nach Gleichung 2, Kap. 2.6) in 100 μl OptiMEM aufgenommen und zu dem Lipofektamin-OptiMEM-Gemisch pipettiert, vermischt und für weitere 20 min inkubiert. Dieser Ansatz wurde daraufhin in die mit Zellen besäte Schale gegeben, in der 1,8 ml frisches Medium für die Transfektion vorgelegt waren, und für 24 h im Brutschrank unter den in Kap. 2.5 beschriebenen Bedingungen inkubiert.

An **Tag 3** wurde das Inkubationsmedium abgenommen. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen und vereinzelt. 2 ml Zellsuspension wurden in Kulturschalen mit 35 mm Durchmesser ausgesät, so dass sich möglichst vereinzelt Zellen absetzten.

Die Zellen wurden mindestens weitere 24 h inkubiert, um die Proteinexpression zu ermöglichen. Die elektrophysiologischen Versuche der transfizierten Zellen wurden an den **Tagen 4 und 5** durchgeführt.

Die Transfektionseffizienz, ausgewertet an Tag 4 anhand des Anteiles der grün fluoreszierenden Zellen, betrug 20-30 %.

2.8 Patch-Clamp-Experimente

2.8.1 Prinzip der Patch-Clamp-Technik

Die von Neher und Sakmann (1976) entwickelte Patch-Clamp-Technik ermöglicht es sowohl transmembranäre Ströme über die gesamte Zellmembran als auch den Strom durch einzelne Ionenkanäle zu messen. In der vorliegenden Arbeit wurde in der Whole-Cell-Konfiguration gemessen, d.h. es wurde der Strom durch Ionenkanäle der gesamten Zelloberfläche abgeleitet. Bei der Patch-Clamp-Technik wird eine spitz ausgezogene Glaspipette (Spitzeninnendurchmesser 1-2 μm) unter einem Mikroskop mit Hilfe eines Mikromanipulators in sehr engen Kontakt mit der Zellmembran gebracht. Um den Patch (Membranfleck) elektrisch von seiner Umgebung zu isolieren, muss eine sehr dichte Verbindung zwischen der Zellmembran und dem Rand der fein ausgezogenen Glaspipette geschaffen werden. Dazu wird an der Pipette ein Unterdruck erzeugt, wodurch ein enger Kontakt zur Zellmembran entsteht. Liegt der Abdichtwiderstand zwischen der Pipette und der Zellmembran im Bereich einiger Gigaohm ($\text{G}\Omega$), so spricht man von einem Gigaseal. Diese hochohmige Verbindung wird als Cell-attached-Konfiguration bezeichnet (Abb. 12, links).

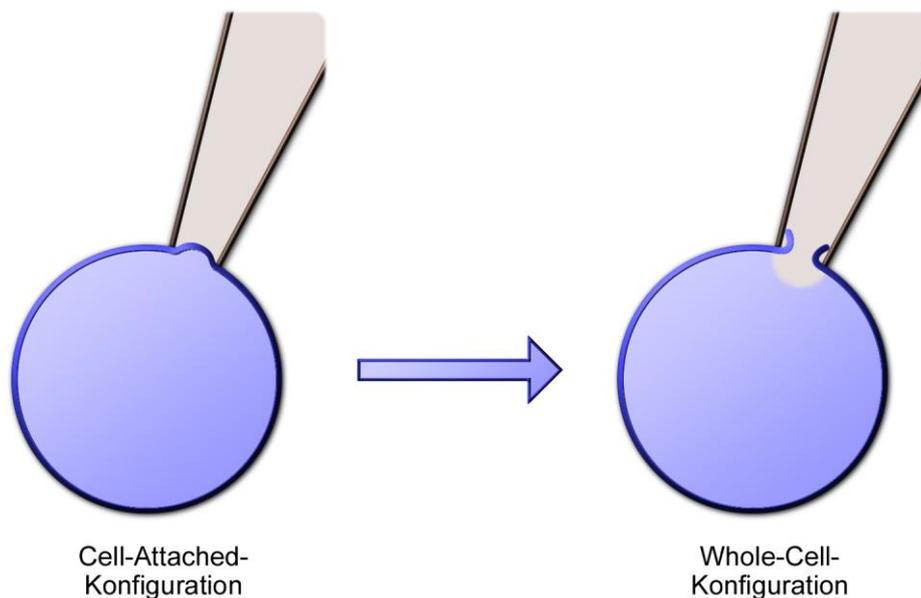


Abb. 12: Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration (nach Hamill et al. 1981). Nach Aufsetzen einer Pipette und Anlegen eines leichten Unterdrucks (leichtes Ansaugen) bildet sich die Cell-attached Konfiguration. Durch einen weiteren Saugimpuls kann ein kleiner Membranfleck unter der Pipette aufgerissen werden und die Whole-Cell-Konfiguration wird erreicht.

Durch einen kurzen kräftigen Saugimpuls (-140 mbar) bricht das isolierte Membranstück unter der Pipette auf, ohne die Dichtung zwischen der Pipette und der Membran zu verändern.

Diese Anordnung wird als Whole-Cell-Konfiguration (Ganzzelleableitung) bezeichnet (Abb. 12, rechts). In dieser Konfiguration tauscht sich das Cytoplasma durch Diffusion mit der Pipettenlösung (intrazelluläre Lösung) aus. Über eine in der Glaspipette befindliche Elektrode und einen Vorverstärker können das Membranpotential der Zelle U_m und die Ionenströme I_m , die über Ionenkanäle der Zellmembran fließen, gemessen werden. Dabei muss der Abdichtwiderstand zwischen Zellmembran und Glaspipette möglichst groß sein, um das elektrische Rauschen und das Auftreten von Leckströmen zwischen Glaspipette und Zellmembran zu reduzieren. Ein Nachteil der Whole-Cell-Konfiguration ist die Dialyse der Zelle mit der Pipettenlösung, da die Zelle infolge dessen von regulatorischen Komponenten ihres Zytoplasmas (Enzyme, Second Messenger usw.) ausgewaschen wird (Pusch und Neher 1988). Andererseits bietet die Whole-Cell-Konfiguration den Vorteil, dass die Pipettenlösung in die Zelle diffundiert und somit die Ionenkonzentrationen an der Innenseite der Membran bekannt sind.

Es ergeben sich zwei Möglichkeiten der elektrophysiologischen Messung: entweder wird die Größe der Ionenströme unter experimenteller Kontrolle der Membranspannung (= Voltage-Clamp) gemessen oder es werden die Membranspannungen nach definierter Strominduktion (= Current-Clamp) erfasst. Die folgende Abbildung (Abb. 13) veranschaulicht den Schaltkreis eines Whole-Cell-Patch-Clamp-Experimentes im Voltage-Clamp-Modus.

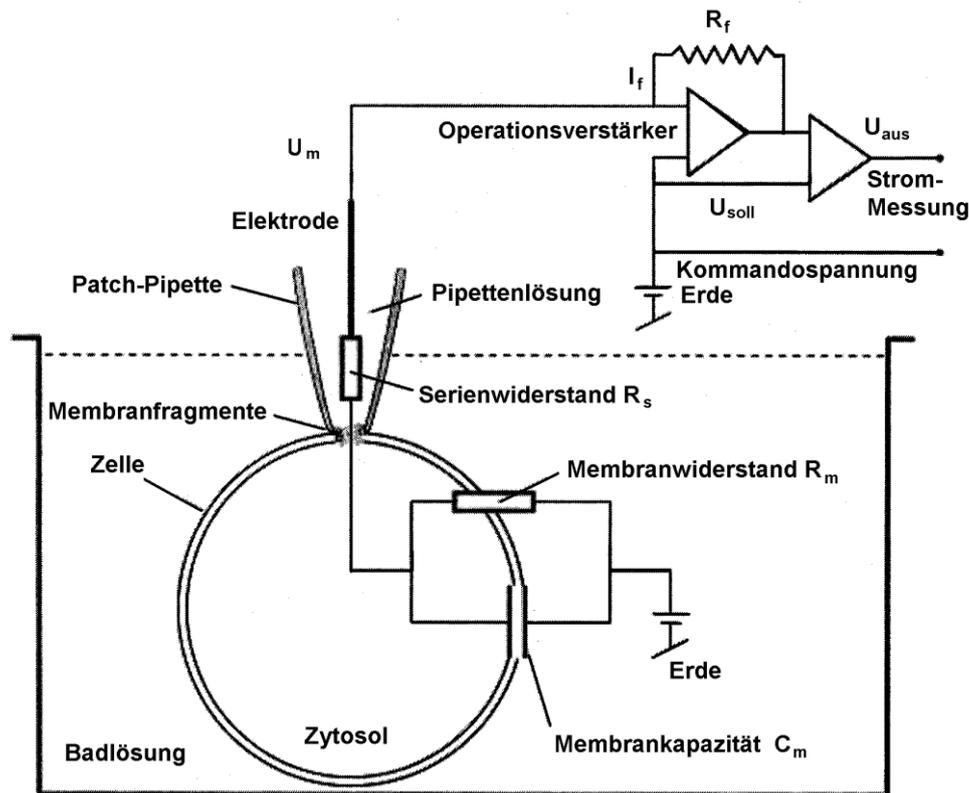


Abb. 13: Schematische Darstellung der Stromableitung beim Patch-Clamp-Experiment in der Whole-Cell-Konfiguration (aus www.stefanmergler.de/images/Verstaerk.gif). Nach dem Durchbrechen der Membran erhält man die Whole-Cell-Konfiguration. In der Pipettenöffnung häuft sich Zellmaterial an, wodurch sich der Serienwiderstand erhöht (R_s = Pipettenwiderstand plus Widerstand durch Membranpartikel). Der Schaltkreis des Operationsverstärkers befindet sich im Vorverstärker, der sich in der Nähe der Pipette befindet. C_m = Membrankapazität; I_f = Kompensationsstrom; R_m = Membranwiderstand; R_f = Rückkopplungswiderstand; U_{aus} = Ausgangsspannung proportional zum Strom; U_m = Membranpotential der Zelle; U_{soll} = Kommandospannung.

Bei dem Voltage-Clamp-Modus wird die Kommandospannung U_{soll} vorgegeben. Die Aufgabe des Verstärkers besteht darin, die Membranspannung U_m immer auf U_{soll} einzustellen (zu „klemmen“) und den hierzu notwendigen Kompensationsstrom I_f zu messen. Dieser Kompensationsstrom wird registriert und ausgewertet, er entspricht dem Ionenstrom, der zur Differenz zwischen U_m und U_{soll} führte. Über das Prinzip der negativen Rückkopplung wird am Strom-Spannungs-Wandler, dessen wichtigste Komponente der Operationsverstärker (OPA) ist, das Membranpotential U_m gemessen und mit der Sollspannung U_{soll} verglichen. Bei einer Differenz zwischen U_m und U_{soll} wird eine veränderte Spannung am Ausgang des Operationsverstärker U_{aus} generiert, die proportional zur Differenz zwischen U_m und U_{soll} und um ein Vielfaches verstärkt ist. Dadurch entsteht ein Spannungsabfall über dem Rückkopplungswiderstand R_f und es fließt ein je nach Leitfähigkeit der Zellmembran unterschiedlich großer Kompensationsstrom I_f in die Zelle. Der Strom, der durch den Rückkopplungswiderstand R_f fließt, kann nur in die Pipette fließen, da der

Eingangswiderstand des Operationsverstärkers sehr hoch ist (ca. $10^{12} \Omega$). Differenzen zwischen U_m und U_{soll} können entstehen, wenn die vorgegebene Kommandospannung geändert wird oder bei Leitfähigkeitsänderungen an der Zellmembran. Im letzten Fall ist der Kompensationsstrom I_f genauso groß wie der Membranstrom I_m , welcher hauptsächlich über die Ionenkanäle der Plasmamembran fließt, ist diesem aber entgegengerichtet (negativer Rückkopplungsmechanismus) und lässt direkte Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit der Ionenkanäle der Zellmembran g_m zu.

Betrachtet man die Ionenkanäle der Zellmembran als einen Ohmschen Widerstand R , dann besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der angelegten Spannung U und dem daraus resultierenden Strom I , der durch das Ohmsche Gesetz beschrieben wird:

$$U = R \cdot I \quad \text{Gleichung 3}$$

Da die Leitfähigkeit (g) als

$$g = \frac{1}{R} \quad \text{Gleichung 4}$$

definiert ist, gilt:

$$U = \frac{I}{g} \quad \text{Gleichung 5}$$

Die treibende Spannung U für den Ionenstrom über die Zellmembran I_m setzt sich aus der Differenz aus der vorgegebenen Kommandospannung U_{soll} und dem Ruhemembranpotential E_m , bei dem keine Nettoströme fließen, zusammen:

$$U = U_{soll} - E_m \quad \text{Gleichung 6}$$

Das Ruhemembranpotential wird durch das Verhältnis der Ionenkonzentrationen im Intra- und Extrazellularraum bestimmt, es lässt sich unter der Annahme, dass die Membran nur für Ionen eines Typs (z.B. K^+) permeabel ist, nach der Nernst-Gleichung berechnen:

$$E_{K^+} = 2,303 \frac{R \cdot T}{Q_{K^+} \cdot F} \cdot \log \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \quad \text{Gleichung 7}$$

E_{K^+} : Ruhemembranpotential für Kalium

R: Gaskonstante: $8,3145 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$

T: absolute Temperatur in Kelvin (K)

Q_{K^+} : Wertigkeit (Ladung) des Kaliumions: 1

F: Faraday-Konstante: $96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$

$[K^+]_{i/o}$: extrazelluläre / intrazelluläre Kaliumionenkonzentration

Damit lässt sich die Leitfähigkeit g_m bei einer vorgegebenen Kommandospannung ermitteln:

$$g_m = \frac{I_m}{U_{soll} - E_m} \quad \text{Gleichung 8}$$

Bei der Whole-Cell-Konfiguration tritt ein Widerstand R_S auf, welcher in Serie mit dem Membranwiderstand verbunden ist und deshalb als Serienwiderstand R_S bezeichnet wird. Der Serienwiderstand entspricht dem Pipettenwiderstand R_{pip} . Der Pipettenwiderstand wird zu Beginn jeder Messung ermittelt und kompensiert, der Serienwiderstand kann allerdings im Verlauf der Messung zunehmen, da sich Membranfragmente und Zellorganellen an der Mündung der Pipette ablagern. Damit die angelegte Kommandospannung nicht zu stark über den Serienwiderstand R_S abfällt, muss der Membranwiderstand $R_m \gg R_S$ sein. Nur dann ist sichergestellt, dass die Potentialdifferenz zwischen dem Zellinneren und der Erdungselektrode im Bad auch tatsächlich der vorgegebenen Kommandospannung U_{soll} entspricht. Je geringer der Serienwiderstand R_S ist, desto größer ist der Strom, der über den Verstärker in die Zelle fließt und umso schneller wird die Plasmamembran, die die kapazitiven Eigenschaften eines Kondensators (C_m =Zellmembrankapazität) besitzt, umgeladen. Durch eine Änderung der Leitfähigkeit der Membran, etwa durch eine Öffnung von Ionenkanälen, kommt es zu einer Potentialänderung an der Zellmembran. Im Voltage-Clamp Modus wird diese Änderung der Membranspannung durch Injektion eines entgegengerichteten Stromes kompensiert. Die Geschwindigkeit dieses Prozesses hängt von C_m und R_S ab, so dass die Veränderung erst verzögert am Verstärker gemessen wird und der Kompensationsstrom nicht immer zeitlich exakt die Leitfähigkeitsänderung widerspiegelt. Dadurch kann das Potential der Zelle für eine gewisse Zeit vom Sollwert abweichen. Deshalb bietet der Verstärker die Möglichkeit der

Serienwiderstandskompensation, bei der zu der Kommandospannung noch ein zusätzlicher Anteil addiert wird, der proportional zum gerade injizierten Strom ist (R_s -Kompensation) und somit einen Teil des erwarteten Spannungsverlustes ausgleicht. Dies ist bei Messungen der Ströme, die durch den hERG-Kanal fließen, wichtig, da die Kinetik des Kanals von der Membranspannung abhängt.

2.8.2 Aufbau des Patch-Clamp-Messplatzes

Die einzelnen Komponenten des Patch-Clamp-Messplatzes sind in der folgenden Abbildung (Abb. 14) dargestellt. Der Messtand bestand aus den folgenden Komponenten:

Zur visuellen Kontrolle der Patchpipette während der Annäherung an die Zellmembran wurde ein **inverses Durchlichtmikroskop** (Axiovert 25 C, Zeiss, Objektive: A-Plan 5x und LD-A-Plan 32x) mit binokularem Tubus verwendet.

Der **Objektisch**, der über einen 2-Achsen-Manipulator in der XY-Richtung bewegt werden konnte, diente der Halterung der 35 mm-Kulturschalen.

Der **Vorverstärker** (EPC 10, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland), der gemeinsam mit dem **Pipettenhalter** (HEKA) auf dem **Mikromanipulator** (MIM 4, HEKA Elektronik, Deutschland) montiert war, diente der Messung des Stromsignals. Mit dem Mikromanipulator, der über die Software POS und einen USB Joystick bedient wurde, konnte der Pipettenhalter, an dem die Glaspipette befestigt war, manuell in alle Richtungen und sehr präzise im μm -Bereich bewegt werden.

Da das Messsystem sehr erschütterungsempfindlich war, waren die oben genannten Komponenten auf einem **schwingungsgedämpften, mit Pressluft gelagerten Tisch** (TMC, Technical Manufacturing Corporation, USA) montiert. Sämtliche Metallobjekte auf dem Experimentiertisch waren geerdet. Der Messplatz war von einem **Faraday-Käfig** (HEKA Elektronik, Deutschland) umgeben, um die Einstreuung elektromagnetischer Wechselfelder² zu reduzieren.

² Die wesentliche Quelle des Rauschens im niederfrequenten Bereich ist das sog. Netzbrummen (50 Hertz), das vom öffentlichen Spannungsnetz generiert wird und sich durch metallische Komponenten und stromführende Kabel in den Messaufbau überträgt.

Das **Perfusionssystem** bestand aus 50 ml Spritzen (BD Plastipak, Heidelberg, Deutschland) zur Lösungsbevorratung, Polyethylen-Schläuchen (neoLab, Heidelberg, Deutschland) für den Zu- und Ablauf und einem 4-Kanal Kontrollsystem (ALA-VM 4, ALA Scientific Instruments, Westbury, USA) für die Steuerung des Zulaufes. Die Badlösung wurde mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 2 ml/min gewechselt.

Die folgenden Hauptkomponenten des Messplatzes befanden sich außerhalb des Käfigs:

Mit Hilfe des **Haupt- oder Nachverstärkers** (EPC 10, HEKA Elektronik, Lambrecht) wurden die Signale des Vorverstärkers verstärkt und gefiltert. Als Software zur Datenerfassung und zur Kontrolle des Verstärkers diente das Programm PULSE (HEKA Elektronik, Lambrecht), über diese Software erfolgte die Kompensation des Serienwiderstandes und die Applikation der Pulsprotokolle. Der **AD/DA³-Wandler** war im Verstärker integriert. Der AD/DA-Wandler digitalisierte die analogen Signale des Verstärkers und leitete diese an den Computer weiter. Andererseits wurden digitale Signale des Computers analogisiert und als Spannungspulse an den Verstärker gesendet.

Der **Computer** (MaxData, P4 mit 2,6 GHz) lieferte einerseits die Spannungsimpulse an den Verstärker und diente andererseits der Darstellung und Analyse der gemessenen Ströme. Die Aufnahme der Daten erfolgte mit der Software PULSE, die Auswertung mit dem Programm PULSE FIT (HEKA Elektronik, Deutschland).

³ Analog-Digital/Digital-Analog-Wandler



Abb. 14: Photographische Darstellung des Patch-Clamp-Messplatzes. 1 Faraday-Käfig, 2 Perfusionssystem, 3 Vorverstärker mit Pipettenhalter und Patchpipette, 4 Perfusionskammer mit Zu- und Ablauf, 5 Inverses Mikroskop, 6 Joystick zur Steuerung der Patchpipette, 7 Schwingungsgedämpfter Tisch, 8 Mikromanipulator, 9 EPC 10 Verstärker mit integriertem AD/DA-Wandler, 10 Computer mit Pulse und Pulse Fit Software zur Datenaufnahme und -analyse

2.8.3 Herstellung der Patch-Pipetten

Die Patch-Pipetten wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren (1,5 mm Durchmesser, 0,3 mm Wanddicke, Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) mit einem Pipettenzieh-Gerät (Abb. 15 links; Pipettenpuller L/M-3P-A, List-electronic, Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Die Pipetten wurden in zwei Schritten senkrecht gezogen. Zunächst wurde die Glaskapillare mit einer Heizspirale erwärmt, ein Gewicht am unteren Ende zog dabei das geschmolzene Glas auseinander. In diesem ersten Schritt wurde die Form der Flanken festgelegt. Im zweiten Schritt wurde die Pipette rezentriert und erneut erhitzt. Die zweite Stufe formte die Spitze und trennte die beiden Pipetten. Der Durchmesser der Pipettenöffnung konnte über den im Heizdraht fließenden Strom und damit über das Ausmaß der Erhitzung der Glaskapillare reguliert werden. Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden Pipetten mit einem Widerstand von 3 – 7 M Ω verwendet. Die Pipettenspitzen wurden anschließend mit einer Mikroschmiede (Abb. 15 rechts; L/M-CPZ 101, List-electronic) poliert. Die Mikroschmiede ist ein Mikroskop mit Pipettenhalter und Mikromanipulator, mit dem ein Platin-Iridium-Draht

sehr nah an die Pipettenspitze herangeführt wurde. Mit Hilfe des glühenden Drahtes wurden scharfkantige Ränder der Pipette rundgeschmolzen.

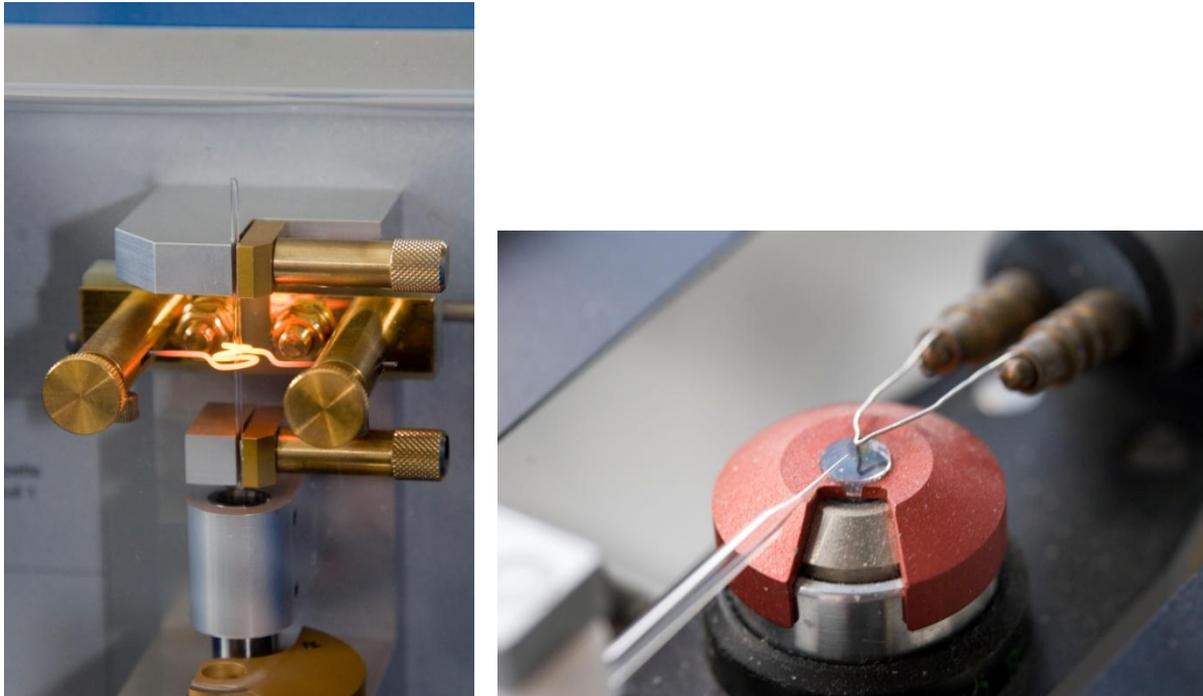


Abb. 15: Pipettenzieh-Gerät (links) und Pipettenhalterung mit Polierdraht (rechts) der Pipetten-Polier Apparatur (Mikroforge).

Das Befüllen der Pipette mit Pipettenlösung erfolgte mit einer Eppendorf-Pipette (10 μ l, Bedienungsknopf grau, Eppendorf), auf die eine entsprechend lang ausgezogene Spitze (Microloader, Eppendorf) aufgesetzt war. Das Befüllen der Pipetten führte zur Bildung von Luftblasen, vor allem in der Pipettenspitze. Daher wurden die Pipetten vor dem Befüllen für mindestens 30 s mit der Spitze in ein mit der Pipettenlösung gefülltes Eppendorf-Gefäß (Volumen 1,5 ml) getaucht. Durch Kapillarkräfte füllten sich die Pipetten an der Spitze luftblasenfrei, so dass sie anschließend mit der Eppendorf Reference-Pipette vom anderen Ende befüllt werden konnten.

2.8.4 Durchführung der elektrophysiologischen Messungen

Für die elektrophysiologischen Messungen wurden die stabil transfizierten hERG-exprimierenden HEK 293-Zellen in Petri-Schalen mit einem Durchmesser von 35 mm dünn ausgesät. Die Kultivierung erfolgte mit Vollmedium ohne Zusatz von Antibiotika (DMEM mit 2 mM Glutamin und 10 % inaktiviertem FKS, ohne Zusatz von Penicillin, Streptomycin oder Geneticin), um einen möglichen Einfluss der Antibiotika auf den hERG-Kanal auszuschließen. Für jede elektrophysiologische Messung wurde ein neues Schälchen aus dem Brutschrank entnommen, das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit ca. 1 ml Badlösung

gespült, um Mediumreste zu entfernen, und ein Einsatz in die Schale gelegt. Der Einsatz verringerte das Kammervolumen, enthielt Ausfräsungen zur Fixierung der Referenzelektrode und des Badzulaufes sowie eine Schräge, so dass der Einsatz zur Mitte hin abflachte. Diese Abflachung gestattete einen gleichmäßigen Lösungsablauf mit Hilfe der Absaugpumpe (Pumpe und Controller Typ MPCU, Lorenz Messgerätebau, Lindau, Deutschland) sowie des Ablaufschlauches. Die Schale wurde in die Badkammerhalterung des Objektisches montiert. Das Bad wurde mit 1,5 ml extrazellulärer Lösung gefüllt. Die Referenzelektrode⁴ wurde in die Badlösung getaucht und im Einsatz fixiert. Die Pipette enthielt die Pipettenlösung und die Messelektrode.⁴ Vor dem Eintauchen der Pipette in die Badlösung wurde ein leichter Überdruck angelegt, so dass die Pipette in der Badlösung nicht mit Partikeln verstopfte und ein hoher Abdichtwiderstand an der Zellmembran erreicht werden konnte. Durch das Eintauchen der Pipette und die Vorgabe eines Spannungspulses von 5 mV über 5 ms mit einer Stimulationsfrequenz von 0,1 kHz war ein rechteckiger Stromimpuls am Oszilloskop sichtbar (Abb. 16). Die Größe des Stromimpulses war ein Maß für die Größe der Pipettenöffnung.

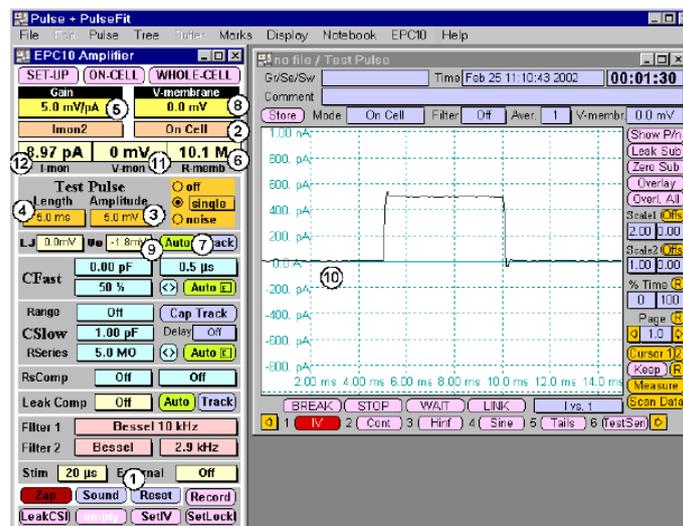


Abb. 16: Rechteckiger Stromimpuls am Oszilloskop nach Eintauchen der Pipette in die Badlösung (HEKA, EPC 10 Manual)

⁴ Die Elektroden sind metallische Leiter (Silberdraht), die chloriert sind, um so genannte Offsetpotentiale zu vermeiden. Offsetpotentiale sind Spannungsartefakte, die an Übergängen innerhalb der Messkette (Silberdraht-Pipettenlösung-Badlösung-Erdung) entstehen, z. B. das Elektrodenpotential oder das Liquid-Junction Potential (= Potential, das zwischen unterschiedlich zusammengesetzten Bad- und Pipettenlösungen entstehen kann). Solche Spannungen führen zu Abweichungen zwischen dem angezeigten und dem tatsächlichen Potential an der Zellmembran. Offsetpotentiale müssen korrigiert werden, damit während der Messung das vom Vorverstärker vorgegebene Potential an der Membran anliegt.

Unter visueller Kontrolle mit dem Inversmikroskop wurde eine Zelle ausgewählt. Anschließend wurde die Pipette mit Hilfe des Mikromanipulators an die Zelle herangefahren. Der Kontakt zwischen der Zelle und der Pipette führte zu einem Anstieg des Pipettenwiderstandes, was durch einen Stromabfall erkennbar war. Durch Ablassen des Überdrucks und leichtes Ansaugen entstand ein sehr fester Pipetten-Membran-Kontakt mit einem sehr hohen Abdichtwiderstand (Gigaseal). Die an der Zelle hervorgerufenen kapazitiven Ströme wurden kompensiert (Abb. 17).

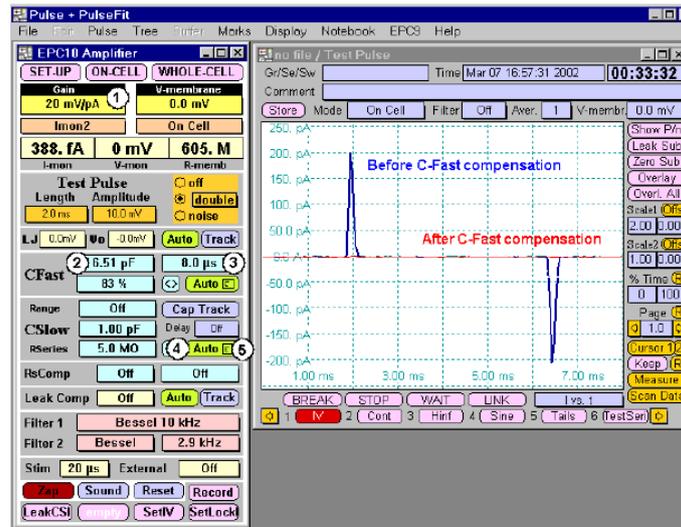


Abb. 17: Cell-attached-Konfiguration (HEKA, EPC 10 Manual). Kapazitive Ströme nach Erreichen der Cell-attached-Konfiguration (blaue Linie). Nach Kompensation dieser Ströme fließt kein Strom mehr (rote Linie).

Durch weiteres Saugen wurde die Membran durchbrochen und die Whole-Cell-Konfiguration erreicht. Dabei traten kapazitive Ströme über der Zellmembran auf, die kompensiert wurden.

Die Kompensation der Zellmembrankapazität C_m und des seriellen Widerstandes R_s nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration erfolgte mit Hilfe des Hauptverstärkers. Die R_s -Kompensation (Kap. 2.8.1) betrug mindestens 50 %. Nach Durchbrechen der Zellmembran und Übergang in die Whole-Cell-Konfiguration wurde das Pulsprotokoll appliziert. Mit der Aufnahme der Daten wurde 3-5 min gewartet, damit sich die Stromamplitude und die Kinetik des Kanals stabilisieren und die Pipettenlösung mit dem Cytoplasma austauschen konnte. Ströme wurden als stabil angesehen, wenn die Stromamplitude eine konstante Größe erreichte.

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (20 - 24°C) durchgeführt.

2.8.5 Bestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen

Zur Bestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Hemmung der hERG-Spitzen-Tail-Ströme durch Testsubstanzen wurde folgendes Pulsprotokoll (Abb. 18) verwendet: ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde ein Depolarisationspuls auf +20 mV über eine Dauer von 2 s appliziert, wodurch hERG-Ströme ausgelöst wurden. Der Aktivierungsstrom war das Resultat der verzögerten Aktivierung und der überlagernden schnellen Inaktivierung des hERG-Kanals. Darauf folgte ein Repolarisationspuls auf -40 mV über eine Dauer von 2 s zur Induktion der hERG-Tail-Ströme. Die Tail-Ströme bei Repolarisation nach vorheriger Depolarisation der Membran sind charakteristisch für den hERG-Kanal aufgrund seiner besonderen Kinetik (rasche Erholung von der Inaktivierung, Kap. 1.5.1). Als Tail-Strom wird der abnehmende Auswärtsstrom bei Repolarisation der Membran bezeichnet.

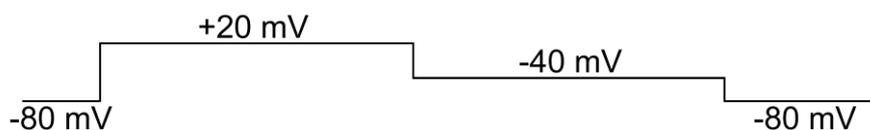


Abb. 18: Pulsprotokoll zur Bestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Reduktion der hERG-Spitzen-Tail-Ströme durch Testsubstanzen. Das Haltepotential betrug -80 mV. Ein Spannungspuls auf +20 mV über eine Dauer von 2 s wurde appliziert, um hERG-Ströme auszulösen. Es folgte ein Repolarisationspuls auf -40 mV über eine Dauer von 2 s zur Induktion der hERG-Tail-Ströme. Die Stimulationsfrequenz betrug 0,1 Hz.

Das Pulsprotokoll wurde zuerst unter Kontrollbedingungen (Perfusion mit extrazellulärer Lösung) und anschließend in Anwesenheit der zu untersuchenden Testsubstanzen so lange appliziert, bis die Reduktion der hERG-Ströme ein Gleichgewicht erreichte. Die Stimulationsfrequenz betrug 0,1 Hz. Die Stromsignale wurden bei 1 kHz mit einem Bessel-Tiefpassfilter gefiltert.

Der Aktivierungsverlauf bei einem Testpuls auf +20 mV konnte durch Angleichen des Stromverlaufes mit einer Exponentialfunktion beschrieben werden. Anhand der e-Funktion wurde die Zeitkonstante der „scheinbaren“ Aktivierung („scheinbar“ aufgrund der gleichzeitig stattfindenden Inaktivierung) ermittelt.

Der Deaktivierungs-Tail-Strom wurde mit einer doppelten Exponentialfunktion angeglichen und auf den Beginn des Testpulses extrapoliert, um die initiale Spitzen-Tail-Stromamplitude zu kalkulieren. Die Spitzen-Tail-Stromamplitude in Anwesenheit der untersuchten

Testsubstanz wurde auf die Spitzen-Tail-Stromamplitude in Abwesenheit der Testsubstanz (Kontrolle) bezogen und die Stromreduktion wurde in Abhängigkeit von der Testsubstanzkonzentration bestimmt. Beim Angleichen der Deaktivierungs-Tail-Ströme mit einer doppelten e-Funktion erhält man die Werte für die schnelle (τ_{fast}) und die langsame Zeitkonstanten (τ_{slow}) der Deaktivierung.

2.8.6 Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Aktivierung

Für die Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Aktivierung und der Spannungsabhängigkeit der Stromreduktion durch die getesteten Substanzen wurde folgendes Spannungsprotokoll (Abb. 19) eingesetzt: es wurden Testpulse auf Membranpotentiale von -40 mV bis +40 mV in 10 mV-Schritten ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV über eine Dauer von 2 s appliziert, denen jeweils ein Repolarisationspuls auf -40 mV über eine Dauer von 2 s folgte. Die Stimulationsfrequenz betrug 0,1 Hz.

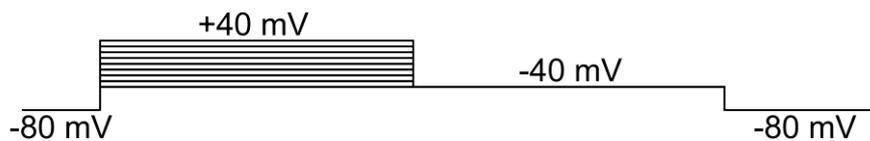


Abb. 19: Pulsprotokoll zur Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Aktivierung und der Spannungsabhängigkeit der hERG-Stromreduktion durch die Testsubstanzen. Das Haltepotential betrug -80 mV. Es wurden Spannungspulse auf Membranpotentiale von -40 bis +40 mV in 10 mV-Schritten über eine Dauer von 2 s bei einer Stimulationsfrequenz von 0,1 Hz zur Aktivierung der hERG-Ströme appliziert. Diesen Spannungspulsen folgte jeweils ein Repolarisationspuls auf -40 mV über eine Dauer von 2 s zur Induktion der hERG-Tail-Ströme.

Nach Ermittlung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung unter Kontrollbedingungen wurden die Testsubstanzen über eine Dauer von 5-10 min ohne Stimulation zugegeben und das Pulsprotokoll anschließend erneut appliziert. Die Spitzen-Tail-Stromamplitude in Anwesenheit der untersuchten Testsubstanz wurde auf die Spitzen-Tail-Stromamplitude in Abwesenheit der Testsubstanz (Kontrolle) bezogen und die Stromreduktion wurde in Abhängigkeit von der Spannung bestimmt.

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurde mit Hilfe der Boltzmann-Funktion (Kap. 2.8.13, Gleichung 12) beschrieben. Die halbmaximalen Aktivierungsspannungen unter Kontrollbedingungen und nach Applikation der Testsubstanzen wurden miteinander verglichen.

2.8.7 Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Inaktivierung

Für die Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Inaktivierung wurde folgendes Spannungsprotokoll (Abb. 20) eingesetzt: ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde ein Depolarisationspuls auf +40 mV über eine Dauer von 2 s appliziert, was zur Inaktivierung von hERG-Strömen führte. Anschließend wurden kurze Testpulse (10 ms) von -120 mV bis +60 mV in 10 mV-Schritten appliziert, was zu einer unterschiedlich starken Erholung der hERG-Ströme von der Inaktivierung führte. Beim anschließenden Depolarisationspuls auf +40 mV über eine Dauer von 1 s wurden Tail-Ströme ausgelöst.

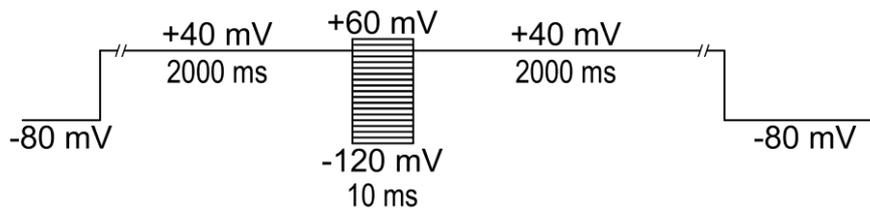


Abb. 20: Pulsprotokoll zur Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Inaktivierung. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde ein Depolarisationspuls auf +40 mV über eine Dauer von 2 s appliziert, anschließend wurden ein Testpulse von -120 bis +60 mV in 10 mV-Schritten über eine Dauer von 10 ms appliziert. Danach wurde erneut ein Depolarisationspuls auf +40 mV über eine Dauer von 1 s appliziert, der zur Auslösung von Tail-Strömen führte.

Nach Ermittlung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung unter Kontrollbedingungen, wurden die Testsubstanzen über eine Dauer von 5-10 min ohne Stimulation zugegeben und das Pulsprotokoll anschließend erneut appliziert. Die Spitzen-Tail-Stromamplitude in Anwesenheit der untersuchten Testsubstanz wurde auf die Spitzen-Tail-Stromamplitude in Abwesenheit der Testsubstanz (Kontrolle) bezogen und die Stromreduktion wurde in Abhängigkeit von der Spannung bestimmt.

Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung wurde mit Hilfe der Boltzmann-Funktion (Kap. 2.8.13, Gleichung 13) beschrieben. Die halbmaximalen Inaktivierungsspannungen unter Kontrollbedingungen und nach Applikation der Testsubstanzen wurden miteinander verglichen.

2.8.8 Erholung von der Inaktivierung und Deaktivierung

Mit Hilfe des folgenden Pulsprotokolls (Abb. 21) wurden die Erholung der hERG-Ströme von der Inaktivierung sowie die Deaktivierung der hERG-Ströme untersucht. Dazu wurde ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV ein Depolarisationspuls auf +40 mV über eine Dauer von 2 s appliziert, wobei es zur Aktivierung und gleichzeitig zur Inaktivierung von

hERG-Kanälen kam. Anschließend wurden Repolarisationspulse von -120 mV bis +20 mV in 20 mV-Schritten über eine Dauer von 2 s appliziert, was zu einer unterschiedlich starken Erholung der hERG-Ströme von der Inaktivierung führte. Gleichzeitig setzte auch die Deaktivierung ein.

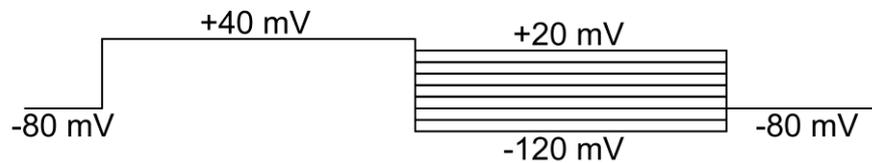


Abb. 21: Pulsprotokoll zur Bestimmung der Erholung der hERG-Ströme von der Inaktivierung. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde ein Depolarisationspuls auf + 40 mV über eine Dauer von 2 s appliziert, anschließend wurde ein Repolarisationspuls von -120 bis +20 mV in 20 mV-Schritten über eine Dauer von 2 s appliziert.

Nach Ermittlung der Spannungsabhängigkeit der Erholung von hERG-Strömen von der Inaktivierung unter Kontrollbedingungen wurden die Testsubstanzen über eine Dauer von 5-10 min ohne Stimulation zugegeben und das Pulsprotokoll anschließend erneut appliziert. Zur Bestimmung der Erholung der hERG-Ströme von der Inaktivierung wurde der Strom vom Beginn des Hyperpolarisationspulses bis zum Maximum mit einer Exponentialfunktion angepasst, die daraus ermittelte Zeitkonstante entspricht der Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung (τ_{Erholung}). Zur Auswertung der Deaktivierung wurde der Strom vom Maximum bis zum Ende des Hyperpolarisationspulses mit einer doppelten Exponentialfunktion angepasst, die daraus resultierenden Zeitkonstanten entsprechen den Zeitkonstanten der Deaktivierung (τ_{fast} , τ_{slow}).

2.8.9 „Envelope of Tails“-Test

Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Blockade von hERG-Strömen wurde der sogenannte „Envelope of Tails“-Test verwendet. Dabei werden zur Aktivierung des hERG-Kanals Testpulse auf +40 mV mit steigender Dauer (50-600 ms, $\Delta t = 50$ ms) ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV appliziert, anschließend erfolgte die Repolarisation auf -40 mV über eine Dauer von 2 s (Abb. 22). Durch die Zunahme der Dauer des Aktivierungspulses kommt es zu einer immer stärkeren Aktivierung von hERG-Strömen und ein immer größerer Anteil der hERG-Kanäle liegt in der offenen Konformation vor. Mit Hilfe dieses Spannungsprotokolls kann die Affinität einer Testsubstanz zum offenen Zustand des hERG-Kanals untersucht werden.

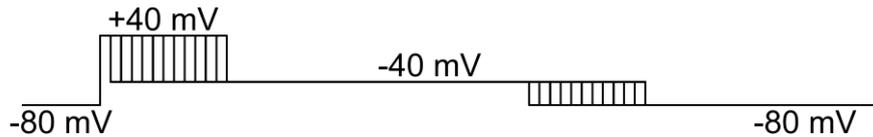


Abb. 22: Pulsprotokoll zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der hERG-Stromreduktion durch die Testsubstanzen mit Hilfe des „Envelope of Tails“-Tests. Das Haltepotential betrug -80 mV. Es wurden Spannungspulse auf +40 mV über eine Dauer von 50 bis 600 ms in 50 ms-Schritten zur Aktivierung von hERG-Strömen appliziert. Anschließend wurde ein Repolarisationspuls auf -40 mV über eine Dauer von 2 s appliziert, wodurch hERG-Tail-Ströme induziert wurden.

Nach Applikation des „Envelope of Tails“-Protokolls unter Kontrollbedingungen wurden die Testsubstanzen über eine Dauer von 5-10 min ohne Stimulation zugegeben und das Pulsprotokoll anschließend erneut appliziert. Die Spitzen-Tail-Stromamplitude in Anwesenheit der untersuchten Testsubstanz wurde auf die Spitzen-Tail-Stromamplitude in Abwesenheit der Testsubstanz (Kontrolle) bezogen und die Stromreduktion wurde in Abhängigkeit von der Dauer des Aktivierungspulses bestimmt. Anhand dieser Versuche wurde die „wahre“ Aktivierungszeitkonstante ermittelt, da nur der offene Zustand des Kanals untersucht wurde.

2.8.10 Langes Puls-Protokoll

Beim Langen Puls-Test wurde ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV ein Depolarisationspuls auf +20 mV über eine Dauer von 10 s appliziert (Abb. 23). Dabei kommt es zunächst zu einer Aktivierung von hERG-Kanälen, mit zunehmender Dauer des Depolarisationspulses nimmt der Anteil inaktivierter Kanäle zu.

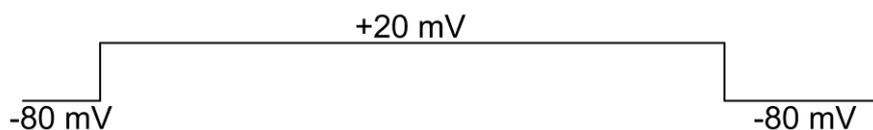


Abb. 23: Langes Puls-Protokoll. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde ein Depolarisationspuls auf +20 mV über eine Dauer von 10 s appliziert.

Mit Hilfe dieses Protokolls kann untersucht werden, ob eine Testsubstanz bevorzugt den inaktivierten Zustand des Kanals hemmt. In diesem Fall würde die hERG-Strom-Blockade mit zunehmender Dauer des Depolarisationspulses und damit mit zunehmender Inaktivierung der hERG-Kanäle zunehmen. Nach Applikation des Langes Puls-Protokolls unter Kontrollbedingungen wurden die Testsubstanzen über eine Dauer von 5-10 min ohne Stimulation zugegeben und das Lange Puls-Protokoll anschließend erneut appliziert. Daraus

wurde die Entwicklung der hERG-Kanal-Blockade mit fortschreitender Dauer des Depolarisationspulses untersucht.

2.8.11 Die Spannungsrampe

Die Spannungsrampe simuliert in vereinfachter Form ein kardiales Aktionspotential (Hancox et al. 1998) und ist geeignet, die Wirkung von Testsubstanzen auf das Verhalten der hERG-Kanäle während eines Aktionspotentials abzuschätzen. Dazu wurde ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV ein Depolarisationspuls auf +20 mV über eine Dauer von 2 s appliziert. Anschließend wurde die Membran im Verlauf von 1 s kontinuierlich auf -80 mV repolarisiert.

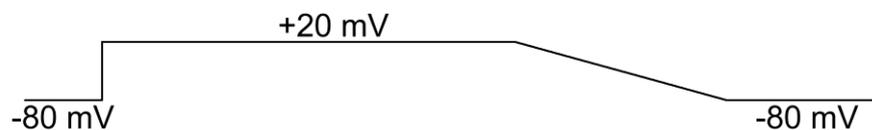


Abb. 24: Die Spannungsrampe. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde ein Depolarisationspuls auf +20 mV über eine Dauer von 2 s appliziert und anschließend eine Spannungsrampe von +20 mV bis -80 mV über eine Dauer von 1 s appliziert.

2.8.12 Korrektur um die Leckströme

Das Haltepotential von -80 mV entspricht ungefähr dem Kaliumumkehrpotential (E_m , Nernst-Gleichung, Kap. 2.8.1, Gleichung 7), sodass bei diesem Membranpotential keine Ströme durch hERG-Kanäle flossen. Daher wurde der Strom, der bei einem Haltepotential von -80 mV als Einwärtsstrom gemessen wurde, als Leckstrom bezeichnet. Leckströme sind Ströme, die von der Badlösung direkt in die Pipette oder durch nicht-spannungsabhängige Kationenkanäle in der Plasmamembran fließen. Die hERG-Ströme aktivieren erst bei Membranpotentialen positiver als ca. -40 mV. Der beim jeweiligen Membranpotential auftretende Leckstrom wurde ausgehend von dem Leckstrom bei -80 mV berechnet. Dabei wurde von einer linearen Beziehung zwischen dem auftretenden Leckstrom und der anliegenden Membranspannung ausgegangen. Daher wurde bei der Auswertung der Aktivierung (Depolarisation auf +20 mV) ein Viertel des bei -80 mV gemessenen Leckstroms von dem gemessenen Wert subtrahiert. Bei der Deaktivierung (Repolarisation auf -40 mV) wurde entsprechend der bei -80 mV gemessene Leckstrom halbiert und zu dem gemessenen maximalen Spitzen-Tail-Strom addiert. Mit diesen Leckstrom-korrigierten Werten wurden alle folgenden Berechnungen und Auswertungen durchgeführt. Für die Auswertung wurden

nur solche Versuche herangezogen, bei denen der Leckstrom maximal 20 % des Spitzen-Tail-Stromes der Kontrolle betrug.

2.8.13 Datenauswertung und Statistik für die elektrophysiologischen Messungen

Der **Aktivierungsstrom** des hERG-Kanals wurde mit einer einfachen Exponentialfunktion angepasst, aus der sich die „scheinbare“ Aktivierungszeitkonstante (τ) berechnete:

$$f = a_0 + a_1 \cdot x^{\left(\frac{-t}{\tau}\right)} \quad \text{Gleichung 9}$$

a_0 : Basislinie

a_1 : Amplitude der Exponential-Funktion

τ : „scheinbare“ Zeitkonstante der Exponential-Funktion

Der **Deaktivierungs-Tail-Strom** während des Repolarisationspulses wurde mit einer doppelten Exponentialfunktion angepasst, aus der die schnelle (τ_{fast}) und langsame Zeitkonstante (τ_{slow}) der Deaktivierung berechnet wurden:

$$f = a_0 + a_1 \cdot x^{\left(\frac{-t}{\tau_{fast}}\right)} + a_2 \cdot x^{\left(\frac{-t}{\tau_{slow}}\right)} \quad \text{Gleichung 10}$$

a_0 : Basislinie

a_1, a_2 : Amplituden der jeweiligen Komponente der Exponential-Funktion

τ_{fast} : schnelle Zeitkonstante der Exponential-Funktion der Deaktivierung

τ_{slow} : langsame Zeitkonstante der Exponential-Funktion der Deaktivierung

Die **Konzentrations-Wirkungs-Beziehung** für die Reduktion der Spitzen-Tail-Stromamplitude durch Testsubstanzen wurde mit der logistischen Form der Hill-Gleichung (Hill 1910) beschrieben:

$$\frac{I}{I_c} = 1 - \frac{\alpha}{1 + 10^{n(px-pK)}} \quad \text{Gleichung 11}$$

- I: Spitzen-Tail-Stromamplitude in Anwesenheit der Testsubstanzen nach Erreichen des Gleichgewichtes
- I_c: Spitzen-Tail-Stromamplitude während der Kontrollperiode vor der Testsubstanz-Applikation
- α: maximaler Block des hERG-Kanals durch die Testsubstanz
- n: Hill-Koeffizient
- x: Konzentration der untersuchten Testsubstanz, px = - log x
- K: halbmaximale Hemmkonzentration (= IC₅₀-Wert), pK = - log IC₅₀

Die modifizierte Hill-Gleichung wurde mit dem Programm Sigma Plot (Version 8.0, Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland) angepasst.

Die **Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Aktivierung** wurde mit Hilfe der Boltzmann-Funktion beschrieben:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{(V_{1/2} - V_M)}{k}}} \quad \text{Gleichung 12}$$

- I: Spitzen-Tail-Stromamplitude bei den jeweilig unterschiedlichen Membranpotentialen
- I_{max}: maximale Spitzen-Tail-Stromamplitude
- V_M: angelegtes Membranpotential
- V_{1/2}: halbmaximale Aktivierungsspannung
- k: Neigungsfaktor, welcher die Steilheit der Spannungsabhängigkeit beschreibt

Die **Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Inaktivierung** wurde mit Hilfe der modifizierten Boltzmann-Funktion beschrieben:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{1-a}{1 + e^{\frac{(V_{1/2}-V_M)}{k}}} + a \quad \text{Gleichung 13}$$

I: Spitzen-Tail-Stromamplitude bei den jeweilig unterschiedlichen Membranpotentialen

I_{\max} : maximale Spitzen-Tail-Stromamplitude

V_M : angelegtes Membranpotential

$V_{1/2}$: halbmaximale Aktivierungsspannung

k: Neigungsfaktor, welcher die Steilheit der Spannungsabhängigkeit beschreibt

a: Plateau, gegen das sich die Funktion annähert

Die Angabe der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert mit Standardabweichung des Mittelwertes (\pm S.E.M.) bzw. unter Angabe des 95 %igen Konfidenzintervalls (KI). Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz zwischen zwei unabhängigen Stichproben wurde der zweiseitige ungepaarte Student's t-Test bei einfachem Vergleich und der ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur bei mehrfachem Vergleich verwendet. Dabei wurde von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen. Die Signifikanz wurde bei einem t-Wert angenommen, der einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % entsprach.

2.9 Kombinationsuntersuchungen

Zunächst wurden die halbmaximalen Hemmkonzentrationen (IC_{50} -Werte) der Testsubstanzen ermittelt. Dazu wurde der Einfluss ansteigender Substanzkonzentrationen auf die Spitzen-Tail-Stromamplitude untersucht. Die Testsubstanzen wurden dazu kumulativ, d.h. in ansteigenden Konzentrationen getestet. Im Anschluss wurden Kombinationsuntersuchungen nach dem Kombinationsschema von Chou (2006) durchgeführt. Dabei wurden jeweils zwei hERG-Kanal-Blocker simultan appliziert. Es wurden Kombinationen von zwei Testsubstanzen verwendet, die äquieffektive Konzentrationen enthielten (Tab. 3), d.h. es wurden jeweils gleiche Vielfache der IC_{50} -Konzentrationen der Einzelsubstanzen miteinander kombiniert. Dabei wurde angenommen, dass der Anteil der jeweiligen Einzelsubstanz am Gesamteffekt der Kombination gleich ist.

		Testsubstanz 1				
		0,125 (IC ₅₀) ₁	0,25 (IC ₅₀) ₁	0,5 (IC ₅₀) ₁	(IC ₅₀) ₁	2 (IC ₅₀) ₁
Testsubstanz 2	0,125 (IC ₅₀) ₂		X			
	0,25 (IC ₅₀) ₂			X		
	0,5 (IC ₅₀) ₂				X	
	(IC ₅₀) ₂					X
	2 (IC ₅₀) ₂					

Tab. 3: Kombinationschema nach Chou 2006. Für die Kombinationsuntersuchungen wurden jeweils Kombinationen getestet, die äquieffektive Konzentrationen zweier hERG-Kanal-blockierender Substanzen enthielten.

Für die untersuchten Kombinationen wurde mit Hilfe der Gleichung nach van den Brink das Ausmaß der Blockade für additives Verhalten ermittelt und diese mit den tatsächlich gemessenen Werten verglichen.

$$\frac{I_{AB}}{I_c} = \frac{\alpha}{1 + \left(1 + \frac{[B]}{IC_{50B}}\right) \frac{IC_{50A}}{[A]}} + \frac{\beta}{1 + \left(1 + \frac{[A]}{IC_{50A}}\right) \frac{IC_{50B}}{[B]}}$$

Gleichung 14

I_{AB} : Spitzen-Tail-Stromamplitude in Anwesenheit der Testsubstanzen A und B

I_c : Spitzen-Tail-Stromamplitude während der Kontrollperiode vor der Testsubstanz-Applikation

α : maximaler Block des hERG-Kanals durch die Testsubstanz A

β : maximaler Block des hERG-Kanals durch die Testsubstanz B

IC_{50A} : halbmaximale Hemmkonzentration der Testsubstanz A

IC_{50B} : halbmaximale Hemmkonzentration der Testsubstanz B

[A]: Konzentration der Testsubstanz A

[B]: Konzentration der Testsubstanz B

In der folgenden Tabelle 4 sind die nach der van den Brink-Gleichung berechneten Effekte bei additiven Wirkungen der untersuchten Kombinationen aufgeführt.

Kombination	Block in % bei additivem Effekt
$2 \cdot 0,125 \text{ IC}_{50}$	20
$2 \cdot 0,25 \text{ IC}_{50}$	33,3
$2 \cdot 0,5 \text{ IC}_{50}$	50
$2 \cdot \text{IC}_{50}$	66,7
$2 \cdot 2 \text{ IC}_{50}$	80

Tab. 4: Ausmaß der Blockade bei additivem Verhalten der Kombinationen. Das nach der van den Brink-Gleichung berechnete Ausmaß der Blockade des hERG-Stroms bei additivem Verhalten für die untersuchten Kombinationen.

2.9.1 Der Kombinationsindex CI

Zur Beurteilung möglicher Interaktionen von zwei simultan applizierten Testsubstanzen wurde der von Chou (2006) eingeführte Kombinationsindex verwendet:

$$CI = \frac{A}{A_x} + \frac{B}{B_x} \quad \text{Gleichung 15}$$

A: Konzentration der Testsubstanz A in der Kombination, welche den Strom zu x % hemmt

B: Konzentration der Testsubstanz B in der Kombination, welche den Strom zu x % hemmt

A_x : Konzentration der Testsubstanz A, welche den Strom allein zu x % hemmt

B_x : Konzentration der Testsubstanz B, welche den Strom allein zu x % hemmt

CI = 0,9-1,1 Additivität

CI < 0,9 Superadditivität

CI > 1,1 Subadditivität

Ist der Kombinationsindex gleich 1 so liegt Additivität vor. Ist der Kombinationsindex kleiner als 1, so liegt Superadditivität (Synergismus) vor, d.h. es wurde in der Kombination zur Erzielung des gleichen Effektes weniger Substanz benötigt als bei Additivität zu erwarten wäre, demzufolge muss eine Verstärkung der Effekte stattgefunden haben. Ist der Kombinationsindex größer als 1, so liegt der umgekehrte Fall vor, die untersuchten Substanzen schwächen sich in ihrer Wirkung ab, es liegt Subadditivität (Antagonismus) vor.

2.10 Intrazelluläre Applikation von Testsubstanzen

Bei der intrazellulären Applikation wurden die Testsubstanzen über die Pipettenlösung (intrazelluläre Lösung, siehe Kap. 2.3.3) appliziert, so dass sie über Diffusion ins Zellinnere gelangten.



Abb. 25: Intrazelluläre Applikation von Testsubstanzen.

Nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration tauschte sich das Cytosol mit dem Pipetteninhalt aus. Als Kontrollstrom wurde der erste, nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration gemessene hERG-Spitzen-Tail-Strom ausgewertet. Nach 10 bzw. 20 min erfolgte die erneute Messung der hERG-Spitzen-Tail-Ströme, welche auf den Kontrollstrom direkt nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration bezogen wurden. Zur Ausschaltung ATP-abhängiger Transportprozesse, wurde Terfenadin in einer Pipettenlösung ohne ATP, die entsprechend weniger Magnesiumchlorid enthielt (Kap. 2.3.3), gelöst. Die Auswertung erfolgte analog zum oben beschriebenen Vorgehen. In weiteren Untersuchungen erfolgte die intrazelluläre Applikation von Terfenadin nach Hemmung von Membrantransportern. Dazu wurden hERG-exprimierende HEK 293-Zellen vor Durchführung der Patch-Clamp-Untersuchungen mit 0,5 mM Cimetidin (Hemmung des OCTN-1-Transporters) bzw. mit 10 μ M Cyclosporin A (Hemmung von P-Glykoprotein) für mindestens 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Applikation von Terfenadin über die Pipettenlösung. Die Auswertung erfolgte analog zum oben beschriebenen Vorgehen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Wirkungen von Terfenadin, Fluvoxamin, Chlorbutanol, Dofetilid und CnErg1 auf hERG-Ströme

3.1.1 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Hemmung der hERG-Spitzen-Tail-Ströme durch Terfenadin, Fluvoxamin, Chlorbutanol, Dofetilid und CnErg1

Terfenadin, Fluvoxamin, Chlorbutanol, Dofetilid und CnErg1 führten zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion von hERG-Strömen. Terfenadin reduzierte die hERG-Spitzen-Tail-Stromamplitude mit einer halbmaximal wirksamen Hemmkonzentration (IC_{50} -Wert) von 27,7 nM (95 % Konfidenzintervall (KI): 24,4–31,5 nM), der Hill-Koeffizient betrug 1,13 (95 % KI: 0,97–1,29). Fluvoxamin hemmte die hERG-Spitzen-Tail-Stromamplitude mit einem IC_{50} -Wert von 3,6 μ M (95 % KI: 3,0–4,4 μ M) und der Hill-Koeffizient betrug 0,89 (95 % KI: 0,75–1,04). Für Chlorbutanol konnte ein IC_{50} -Wert von 7,4 mM (95 % KI: 6,1–9,1 mM) und ein Hill-Koeffizient von 1,07 (95 % KI: 0,85–1,3) ermittelt werden. Für Dofetilid wurde ein IC_{50} -Wert von 12,9 nM (95 % KI: 11,4–14,6 nM) ermittelt, der Hill-Koeffizient betrug 1,55 (95 % KI: 1,27–1,83). CnErg1 reduzierte die hERG-Spitzen-Tail-Ströme mit einem IC_{50} -Wert von 6,4 nM (95 % KI: 3,8–10,7 nM). Bei der Anpassung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von CnErg1 wurde ein Hill-Koeffizient von 1,0 vorgegeben, da aus der Literatur bekannt ist, dass CnErg1 mit einer 1:1 Stöchiometrie mit dem hERG-Kanal interagiert (Pardo-Lopez 2002 B, Zhang 2003 B). Auch hohe Konzentrationen CnErg1 (100 nM \sim 15 x IC_{50}) führten nicht zu einer vollständigen Blockade von hERG-Strömen. Für CnErg1 wurde ein Reststrom von 15,9 % (95 % KI: 0,4–31,4 %) ermittelt. Dagegen blockierten Terfenadin, Fluvoxamin, Dofetilid und Chlorbutanol hERG-Ströme bei hohen Konzentrationen komplett. Für Terfenadin betrug der Reststrom -1,7 % (95 % KI: -11,6–8,2 %), für Fluvoxamin 0,1 % (95 % KI: -21,7–21,9 %), für Dofetilid -10,3 % (95 % KI: -22,3–1,8 %) und für Chlorbutanol -11,1 % (95 % KI: -59,4–37,2 %), diese Werte waren nicht signifikant ($p > 0,05$) unterschiedlich von 0.

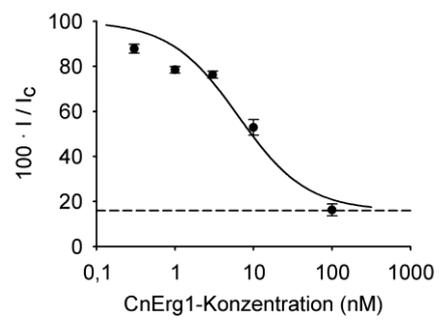
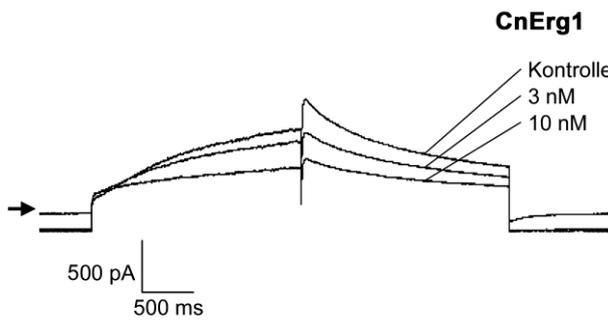
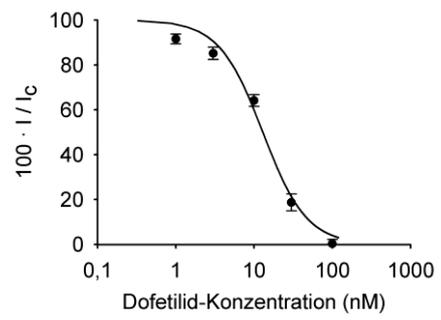
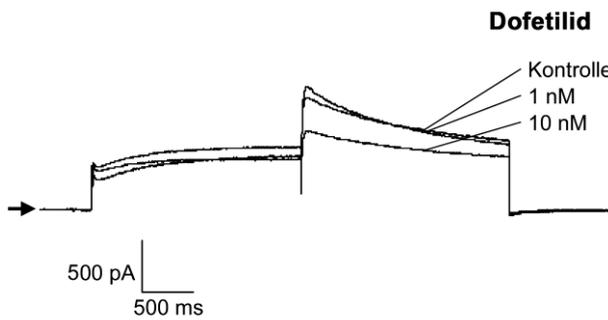
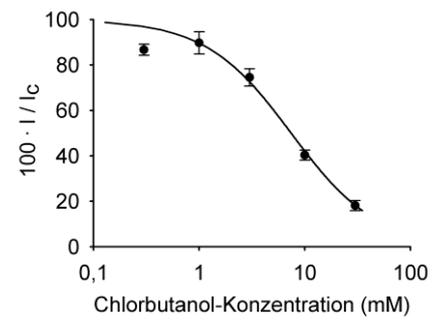
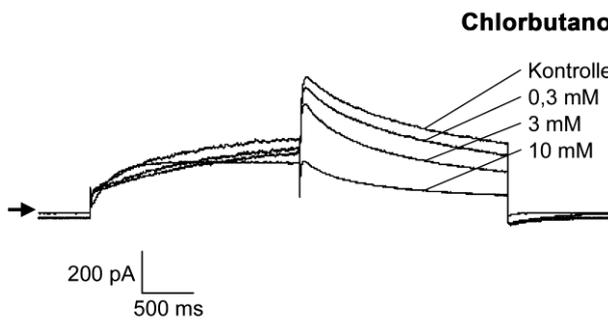
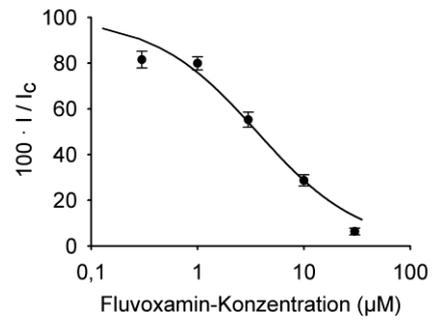
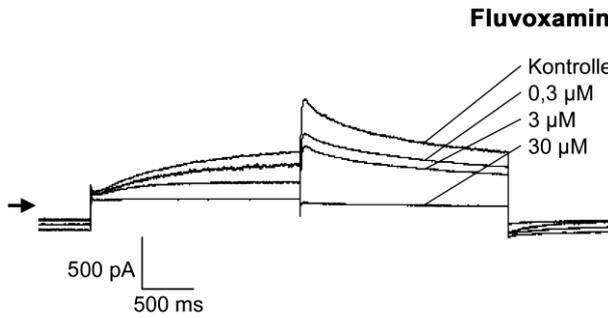
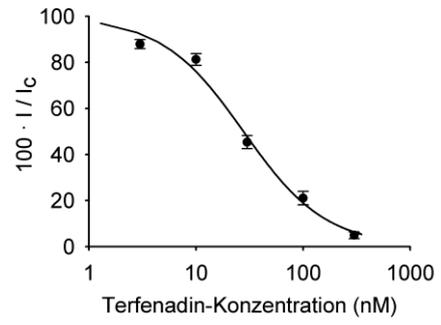
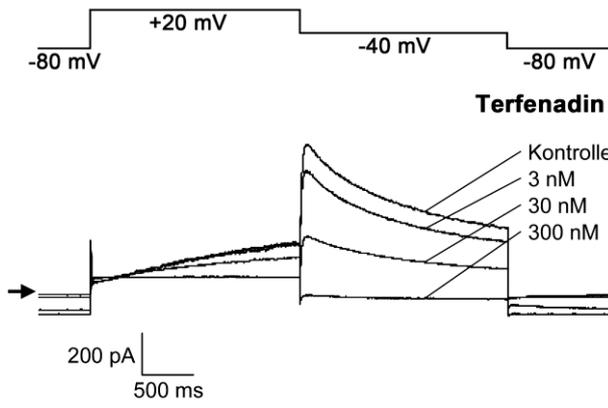


Abb. 26: Links: Effekte von Terfenadin, Fluvoxamin, Chlorbutanol, Dofetilid und CnErg1 auf hERG-Ströme. Dargestellt sind repräsentative Stromverläufe bei steigenden Konzentrationen von Terfenadin, Fluvoxamin, Chlorbutanol, Dofetilid und CnErg1. Oben ist das Pulsprotokoll abgebildet. Die Pfeile geben das Null-Strom-Niveau an.

Terfenadin blockierte den hERG-Spitzen-Tail-Strom um 17,7 %, 57,3 % und 94,9 % bei Konzentrationen von 3, 30 und 300 nM.

Für **Fluvoxamin** betrug das Ausmaß der Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen 24,1 %, 42,3 % und 92,4 % bei Konzentrationen von 0,3, 3 und 30 μ M.

Bei **Chlorbutanol** betrug die Hemmung des hERG-Spitzen-Tail-Stroms 5,2 %, 17,9 % und 61,4 % bei Konzentrationen von 0,3, 3 und 10 mM.

Dofetilid blockierte den hERG-Spitzen-Tail-Strom um 16,5 % und 42,3 % bei Konzentrationen von 1 und 10 nM.

Das Ausmaß der hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade durch **CnErg1** betrug 22,3 % und 31,5 % bei Konzentrationen von 3 und 10 nM.

Rechts: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch Terfenadin, Fluvoxamin, Chlorbutanol, Dofetilid und CnErg1. Auf der **Abszisse** ist die Konzentration der jeweiligen Testsubstanz (Terfenadin, Fluvoxamin, Chlorbutanol, Dofetilid und CnErg1) im logarithmischen Maßstab aufgetragen. Auf der **Ordinate** ist die jeweilige Stromamplitude in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der Testsubstanzen (I) in Prozent von der Stromamplitude unter Kontrollbedingungen (I_c) aufgetragen. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte und die vertikalen Linien die S.E.M. Die Anzahl der Beobachtungen lag zwischen 4 und 12 bei jeder untersuchten Testkonzentration. Die Kurven stellen Anpassungen an die logistische Form der Hill-Gleichung dar (Kap. 2.8.13, Gleichung 11). Die unterbrochene Linie in der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von CnErg1 markiert den Anteil des hERG-Stroms, der durch hohe CnErg1-Konzentrationen nicht blockiert wurde (Reststrom).

3.1.2 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Hemmung von hERG-Aktivierungsströmen durch Terfenadin, Fluvoxamin, Chlorbutanol, Dofetilid und CnErg1

Neben den Deaktivierungs-Tail-Strömen, die bei einem Repolarisationspuls von -40 mV nach Depolarisation auf + 20 mV gemessen wurden, wurden auch die Aktivierungsströme untersucht, die durch einen Depolarisationspuls von +20 mV ausgelöst wurden. Bei Terfenadin, Fluvoxamin, Dofetilid, Chlorbutanol und CnErg1 kam es zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Aktivierungsströme. Terfenadin reduzierte die Aktivierungsströme mit einem IC_{50} -Wert von 63,8 nM (95 % KI: 52,0–78,3 nM), der Hill-Koeffizient betrug 0,79 (95 % KI: 0,65–0,92). Fluvoxamin hemmte die Aktivierungsströme mit einem IC_{50} -Wert von 4,3 μ M (95 % KI: 3,6–5,2 μ M), und der Hill-Koeffizient betrug 1,03 (95 % KI: 0,84–1,21). Für Chlorbutanol konnte für die Aktivierung ein IC_{50} -Wert von 19,7 mM (95 % KI: 13,2–29,4 mM) und ein Hill-Koeffizient von 1,33 (95 % KI: 0,67–1,99) ermittelt werden. Für Dofetilid betrug der IC_{50} -Wert 30,3 nM (95 % KI: 22,6–40,6 nM), und der Hill-Koeffizient betrug 0,98 (95 % KI: 0,70–1,26). Bei CnErg1 wurde bei der Aktivierung ein IC_{50} -Wert von 7,1 nM (95 % KI: 2,9–17,5 nM) ermittelt, der Hill-Koeffizient wurde mit 1,0 vorgegeben. In der Tabelle 5 sind die 95 %igen Konfidenzintervalle der halbmaximalen

Hemmkonzentrationen der Aktivierungsströme und der Spitzen-Tail-Ströme (Deaktivierungsströme) gegenübergestellt.

	Aktivierung	Deaktivierung
Terfenadin	52,0–78,3 nM	24,4–31,5 nM
Fluvoxamin	3,6–5,2 μ M	3,0–4,4 μ M
Chlorbutanol	13,2–29,4 mM	6,1–9,1 mM
Dofetilid	22,6–40,6 nM	11,4–14,6 nM
CnErg1	2,9–17,5 nM	3,8–10,6 nM

Tab. 5: Gegenüberstellung der 95 %igen Konfidenzintervalle der IC₅₀-Werte für die Hemmung der Aktivierungs- und Deaktivierungsströme durch Terfenadin, Fluvoxamin, Chlorbutanol, Dofetilid und CnErg1.

Für Terfenadin, Chlorbutanol und Dofetilid waren die IC₅₀-Werte für die Hemmung der Spitzen-Tail-Ströme signifikant kleiner als die IC₅₀-Werte für die Hemmung der hERG-Aktivierungsströme ($p < 0,05$). Dagegen konnte bei Fluvoxamin und CnErg1 kein signifikanter Unterschied der IC₅₀-Werte für die Hemmung der Aktivierungs- und Deaktivierungsströme nachgewiesen werden.

3.2 Untersuchung von Interaktionen am hERG-Kanal

3.2.1 Untersuchung der Wirkungen der Kombinationen von Terfenadin einerseits mit Fluvoxamin, Dofetilid, Chlorbutanol und CnErg1 andererseits auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme

Bei den untersuchten Kombinationen wurden jeweils äquieffektive Konzentrationen zweier hERG-Kanal-Blocker simultan appliziert. Es wurde davon ausgegangen, dass der Anteil der Einzelsubstanzen am Gesamteffekt der Kombination unter diesen Bedingungen annähernd gleich groß ist (Chou 2006). In der folgenden Tabelle (Tab. 6) sind die in den Kombinationsuntersuchungen verwendeten Konzentrationen angegeben.

Vielfaches der IC ₅₀ - Konzentration	Terfenadin (nM)	Fluvoxamin (µM)	Dofetilid (nM)	Chlorbutanol (mM)	CnErg1 (nM)
0,125	3,5			0,9	
0,25	6,9	0,9	3,2	1,9	1,6
0,5	13,8	1,8	6,5	3,7	3,2
1	27,7	3,6	12,9	7,4	6,4
2	55,4	7,2	25,8	14,8	12,8

Tab. 6: Konzentrationen der hERG-Kanal-blockierenden Testsubstanzen, die bei den Untersuchungen von Interaktionen am hERG-Kanal verwendet wurden. Angegeben sind die in den Kombinationsuntersuchungen simultan applizierten Vielfachen der IC₅₀-Konzentrationen von Terfenadin sowie von den simultan zu Terfenadin applizierten Testsubstanzen Fluvoxamin, Dofetilid, Chlorbutanol bzw. CnErg1.

Die folgende Abbildung zeigt repräsentative Stromverläufe der Kombinationsuntersuchungen (Abb. 27).

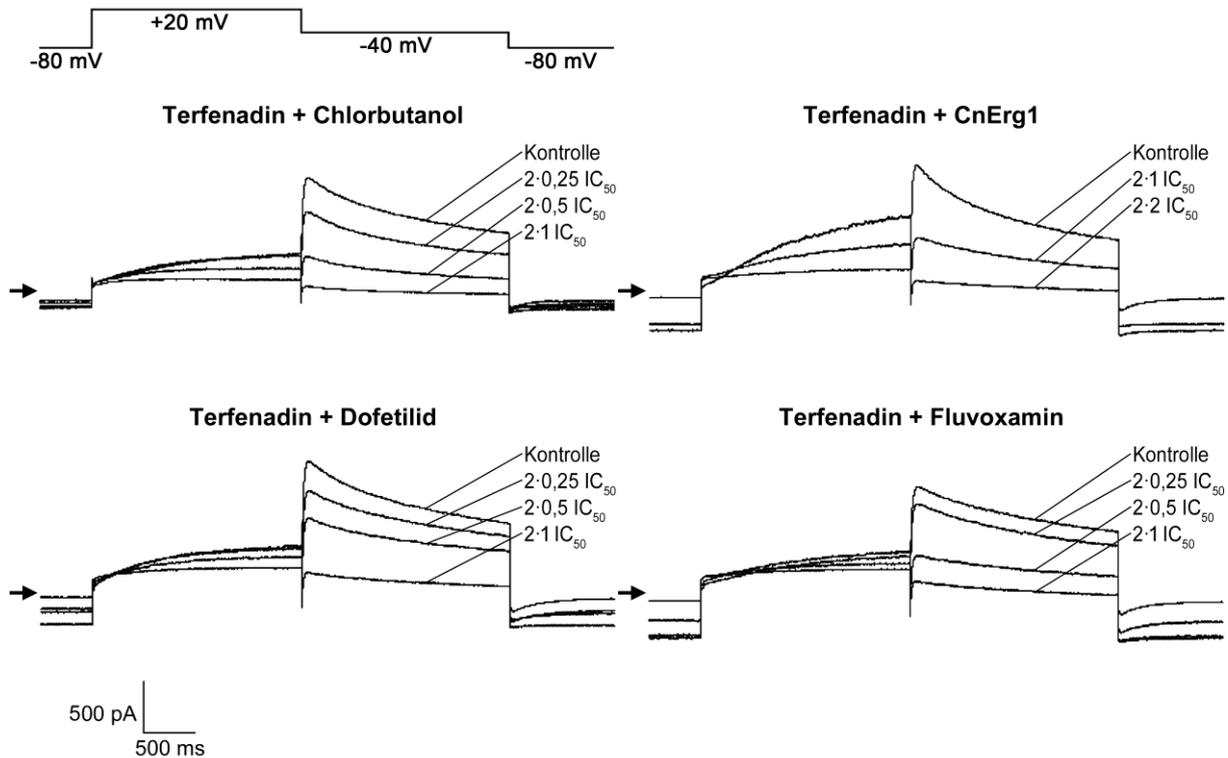


Abb. 27: Effekte der Kombinationen äquieffektiver Konzentrationen von Terfenadin mit Fluvoxamin, Dofetilid, Chlorbutanol und CnErg1 auf hERG-Ströme. Die Pfeile geben das Null-Strom-Niveau an. Das Ausmaß der Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen betrug:

Oben links: 27,2 % für 6,9 nM Terfenadin + 1,9 mM Chlorbutanol (2·0,25 IC_{50}), 62,7 % für 13,8 nM Terfenadin + 3,7 mM Chlorbutanol (2·0,5 IC_{50}) und 88,0 % für 27,7 nM Terfenadin + 7,4 mM Chlorbutanol (2·1 IC_{50}).

Oben rechts: 44,6 % für 27,7 nM Terfenadin + 6,4 nM CnErg1 (2·1 IC_{50}), 80,2 % für 55,4 nM Terfenadin + 12,8 nM CnErg1 (2·2 IC_{50}).

Unten links: 19,1 % für 6,9 nM Terfenadin + 3,2 nM Dofetilid (2·0,25 IC_{50}), 38,6 % für 13,8 nM Terfenadin + 6,5 nM Dofetilid (2·0,5 IC_{50}) und 74,9 % für 27,7 nM Terfenadin + 12,9 nM Dofetilid (2·1 IC_{50}).

Unten rechts: 7,1 % für 6,9 nM Terfenadin + 0,9 μ M Fluvoxamin (2·0,25 IC_{50}), 41,0 % für 13,8 nM Terfenadin + 1,8 μ M Fluvoxamin (2·0,5 IC_{50}) und 69,5 % für 27,7 nM Terfenadin + 3,6 μ M Fluvoxamin (2·1 IC_{50}).

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Kombinationsuntersuchungen zusammengefasst (Tab. 7):

hERG-Spitzen-Tail-Strom Blockade (%)					
Vielfaches der IC ₅₀ -Konzentration	bei Additivität berechnete hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade ¹	Terfenadin + Fluvoxamin	Terfenadin + Dofetilid	Terfenadin + Chlorbutanol	Terfenadin + CnErg1
2·0,125 IC ₅₀	20			19,7 (15,4-24,0) (n=7)	
2·0,25 IC ₅₀	33 (30,6 CnErg1)	29,9* (27,6-32,2) (n=7)	29,2 (23,2-35,2) (n=7)	33,8 (30,4-37,1) (n=9)	23,4* (18,7-28,0) (n=11)
2·0,5 IC ₅₀	50 (46,0 CnErg1)	48,7 (42,9-54,4) (n=6)	47,3 (42,2-52,4) (n=9)	63,2* (55,4-71,1) (n=8)	38,7* (33,1-44,2) (n=12)
2·1 IC ₅₀	67 (61,3 CnErg1)	66,7 (63,7-69,7) (n=7)	78,5* (73,6-83,5) (n=8)	90,8* (87,4-94,3) (n=7)	63,9 (58,7-69,0) (n=12)
2·2 IC ₅₀	80 (73,6 CnErg1)	77,4 (73,8-81,1) (n=7)	81,2 (76,5-86,0) (n=5)	95,9* (91,9-99,9) (n=8)	73,7 (67,8-79,5) (n=11)

Tab. 7: Effekte der simultanen Applikation von Terfenadin mit Fluvoxamin, Dofetilid, Chlorbutanol und CnErg1 auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme. Angegeben sind die in den Kombinationsuntersuchungen simultan applizierten Vielfachen der IC₅₀-Konzentrationen, die berechnete hERG-Strom-Blockade im Fall von Additivität und die bei den einzelnen Kombinationsuntersuchungen experimentell ermittelte Blockade der hERG-Spitzen-Tail-Ströme unter Angabe der 95 %igen Konfidenzintervalle und der Anzahl der durchgeführten Untersuchungen n.

*signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich vom errechnetem Ausmaß der hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade bei additivem Verhalten

¹Für die Kombinationsuntersuchungen mit CnErg1 wurde das Ausmaß der Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen im Fall von Additivität nach der Hill-Gleichung mit einem Wert von 0,84 für die intrinsische Aktivität berechnet und jeweils in Klammern angegeben.

Bei allen untersuchten Kombinationen von Terfenadin und Fluvoxamin wurden Effekte beobachtet, die nicht signifikant unterschiedlich zu dem im Fall von Additivität errechneten Ausmaß der Blockade waren, mit Ausnahme der Kombination von 2·0,25 IC₅₀. Bei dieser Kombination war der gemessene Effekt etwas geringer als der im Fall von Additivität berechnete Effekt. Auch bei der Kombination von Terfenadin und Dofetilid konnten additive Effekte beobachtet werden, mit Ausnahme der Kombination von 2·1 IC₅₀, bei der der gemessene Effekt etwas größer war als der Effekt im Fall von Additivität. Bei der Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol konnten bei hohen Konzentrationen deutlich superadditive Effekte nachgewiesen werden. Bei den Kombinationen mit 2·0,5 IC₅₀, 2·1 IC₅₀ und 2·2 IC₅₀ war der gemessene Effekt jeweils um 13 %, 24 % bzw. 16 % größer als der im Fall von Additivität berechnete Effekt. Bei der Kombination von Terfenadin mit CnErg1

waren die gemessenen Effekte bei den niedrigen Konzentrationen ($2 \cdot 0,25 \text{ IC}_{50}$ und $2 \cdot 0,5 \text{ IC}_{50}$) um 7 % geringer als der Effekt im Fall von Additivität, bei den höheren Konzentrationen ($2 \cdot 1 \text{ IC}_{50}$ und $2 \cdot 2 \text{ IC}_{50}$) lagen die gemessenen Werte im Bereich der Additivität.

3.2.2 Der Kombinationsindex CI

Für alle untersuchten Kombinationen wurde der Kombinationsindex (Kap. 2.9.1, Gleichung 15) berechnet und in einem sog. CI-Plot gegen den ermittelten Effekt der Kombination ($F_a = \text{Fraction affected} = \text{blockierter Anteil } 1 - I/I_C$) aufgetragen.

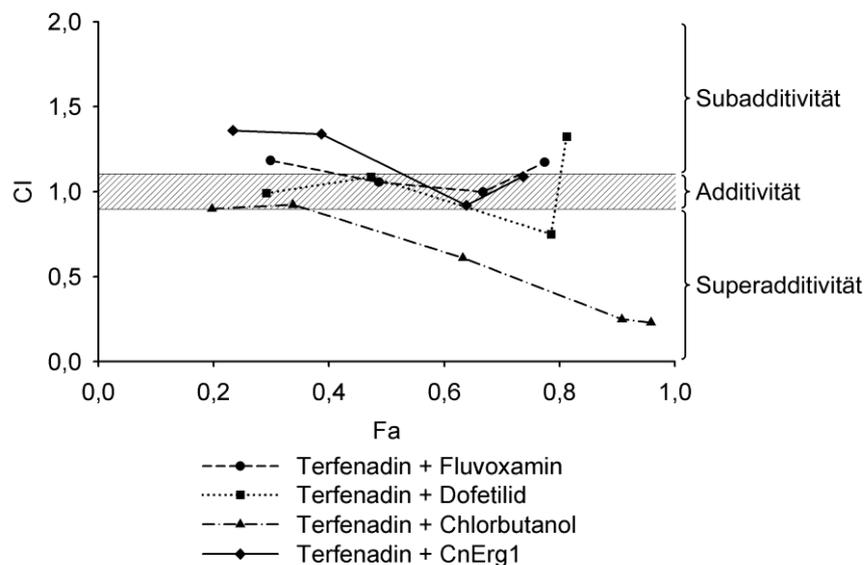


Abb. 28: CI (Kombinationsindex)-Plot für die Wirkungen der Kombinationen von Terfenadin mit Fluvoxamin, mit Dofetilid, mit Chlorbutanol und mit CnErg1 auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme. Auf der **Abszisse** ist das Ausmaß der Blockade durch die untersuchten Kombinationen dargestellt ($F_a = \text{Fraction affected} = \text{blockierter Anteil } 1 - I/I_C$). Dabei entspricht 1 einem maximalen Block von 100 %. Auf der **Ordinate** ist den einzelnen Kombinationen der berechnete Kombinationsindex CI zugeordnet (Berechnung siehe Material und Methoden Kap. 2.9.1). Der schraffierte Bereich stellt den Bereich der Additivität dar. Darüber befindet sich der Bereich der Subadditivität, darunter der Bereich der Superadditivität.

Die Abbildung 28 zeigt, dass der Kombinationsindex bei den Kombinationen von Terfenadin mit Dofetilid sowie von Terfenadin mit Fluvoxamin etwa bei 1 lag, was auf additives Verhalten hindeutet. Dagegen war der CI der Kombinationen bei geringen Konzentrationen von Terfenadin und CnErg1 größer als 1 ($\text{CI} = 1,36$ für $2 \cdot 0,25 \text{ IC}_{50}$, $\text{CI} = 1,34$ für $2 \cdot 0,5 \text{ IC}_{50}$), sodass auf leichte Subadditivität geschlossen werden kann. Bei höheren Konzentrationen wurden für die Kombination von Terfenadin mit CnErg1 jedoch CI-Werte im Additivitätsbereich ermittelt ($\text{CI} = 0,92$ für $2 \cdot 1 \text{ IC}_{50}$, $\text{CI} = 1,09$ für $2 \cdot 2 \text{ IC}_{50}$). Bei niedrigen Konzentrationen lag der Kombinationsindex für die Kombination von Terfenadin mit Chlorbutanol etwa bei 1 ($\text{CI} = 0,90$ für $2 \cdot 0,125 \text{ IC}_{50}$, $\text{CI} = 0,92$ für $2 \cdot 0,25 \text{ IC}_{50}$). Bei den

höheren Konzentrationen war der CI kleiner als 1 und nahm mit steigenden Konzentrationen deutlich ab (CI = 0,61 für 2·0,5 IC₅₀, CI = 0,25 für 2·1 IC₅₀ und CI = 0,23 für 2·2 IC₅₀).

3.2.3 Untersuchung der Interaktion zwischen Terfenadin und CnErg1

3.2.3.1 Applikation steigender CnErg1-Konzentrationen in Anwesenheit von Terfenadin

Aufgrund der leicht subadditiven Effekte, die zwischen CnErg1 und Terfenadin bei niedrigen Konzentrationen nachgewiesen wurden, wurde die Interaktion zwischen Terfenadin und CnErg1 näher untersucht. Zunächst wurde der hERG-Spitzen-Tail-Strom mit 27,7 nM Terfenadin um 50 % blockiert, und anschließend wurde CnErg1 in ansteigenden Konzentrationen von 1, 10 und 30 nM simultan appliziert. Mit Hilfe der van den Brink-Gleichung (Kap. 2.9, Gleichung 14) wurde das Ausmaß der Blockade berechnet, das bei additivem Verhalten zu erwarten wäre. Diese Werte wurden mit den tatsächlich gemessenen Werten verglichen. Die folgende Abbildung 29 zeigt repräsentative Stromverläufe dieser Untersuchung.

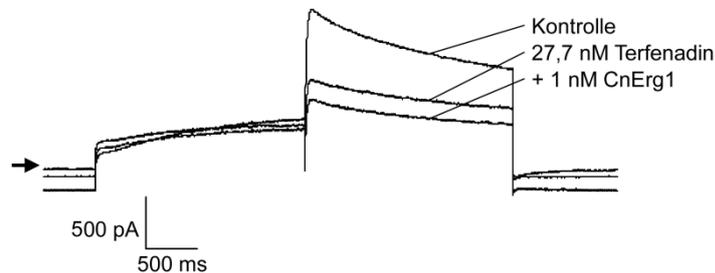


Abb. 29: Wirkungen von 27,7 nM Terfenadin allein und in Anwesenheit von 1 nM CnErg1 auf hERG-Ströme. Die Applikation von 27,7 nM Terfenadin blockierte hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 42,7 %. Das Ausmaß der Blockade bei Applikation von 1 nM CnErg1 in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin betrug 49,9 %.

In der folgenden Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zusammenfassend dargestellt:

CnErg1 (nM)	Experimentell ermittelte hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade (%)	95 % Konfidenzintervall	Anzahl der Versuche	Berechnete hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade bei Additivität (%)
1	49,6	45,9-53,2	6	52,5
3	54,5	50,7-58,3	7	56,5
10	69,2	63,5-74,9	5	65,1

Tab. 8: Ausmaß der Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen nach Applikation steigender CnErg1-Konzentrationen in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin. Angegeben sind die CnErg1-Konzentrationen, der experimentell ermittelte Block des hERG-Spitzen-Tail-Stroms mit 95 %igem Konfidenzintervall, die Anzahl der durchgeführten Untersuchungen sowie das Ausmaß der bei additivem Verhalten berechneten Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen.

Wie die Tabelle 8 zeigt, waren die gemessenen Werte der hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade für die Applikation steigender CnErg1-Konzentrationen in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin nicht signifikant unterschiedlich zu den Werten, die bei additivem Verhalten der Kombinationen zu erwarten sind.

3.2.3.2 Applikation steigender Terfenadin-Konzentrationen in Anwesenheit von CnErg1

In weiteren Untersuchungen wurde der hERG-Spitzen-Tail-Strom mit der IC_{50} -Konzentration von CnErg1 (6,4 nM) blockiert. Aufgrund der unvollständigen Blockade von hERG-Strömen durch CnErg1 wurden hERG-Spitzen-Tail-Ströme durch die IC_{50} -Konzentration von CnErg1 nur um 42 % blockiert. Anschließend wurden steigende Terfenadin-Konzentrationen von 1, 3, 10 und 30 nM simultan appliziert. Repräsentative Strömverläufe dieser Untersuchungen sind in der folgenden Abbildung 30 dargestellt.

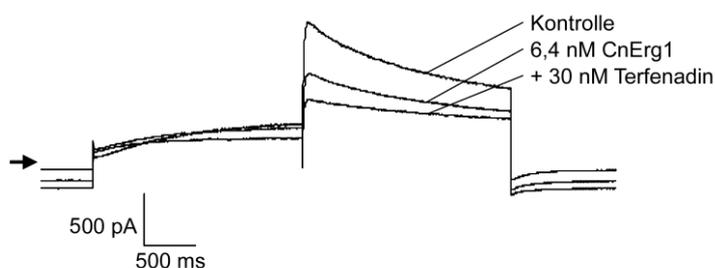


Abb. 30: Wirkung von 6,4 nM CnErg1 allein und in Anwesenheit von 30 nM Terfenadin auf hERG-Ströme. Die Applikation von 6,4 nM CnErg1 blockierte hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 31,3 %. Die anschließende Applikation von 30 nM Terfenadin in Anwesenheit von 6,4 nM CnErg1 blockierte den hERG-Spitzen-Tail-Strom um 52,0 %.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in der folgenden Tabelle 9 zusammengefasst:

Terfenadin (nM)	Experimentell ermittelte hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade (%)	95 % Konfidenzintervall	Anzahl der Versuche	Berechnete hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade bei Additivität (%)
1	38,6	36,1-41,1*	5	43,7
3	36,9	33,5-40,3*	5	45,0
10	46,7	44,3-49,2*	7	50,8
30	52,7	50,3-55,2*	8	62,2

Tab. 9: Ausmaß der Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen nach Applikation steigender Terfenadin-Konzentrationen in Anwesenheit von 6,4 nM CnErg1. Angegeben sind die Terfenadin-Konzentrationen, die experimentell ermittelte Blockade des hERG-Spitzen-Tail-Stroms mit 95 %igem Konfidenzintervall, die Anzahl der durchgeführten Untersuchungen sowie das Ausmaß der bei additivem Verhalten berechneten Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen.

*signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich vom errechnetem Ausmaß der hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade bei additivem Verhalten

In der folgenden Tabelle 10 sind die für die Untersuchungen mit Terfenadin und CnErg1 berechneten Kombinationsindices dargestellt:

CnErg1 in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin				
CnErg1 (nM)	1	3	10	
Kombinationsindex (CI)	1,13	1,11	0,83	
Terfenadin in Anwesenheit von 6,4 nM CnErg1				
Terfenadin (nM)	1	3	10	30
Kombinationsindex (CI)	1,23	1,46	1,20	1,58

Tab. 10: CI-Werte für die Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch 1, 3 und 10 nM CnErg1 in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin sowie durch 1, 3, 10 und 30 nM Terfenadin in Anwesenheit von 6,4 nM CnErg1.

Die Tabelle zeigt, dass die Kombinationsindices für die Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch ansteigende Konzentrationen von CnErg1 in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin um eins schwankten, also im Bereich der Additivität lagen. Dagegen waren die Kombinationsindices für die Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch ansteigende Terfenadin-Konzentrationen in Anwesenheit von 6,4 nM CnErg1 größer als eins, woraus auf Subadditivität geschlossen werden kann. Dies deutet darauf hin, dass die CnErg1-induzierte Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch Terfenadin kaum beeinflusst wurde,

dagegen führte CnErg1 zu einer leichten Verminderung der Terfenadin-induzierten Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen.

3.2.4 Untersuchung der Interaktion zwischen Terfenadin und Chlorbutanol

Da zwischen Terfenadin und Chlorbutanol superadditive Effekte nachgewiesen werden konnten, wurde diese Interaktion detaillierter untersucht. Dazu wurde der hERG-Strom zunächst mit einer Substanz blockiert und anschließend die andere Substanz in ansteigenden Konzentrationen simultan zugegeben.

3.2.4.1 Applikation steigender Terfenadin-Konzentrationen in Anwesenheit von Chlorbutanol

Zunächst wurden hERG-Spitzen-Tail-Ströme mit 2,5 mM Chlorbutanol um 25 % gehemmt. Anschließend wurde Terfenadin in ansteigenden Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 nM simultan appliziert. Die folgende Abbildung zeigt repräsentative Stromverläufe dieser Untersuchungen (Abb. 31).

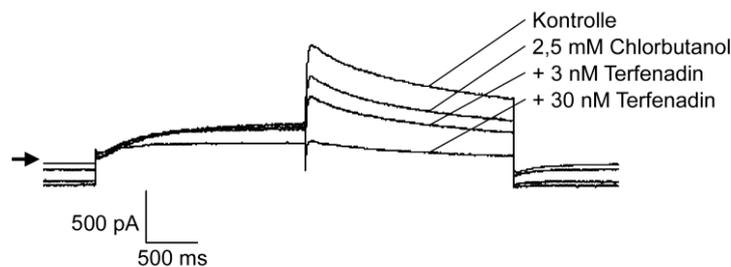


Abb. 31: Wirkungen von 2,5 mM Chlorbutanol allein und in Anwesenheit steigender Terfenadin-Konzentrationen auf hERG-Ströme. Die Applikation von 2,5 mM Chlorbutanol blockierte hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 25,3 %. Anschließend wurden simultan 3 und später 30 nM Terfenadin appliziert. Dabei betrug das Ausmaß der Blockade 37,5 % für 3 nM und 74,1 % für 30 nM Terfenadin in Anwesenheit von 2,5 mM Chlorbutanol.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle 11 zusammengefasst:

Terfenadin (nM)	Experimentell ermittelte hERG-Spitzen-Tail-Blockade (%)	95 % Konfidenzintervall	Anzahl der Versuche	Berechnete hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade bei Additivität (%)
1	28,4	24,5–32,4	14	27,2
3	34,2	28,6–39,9	11	30,8
10	51,7	49,3–54,1*	10	41,0
30	72,6	69,4–75,9*	10	58,5
100	91,6	88,2–95,01*	8	79,6

Tab. 11: Ausmaß der Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen nach Applikation steigender Terfenadin-Konzentrationen in Anwesenheit von 2,5 mM Chlorbutanol. Angegeben sind die Terfenadin-Konzentrationen, die experimentell ermittelte Blockade des hERG-Spitzen-Tail-Stroms mit 95 %igem Konfidenzintervall, die Anzahl der durchgeführten Untersuchungen sowie das Ausmaß der bei additivem Verhalten berechneten Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen.

*signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich vom errechnetem Ausmaß der hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade bei additivem Verhalten.

In einer weiteren Untersuchung wurden durch Applikation von 7,4 mM Chlorbutanol hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 50 % blockiert und anschließend analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen 1, 3, 10, 30 oder 100 nM Terfenadin in ansteigenden Konzentrationen in Anwesenheit von 7,4 mM Chlorbutanol zugegeben. Die folgende Abbildung 32 zeigt repräsentative Stromverläufe dieser Untersuchungen.

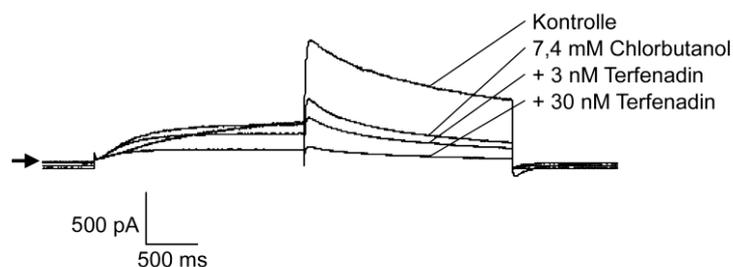


Abb. 32: Wirkungen von 7,4 mM Chlorbutanol allein und in Anwesenheit steigender Terfenadin-Konzentrationen auf hERG-Ströme. Die Applikation von 7,4 mM Chlorbutanol blockierte hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 46,6 %. Anschließend wurden simultan 3 und später 30 nM Terfenadin appliziert, dabei betrug das Ausmaß der Blockade 61,3 % für 3 nM und 85,3 % für 30 nM Terfenadin in Anwesenheit von 7,4 mM Chlorbutanol.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle 12 zusammengefasst:

Terfenadin (nM)	Experimentell ermittelte hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade (%)	95 % Konfidenzintervall	Anzahl der Versuche	Berechnete hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade bei Additivität (%)
1	63,2	56,9–69,4*	8	50,9
3	67,0	64,0–69,9*	10	52,5
10	79,0	76,2–81,7*	13	57,6
30	90,6	88,5–92,8*	10	67,4
100	97,9	96,5–99,2*	7	82,1

Tab. 12: Ausmaß der Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen nach Applikation steigender Terfenadin-Konzentrationen in Anwesenheit von 7,4 mM Chlorbutanol. Angegeben sind die Terfenadin-Konzentrationen, die experimentell ermittelte Blockade des hERG-Spitzen-Tail-Stroms mit 95 %igem Konfidenzintervall, die Anzahl der durchgeführten Untersuchungen sowie das Ausmaß der bei additivem Verhalten berechneten Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen.

*signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich vom errechnetem Ausmaß der hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade bei additivem Verhalten.

In der folgenden Abbildung 33 sind die CI-Plots für die in den Tabellen 11 und 12 zusammengefassten Ergebnisse dargestellt:

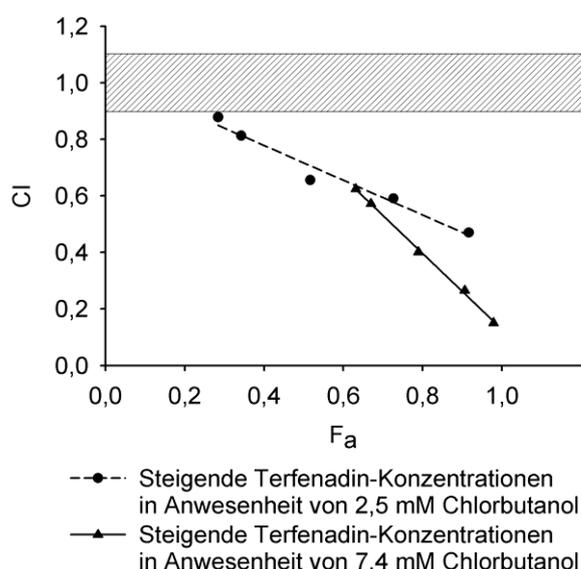


Abb. 33: CI-Plot für die Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch ansteigende Terfenadin-Konzentrationen in Anwesenheit von 2,5 mM bzw. 7,4 mM Chlorbutanol. Auf der Abszisse ist der durch die Kombinationen hervorgerufene blockierte Anteil der hERG-Spitzen-Tail-Ströme angegeben (F_a = Fraction affected = blockierter Anteil $1 - I/I_C$). Dabei entspricht 1 einem maximalen Block von 100 %. Auf der Ordinate ist den einzelnen Kombinationen der Kombinationsindex CI zugeordnet (Berechnung siehe Methoden Kap. 2.9.1). Der schraffierte Bereich stellt den Bereich der Additivität dar. Darüber befindet sich der Bereich der Subadditivität, darunter der Bereich der Superadditivität. Untersucht wurden 1, 3, 10, 30 und 100 nM Terfenadin jeweils in Anwesenheit von 2,5 bzw. 7,4 mM Chlorbutanol.

In der Abbildung 33 ist der für die jeweilige Kombination gemessene blockierte Anteil der hERG-Spitzen-Tail-Ströme (F_a = Fraction affected = blockierter Anteil $1-I/I_C$) gegen den Kombinationsindex CI aufgetragen. Die dargestellten Regressionsgeraden weisen eine unterschiedliche Steilheit auf. Die Regressionsgerade für die Auftragung des CI gegen F_a für die Applikation steigender Terfenadin-Konzentrationen in Anwesenheit von 2,5 mM Chlorbutanol wies eine Steigung von -0,62 auf, der Korrelationskoeffizient betrug 0,98. Die Regressionsgerade für die Auftragung des CI gegen F_a für die Applikation steigender Terfenadin-Konzentrationen in Anwesenheit von 7,4 mM Chlorbutanol war steiler, ihr Anstieg betrug -1,35, der Korrelationskoeffizient betrug 1,00. Aus der zunehmenden Steilheit der Geraden in Anwesenheit ansteigender Chlorbutanol-Konzentrationen kann geschlussfolgert werden, dass Chlorbutanol konzentrationsabhängig die Wirkungen von Terfenadin auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme verstärkt.

3.2.4.2 Applikation steigender Chlorbutanol-Konzentrationen in Anwesenheit von Terfenadin

In weiteren Untersuchungen wurde die Wirkung steigender Chlorbutanol-Konzentrationen in Anwesenheit von Terfenadin auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme untersucht. Zunächst wurde der hERG-Spitzen-Tail-Strom mit 9,2 nM Terfenadin um 25 % gehemmt. Anschließend wurden folgende Chlorbutanol-Konzentrationen simultan in ansteigender Konzentration appliziert: 0,1, 0,3, 1, 3 und 10 mM. Repräsentative Ströme sind in Abbildung 34 dargestellt.

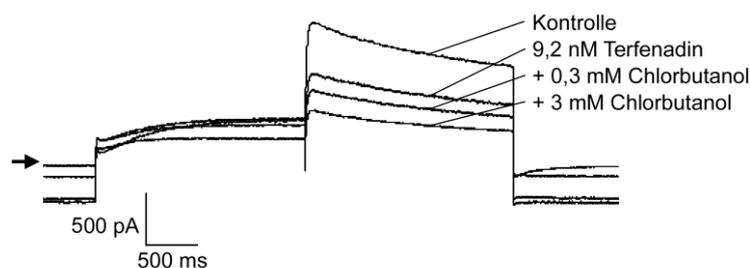


Abb. 34: Wirkungen von 9,2 nM Terfenadin allein und in Anwesenheit steigender Chlorbutanol-Konzentrationen auf hERG-Ströme. Die Applikation von 9,2 nM Terfenadin blockierte hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 24,7 %. Anschließend wurden simultan 0,3 mM und später 3 mM Chlorbutanol appliziert, dabei betrug das Ausmaß der Blockade 38,0 % für 0,3 mM und 58,1 % für 3 mM Chlorbutanol in Anwesenheit von 9,2 nM Terfenadin.

In der folgenden Tabelle 13 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt.

Chlorbutanol (mM)	Experimentell ermittelte hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade (%)	95 % Konfidenzintervall	Anzahl der Versuche	Berechnete hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade bei Additivität (%)
0,1	26,0	22,5–29,5	8	25,5
0,3	36,2	32,6–39,8*	12	26,9
1	53,1	48,9–57,2*	7	31,7
3	59,0	54,4–63,7*	13	42,3
10	87,3	85,2–89,4*	10	62,7

Tab. 13: Ausmaß der Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen nach Applikation steigender Chlorbutanol-Konzentrationen in Anwesenheit von 9,2 nM Terfenadin. Angegeben sind die Chlorbutanol-Konzentrationen, die experimentell ermittelte Blockade des hERG-Spitzen-Tail-Stroms mit 95 %igem Konfidenzintervall, die Anzahl der durchgeführten Untersuchungen sowie das Ausmaß der bei additivem Verhalten berechneten Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen.

*signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich vom errechnetem Ausmaß der hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade bei additivem Verhalten

In einer weiteren Untersuchung wurden durch Applikation von 27,7 nM Terfenadin hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 50 % blockiert und anschließend analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen 0,3, 1, 3 und 10 mM Chlorbutanol in ansteigenden Konzentrationen in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin zugegeben. Die folgende Abbildung zeigt repräsentative Stromverläufe dieser Untersuchungen.

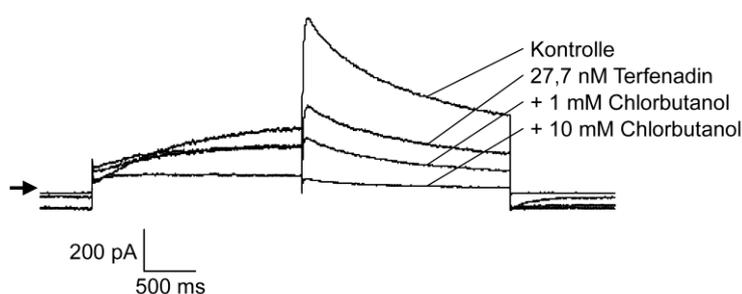


Abb. 35: Wirkungen von 27,7 nM Terfenadin allein und in Anwesenheit steigender Chlorbutanol-Konzentrationen auf hERG-Ströme. Die Applikation von 27,7 nM Terfenadin blockierte hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 47,7 %. Anschließend wurden simultan 1 mM und später 10 mM Chlorbutanol appliziert, dabei betrug das Ausmaß der Blockade 65,7 % für 1 mM und 93,2 % für 10 mM Chlorbutanol in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Chlorbutanol (mM)	Experimentell ermittelte hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade (%)	95 % Konfidenzintervall	Anzahl der Versuche	Berechnete hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade bei Additivität (%)
0,3	60,39	56,01–64,77*	9	51,0
1	64,88	60,58–69,18*	8	53,2
3	78,56	74,61–82,51*	10	58,4
10	93,09	90,61–95,57*	11	70,2

Tab. 14: Ausmaß der Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen nach Applikation steigender Chlorbutanol-Konzentrationen in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin. Angegeben sind die Chlorbutanol-Konzentrationen, die experimentell ermittelte Blockade des hERG-Spitzen-Tail-Stroms mit 95 %igem Konfidenzintervall, die Anzahl der durchgeführten Untersuchungen sowie das Ausmaß der bei additivem Verhalten berechneten Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen.

*signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich vom errechnetem Ausmaß der hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade bei additivem Verhalten

In der folgenden Abbildung 36 sind die in den Tabellen 13 und 14 gezeigten Ergebnisse graphisch als CI-Plots dargestellt:

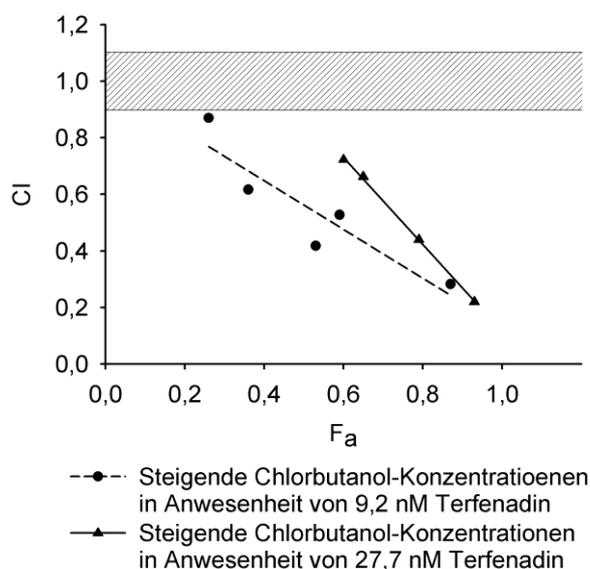


Abb. 36: CI-Plot für die Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch ansteigende Chlorbutanol-Konzentrationen in Anwesenheit von 9,2 nM bzw. 27,7 nM Terfenadin. Auf der Abszisse ist der durch die Kombinationen hervorgerufene blockierte Anteil der hERG-Spitzen-Tail-Ströme angegeben (F_a = Fraction affected = blockierter Anteil $1 - I/I_C$). Dabei entspricht 1 einem maximalen Block von 100 %. Auf der Ordinate ist den einzelnen Kombinationen der Kombinationsindex CI zugeordnet (Berechnung siehe Methoden Kap. 2.9.1). Der schraffierte Bereich stellt den Bereich der Additivität dar. Darüber befindet sich der Bereich der Subadditivität, darunter der Bereich der Superadditivität. Untersucht wurden 0,1, 0,3, 1, 3 und 10 mM Chlorbutanol in Anwesenheit von 9,2 nM Terfenadin und 0,3, 1, 3 und 10 mM Chlorbutanol in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin.

Analog zu den vorangegangenen Untersuchungen wurden durch die Messwerte lineare Regressionen gelegt. Diese ergaben für die Auftragung des CI gegen Fa für die Applikation steigender Chlorbutanol-Konzentrationen in Anwesenheit von 9,2 nM Terfenadin einen Geradenanstieg von -0,86 und einen Korrelationskoeffizienten von 0,92, sowie einen Anstieg von -1,54 und einen Korrelationskoeffizienten von 1,00 bei Applikation steigender Chlorbutanol-Konzentrationen in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin. Aus der zunehmenden Steilheit der Regressionsgeraden in Anwesenheit ansteigender Terfenadin-Konzentrationen kann darauf geschlossen werden, dass Terfenadin konzentrationsabhängig die Wirkungen von Chlorbutanol auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme verstärkte.

Zusammenfassend kann aus den Untersuchungen geschlussfolgert werden, dass Chlorbutanol zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der durch Terfenadin vermittelten hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade führte, und dass Terfenadin zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der durch Chlorbutanol vermittelten hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade führte.

3.3 Untersuchungen des Einflusses von Terfenadin, Chlorbutanol und der Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol auf hERG Ströme

Die Interaktionsuntersuchungen haben gezeigt, dass sich Terfenadin und Chlorbutanol gegenseitig in ihren hERG-Strom-hemmenden Eigenschaften verstärken. Daraus kann vermutet werden, dass die beiden Substanzen mit unterschiedlichen Bindungsstellen am hERG-Kanal interagieren. Würden beide Substanzen an die gleiche Bindungsstelle binden (kompetitive Interaktion), dann wären nur additive Effekte zu erwarten. Das Ziel der folgenden Untersuchungen war daher, den Mechanismus der Interaktion und damit die Bindungsstellen von Terfenadin und Chlorbutanol näher zu charakterisieren, um so auch die synergistischen Effekte erklären zu können. Zur Untersuchung der Zeit- und Spannungsabhängigkeit der Blockade von hERG-Strömen durch Terfenadin und Chlorbutanol wurden die halbmaximalen Hemmkonzentrationen untersucht: 27,7 nM Terfenadin und 7,4 mM Chlorbutanol. Zur Untersuchung der Kombination der beiden Substanzen wurde jeweils die halbe IC₅₀-Konzentration der beiden Substanzen kombiniert: 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol.

3.3.1 Untersuchungen der Spannungsabhängigkeit der hERG-Strom-Reduktion durch Chlorbutanol, durch Terfenadin und durch die Kombination der beiden Substanzen

3.3.1.1 Einfluss der Dauer des Aktivierungspulses auf die halbmaximale Aktivierungsspannung

Gemäß einer Arbeit von Schönherr et al. (1999) schwanken die publizierten Werte für die halbmaximale Aktivierungsspannung des hERG-Kanals von -24 bis +6 mV. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die halbmaximale Aktivierungsspannung von dem verwendeten Pulsprotokoll abhängt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher geprüft, welchen Einfluss die Dauer des Aktivierungspulses auf die halbmaximale Aktivierungsspannung hat. Dazu wurden Testpulse auf Membranpotentiale von -40 mV bis +40 mV in 10 mV-Schritten ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV appliziert, denen jeweils ein Repolarisationspuls auf -40 mV über eine Dauer von 2 s folgte. Die Dauer des Depolarisationspulses betrug 2, 5 bzw. 12 s. Die Abbildung 37 zeigt repräsentative Stromverläufe dieser Untersuchungen.

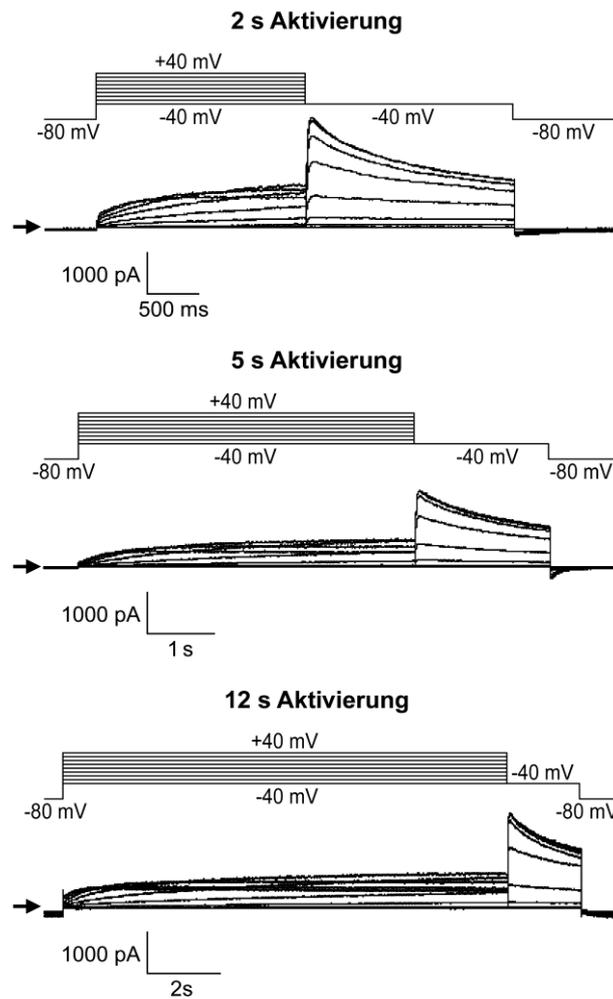


Abb. 37: Einfluss der Dauer des Aktivierungspulses auf die Kinetik der hERG-Kanal-Aktivierung. Dargestellt sind jeweils das Pulsprotokoll sowie ein repräsentativer Versuch unter Kontrollbedingungen. Die Pfeile geben das Null-Strom-Niveau an.

Die folgende Abbildung 38 zeigt die mit der Boltzmann-Funktion angepassten Aktivierungskurven unter Kontrollbedingungen in Abhängigkeit von der Dauer des Aktivierungspulses.

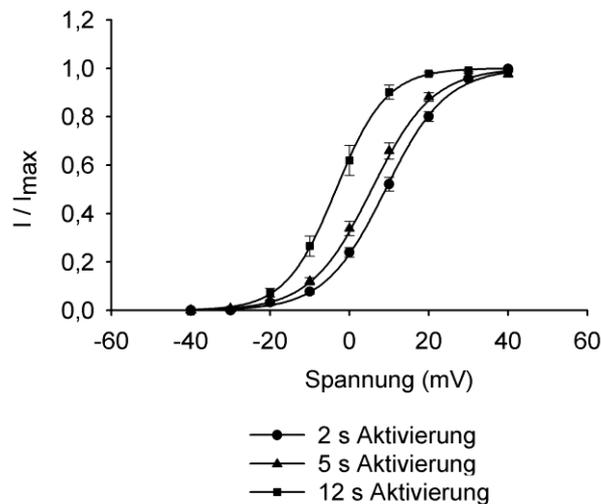


Abb. 38: Einfluss der Dauer des Aktivierungspulses auf die halbmaximale Aktivierungsspannung. Dargestellt sind die Aktivierungskurven unter Kontrollbedingungen bei einer Aktivierungsdauer von 2 s (▲, $n = 28$), von 5 s (●, $n = 30$) und von 12 s (■, $n = 7$). **Ordinate:** Die Spitzen-Tail-Stromamplituden unter Kontrollbedingungen wurden auf die jeweiligen maximalen hERG-Tail-Stromamplituden innerhalb jeden Versuches normalisiert. **Abszisse:** Membranspannung zur Aktivierung der hERG-Ströme in mV. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte und die vertikalen Linien die S.E.M. Die Kurven wurden mit der Boltzmann-Funktion angepasst (Kap. 2.8.13, Gleichung 12).

Bei einer Aktivierungsdauer von 2 s betrug die halbmaximale Aktivierungsspannung $V_{1/2}$ $9,1 \pm 0,3$ mV, die Steigung der Kurve k betrug $7,6 \pm 0,3$ mV. Bei einer Erhöhung der Dauer des Aktivierungspulses auf 5 s wurde die Spannungskurve signifikant zu negativeren Potentialen verschoben, $V_{1/2}$ betrug $5,6 \pm 0,4$ mV und k betrug $7,7 \pm 0,4$ mV. Bei weiterer Verlängerung des Aktivierungspulses auf 12 s wurde die halbmaximale Aktivierungsspannung weiter signifikant zu negativeren Potentialen verschoben, dabei betrug $V_{1/2}$ $-3,4 \pm 0,5$ mV und k betrug $6,4 \pm 0,5$ mV. Die Untersuchungen zeigen, dass es mit zunehmender Dauer des Aktivierungspulses zu einer Abnahme der halbmaximalen Aktivierungsspannung kam. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurde im Folgenden mit einer Aktivierungspulsdauer von 2 s untersucht. Es wurden die relativen Änderungen der halbmaximalen Aktivierungsspannungen untersucht.

3.3.1.2 Untersuchungen der Wirkungen von Terfenadin, Chlorbutanol und der Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol auf die Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Aktivierung

Zur Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der Reduktion von hERG-Strömen durch Terfenadin und Chlorbutanol wurden ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV Testpulse auf Membranpotentiale von -40 mV bis +40 mV in 10 mV-Schritten über eine

Dauer von 2 s appliziert, denen jeweils ein Repolarisationspuls auf -40 mV über eine Dauer von 2 s folgte.

Repräsentative Stromverläufe sind in der folgenden Abbildung 39, jeweils unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluss von 27,7 nM Terfenadin, von 7,4 mM Chlorbutanol sowie unter dem Einfluss der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol dargestellt.

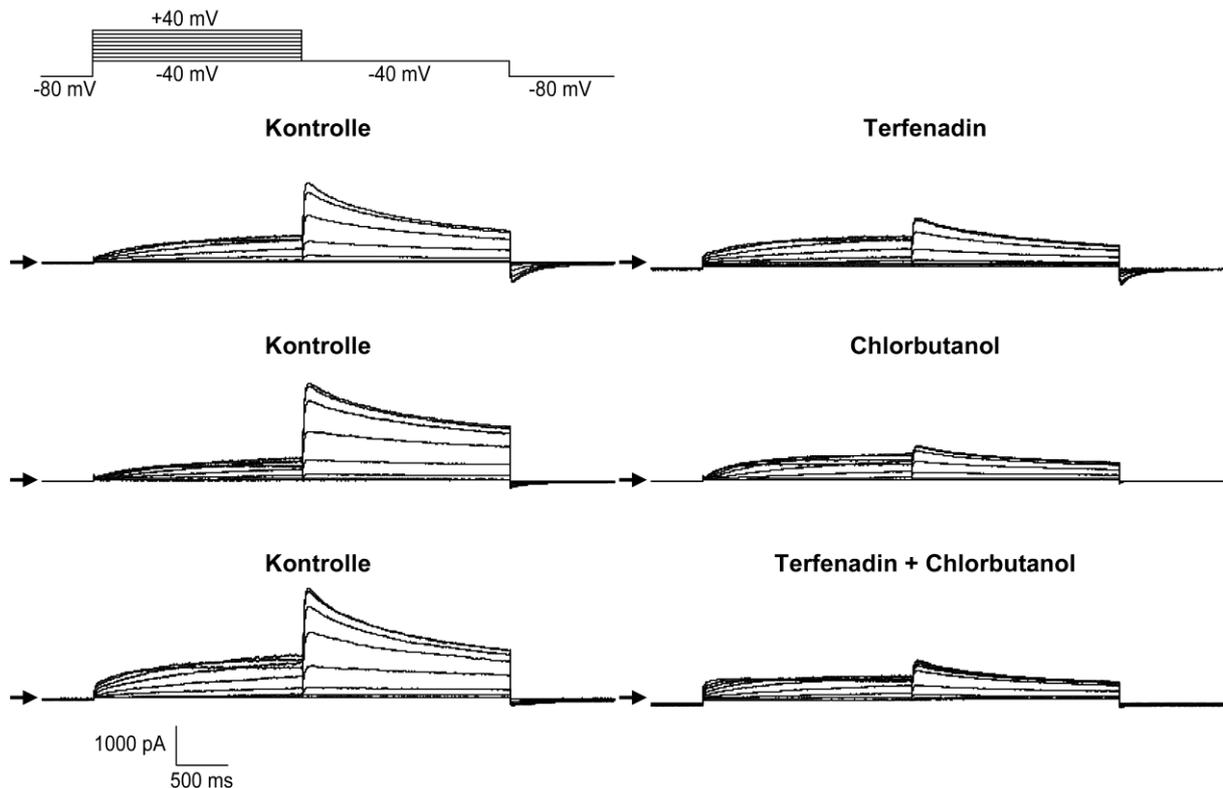


Abb. 39: Einfluss der Wirkung von Terfenadin, Chlorbutanol und der Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination auf die Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Aktivierung. Dargestellt sind das Pulsprotokoll (oben links) sowie 3 repräsentative Versuche jeweils unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin (oben), von 7,4 mM Chlorbutanol (Mitte) und der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 nM Chlorbutanol (unten) auf die Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Aktivierung. Die Pfeile geben jeweils das Null-Strom-Niveau an.

Zur Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung wurden die Spitzen-Tail-Stromamplituden unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 7,4 mM Chlorbutanol, von 27,7 nM Terfenadin und der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol auf die Maximalamplitude innerhalb desselben Versuches bezogen und als Funktion der angelegten Membranspannung dargestellt. Die folgende Abbildung 40 zeigt die Aktivierungskurven unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 7,4 mM Chlorbutanol, von 27,7 nM Terfenadin und der Kombination von 3,7 mM Chlorbutanol und

13,8 nM Terfenadin. Die Kurven wurden jeweils mit der Boltzmann-Funktion (Kap. 2.8.13, Gleichung 12) angepasst.

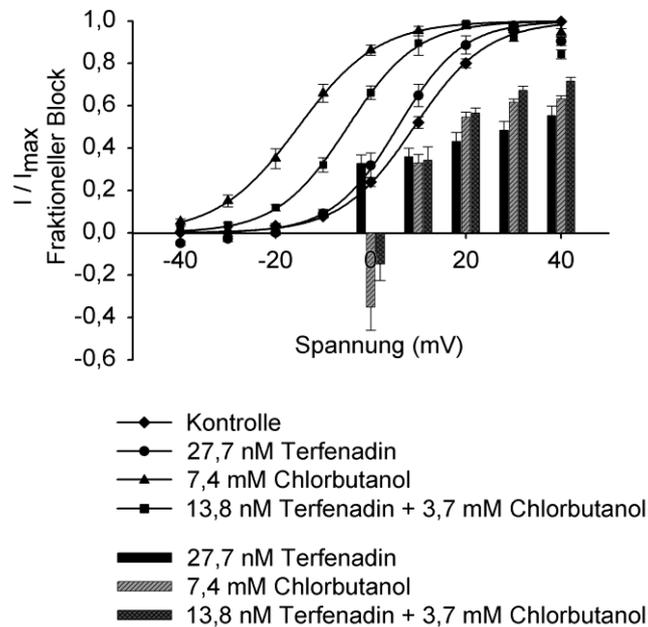


Abb. 40: Einfluss von 27,7 nM Terfenadin, 7,4 mM Chlorbutanol und der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol auf die Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Aktivierung. Liniengraph: Dargestellt sind die Aktivierungskurven unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin, 7,4 mM Chlorbutanol und der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol. **Ordinate:** Die Spitzen-Tail-Stromamplituden unter Kontrollbedingungen (\diamond Abwesenheit von Substanzen; $n = 28$), nach Applikation von 27,7 nM Terfenadin (\bullet ; $n = 8$), nach Applikation von 7,4 mM Chlorbutanol (\blacktriangle ; $n = 11$) und nach Applikation der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol (\blacksquare ; $n = 9$) wurden auf die jeweiligen maximalen hERG-Spitzen-Tail-Stromamplituden innerhalb jedes Versuches normalisiert. **Abszisse:** Membranspannung zur Aktivierung der hERG-Ströme in mV. Die Kurven wurden mit der Boltzmann-Funktion angepasst (Kap. 2.8.13, Gleichung 12). Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte und die vertikalen Linien die S.E.M. **Balkendiagramm:** Dargestellt ist die Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch 27,7 nM Terfenadin (schwarze Balken), 7,4 mM Chlorbutanol (grau schraffierte Balken) und durch die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol (dunkelgrau karierte Balken) in Abhängigkeit von der Membranspannung. **Ordinate:** Fraktioneller Block ($1 - I/I_c$) von hERG-Spitzen-Tail-Strömen. **Abszisse:** Membranspannung zur Aktivierung von hERG-Strömen in mV.

Unter Kontrollbedingungen betragen die halbmaximalen Aktivierungsspannungen des hERG-Stroms ($V_{1/2}$) und die Parameter für die Steigung der Kurven (k) $9,1 \pm 0,3$ mV und $7,7 \pm 0,3$ mV ($n = 28$), in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin $5,7 \pm 1,1$ mV und $6,8 \pm 0,9$ mV ($n = 8$); in Anwesenheit von 7,4 mM Chlorbutanol $-15,2 \pm 0,6$ mV und $8,4 \pm 0,5$ mV ($n = 11$) und in Anwesenheit der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol $-4,9 \pm 0,7$ mV und $7,4 \pm 0,6$ mV ($n = 9$). Sowohl 7,4 mM Chlorbutanol als auch die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol zeigten einen signifikanten Einfluss auf die halbmaximale Aktivierungsspannung der hERG-Kanäle (Verschiebung zu negativeren

Potentialen, $p < 0,05$). Dabei war das Ausmaß der Verschiebung unter Chlorbutanol allein am größten (Chlorbutanol: $\Delta 24,3$ mV, Kombination: $\Delta 14,0$ mV, Terfenadin: $\Delta 3,4$ mV). Die geringste Linksverschiebung der Aktivierungskurve wurde unter dem Einfluss von 27,7 nM Terfenadin beobachtet ($p > 0,05$). Die halbmaximale Aktivierungsspannung unter dem Einfluss von 7,4 mM Chlorbutanol war signifikant kleiner als die halbmaximale Aktivierungsspannung unter dem Einfluss der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol, dagegen war die halbmaximale Aktivierungsspannung unter dem Einfluss von 27,7 nM Terfenadin signifikant größer als die halbmaximale Aktivierungsspannung unter dem Einfluss der Kombination ($p < 0,05$). Der Effekt der Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol lag demzufolge zwischen den Effekten der Einzelsubstanzen.

Das Ausmaß der Reduktion von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch 27,7 nM Terfenadin, durch 7,4 mM Chlorbutanol sowie durch die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol variierte mit der angelegten Membranspannung. Bei 0 mV konnte sowohl für 7,4 mM Chlorbutanol ($-35,2 \pm 10,8$ %) als auch für die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol ($-14,8 \pm 7,7$ %) ein stimulierender Effekt auf die hERG-Spitzen-Tail-Ströme nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu führte die Applikation von 27,7 nM Terfenadin bei einer Membranspannung von 0 mV zu einer hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade um $32,8 \pm 4,1$ %. Bei positiveren Testpotentialen wurden nach der Applikation von 7,4 mM Chlorbutanol sowie der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol hemmende Effekte nachgewiesen, die mit steigender Depolarisationsspannung zunahmen. Nach Applikation von 27,7 nM Terfenadin, von 7,4 mM Chlorbutanol sowie nach Applikation der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol nahm die Reduktion der Spitzen-Tail-Stromamplitude zwischen Membranpotentialen von +10 mV und +40 mV signifikant zu (27,7 nM Terfenadin: von $36,0 \pm 4,0$ % bei +10 mV auf $55,4 \pm 4,5$ % bei +40 mV ($p < 0,05$); 7,4 mM Chlorbutanol: von $33,2 \pm 3,8$ % bei +10 mV auf $63,2 \pm 1,5$ % bei +40 mV ($p < 0,005$); Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol: von $34,2 \pm 4,0$ % bei +10 mV auf $71,6 \pm 1,9$ % bei +40 mV ($p < 0,005$)).

3.3.1.3 Untersuchungen der Wirkungen von Terfenadin, Chlorbutanol und der Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol auf die Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Inaktivierung

Für die Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Inaktivierung unter dem Einfluss von Terfenadin, Chlorbutanol und der Kombination von Terfenadin und

Chlorbutanol wurde ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV ein Depolarisationspuls auf +40 mV über eine Dauer von 2 s appliziert, was zur Inaktivierung von hERG-Strömen führte. Anschließend wurden kurze Testpulse (10 ms) von -120 mV bis +60 mV in 10 mV-Schritten appliziert, was zu einer unterschiedlich starken Erholung der hERG-Ströme von der Inaktivierung führte. Beim anschließenden Depolarisationspuls auf +40 mV über eine Dauer von 1 s wurden Tail-Ströme ausgelöst. Die folgende Abbildung 41 zeigt repräsentative Stromverläufe dieser Untersuchungen.

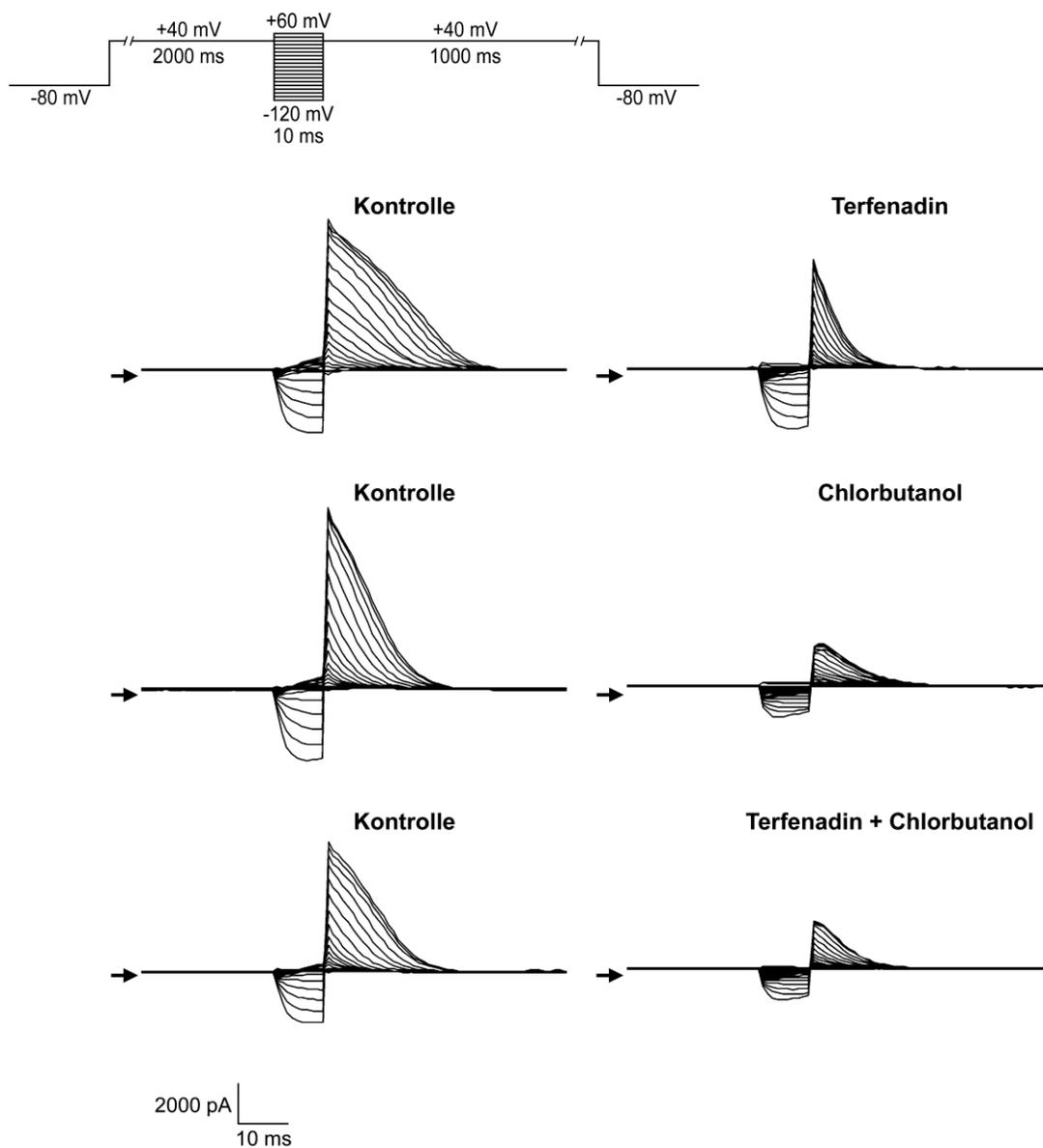


Abb. 41: Einfluss der Wirkungen von Terfenadin, Chlorbutanol und der Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination auf die Spannungsabhängigkeit der hERG-Kanal-Inaktivierung. Dargestellt sind das Pulsprotokoll (oben links) sowie 3 repräsentative Versuche jeweils unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin (oben), von 7,4 mM Chlorbutanol (Mitte) und der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol (unten). Die Pfeile geben jeweils das Null-Strom-Niveau an.

Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung des hERG-Kanals wurde mit einer modifizierten Boltzmann-Funktion angepasst (Kap. 2.8.13, Gleichung 13). Da die Kurven gegen ein Plateau und nicht gegen Null laufen, wurde der Faktor a eingeführt, der den Wert angibt, gegen den sich die Kurven asymptotisch annäherten (Abb. 42).

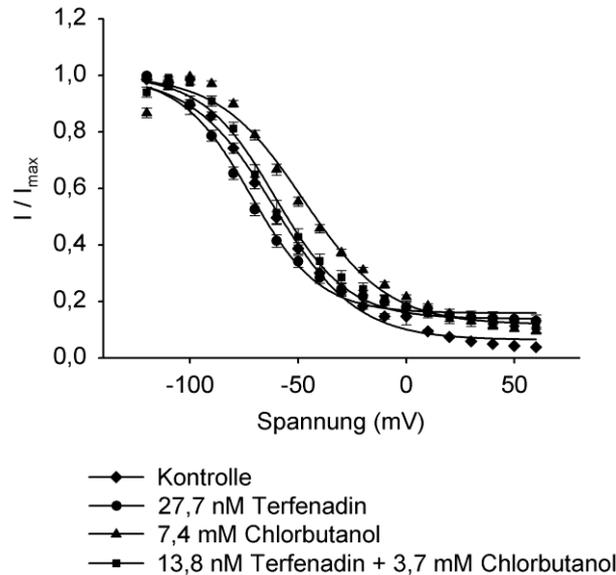


Abb. 42: Einfluss von 27,7 nM Terfenadin, 7,4 mM Chlorbutanol und der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von hERG-Strömen. Dargestellt sind die Kurven, die die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin, von 7,4 mM Chlorbutanol und der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol beschreiben. **Ordinate:** Nach Depolarisation auf +40 mV wurden unterschiedliche Repolarisationspulse von -120 mV bis +20 mV appliziert. Es wurden die Tail-Ströme 2 ms nach Beginn des Repolarisationspulses unter Kontrollbedingungen (\blacklozenge , n = 27), nach Applikation von 27,7 nM Terfenadin (\bullet , n = 9), nach Applikation von 7,4 mM Chlorbutanol (\blacktriangle , n = 9) und nach Applikation der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol (\blacksquare , n = 9) auf den jeweiligen maximalen Tail-Strom 2 ms nach Beginn des Repolarisationspulses in Ab- und Anwesenheit der Substanz innerhalb jedes Versuches normalisiert. **Abszisse:** Membranspannung zur Inaktivierung der hERG-Ströme in mV. Die Kurven wurden mit einer modifizierten Boltzmann-Funktion angepasst (Kap. 2.8.13, Gleichung 13). Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte und die vertikalen Linien die S.E.M.

Die halbmaximale Inaktivierungsspannung des hERG-Stroms ($V_{1/2}$), der Parameter für die Steigung der Kurve (k) und das Plateau (a) gegen das sich die Kurve asymptotisch annäherte betragen unter Kontrollbedingungen $-60,9 \pm 0,7$ mV, $-19,2 \pm 0,6$ mV und $0,06 \pm 0,01$ (n = 27), in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin $-72,1 \pm 0,9$ mV, $-16,1 \pm 0,8$ mV und $0,16 \pm 0,01$ (n = 9), in Anwesenheit von 7,4 mM Chlorbutanol $-47,5 \pm 0,8$ mV, $-19,6 \pm 0,7$ mV und $0,12 \pm 0,01$ (n = 9) und in Anwesenheit der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol $-60,6 \pm 1,0$ mV, $-16,7 \pm 0,9$ mV und $0,14 \pm 0,01$ (n = 9). In Anwesenheit von 7,4 mM Chlorbutanol kam es zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der halbmaximalen Inaktivierungsspannung ($\Delta 13,4$ mV). Dagegen kam es unter dem Einfluss

von 27,7 nM Terfenadin zu einer signifikanten Verschiebung der halbmaximalen Inaktivierungsspannung zu negativeren Potentialen (Δ 11,2 mV). Die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol führte zu keiner signifikanten Änderung der halbmaximalen Inaktivierungsspannung (Δ 0,3 mV).

3.3.1.4 Untersuchungen der Wirkungen von Terfenadin, Chlorbutanol und der Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol auf die Deaktivierung und die Erholung der hERG-Ströme von der Inaktivierung

Zur Untersuchung der Deaktivierung und der Erholung der hERG-Ströme von der Inaktivierung wurde ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV ein Depolarisationspuls auf +40 mV über eine Dauer von 2 s appliziert, dabei kommt es zur Aktivierung und gleichzeitig zur Inaktivierung von hERG-Kanälen. Anschließend wurden Repolarisationspulse von -120 mV bis +20 mV in 20 mV-Schritten über eine Dauer von 2 s appliziert, wodurch sich die hERG-Kanäle von der Inaktivierung erholten und anschließend deaktivierten. Die folgende Abbildung 43 zeigt repräsentative Stromverläufe dieser Untersuchungen.

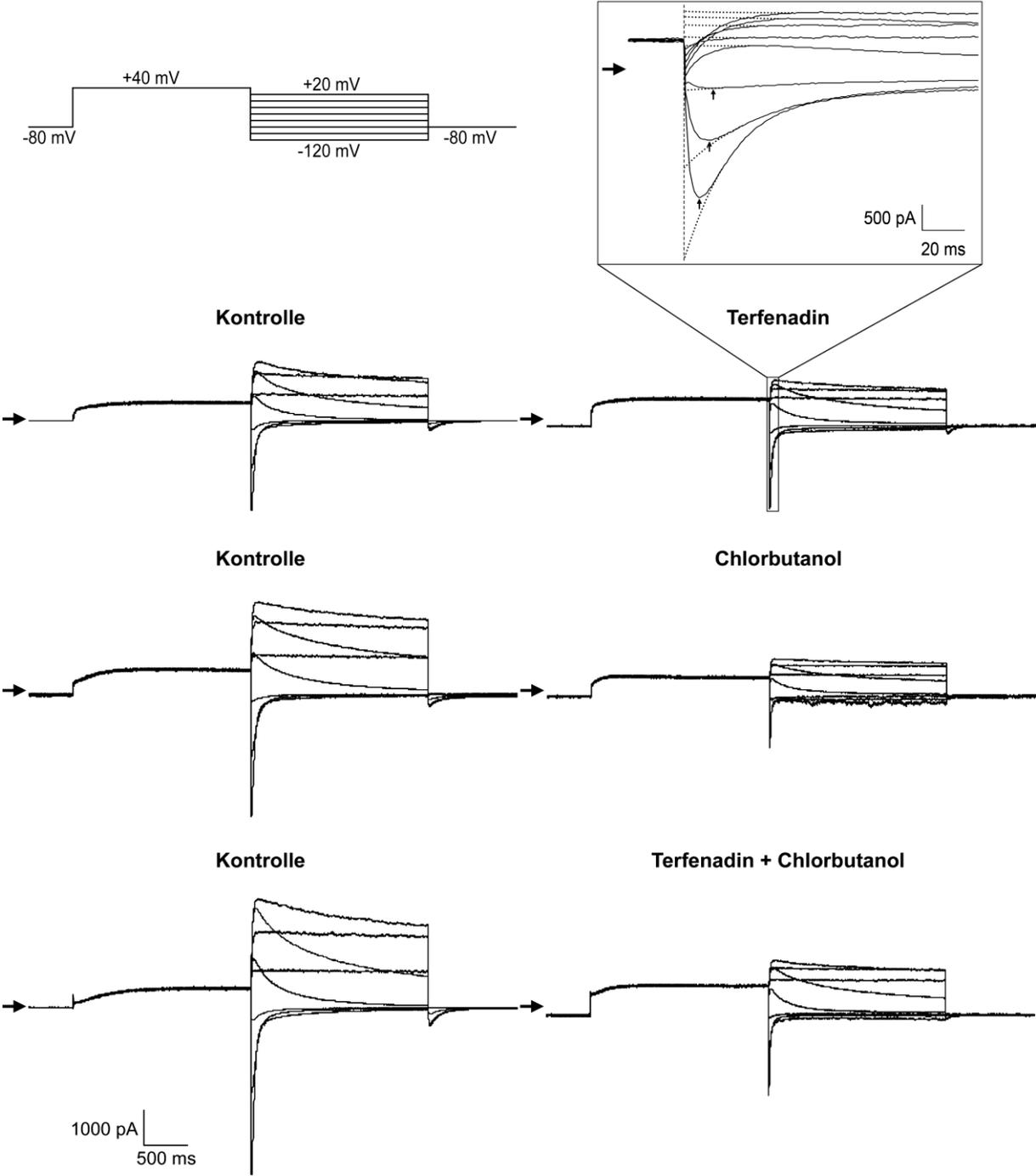


Abb. 43: Einfluss der Wirkungen von Terfenadin, Chlorbutanol und der Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination auf die Spannungsabhängigkeit der Erholung von hERG-Strömen von der Inaktivierung sowie auf die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung von hERG-Strömen. Dargestellt sind das Pulsprotokoll (oben links) sowie 3 repräsentative Versuche jeweils unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin (oben), von 7,4 mM Chlorbutanol (Mitte) und der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol (unten). Die Pfeile geben jeweils das Null-Strom-Niveau an. Die Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung wurde ermittelt, indem der Strom vom Beginn des Hyperpolarisationspulses bis zum Maximum (durch Pfeil markiert, oben rechts) mit einer Exponentialfunktion angepasst wurde. Die Zeitkonstanten der Deaktivierung wurden ermittelt, indem der Strom vom Maximum (durch Pfeile markiert, oben rechts) bis zum Ende des Hyperpolarisationspulses mit einer doppelten Exponentialfunktion angepasst wurde und auf den Beginn des Hyperpolarisationspulses extrapoliert wurde (gestrichelte Linien, oben rechts).

In der folgenden Abbildung 44 ist die Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung gegen das Membranpotential unter Kontrollbedingungen, unter dem Einfluss von 27,7 nM Terfenadin, von 7,4 mM Chlorbutanol und unter dem Einfluss der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol aufgetragen.

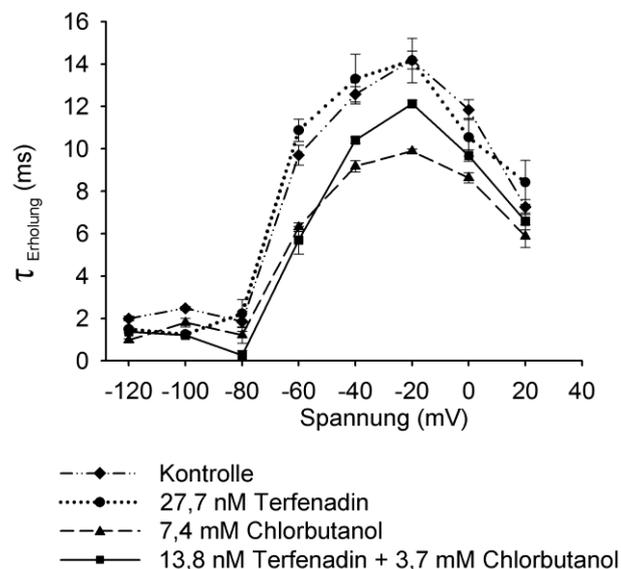


Abb. 44: Abhängigkeit der Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung vom Membranpotential. Dargestellt ist die Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung (Ordinate) unter Kontrollbedingungen (\blacklozenge , $n = 30$), unter dem Einfluss von 27,7 nM Terfenadin (\bullet , $n = 11$), von 7,4 mM Chlorbutanol (\blacktriangle , $n = 9$) sowie unter dem Einfluss der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol (\blacksquare , $n = 10$) in Abhängigkeit vom angelegten Membranpotential in mV (Abszisse).

Die Auftragung der Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung in Abhängigkeit vom angelegten Membranpotential unter Kontrollbedingungen sowie unter dem Einfluss von 27,7 nM Terfenadin, von 7,4 mM Chlorbutanol und unter dem Einfluss der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol zeigte jeweils einen glockenförmigen Verlauf. Der Vergleich von τ_{Erholung} bei einer Repolarisationsspannung auf -40 mV, die auch bei der Untersuchung der IC_{50} -Konzentration verwendet wurde, zeigte, dass 27,7 nM Terfenadin und die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol keinen signifikanten

Einfluss auf die Erholung von der Inaktivierung hatten (Kontrolle: $12,6 \pm 0,4$ ms, Terfenadin: $13,3 \pm 1,2$ ms, Kombination: $10,4 \pm 0,2$ ms). Dagegen kam es unter dem Einfluss von 7,4 mM Chlorbutanol ($9,2 \pm 0,3$ ms) zu einer signifikanten Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung.

Die folgenden Abbildungen 45 zeigen die Auftragung der schnellen Deaktivierungszeitkonstanten (τ_{fast}) und der langsamen Deaktivierungszeitkonstanten (τ_{slow}) gegen das Membranpotential.

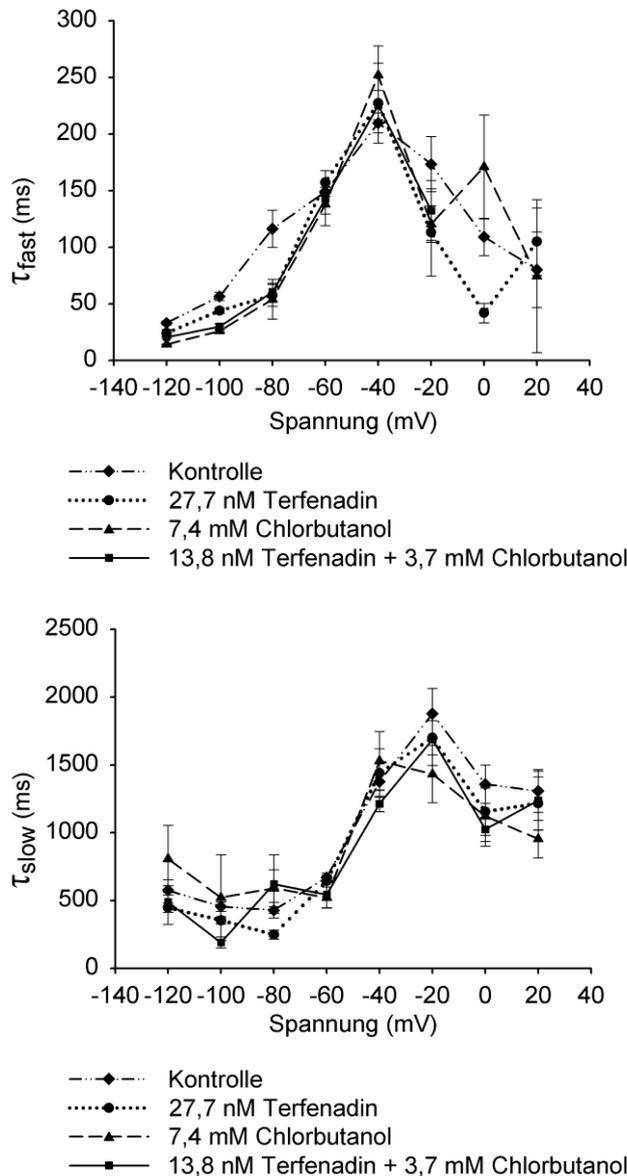


Abb. 45: Abhängigkeit der schnellen und der langsamen Deaktivierungszeitkonstanten vom Membranpotential. Dargestellt sind die schnelle Deaktivierungszeitkonstante (τ_{fast} , oben, **Ordinate**) und die langsame Deaktivierungszeitkonstante (τ_{slow} , unten, **Ordinate**) unter Kontrollbedingungen (◆, n = 30), unter dem Einfluss von 27,7 nM Terfenadin (●, n = 11), unter dem Einfluss von 7,4 mM Chlorbutanol (▲, n = 9) und unter dem Einfluss der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,8 mM Chlorbutanol (■, n = 10) in Abhängigkeit vom angelegten Membranpotential in mV (**Abszisse**).

Wie in der Abbildung 45 zu sehen ist, weisen die schnelle (τ_{fast}) und die langsame (τ_{slow}) Deaktivierungszeitkonstante einen glockenförmigen Verlauf auf. Unter Kontrollbedingungen war τ_{fast} bei -40 mV maximal und nahm bei positiveren Spannungen wieder ab, τ_{slow} erreichte bei -20 mV ein Maximum. Bei diesen Spannungen sind die Zeitkonstanten der Deaktivierung erhöht, das bedeutet, dass die Deaktivierung des hERG-Kanals verlangsamt ist. Die Zeitkonstanten der Deaktivierung zeigten unter dem Einfluss von 27,7 nM Terfenadin, von 7,4 mM Chlorbutanol und unter dem Einfluss der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol einen ähnlichen Verlauf wie unter Kontrollbedingungen, so dass es nicht zu einer wesentlichen Änderung der Deaktivierung kam. Ein Vergleich von τ_{fast} und τ_{slow} bei einer Repolarisationsspannung auf -40 mV, die auch bei der Untersuchung der IC_{50} -Konzentration verwendet wurde, zeigte, dass die untersuchten Testsubstanzen keinen signifikanten Einfluss auf die schnelle und die langsame Zeitkonstante der Deaktivierung hatten (τ_{fast} : Kontrolle: $209,8 \pm 8,7$ ms, 27,7 nM Terfenadin: $227,4 \pm 35,3$ ms, 7,4 mM Chlorbutanol: $252,0 \pm 25,9$ ms, 13,8 nM Terfenadin + 3,7 mM Chlorbutanol: $225,6 \pm 13,0$ ms; τ_{slow} : Kontrolle: $1376,3 \pm 64,0$ ms, 27,7 nM Terfenadin: $1440,3 \pm 179,0$ ms, 7,4 mM Chlorbutanol $1530,0 \pm 215,4$, 13,8 nM Terfenadin + 3,7 mM Chlorbutanol: $1213,3 \pm 58,3$ ms).

3.3.2 Untersuchungen der Zeitabhängigkeit der hERG-Strom-Reduktion durch Chlorbutanol, durch Terfenadin und durch die Kombination der beiden Substanzen

3.3.2.1 „Envelope of Tails“-Test

Da die hERG-Kanal-Inaktivierung während der Membrandepolarisation schnell fortschreitet und sich mit der Aktivierung der hERG-Ströme überlagert, wurde der Zeitverlauf der Aktivierung von hERG-Kanälen mit dem so genannten „Envelope of Tails“-Test untersucht, bei dem die Spitzen-Tail-Stromamplitude in Abhängigkeit von der Dauer des Aktivierungspulses untersucht wird. Dabei werden zur Aktivierung des hERG-Kanals Testpulse auf +40 mV mit steigender Dauer (50-600 ms, $\Delta t = 10$ ms) ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV appliziert, anschließend erfolgte die Repolarisation auf -40 mV über eine Dauer von 2 s.

Repräsentative Stromverläufe sind in der folgenden Abbildung 46, jeweils unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluss von 7,4 mM Chlorbutanol, von 27,7 nM

Terfenadin sowie von der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol dargestellt.

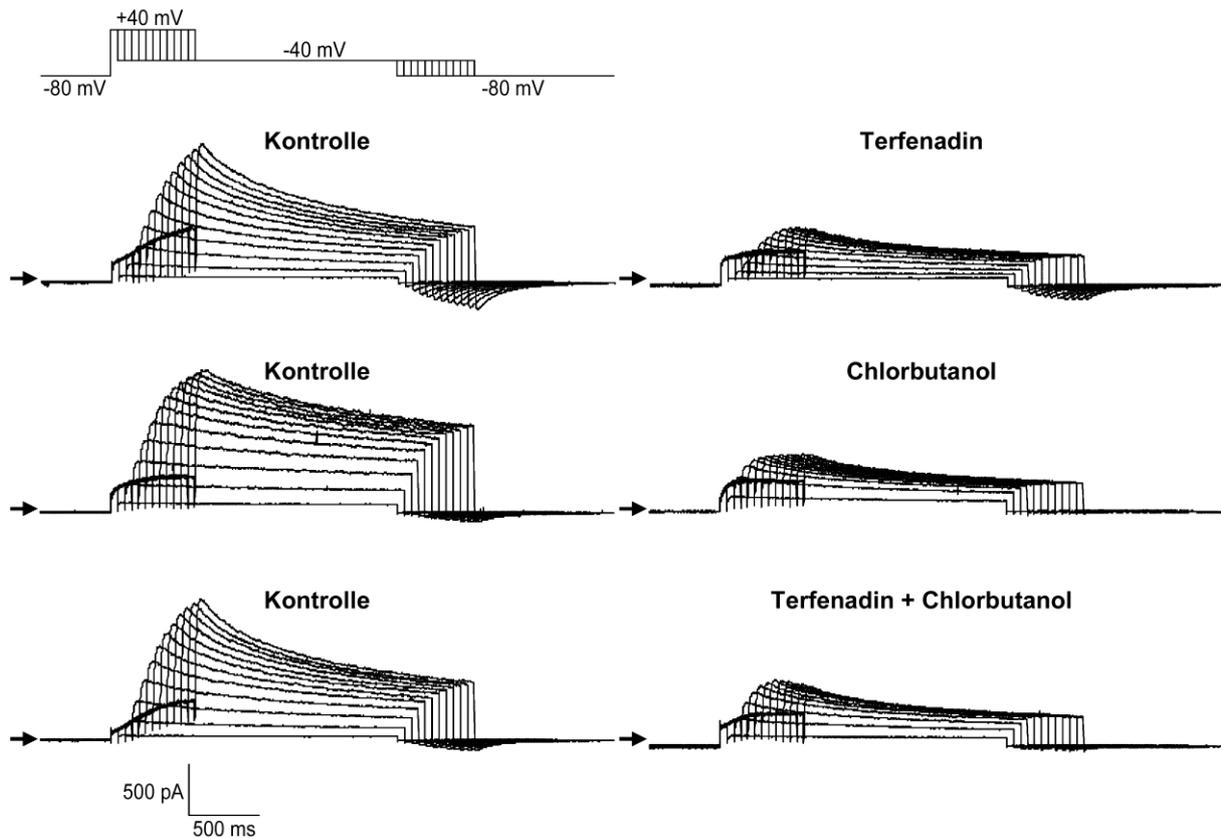


Abb. 46: Untersuchung der Wirkungen von Terfenadin, Chlorbutanol und der Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination auf den Zeitverlauf der Aktivierung von hERG-Kanälen mit Hilfe des „Envelope of Tails“-Tests. Dargestellt sind das Pulsprotokoll (oben links) sowie 3 repräsentative Versuche jeweils unter Kontrollbedingungen sowie in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin (oben), von 7,4 mM Chlorbutanol (Mitte) und von der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol (unten). Die Pfeile geben jeweils das Null-Strom-Niveau an.

Mit Hilfe des „Envelope of Tails“-Tests kann untersucht werden, ob es sich bei einer Testsubstanz um einen so genannten Offen-Kanal-Blocker handelt. In diesem Fall müsste die Blockade der hERG-Ströme mit steigender Dauer des Aktivierungspulses zunehmen, da der Anteil geöffneter hERG-Kanäle entsprechend ansteigt. In der folgenden Abbildung 47 ist der fraktionelle Block von hERG-Spitzen-Tail-Strömen gegen die Dauer des Aktivierungspulses aufgetragen. Die Kurven von Chlorbutanol und der Kombination wurden mit Hilfe einer monoexponentiellen Funktion angepasst. Dabei wurden die folgenden halbmaximalen Zeitkonstanten $t_{1/2}$ für die Blockade von aktivierten hERG-Strömen ermittelt: 251,2 ms für 7,4 mM Chlorbutanol und 276,8 ms für die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol. Da die durch 27,7 nM Terfenadin induzierte Blockade sehr schnell einsetzte und mit zunehmender Dauer des Aktivierungspulses kaum anstieg (Depolarisationspuls von

200 ms: $45,0 \pm 4,9$ % Blockade; Depolarisationspuls von 600 ms: $50,9 \pm 3,8$ % Blockade; $p > 0,05$), wurde für Terfenadin keine halbmaximale Aktivierungszeitkonstante ermittelt.

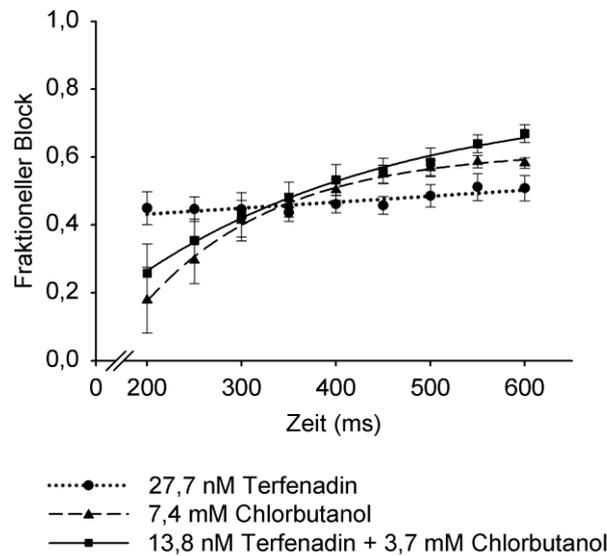


Abb. 47: Wirkungen von Terfenadin, Chlorbutanol und der Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol auf aktivierte hERG-Ströme in Abhängigkeit von der Dauer des Aktivierungspulses („Envelope of Tails“-Test). Dargestellt ist die Blockade von Spitzen-Tail-Stromamplituden nach Depolarisation auf +40 mV durch 27,7 nM Terfenadin, durch 7,4 mM Chlorbutanol sowie durch die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol in Abhängigkeit von der Dauer des Depolarisationspulses auf +40 mV. **Ordinate:** Fraktioneller Block ($1-I/I_c$) des hERG-Stroms bezogen auf die Kontrolle. **Abszisse:** Dauer des Aktivierungspulses auf +40 mV in ms.

Die Terfenadin-induzierte-Blockade von hERG-Strömen zeigte keine signifikante Abhängigkeit von der Zeit, dagegen nahm die Blockade von hERG-Strömen durch Chlorbutanol und die Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol mit zunehmender Dauer des Aktivierungspulses zu. Daraus kann geschlossen werden, dass für die Hemmung von hERG-Strömen durch Chlorbutanol die Öffnung des hERG-Kanals erforderlich ist.

3.3.2.2 Langes Puls-Protokoll

Mit Hilfe des Langen Puls-Protokolls wurde untersucht, ob es zu einer Änderung des Ausmaßes der Blockade durch 27,7 nM Terfenadin, durch 7,4 mM Chlorbutanol und durch die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol mit fortdauernder Depolarisation kommt. Dazu wurde ausgehend von einem Haltepotential ein Depolarisationspuls auf +20 mV über eine Dauer von 10 s appliziert. Die folgende Abbildung 48 zeigt repräsentative Stromverläufe dieser Untersuchungen.

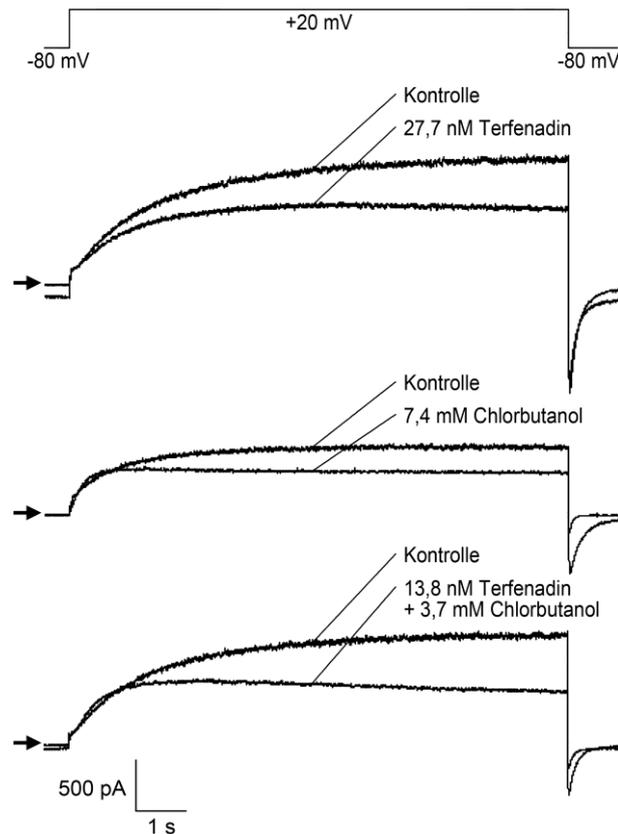


Abb. 48: Untersuchungen zu den Wirkungen von Terfenadin, Chlorbutanol und der Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination während des Langen Puls-Protokolls. Dargestellt sind das Pulsprotokoll (oben) sowie 3 repräsentative Versuche jeweils unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin (oben), von 7,4 mM Chlorbutanol (Mitte) und von der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol (unten). Die Pfeile geben jeweils das Null-Strom-Niveau an.

Mit Hilfe des Langen Puls-Protokolls kann untersucht werden, ob eine Testsubstanz bevorzugt den inaktivierten Zustand des Kanals blockiert. Mit fortschreitender Dauer des Depolarisationspulses liegt ein immer größerer Anteil der hERG-Kanäle im inaktivierten Zustand vor. Bei einer Substanz, die eine höhere Affinität zum inaktivierten Zustand des hERG-Kanals aufweist, müsste es zu einer Zunahme der hERG-Strom-Blockade mit steigender Depolarisationsdauer kommen. In der Abbildung 49 ist der fraktionelle Block von hERG-Spitzen-Tail-Strömen gegen die Dauer des Aktivierungspulses aufgetragen. Die Kurven von Chlorbutanol und der Kombination wurden mit Hilfe einer monoexponentiellen Funktion angepasst. Dabei wurden die folgenden halbmaximalen Aktivierungszeitkonstanten $t_{1/2}$ für die Entwicklung der Blockade ermittelt: 1,1 s für 7,4 mM Chlorbutanol und 1,7 s für die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol. Die Hemmung von hERG-Strömen durch Chlorbutanol nahm innerhalb der ersten drei Sekunden zu und ging mit zunehmender Dauer der Depolarisation in ein Plateau über. Der Graph für 27,7 nM

Terfenadin wurde mit einer linearen Regression angepasst. Zwischen 1 und 10 s nahm das Ausmaß der Blockade durch 27,7 nM Terfenadin kontinuierlich aber nicht signifikant zu (1 s: $13,6 \pm 9,1$ %, 10 s: $37,5 \pm 6,3$ %, $p > 0,05$).

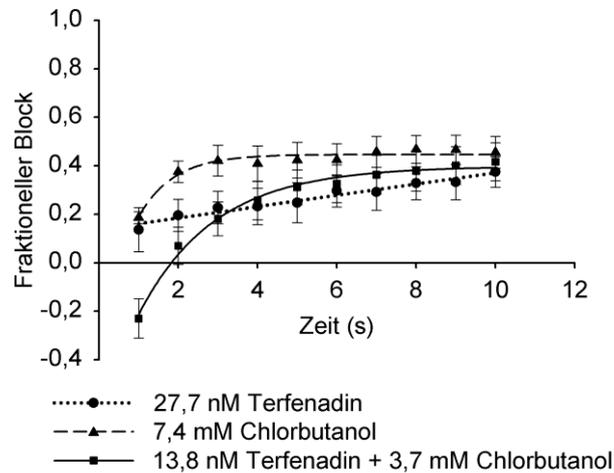


Abb. 49: Untersuchung der Wirkungen von Terfenadin, Chlorbutanol und der Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol auf die Abhängigkeit der hERG-Strom-Blockade von der Dauer des Aktivierungspulses (Langes Puls-Protokoll). Dargestellt ist die Blockade von hERG-Strömen durch 27,7 nM Terfenadin, durch 7,4 mM Chlorbutanol sowie durch die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol in Abhängigkeit von der Dauer des Depolarisationspulses. **Ordinate:** Fraktioneller Block ($1-I/I_0$) des hERG-Stroms bezogen auf die Kontrolle. **Abszisse:** Dauer des Aktivierungspulses auf +20 mV in s.

3.3.2.3 Zeitverlauf und Reversibilität der hERG-Strom-Reduktion

Für 27,7 nM Terfenadin, 7,4 mM Chlorbutanol sowie für die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol wurde der zeitliche Verlauf der hERG-Spitzen-Tail-Ström-Blockade sowie der Zeitverlauf der Reversibilität der Blockade nach Auswaschen der Substanzen untersucht. Dazu wurde ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV ein Depolarisationspuls auf +20 mV über eine Dauer von 2 s appliziert, darauf folgte ein Repolarisationspuls auf -40 mV über eine Dauer von 2 s zur Induktion der hERG-Tail-Ströme. Die folgende Abbildung 50 zeigt repräsentative Stromverläufe dieser Untersuchungen.

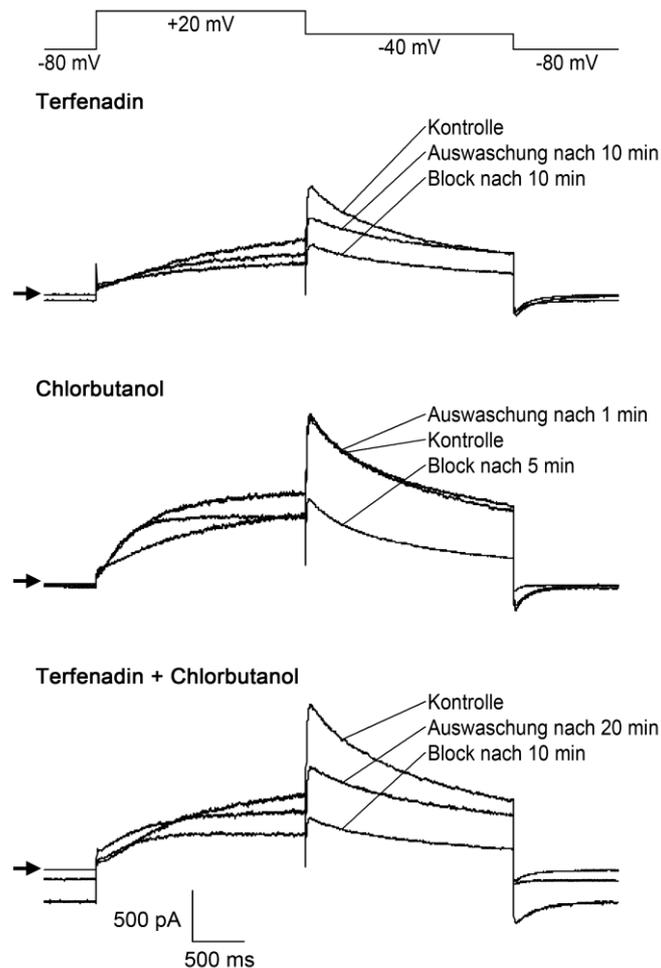


Abb. 50: Zeitverlauf und Reversibilität der hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade durch 27,7 nM Terfenadin, durch 7,4 mM Chlorbutanol und durch die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol. Dargestellt sind das Pulsprotokoll (oben) und 3 repräsentative Versuche jeweils unter Kontrollbedingungen, in Anwesenheit von 27,7 nM Terfenadin, von 7,4 mM Chlorbutanol und in Anwesenheit der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol sowie nach Auswaschen der jeweiligen Substanz. Nach 10 min Substanzapplikation betrug das Ausmaß der Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch 27,7 nM Terfenadin 52,9 % (oben), nach 10 min Auswaschen der Substanz betrug die hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade noch 33,4 %. Nach 5 min Applikation von 7,4 mM Chlorbutanol (Mitte) betrug die hERG-Spitzen-Tail-Strom-Reduktion 49,4 %. Nach 1 min Auswaschen von Chlorbutanol war kein Block mehr nachweisbar. Nach 10 min Applikation der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol betrug das Ausmaß der Blockade 67,5 % (unten), nach 20 min Auswaschen des Substanzgemisches betrug die Blockade noch 31,7 %. Die Pfeile geben jeweils das Null-Strom-Niveau an.

Die Abbildung 51 zeigt den zeitlichen Verlauf der hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade durch 27,7 nM Terfenadin, durch 7,4 mM Chlorbutanol und durch die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol jeweils anhand eines Beispielversuches.

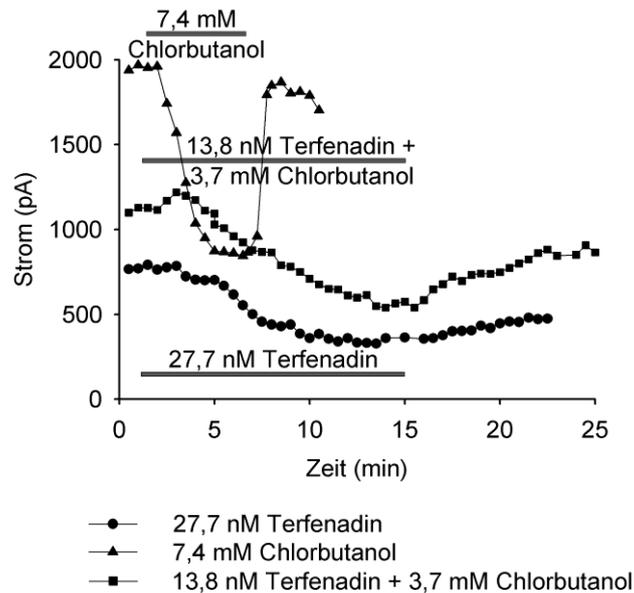


Abb. 51: Zeitverlauf und Reversibilität der hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade durch 27,7 nM Terfenadin, durch 7,4 mM Chlorbutanol und durch die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol (3 Beispielversuche). Dargestellt ist die Entwicklung der Blockade des hERG-Spitzen-Tail-Stroms durch die Applikation von 27,7 nM Terfenadin, durch 7,4 mM Chlorbutanol und durch die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol sowie der hERG-Spitzen-Tail-Strom-Verlauf während des anschließenden Auswaschens der Substanzen. **Ordinate:** Gemessener hERG-Spitzen-Tail-Strom in pA. **Abszisse:** Zeit in min. Die Balken stellen die Zeiträume dar, in denen die Substanzapplikation erfolgte.

Aus den Einzelversuchen zum zeitlichen Verlauf der Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch 27,7 nM Terfenadin ($n = 7$), durch 7,4 mM Chlorbutanol ($n = 9$) und durch die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol ($n = 6$) wurde eine Halbwertszeit $t_{1/2}$ für die Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch die einzelnen Substanzen ermittelt. Für Terfenadin betrug $t_{1/2}$ $5,4 \pm 0,5$ min, für Chlorbutanol $1,8 \pm 0,2$ min und für die Kombination der beiden Substanzen betrug $t_{1/2}$ $4,0 \pm 0,8$ min. Die Bestimmung der Halbwertszeit für die Reversibilität der hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade nach Auswaschen der Substanzen war nur für Chlorbutanol möglich, da der durch Chlorbutanol induzierte Block vollständig reversibel war. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ für die Reversibilität des Chlorbutanol-Blocks betrug $1,3 \pm 0,3$ min. Die Effekte von 27,7 nM Terfenadin und der Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM am hERG-Kanal zeigten nur eine geringe Reversibilität. Nach 10 min Auswaschen der Substanzen betrug das Ausmaß der Blockade durch 27,7 nM Terfenadin noch $43,5 \pm 4,7$ % und durch die Kombination von 13,8 nM Terfenadin und 3,7 mM Chlorbutanol noch $29,3 \pm 5,2$ %.

3.3.3 Intrazelluläre Applikation

Chlorbutanol, Fluvoxamin, Terfenadin und Dofetilid wurden intrazellulär über die Pipettenlösung appliziert.

Chlorbutanol wurde in einer Konzentration von 7,4 mM (IC_{50} -Konzentration bei extrazellulärer Applikation) in der Pipettenlösung gelöst (siehe Kap. 2.3.3). Intrazellulär appliziertes Chlorbutanol hatte keinen Effekt auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme, die 10 min nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration $100,8 \pm 2,9 \%$ ($n = 8$) der Kontrolle (kurz nach dem Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration) betragen.

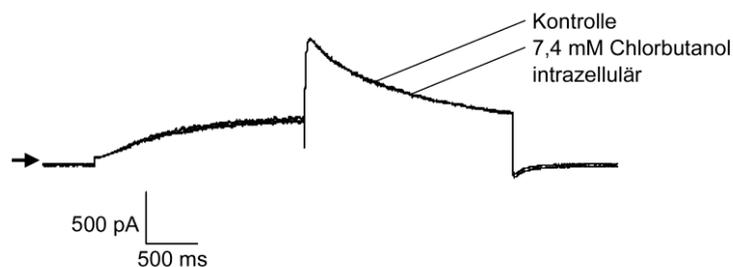


Abb. 52: Effekte von intrazellulär appliziertem Chlorbutanol auf hERG-Ströme. 7,4 mM intrazellulär appliziertes Chlorbutanol zeigte keine Effekte auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme. Der Pfeil gibt das Null-Strom-Niveau an.

Die intrazelluläre Applikation von 30 μ M Fluvoxamin (10facher IC_{50} -Wert bei extrazellulärer Applikation) führte ebenfalls nicht zu einer Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen. 10 min nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration betragen die hERG-Spitzen-Tail-Ströme noch $103,7 \pm 2,0 \%$ ($n = 5$) des Kontrollstromes kurz nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration.

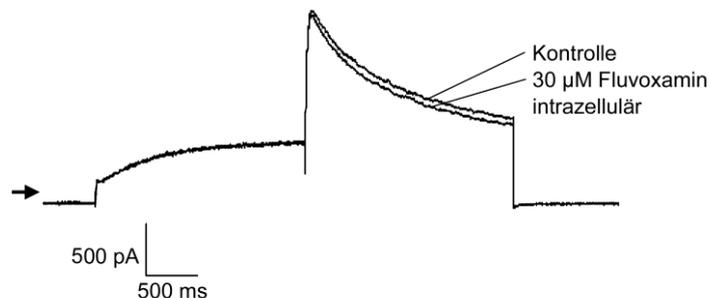


Abb. 53: Effekte von intrazellulär appliziertem Fluvoxamin auf hERG-Ströme. 30 μ M intrazellulär appliziertes Fluvoxamin zeigte sehr schwache Effekte auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme, im vorliegenden Beispiel betrug die Blockade der hERG-Spitzen-Tail-Ströme 3,9 %. Der Pfeil gibt das Null-Strom-Niveau an.

Die folgenden Terfenadin-Konzentrationen wurden intrazellulär appliziert: 0,3, 3, 10 und 30 μM . Intrazellulär appliziertes Terfenadin führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion von hERG-Spitzen-Tail-Strömen. Die Effekte von Terfenadin wurden 10 min nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration gemessen. Höhere Terfenadin-Konzentrationen wurden aufgrund der begrenzten Löslichkeit der Substanz in wässrigen Lösungen nicht untersucht. Intrazellulär appliziertes Terfenadin reduzierte die Spitzen-Tail-Stromamplitude mit einem IC_{50} -Wert von 18,4 μM (95 % KI: 13,3-25,5 μM), der Hill-Koeffizient wurde zum Anpassen der Kurve mit 1 vorgegeben. Um zu prüfen, ob die Gleichgewichtseinstellung der Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch intrazellulär appliziertes Terfenadin nach 10 min erreicht ist, wurde untersucht, ob sich die Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen nach 10 und 20 min signifikant unterschieden. Der nach 20 min ermittelte IC_{50} -Wert bei intrazellulärer Applikation von Terfenadin betrug 12,9 μM (95 % KI: 9,9-16,8 μM , Vorgabe des Hill-Koeffizienten mit 1) und unterschied sich nicht signifikant von dem nach 10 min ermittelten IC_{50} -Wert von 18,4 μM ($p > 0,05$). Die Terfenadin-induzierte Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen war demzufolge bereits nach 10 min im Gleichgewicht. Aufgrund der mit längerer Versuchsdurchführung zunehmenden Verschlechterung des Seals (enge Verbindung zwischen Zelle und Pipette) erfolgte die Auswertung der durch intrazellulär appliziertes Terfenadin induzierten Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen in allen weiteren Untersuchungen 10 min nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration.

Die folgende Abbildung 54 zeigt repräsentative Stromverläufe dieser Untersuchungen.

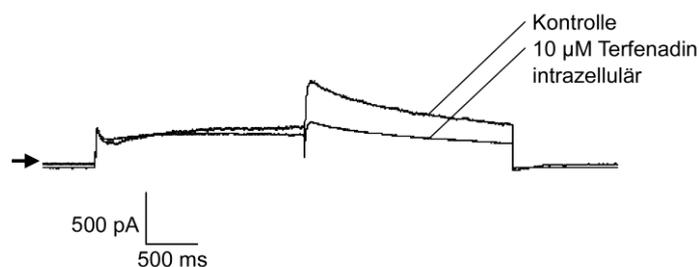


Abb. 54: Effekte von intrazellulär appliziertem Terfenadin auf hERG-Ströme. 10 μM intrazellulär appliziertes Terfenadin blockierte hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 49,8 %. Der Pfeil gibt das Null-Strom-Niveau an.

Die folgende Abbildung 55 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch intrazellulär appliziertes Terfenadin nach 10 und 20 min; zum Vergleich ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve aus Abbildung 26 nach extrazellulärer Applikation von Terfenadin dargestellt.

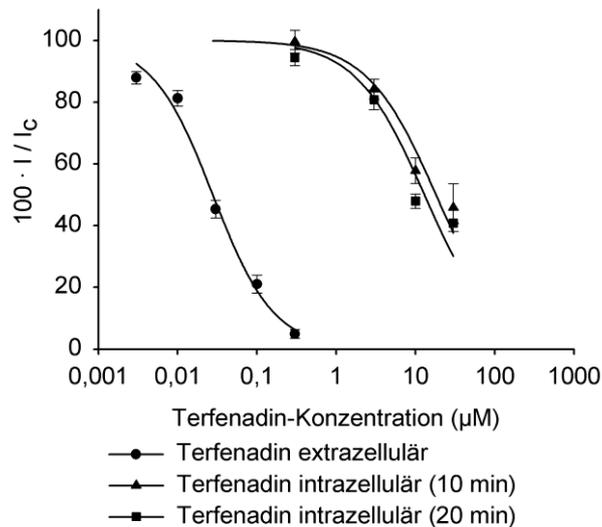


Abb. 55: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch intrazellulär und extrazellulär appliziertes Terfenadin. Auf der **Abszisse** ist die Terfenadin-Konzentration im logarithmischen Maßstab aufgetragen. Auf der **Ordinate** ist die jeweilige Stromamplitude in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Terfenadin (I) in Prozent von der Stromamplitude unter Kontrollbedingungen (I_c) aufgetragen. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte und die vertikalen Linien die S.E.M. Die Anzahl der Beobachtungen lag zwischen 3 und 11 bei jeder untersuchten Testkonzentration. Die Kurven stellen Anpassungen an die logistische Form der Hill-Gleichung dar (Kap. 2.8.13, Gleichung 11).

Bei Applikation über die Pipettenlösung wurde die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Terfenadin im Vergleich zur Applikation über die Badlösung sehr stark zu höheren Konzentrationen verschoben. Bei extrazellulärer Applikation von Terfenadin betrug der IC_{50} -Wert 27,7 nM, bei intrazellulärer Applikation betrug der IC_{50} -Wert nach 10 min 18,4 µM und nach 20 min 12,9 µM. Im Vergleich zu extrazellulär appliziertem Terfenadin kam es bei intrazellulärer Applikation zu einer Affinitätsabnahme um den Faktor 664 (nach 10 min) bzw. 466 (nach 20 min).

In weiteren Untersuchungen erfolgte die Applikation von 10, 30, 100, 300 und 1000 nM Dofetilid über die Pipettenlösung. Die Effekte von Dofetilid wurden 20 min nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration gemessen. Intrazellulär appliziertes Dofetilid führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion von hERG-Spitzen-Tail-Strömen. Die folgende Abbildung zeigt repräsentative Stromverläufe dieser Untersuchungen. Intrazellulär appliziertes Dofetilid reduzierte die hERG-Spitzen-Tail-Stromamplitude mit einem IC_{50} -Wert von 54,8 nM (95 % KI: 45,7-65,7 nM) und einem Hill-Koeffizienten von 0,96 (95 % KI: 0,79-1,14). Nach 10 min Dofetilid-Applikation betrug der IC_{50} -Wert 169,2 nM (95 % KI: 141,4-201,5 nM) und der Hill-Koeffizient betrug 1,68 (95 % KI: 1,21-2,15). Der nach 10 min ermittelte IC_{50} -Wert war signifikant größer als der nach 20 min ermittelte IC_{50} -Wert, woraus

geschlussfolgert wurde, dass die Dofetilid-induzierte Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen bei intrazellulärer Applikation nach 10 min noch kein Gleichgewicht erreicht hatte.

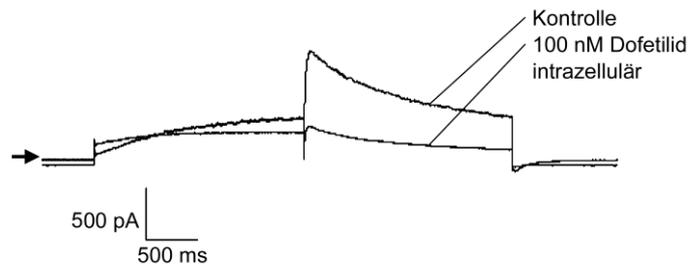


Abb. 56: Effekte von intrazellulär appliziertem Dofetilid auf hERG-Ströme. 100 nM intrazellulär appliziertes Dofetilid blockierte hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 67,8 %. Der Pfeil gibt das Null-Strom-Niveau an.

Die folgende Abbildung 57 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch intrazellulär appliziertes Dofetilid nach 10 und 20 min; zum Vergleich ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve aus Abbildung 26 nach extrazellulärer Applikation von Dofetilid dargestellt.

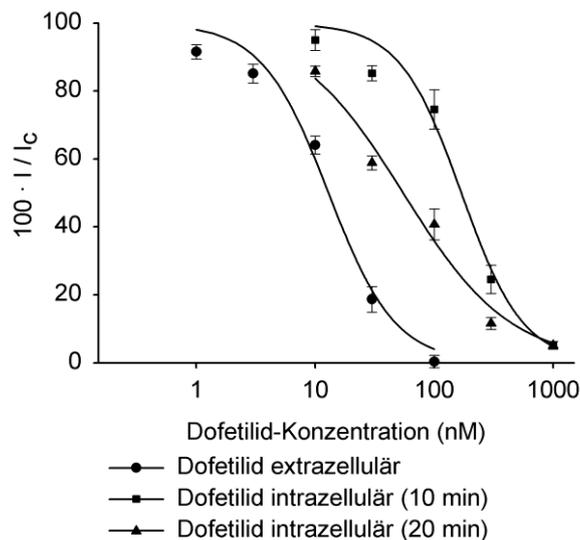


Abb. 57: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch intrazellulär und extrazellulär appliziertes Dofetilid. Auf der **Abszisse** ist die Dofetilid-Konzentration im logarithmischen Maßstab aufgetragen. Auf der **Ordinate** ist die jeweilige Stromamplitude in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Dofetilid (I) in Prozent von der Stromamplitude unter Kontrollbedingungen (I_c) aufgetragen. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte und die vertikalen Linien die S.E.M. Die Anzahl der Beobachtungen lag zwischen 5 und 11 bei jeder untersuchten Testkonzentration. Die Kurven stellen Anpassungen an die logistische Form der Hill-Gleichung dar (Kap. 2.8.13, Gleichung 11).

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die Hemmung der hERG-Spitzen-Tail-Ströme durch Dofetilid wurde bei intrazellulärer Applikation im Vergleich zur extrazellulären Applikation

ebenfalls zu höheren Konzentrationen verschoben. Bei extrazellulärer Applikation von Dofetilid betrug der IC_{50} -Wert 12,9 nM, bei intrazellulärer Applikation betrug der IC_{50} -Wert nach 10 min 169,2 nM, nach 20 min 54,8 nM. Die Affinität nahm im Vergleich zur extrazellulären Applikation um den Faktor 13 (nach 10 min) bzw. 4 (nach 20 min) ab.

3.3.4 Untersuchung des Einflusses von Membrantransportern

Im Folgenden wurde untersucht, ob der organische Kationentransporter OCTN-1 einen Einfluss auf die Wirkung von intrazellulär appliziertem Terfenadin bezüglich der hERG-Strom-Blockade hat. Es wurde geprüft, ob OCTN-1 am Efflux von intrazellulär appliziertem Terfenadin beteiligt ist, und so die geringe Blockade von hERG-Strömen durch über die Pipettenlösung appliziertes Terfenadin bedingt. Um diesen Ansatz zu prüfen, wurden OCTN-1-Transporter mit Cimetidin gehemmt und die Wirkung von 30 μ M über die Pipettenlösung appliziertem Terfenadin auf hERG-Ströme untersucht. Cimetidin blockierte hERG-Spitzen-Tail-Ströme bei einer Konzentration von 0,5 mM um $32,2 \pm 10,5$ % ($n = 4$). In Anwesenheit von 0,5 mM Cimetidin in der Badlösung hemmte 30 μ M über die Pipettenlösung appliziertes Terfenadin die hERG-Spitzen-Tail-Ströme um $48,3 \pm 7,2$ % ($n = 5$, 10 min nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration). Dieser Wert ist nicht signifikant unterschiedlich ($p > 0,05$) von der Blockade der hERG-Spitzen-Tail-Ströme durch 30 μ M intrazellulär appliziertes Terfenadin in Abwesenheit von Cimetidin ($54,1 \pm 7,7$ %, $n = 5$). Die Hemmung von OCTN-1-Transportern durch Cimetidin führte nicht zu einer Affinitätserhöhung von intrazellulär appliziertem Terfenadin. Eine Beteiligung des OCTN-1-Transporters am Efflux von Terfenadin in HEK 293-Zellen scheint unwahrscheinlich. Repräsentative Ströme dieser Untersuchungen sind in Abbildung 58 dargestellt.

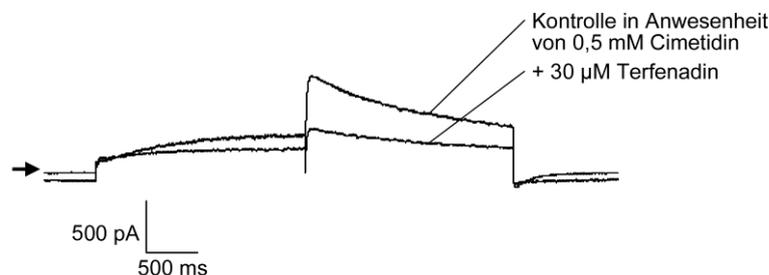


Abb. 58: Effekte von intrazellulär appliziertem Terfenadin auf hERG-Ströme nach Hemmung des OCTN-1-Transporters mit 0,5 mM Cimetidin. 30 μ M intrazellulär appliziertes Terfenadin blockierte hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 51,5 %, nachdem OCTN-1-Transporter mit 0,5 mM Cimetidin blockiert wurden. Der Pfeil gibt das Null-Strom-Niveau an.

Da Terfenadin ein Substrat der Effluxpumpe P-Glykoprotein ist, wurde untersucht, ob P-Glykoprotein am Efflux von intrazellulär appliziertem Terfenadin in HEK 293-Zellen beteiligt ist. Dazu wurde P-Glykoprotein mit dem Inhibitor Cyclosporin A gehemmt und anschließend die Wirkung von 30 μM über die Pipettenlösung appliziertem Terfenadin auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme untersucht. 10 μM Cyclosporin A hemmte hERG-Spitzen-Tail-Ströme um $44,1 \pm 6,5 \%$ ($n = 7$). In Anwesenheit von 10 μM Cyclosporin A in der Badlösung hemmte über die Pipettenlösung appliziertes Terfenadin die hERG-Spitzen-Tail-Ströme um $62,9 \pm 4,2 \%$ ($n = 8$). Dieser Wert ist nicht signifikant unterschiedlich ($p > 0,05$) von der Blockade der hERG-Spitzen-Tail-Ströme durch 30 μM intrazellulär appliziertes Terfenadin in Abwesenheit von Cyclosporin A ($54,1 \pm 7,7 \%$, $n = 5$). Demzufolge scheint P-Glykoprotein nicht am Efflux von intrazellulär appliziertem Terfenadin in HEK 293-Zellen beteiligt zu sein. Abbildung 59 zeigt repräsentative Stromverläufe dieser Untersuchungen.

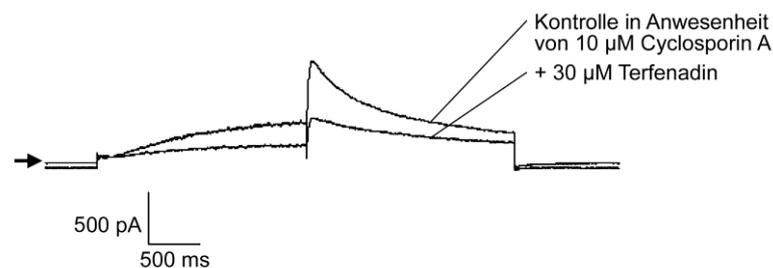


Abb. 59: Effekte von intrazellulär appliziertem Terfenadin auf hERG-Ströme nach Hemmung von P-Glykoprotein mit 10 μM Cyclosporin A. 30 μM intrazellulär appliziertes Terfenadin blockierte hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 58,5 %, nachdem P-Glykoprotein mit 10 μM Cyclosporin A blockiert wurden. Der Pfeil gibt das Null-Strom-Niveau an.

In weiteren Untersuchungen wurde 30 μM Terfenadin in einer ATP-freien intrazellulären Lösung appliziert. Dadurch sollten ATP-abhängige Transportprozesse ausgeschaltet werden. Die folgende Abbildung zeigt repräsentative Stromverläufe dieser Untersuchungen (Abb. 60).

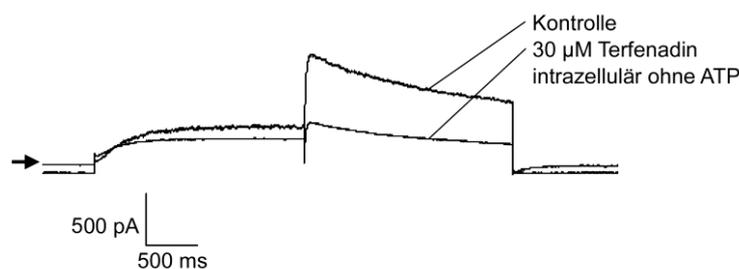


Abb. 60: Effekte von intrazellulär appliziertem Terfenadin in einer ATP-freien intrazellulären Lösung auf hERG-Ströme. 30 μM intrazellulär appliziertes Terfenadin blockierte hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 59,9 %. Der Pfeil gibt das Null-Strom-Niveau an.

Die Blockade durch 30 μM Terfenadin in einer ATP-freien intrazellulären Lösung betrug $45,2 \pm 3,6 \%$ ($n = 6$), 30 μM Terfenadin in einer ATP-haltigen intrazellulären Lösung blockierten hERG-Spitzen-Tail-Ströme um $54,1 \pm 7,7 \%$ ($n = 5$). Die beiden Ergebnisse unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$).

In weiteren Untersuchungen wurde der „Rundown“ von hERG-Spitzen-Tail-Strömen untersucht. Der „Rundown“ ist die spontane Abnahme der Kanalaktivität über die Zeit. Repräsentative Stromverläufe dieser Untersuchungen sind in Abbildung 61 dargestellt.

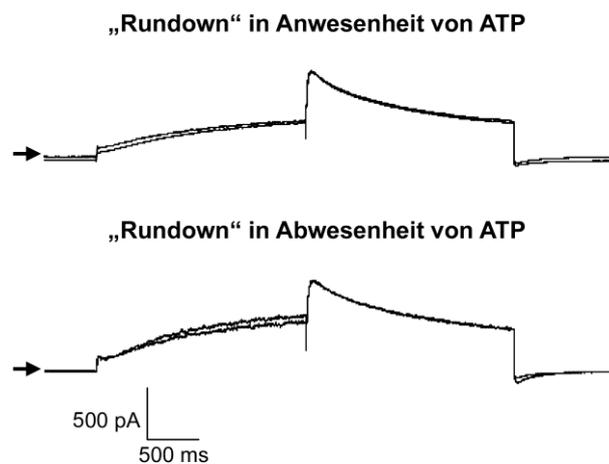


Abb. 61: „Rundown“ von hERG-Strömen in An- und Abwesenheit von ATP in der Pipettenlösung. Nach 10 min war kein „Rundown“ von hERG-Strömen nachweisbar. Die Pfeile geben das Null-Strom-Niveau an

Unter Verwendung der ATP-haltigen intrazellulären Lösung betrug der hERG-Spitzen-Tail-Strom nach 10 min $101,2 \pm 2,2 \%$ ($n = 10$, Abb. 61), unter Verwendung der ATP-freien intrazellulären Lösung $103,0 \pm 6,7 \%$ ($n = 5$, Abb. 61) der Kontrolle direkt nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration. Ein „Rundown“ von hERG-Spitzen-Tail-Strömen spielte in den vorliegenden Untersuchungen demzufolge keine Rolle.

3.3.5 Untersuchung der hERG-Strom-Blockade durch Chlorbutanol mit Hilfe einer Spannungsrampe

Die Verwendung ventrikulärer Aktionspotentiale als Pulsprotokoll für Patch-Clamp-Messungen gibt Aufschluss über die Eigenschaften des hERG-Kanals unter physiologischeren Bedingungen (Walker et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die mit einer Spannungsrampe erzeugten Stromverläufe sehr ähnlich zu den durch ventrikuläre Aktionspotentiale ausgelösten hERG-Stromverläufen sind (Hancox et al. 1998). Ein solches Spannungsrampen-Protokoll wurde verwendet, um die Repolarisation während des kardialen

Aktionspotentials zu simulieren und die Effekte von Chlorbutanol unter diesen Bedingungen zu testen.

Dazu wurde ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV ein Depolarisationspuls auf +20 mV über eine Dauer von 2 s appliziert. Anschließend wurde eine Spannungsrampe von +20 mV bis -80 mV über eine Dauer von 1 s appliziert, wobei glockenförmige Auswärtsströme durch hERG-Kanäle ausgelöst wurden. Die Abbildung 62 zeigt einen repräsentativen Stromverlauf.

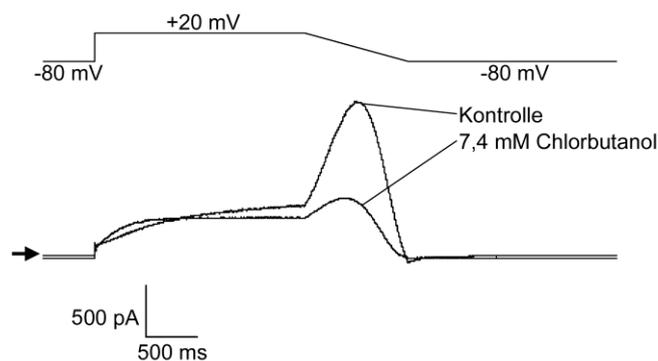


Abb. 62: Untersuchung der hERG-Strom-Blockade durch Chlorbutanol mit Hilfe einer Spannungsrampe. Der Pfeil gibt das Null-Strom-Niveau an.

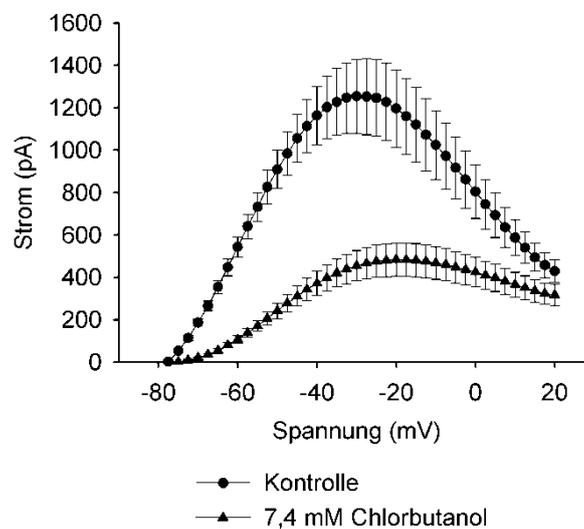


Abb. 63: Durch eine Spannungsrampe ausgelöste hERG-Ströme in An- und Abwesenheit von Chlorbutanol. Während der Spannungsrampe wurde der Strom (Ordinate) jeweils unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 7,4 mM Chlorbutanol gemessen und gegen die Spannung (Abszisse) in 2,5 mV-Schritten aufgetragen.

Unter Kontrollbedingungen trat ein maximaler Strom 500 ms nach Beginn der Rampe bei einem Membranpotential von -30 mV auf ($1253,7 \pm 173,5$ pA). In Anwesenheit von 7,4 mM Chlorbutanol war der Strom 400 ms nach Beginn der Rampe bei einem Membranpotential von -20 mV maximal ($484,0 \pm 78,8$ pA, $n = 10$). Die Auftragung der relativen Blockade des

Stroms gegen die Spannung während der Spannungsrampe zeigte eine Zunahme der durch Chlorbutanol induzierten Strom-Blockade mit negativeren Spannungen (Abb. 64).

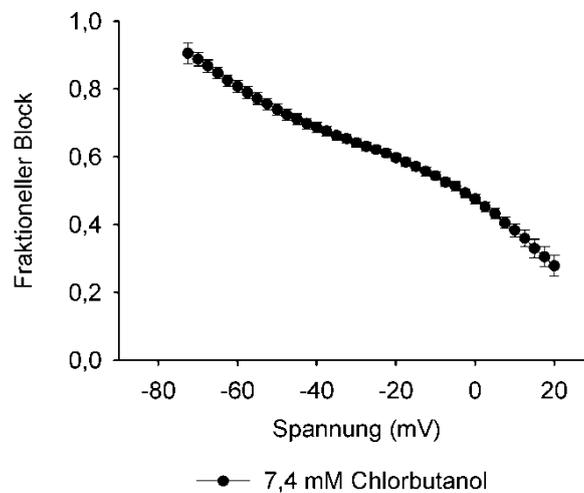


Abb. 64: Blockade der durch das Spannungsrampen-Protokoll induzierten hERG-Ströme durch Chlorbutanol in Abhängigkeit von der Spannung. Während der Spannungsrampe wurde der fraktionelle Block durch 7,4 mM Chlorbutanol (Ordinate) in 2,5 mV-Schritten gemessen und gegen die Spannung (Abszisse) aufgetragen.

3.3.6 Untersuchung der Wirkungen von Terfenadin und Chlorbutanol auf Tyr652Ala-hERG-Kanäle

Wie in der Einleitung dargestellt sind die zwei aromatischen Aminosäuren Tyrosin (Tyr) 652 und Phenylalanin (Phe) 656 besonders wichtig für die hochaffine Bindung vieler hERG-Kanal-Blocker. Porenblocker zeigen an Tyr652Ala und Phe656Ala/Cys-mutierten hERG-Kanälen eine verminderte Affinität gegenüber WT-hERG-Kanälen. Mit Hilfe dieser hERG-Kanal-Mutanten kann untersucht werden, ob es sich bei einer Testsubstanz um einen Porenblocker handelt.

Es wurde die Wirkung von 0,3, 1, 3, 10 und 30 mM Chlorbutanol auf Tyr652Ala-hERG-Spitzen-Tail-Ströme untersucht. Chlorbutanol reduzierte Tyr652Ala-hERG-Spitzen-Tail-Ströme mit einem IC_{50} -Wert von 4,4 mM (95 % KI: 3,9–4,9 mM), der Hill-Koeffizient betrug 1,68 (95 % KI: 1,40–1,97). An WT-hERG-Kanälen wurde ein ähnlicher IC_{50} -Wert von 7,4 mM (95 % KI: 6,1–9,1 mM) ermittelt ($p < 0,05$).

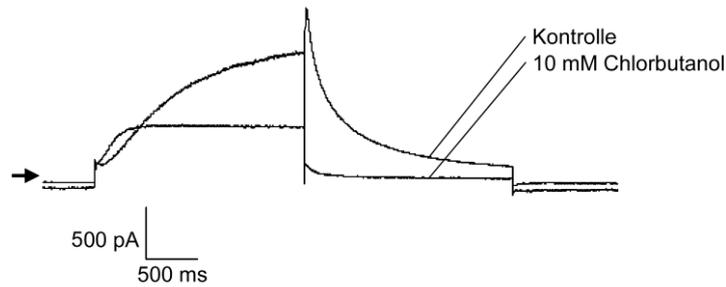


Abb. 65: Wirkung von 10 mM Chlorbutanol auf Tyr652Ala-hERG-Ströme. Die Applikation von 10 mM Chlorbutanol blockierte Tyr652Ala-hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 93,1 %. Der Pfeil gibt das Null-Strom-Niveau an.

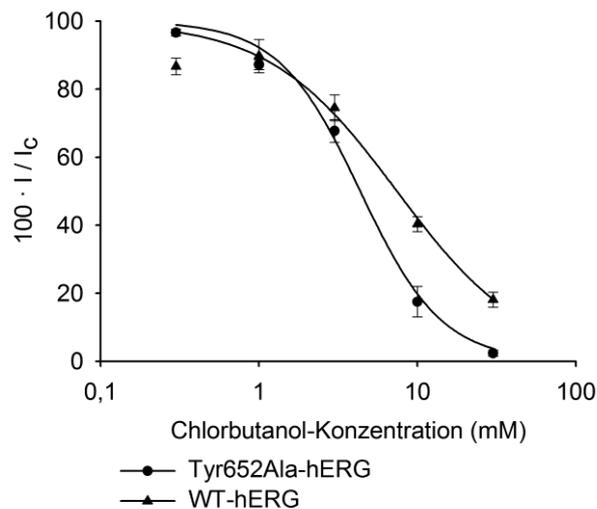


Abb. 66: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Hemmung von Tyr652Ala-hERG-Spitzen-Tail-Strömen und WT-hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch Chlorbutanol. Auf der Abszisse ist die Chlorbutanol-Konzentration im logarithmischen Maßstab aufgetragen. Auf der Ordinate ist die jeweilige Stromamplitude in Anwesenheit verschiedener Chlorbutanol-Konzentrationen (I) in Prozent von der Stromamplitude unter Kontrollbedingungen (I_c) aufgetragen. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte und die vertikalen Linien die S.E.M. Die Anzahl der Beobachtungen lag zwischen 5 und 9 bei jeder untersuchten Testkonzentration. Die Kurven stellen Anpassungen an die logistische Form der Hill-Gleichung dar (Kap. 2.8.13, Gleichung 11).

Des Weiteren wurde die Wirkung von 30, 100, 300 und 1000 nM Terfenadin auf Tyr652Ala-hERG-Spitzen-Tail-Ströme untersucht. Terfenadin hemmte Tyr652Ala-hERG-Spitzen-Tail-Ströme mit einem IC₅₀-Wert von 130,0 nM (95 % KI: 104,6-161,6 nM), der Hill-Koeffizient betrug 1,12 (95 % KI: 0,86-1,38). Terfenadin hemmte WT-hERG-Spitzen-Tail-Ströme mit einer IC₅₀-Konzentration von 27,7 nM (95 % KI: 24,4–31,5 nM), an der Tyr652Ala-hERG-Mutante nahm die Affinität demzufolge um den Faktor 4,7 ab. Die folgende Abbildung zeigt repräsentative Stromverläufe dieser Untersuchungen.

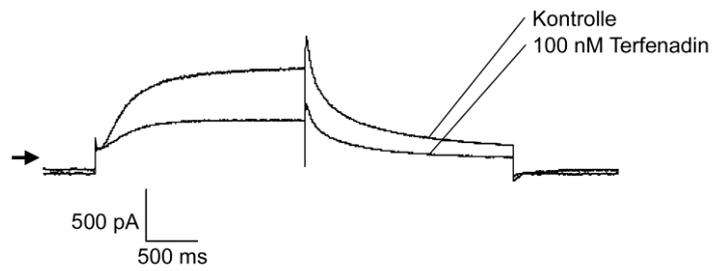


Abb. 67: Wirkung von 100 nM Terfenadin auf Tyr652Ala-hERG-Ströme. Die Applikation von 100 nM Terfenadin blockierte Tyr652Ala-hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 49,4 %. Der Pfeil gibt das Null-Strom-Niveau an.

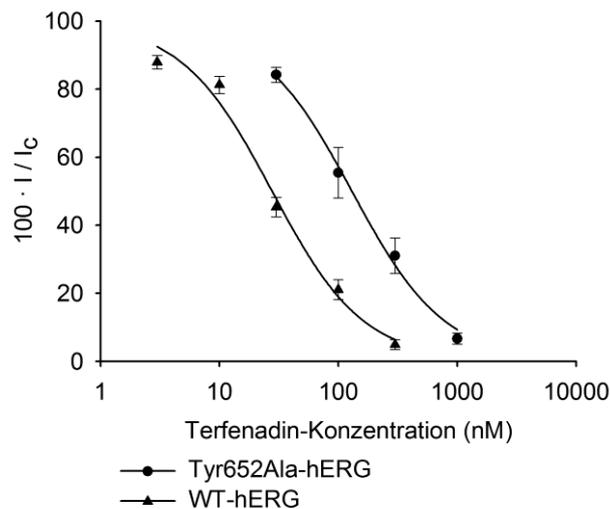


Abb. 68: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Hemmung von Tyr652Ala-hERG-Spitzen-Tail-Strömen und WT-hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch Terfenadin. Auf der **Abszisse** ist die Terfenadin-Konzentration im logarithmischen Maßstab aufgetragen. Auf der **Ordinate** ist die jeweilige Stromamplitude in Anwesenheit verschiedener Terfenadin-Konzentrationen (I) in Prozent von der Stromamplitude unter Kontrollbedingungen (I_c) aufgetragen. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte und die vertikalen Linien die S.E.M. Die Anzahl der Beobachtungen lag zwischen 6 und 8 bei jeder untersuchten Testkonzentration. Die Kurven stellen Anpassungen an die logistische Form der Hill-Gleichung dar (Kap. 2.8.13, Gleichung 11).

4 Diskussion

4.1 Wirkungen von Terfenadin, Fluvoxamin, Chlorbutanol, Dofetilid und CnErg1 auf hERG-Ströme

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Interaktionen zwischen hERG-Kanalblockierenden Substanzen, die unterschiedliche Bindungsstellen am hERG-Kanal aufweisen, zu untersuchen.

Zunächst wurden die halbmaximalen Hemmkonzentrationen (IC_{50} -Werte) der einzelnen Testsubstanzen ermittelt. Für Terfenadin, Dofetilid, Fluvoxamin, Chlorbutanol und CnErg1 konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der hERG-Spitzen-Tail-Ströme nachgewiesen werden (Kap. 3.1.1, Abb. 26). Für Terfenadin wurde für die Hemmung der hERG-Spitzen-Tail-Ströme ein IC_{50} -Wert von 27,7 nM ermittelt, dieser Wert ist etwas niedriger als die bisher aus der Literatur bekannten Werte (56-204 nM, Review in Stansfeld et al. 2007). Eine mögliche Ursache für den in der vorliegenden Arbeit gemessenen niedrigeren IC_{50} -Wert könnte die lange Applikationsdauer des Terfenadins (5-7 min) während der Patch-Clamp-Untersuchungen sein. Dabei wurden kürzliche Untersuchungen von Stork et al. (2007) berücksichtigt, die gezeigt haben, dass das Gleichgewicht des Terfenadin-Blocks am hERG-Kanal erst nach 5-10 min Substanzapplikation erreicht wird. Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte IC_{50} -Wert von Dofetilid betrug 12,9 nM und liegt im Bereich bislang veröffentlichter Werte (9,5 – 15 nM; Snyder and Chaudhary, 1996, Review in Stansfeld et al. 2007). Fluvoxamin blockierte hERG-Spitzen-Tail-Ströme mit einem IC_{50} -Wert von 3,6 μ M, dieser Wert ähnelt dem von Milnes et al. (2003) ermittelten Wert von 3,8 μ M.

Da CnErg1 mit einer 1:1-Stöchiometrie mit dem hERG-Kanal interagiert (Gurrola et al. 1999; Pardo-Lopez et al. 2002 B; Hill et al. 2007), wurde der Hill-Koeffizient zum Anpassen der Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit 1 vorgegeben. Der ermittelte IC_{50} -Wert für die Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch CnErg1 von 6,4 nM liegt im Bereich bekannter Literaturwerte (6-16 nM; Gurrola et al. 1999; Pardo-Lopez et al. 2002 B; Torres et al. 2003; Hill et al. 2007). Es ist bekannt, dass die Blockade von hERG-Strömen durch CnErg1 auch bei Applikation sehr hoher Konzentrationen (1 μ M) unvollständig ist. Der maximale Block beträgt ~90 % (Pardo-Lopez et al. 2002; Torres et al. 2003; Hill et al. 2007). Bei CnErg1 handelt es sich um einen sogenannten „Turret“-Blocker (Mouhat et al. 2008), der den hERG-Kanal von der extrazellulären Seite aus, durch Bindung an die „Turret“-Helix (Aminosäuren

583 – 597) im S5-P-Linker blockiert. Da CnErg1 den Kanal nur unvollständig blockiert, wurde vermutet, dass CnErg1 die Pore nicht vollständig verschließt, so dass Kaliumionen weiterhin passieren können, oder dass CnErg1 in der Nähe der Pore bindet und das Öffnungsverhalten des Kanals so verändert, dass die Kanalleitfähigkeit stark reduziert, aber nicht vollständig gehemmt wird (Hill et al. 2007). In einer Arbeit von Hill et al. (2007) wurde ein Modell entwickelt, das die unvollständige Blockade von hERG-Strömen durch CnErg1 durch die Kinetik der Interaktion von CnErg1 mit dem hERG-Kanal erklärt. Nach diesem Modell entsteht durch Bindung des Toxins (T) an den hERG-Kanal (C) zunächst ein Übergangskomplex (TC*), in dem die Orientierung der Moleküle zu einem ersten Kontakt zwischen Toxin und Kanal führt. Dieser Übergangskomplex geht dann in den Toxin-blockierten Kanal (TC) über:



Aufgrund der schnellen Fluktuation zwischen dem vollständig K^+ -leitenden Übergangskomplex TC^* und dem Toxin-blockierten Kanal TC verbleiben auch in Anwesenheit hoher CnErg1-Konzentrationen 6-9 % der Kanäle im Zustand der Übergangskomplexe und verursachen den Reststrom. Die Interaktionen, die zur Stabilisierung der blockierten Konformation führen, müssen relativ schwach sein und weisen im Vergleich zur Assoziationsrate eine schnelle Dissoziationsrate auf, was die unvollständige Blockade von hERG-Strömen erklärt. Unsere Untersuchungen weisen ebenfalls darauf hin, dass CnErg1 nicht zu einer vollständigen Blockade von hERG-Strömen führt. Die höchste untersuchte CnErg1-Konzentration betrug 100 nM und entspricht etwa dem 15fachen IC_{50} -Wert ($IC_{50} = 6,4$ nM). Diese Konzentration blockierte hERG-Spitzen-Tail-Ströme um $83,7 \pm 2,7$ %. Die 10fachen IC_{50} -Konzentrationen von Terfenadin, Fluvoxamin und Dofetilid führten dagegen zu einer nahezu vollständigen Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen (300 nM Terfenadin: $95,1 \pm 1,5$ %; 30 μ M Fluvoxamin: $93,7 \pm 1,5$ % und 100 nM Dofetilid: $99,7 \pm 1,9$ %). Die Angleichung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von CnErg1 erfolgte gegen einen durch hohe CnErg1-Konzentrationen nicht hemmbaren Reststrom a ($a = 1 - \alpha$, Kap. 2.8.13, Gleichung 11), der Reststrom betrug 15,9 %. Terfenadin, Dofetilid, Chlorbutanol und Fluvoxamin führten dagegen zu einer vollständigen Blockade des hERG-Stroms ($a = 0$).

Der IC_{50} -Wert (7,4 mM) für die Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch Chlorbutanol liegt im Bereich eines publizierten Wertes (4,4 mM; Kornick et al. 2003). Von den untersuchten Substanzen wies Chlorbutanol die niedrigste Affinität zum hERG-Kanal auf

(IC₅₀ im millimolaren Bereich). In einer Arbeit von Yabuuchi et al. (2007) wurde der Einfluss hyperosmolarer Lösungen auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme in CHO-(Chinesische Hamster Ovarial-) Zellen untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mannitol-Lösungen mit steigenden Konzentrationen zu einer Osmolalitäts-abhängigen Blockade des hERG-Stroms führen. Die in der Arbeit von Yabuuchi et al. verwendete extrazelluläre Lösung (Kontrolllösung) wies eine Osmolalität von 273 mOsm/kg auf. Für Mannitol-Lösungen mit einer Osmolalität von 320 mOsm/kg konnten nur geringe Hemmeffekte auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme nachgewiesen werden (~5 % Blockade). Bei einer Osmolalität von 387 mOsm/kg (108 mM Mannitol-Lösung) der Untersuchungslösung wurden hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 57 % reduziert. 308 mM Mannitol (601 mOsm/kg) hemmten die Spitzen-Tail-Ströme in gleichem Ausmaß wie 1 µM E-4031, ein selektiver hERG-Kanal-Blocker (vollständige Blockade). Die höchste, in der vorliegenden Arbeit untersuchte Chlorbutanol-Konzentration betrug 30 mM. Mit Hilfe eines Osmometers (Osmometer, 800 cl, Slamed) wurde die Osmolalität der in der vorliegenden Arbeit verwendeten extrazellulären Lösung ohne und mit 30 mM Chlorbutanol bestimmt. Die Osmolalität der extrazellulären Lösung ohne Chlorbutanol betrug 299 ± 2 mOsm/kg, die der 30 mM Chlorbutanol-Lösung 331 ± 2 mOsm/kg. Für die 30 mM Chlorbutanol-Lösung konnte eine Hemmung der hERG-Spitzen-Tail-Ströme um $81,9 \pm 2,2$ % nachgewiesen werden. Demgegenüber führte die Mannitol-Lösung mit einer vergleichbaren Osmolalität von 320 mOsm/kg nur zu einer etwa 5 %igen Blockade der hERG-Spitzen-Tail-Ströme. Da es sich bei der Osmolalität um eine kolligative Eigenschaft handelt, die nur von der Anzahl der gelösten Teilchen und nicht von deren chemischen oder physikalischen Eigenschaften abhängt, und da die Osmolalität der 30 mM Chlorbutanol-Lösung in einem Bereich liegt, in dem nur sehr geringe Osmolalitäts-bedingte Effekte am hERG-Kanal nachgewiesen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den nachgewiesenen Chlorbutanol-Effekten um Substanz-spezifische Effekte handelt.

Für Terfenadin, Dofetilid und Chlorbutanol wurden für die Hemmung der Aktivierungsströme im Vergleich zu der Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen (Deaktivierungsströme) signifikant höhere IC₅₀-Konzentrationen ermittelt, dagegen konnten für Fluvoxamin und CnErg1 keine signifikanten Unterschiede der IC₅₀-Konzentrationen nachgewiesen werden (Kap. 3.1.2, Tab. 5). Die Aktivierungsströme wurden durch die Applikation eines Depolarisationspulses auf +20 mV über eine Dauer von 2 s ausgelöst. Neben der Öffnung von hERG-Kanälen findet eine rasche Inaktivierung von hERG-Strömen statt. Die Spitzen-Tail-Ströme wurden durch Applikation eines Repolarisationspulses auf -40 mV ausgelöst, wobei

es zur raschen Erholung der hERG-Ströme von der Inaktivierung kam. Zu Beginn der Repolarisation waren alle hERG-Kanäle geöffnet, anschließend setzte die Deaktivierung ein, wobei der offene in den deaktivierten Zustand übergeht. Zur Ermittlung der Spitzen-Tail-Ströme wurde auf den Beginn des Repolarisationspulses extrapoliert, so dass der hERG-Kanal nur im geöffneten Zustand erfasst wurde. Für Terfenadin, Dofetilid und Chlorbutanol waren die IC_{50} -Konzentrationen der Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen jeweils um den Faktor 2,3, 2,3 und 2,7 geringer als die IC_{50} -Konzentrationen der Hemmung von Aktivierungsströmen. Diese Unterschiede könnten darauf hinweisen, dass diese Substanzen eine höhere Affinität zum offenen als zum offen/inaktivierten Zustand des hERG-Kanals besitzen. Allerdings ist aus der Literatur und aus der vorliegenden Arbeit bekannt, dass Terfenadin eine hohe Affinität zum inaktivierten Zustand des hERG-Kanals aufweist. Fluvoxamin und CnErg1 zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Hemmung von Aktivierungs- und Deaktivierungsströmen, woraus geschlossen werden könnte, dass Fluvoxamin und CnErg1 ähnliche Affinitäten zum offenen und zum offen/inaktivierten Zustand des hERG-Kanals aufweisen.

4.2 Kombinationsuntersuchungen

In der vorliegenden Arbeit wurde Terfenadin als Porenblocker in Kombination mit anderen hERG-Strom-blockierenden Substanzen mit unterschiedlichen Bindungsstellen am hERG-Kanal untersucht. Die hochaffine Bindungsstelle von Terfenadin ist im zentralen Hohlraum des hERG-Kanals zwischen dem Selektivitätsfilter und dem Aktivierungstor lokalisiert. Dabei sind die Aminosäuren Tyr652 und Phe656 in der S6 Domäne besonders wichtig für die Bindung von Terfenadin. Kürzlich wurde gezeigt, dass Terfenadin auch mit Thr623 und Ser624, welche an der Basis der Porenhelix lokalisiert sind, interagiert (Kamiya et al. 2008, Thai et al. 2010). Die Aminosäuren Thr623 und Ser624 liegen unterhalb des Selektivitätsfilters und begrenzen das obere Ende des inneren Hohlraumes. Die Hydroxyl-Gruppen von Thr623 und Ser624 könnten Wasserstoffbrücken-Bindungen mit hERG-Kanal-Blockern eingehen (Thai et al. 2010). Die folgende Abbildung zeigt das von Stansfeld et al. (2007) postulierte Pharmakophoren-Modell und die Bindung von Terfenadin im Inneren der Pore.

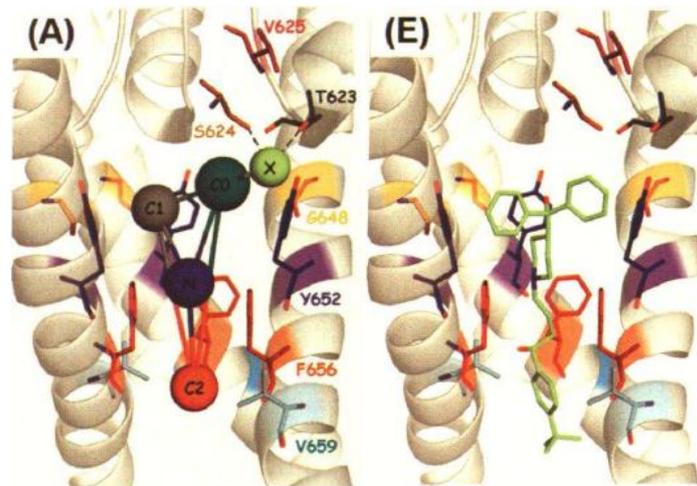


Abb. 69: Pharmakophoren-Modell nach Stansfeld et al. (2007) und Bindung von Terfenadin. A: Dargestellt ist ein Pharmakophor, dessen protonierter Stickstoff N (lila) oberhalb von Phe656 (rot), zentral im inneren Hohlraum bindet. Der Arzneistoffanteil unterhalb des Stickstoff C2 (rot) ist in der Regel hydrophob und geht hydrophobe Interaktionen mit den Aminosäuren Phe656 und Val659 (hellblau) ein. Der Pharmakophor besitzt einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor X (grün) in p-Position zum Phenyl-Ring C0 (dunkelgrün), welcher Wasserstoffbrücken mit Thr623 (schwarz) und Ser624 (braun) ausbildet. In dieser Anordnung geht der Phenyl-Ring C0 π - π -Interaktionen mit Tyr52 (purpurn) ein. E: Bindung von Terfenadin im Poreninneren des hERG-Kanals.

Dofetilid bindet neben Tyr652 und Phe656 auch an die folgenden Aminosäuren: Thr623, Ser624 und Val625 an der Basis der Porenhelix sowie Gly648 und Val659 in der S6 Domäne (Lees-Miller et al. 1999; Kamiya et al. 2006; Review in Stansfeld et al. 2007 und Thai & Ecker 2007). Die Mutationen an den Positionen Val625, Gly648 und Val659 hatten dagegen keinen Einfluss auf die Terfenadin-Bindung am hERG-Kanal (Kamiya et al. 2008, Mitcheson 2008). Nach dem *in silico*-Modell des hERG-Kanals nach Stansfeld et al. (2007) fungieren die beiden Sauerstoff-Atome der Methansulfonamid-Gruppe des Dofetilids als Wasserstoffbrücken-Akzeptoren und interagieren mit den Hydroxyl-Gruppen der Seitenketten von Thr623 und Ser624, über den Phenyl-Ring kommt es zu π - π -Interaktionen mit Try652, und der Rest des Moleküls liegt vertikal entlang des Ionenleitungsweges. Terfenadin und Dofetilid weisen überlappende Bindungsstellen im Poreninneren des hERG-Kanals auf.

Als Mechanismus der hERG-Kanal-Blockade durch Porenblocker wird das Einschließen des Moleküls im Poreninneren (Mitcheson et al. 2000 B) angenommen (Abb. 70). Bei Porenblockern handelt es sich in der Regel um basische Substanzen. Sie passieren die Lipidmembran als neutrale Moleküle und liegen bei physiologischen pH-Werten als Kationen im Cytosol vor. Infolge der Depolarisation und Kanalöffnung erhalten sie Zugang zum Inneren der Kanalpore. Die Interaktion mit der Bindungsstelle erfolgt vor allem im inaktivierten Zustand (Tristani-Firouzi 2001). Durch konformative Änderungen während der

C-Typ-Inaktivierung wird die Affinität zur Bindungsstelle erhöht (Weerapura et al. 2002). In der sich anschließenden Repolarisationsphase schließt das Aktivierungstor infolge des Kreuzens der 6. Domänen im unteren Bereich der Pore (Deaktivierung), und die hERG-Kanal-Blocker werden im Poreninneren eingeschlossen („molecular trapping“). Infolgedessen ist der Block nur sehr langsam reversibel (Mitcheson 2000 B).

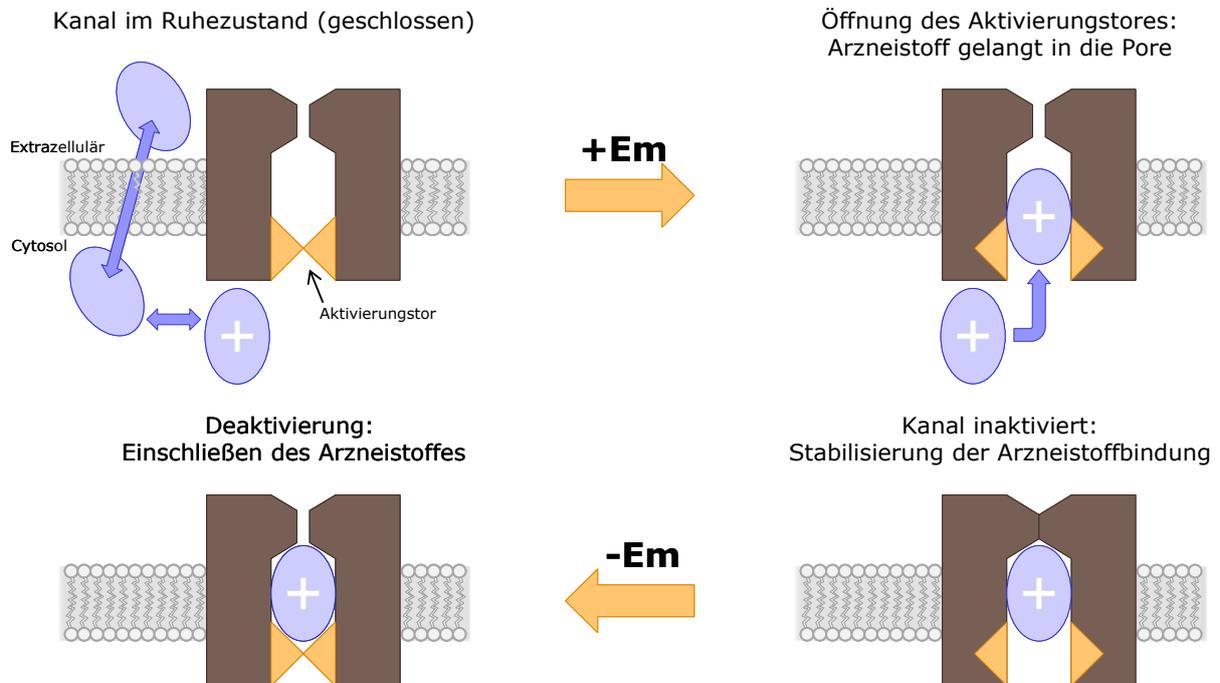


Abb. 70: Einschließen eines Porenblockers ("molecular trapping") (verändert nach Mitcheson et al. 2000 B). Nach Passage der neutralen Form durch die Lipiddoppelschicht liegen die Arzneistoffmoleküle als Kationen im Cytosol vor (oben links). Durch Öffnung des Kanals an der cytoplasmatischen Seite erhalten sie Zugang zum Inneren der Pore (oben rechts). Durch die Inaktivierung des Kanals und dadurch bedingte konformative Änderungen erhalten die Porenblocker Zugang zu ihrer Bindungsstelle im Poreninneren (unten rechts) und werden durch das Schließen des Aktivierungstores im Inneren eingeschlossen (unten links).

Aufgrund der überlappenden Bindungsstellen von Terfenadin und Dofetilid im Poreninneren des hERG-Kanals kann jeweils nur eine der beiden Substanzen gebunden sein, was die in der vorliegenden Arbeit gezeigten additiven Effekten zwischen diesen beiden Substanzen erklären könnte (Mitcheson et al. 2000 A; Review in Stansfeld et al. 2007; Kap. 3.2.1, Tab. 7).

Zwischen Terfenadin und dem selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer Fluvoxamin wurden ebenfalls additive Effekte auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme nachgewiesen (Kap. 3.2.1, Tab. 7). Aufgrund der Annahme einer extrazellulären Bindungsstelle für Fluvoxamin, wie sie von Milnes et al. (2003) und Mitcheson (2003) postuliert wurde, wären Wechselwirkungen mit dem Porenblocker Terfenadin denkbar. 2003 konnten Milnes et al. erstmals zeigen, dass

die hERG-Strom-Blockade durch Fluvoxamin relativ insensitive gegenüber Mutationen an den Positionen Tyr652 und Phe656 ist. Da der Block durch Fluvoxamin extrem schnell (innerhalb von 10 ms) einsetzt und unabhängig von der Inaktivierung ist, wurde vermutet, dass Fluvoxamin an der äußeren Öffnung des Kanals bindet (Kommentar in Mitcheson, 2003). In der vorliegenden Arbeit hatte die intrazelluläre Applikation von Fluvoxamin keine Effekte auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme (Kap. 3.3.3, Abb. 53), was ebenfalls für eine extrazelluläre Lokalisation der Fluvoxamin-Bindungsstelle spricht. Im Fall einer extrazellulären Bindung von Fluvoxamin, wie sie von Milnes et al. (2003) und Mitcheson (2003) angenommen wurde, wären antagonistische Effekte zwischen Terfenadin und Fluvoxamin am hERG-Kanal denkbar. Die Bindung von Fluvoxamin an eine extrazelluläre Bindungsstelle könnte das Schließen des extrazellulären Inaktivierungstores beeinflussen und so den hERG-Strom-hemmenden Effekt von Terfenadin antagonisieren, da die Interaktion von Terfenadin mit der Bindungsstelle bevorzugt im inaktivierten Zustand erfolgt.

In einem *in silico*-Modell des hERG-Kanals postulieren Stansfeld et al. (2007) eine Fluvoxamin-Bindungsstelle im Poreninneren. In diesem Modell bindet der protonierte Stickstoff des Fluvoxamins unterhalb der Aminosäure Phe656, also außerhalb des inneren Hohlraums. Gleichzeitig interagieren die Trifluormethyl-Gruppen mit der nicht-aromatischen Bindungsstelle aus Thr623 und Ser624 im Inneren der Pore.

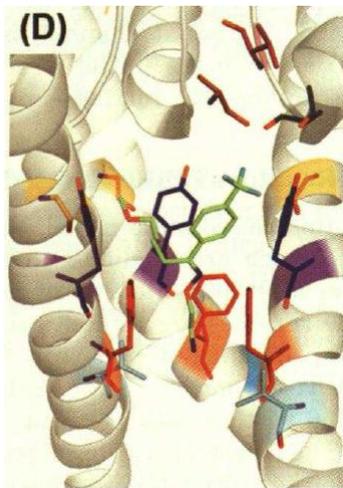


Abb. 71: Bindung von Fluvoxamin im Poreninneren des hERG-Kanals (Stansfeld et al. 2007).

Nach dem von Stansfeld et al. (2007) entwickelten Pharmakophoren-Modell würden Terfenadin und Fluvoxamin überlappende Bindungsstellen im Poreninneren des hERG-Kanals aufweisen, was die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen additiven Effekte zwischen Terfenadin und Fluvoxamin erklären könnte. Aus den beobachteten additiven

Effekten zwischen Terfenadin und Fluvoxamin kann die Lokalisation der Fluvoxamin-Bindungsstelle am hERG-Kanal nicht abgeleitet werden. Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Bindungsstelle des Fluvoxamins noch nicht aufgeklärt, weitere Untersuchungen sind erforderlich.

In einer Studie von Margulis & Sorota (2008) wurden zwischen dem Porenblocker Cisaprid und Chinidin, Fluvoxamin bzw. BeKm-1 additive inhibitorische Effekte auf hERG-Ströme nachgewiesen. Dabei wurde zunächst immer der Porenblocker Cisaprid appliziert und der zweite hERG-Strom-Blocker anschließend simultan zugegeben. Die zwischen Cisaprid und Chinidin nachgewiesenen additiven Effekte sind auf die überlappenden Bindungsstellen im Poreninneren zurückzuführen und entsprechen den in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen additiven Effekten zwischen den beiden Porenblockern Terfenadin und Dofetilid. Bei höheren Konzentrationen fanden Margulis & Sorota schwache subadditive Effekte zwischen Cisaprid und Fluvoxamin, welche jedoch als pharmakologisch nicht signifikant eingestuft wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwischen dem Porenblocker Terfenadin und Fluvoxamin additive Effekte nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen dem Porenblocker Terfenadin und dem Skorpiontoxin CnErg1, welches eine nachgewiesene Bindungsstelle auf der extrazellulären Seite des hERG-Kanals aufweist, untersucht. Im Gegensatz zu der Arbeit von Margulis & Sorota (2008), in der zwischen dem Porenblocker Cisaprid und dem Skorpiontoxin BeKm-1 additive Effekte nachgewiesen wurden, konnten in der vorliegenden Arbeit zwischen Terfenadin und CnErg1 bei simultaner Applikation niedriger Konzentrationen der beiden hERG-Kanal-Blocker subadditive Effekte nachgewiesen werden (Kap. 3.2.1, Tab. 7). Für hERG-spezifische Peptidtoxine, die aus Skorpiongiften isoliert wurden (z.B. CnErg1 aus *Centruroides noxius*; Gurrola et al. 1999), konnten extrazelluläre Bindungsstellen identifiziert werden. Der hERG-Kanal besitzt einen ungewöhnlich langen S5-P-Linker (43 Aminosäuren im Gegensatz zu 12-23 Aminosäuren in anderen K_v-Kanälen), welcher wahrscheinlich eine amphipatische α -Helix („Turret“-Helix) formt, die zusammen mit dem P-S6-Linker eine hydrophobe CnErg1-Bindungsstelle bildet (Gurrola et al. 1999; Pardo-Lopez et al. 2002; Review in Korolkova et al. 2004 und in Wanke und Restano-Cassulini 2007).

Um die bei niedrigen Konzentrationen von Terfenadin und CnErg1 nachgewiesenen subadditiven Effekte genauer zu untersuchen, wurden hERG-Spitzen-Tail-Ströme zunächst

mit Terfenadin um 50 % blockiert und anschließend ansteigende CnErg1-Konzentrationen simultan appliziert. Bei diesen Untersuchungen lag der Kombinationsindex (CI) zwischen 0,83 und 1,13 (Kap. 3.2.3.2, Tab. 10), was auf Additivität schließen lässt (Chou 2006). Diese Ergebnisse stimmen mit den von Margulis & Sorota gefundenen additiven Effekten zwischen Cisaprid und BeKm-1 überein. In weiteren Untersuchungen wurden hERG-Spitzen-Tail-Ströme mit der halbmaximalen Hemmkonzentration von CnErg1 um 42 % gehemmt (entspricht der Hälfte der maximalen CnErg1-induzierten hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade von 84 %) und danach erfolgte die simultane Applikation von Terfenadin in ansteigenden Konzentrationen. Die CI-Werte dieser Untersuchungen lagen zwischen 1,20 und 1,58 (Kap. 3.2.3.2, Tab. 10), was nach den Chou-Kriterien (2006) auf Antagonismus hindeutet. Die Interaktion zwischen Terfenadin und CnErg1 kann daher nicht einfach durch Additivität der beiden Testsubstanzen beschrieben werden. Die Ergebnisse weisen vielmehr darauf hin, dass CnErg1 die durch Terfenadin-induzierte hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade antagonisiert. Es ist vorstellbar, dass die Bindung von CnErg1 an die extrazelluläre Bindungsstelle des S5-P-Linkers die Öffnung des Aktivierungstores auf der intrazellulären Seite des Kanals durch konformatorische Änderungen stört und somit den Zugang von Terfenadin zum Poreninneren behindert. Perrin et al. (2008) stellten die Hypothese auf, dass die amphipatische α -Helix im S5P-Linker an der spannungsabhängigen Inaktivierung von hERG-Kanälen beteiligt ist. Die Bindung von CnErg1 an die extrazelluläre Bindungsstelle innerhalb dieser amphipatischen α -Helix könnte demzufolge den Inaktivierungsprozess behindern. Dies könnte wiederum zu einer Affinitätsabnahme des Terfenadins führen, da die Interaktion des Terfenadins mit seiner Bindungsstelle im Poreninneren bevorzugt im inaktivierten Zustand des hERG-Kanals erfolgt. Demgegenüber scheint die Bindung von Terfenadin an seine Bindungsstelle im Poreninneren keinen Einfluss auf die Affinität von CnErg1 an der extrazellulären Bindungsstelle zu haben, weshalb bei diesen Untersuchungen additive Effekte nachgewiesen wurden.

Darüber hinaus wurde die Interaktion zwischen Terfenadin und Chlorbutanol am hERG-Kanal untersucht. In einer Arbeit von Kornick et al. (2003) wurde gezeigt, dass das Konservierungsmittel Chlorbutanol die hERG-Strom-hemmenden Effekte des Opioids Methadon verstärkt. Neben Chlorbutanol sind weitere Hilfsstoffe bekannt, die den hERG-Kanal blockieren. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die als Lösungsvermittler eingesetzten Hydroxypropyl- β -Cyclodextrine in einer Konzentration von 6 % zu einer Reduktion von hERG-Strömen führen (Mikhail et al. 2007). Cyclodextrine modifizieren die

Lipidumgebung und die Cholesterolzusammensetzung der Plasmamembran. Balijepalli et al. (2007) konnten zeigen, dass hERG-Kanäle in HEK 293-Zellen in Cholesterol- und Sphingolipid-haltigen Mikrodomänen der Plasmamembran, sog. lipid rafts, angereichert sind. Die Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin führte zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von hERG-Strömen und zu einer Beschleunigung der Deaktivierung von hERG-Strömen. Als mögliche Erklärung wurden die Methyl- β -Cyclodextrin-vermittelte Abreicherung von Cholesterol aus der Plasmamembran und die dadurch bedingte Änderung der Lipidumgebung der hERG-Kanäle diskutiert. Des Weiteren hemmen wasserlösliche Lösungsvermittler wie Tween 20, Tween 80 und Cremophor EL hERG-Ströme (Himmel 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnten zwischen Terfenadin und Chlorbutanol synergistische Effekte am hERG-Kanal nachgewiesen werden (Kap. 3.2.1, Tab. 7). Die Beobachtung, dass der synergistische Effekt mit steigenden Konzentrationen von Terfenadin und Chlorbutanol zunahm, kann dadurch erklärt werden, dass die Wahrscheinlichkeit für die gleichzeitige Bindung beider Moleküle am selben Kanal mit steigenden Konzentrationen zunimmt. Wurden hERG-Spitzen-Tail-Ströme um 25 bzw. 50 % mit Chlorbutanol gehemmt und anschließend simultan steigende Terfenadin-Konzentrationen appliziert, nahmen die synergistischen Effekte mit zunehmender Vorhemmung des hERG-Kanals durch Chlorbutanol deutlich zu (Kap. 3.2.4.1, Abb. 33). Beim umgekehrten Fall, der 25 bzw. 50 %igen Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen mit Terfenadin und der anschließenden simultanen Applikation ansteigender Chlorbutanol-Konzentrationen, nahmen die synergistischen Effekte ebenfalls mit zunehmender Vorhemmung durch Terfenadin zu (Kap. 3.2.4.2, Abb. 36). Es wurde gezeigt, dass es zwischen Terfenadin und Chlorbutanol zu einer gegenseitigen konzentrationsabhängigen Verstärkung der hERG-Strom-hemmenden Effekte kommt. Die Bindungsstelle des Chlorbutanols am hERG-Kanal ist bisher nicht bekannt, was die Aufklärung der Mechanismen des Synergismus zwischen Terfenadin und Chlorbutanol am hERG-Kanal erschwert. Daher wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um die Bindungsstelle des Chlorbutanols einzugrenzen und den Mechanismus der Interaktion erklären zu können.

4.3 Untersuchung der Mechanismen der hERG-Strom-Blockade durch Terfenadin, Chlorbutanol und die Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination

hERG-Strom-blockierende Substanzen hemmen die Funktion des Kanals über verschiedene Mechanismen, welche von der Zeit, von der Spannung und somit vom Kanalzustand abhängen (Review in Yao et al. 2005). Da zwischen Terfenadin und Chlorbutanol synergistische Effekte am hERG-Kanal nachgewiesen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass beide Substanzen mit unterschiedlichen Bindungsstellen am hERG-Kanal interagieren. Das Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die Bindungsstellen und die Mechanismen der hERG-Strom-Blockade durch Terfenadin und Chlorbutanol aufzuklären, um die synergistischen Effekte zwischen den beiden Substanzen am hERG-Kanal erklären zu können.

Es konnte gezeigt werden, dass viele hERG-Kanal-Blocker zu einer signifikanten Linksverschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung ($V_{1/2}$) führen. Die halbmaximale Aktivierungsspannung ist die Spannung, bei der 50 % der hERG-Kanäle im aktivierten Zustand vorliegen. In einer Arbeit von Schönherr et al. (1999) konnte gezeigt werden, dass die halbmaximale Aktivierungsspannung von dem verwendeten Pulsprotokoll abhängt. Die Dauer des Depolarisationspulses wurde zwischen 0,6 und 15 s variiert. Die Werte für $V_{1/2}$ betragen -16,7 mV bei einer Depolarisationsdauer von 0,6 s und -44,4 mV bei einer Depolarisationsdauer von 15 s. Die Änderung der Dauer des Depolarisationspulses allein führte zu einer Verschiebung von $V_{1/2}$ um 27,7 mV. Gemäß der Arbeit von Schönherr et al. (1999) schwanken die publizierten Werte für die halbmaximale Aktivierungsspannung des hERG-Kanals von -24 bis +6 mV. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Dauer des Depolarisationspulses zu einer signifikanten Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung zu negativeren Potentialen führte (2 s: 9,1 mV; 5 s: 5,6 mV; 12 s: -3,4 mV; Kap. 3.3.1.1, Abb. 38). Mögliche Ursachen für die relativ hohe Variabilität der halbmaximalen Aktivierungsspannung zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen scheinen daher die unterschiedlichen Messbedingungen, wie vor allem die Dauer des Aktivierungspulses (siehe oben), aber auch die Messtemperatur (Raumtemperatur oder 37°C), die Salzkonzentrationen der verwendeten intra- und extrazellulären Lösungen, das Junction Potential und die unterschiedliche Kompensation des Serienwiderstandes zu sein. Beim Junction Potential handelt es sich um ein Potential, das zwischen unterschiedlich

zusammengesetzten Bad- und Pipettenlösungen entstehen kann. In unserer Arbeitsgruppe wurde für das Junction Potential ein Wert von 5,2 mV ermittelt, d.h. dieses Potential müsste noch von den in der Arbeit angegebenen Werten abgezogen werden.

Eine Verschiebung der Aktivierungskurve zu negativeren Spannungen wurde für die folgenden Substanzen gezeigt: Haloperidol (Suessbrich et al. 1997), Cisaprid (Walker et al. 1999), Propafenon (Paul et al. 2002), Fluvoxamin (Milnes et al. 2003), Moxifloxacin (Alexandrou et al. 2006) und Droperidol (Schwoerer et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung jeweils unter konstanten Versuchsbedingungen (Raumtemperatur, 2 s Depolarisationspuls, 50 % R_S -Kompensation) unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluss von Terfenadin, Chlorbutanol und der Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol untersucht. Chlorbutanol und die Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination führten zu signifikanten Linksverschiebungen der Aktivierungskurve. Terfenadin induzierte eine leichte, aber nicht signifikante Verschiebung der Aktivierungskurve in hyperpolarisierender Richtung ($\Delta -3,4$ mV). Unter dem Einfluss von Chlorbutanol war die Linksverschiebung am größten ($\Delta -24,3$ mV), der Effekt der Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination lag zwischen den Effekten der Einzelsubstanzen ($\Delta -14$ mV; Kap. 3.3.1.2, Abb. 40). Eine Verschiebung der Aktivierungskurve in hyperpolarisierender Richtung könnte durch eine Stabilisierung der offenen Konformation des hERG-Kanals erklärt werden (Ganapathi et al. 2009), das heißt, dass der hERG-Kanal unter dem Einfluss der Substanz bereits bei niedrigeren Spannungen öffnet. Im Allgemeinen wird eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung entweder durch einen direkten Einfluss auf den Spannungssensor oder alternativ durch eine Beeinflussung der Kopplung des Spannungssensors mit der Öffnung der Pore (Aktivierungstor) hervorgerufen. Der unterschiedliche Einfluss von Terfenadin und Chlorbutanol auf die halbmaximale Aktivierungsspannung könnte auf unterschiedliche Bindungsstellen der Substanzen am hERG-Kanal hindeuten.

Bei niedrigen Membranpotentialen (0 mV), an der Schwelle der hERG-Kanal-Aktivierung, konnten für Chlorbutanol und die Terfenadin/Chlorbutanol Kombination stimulierende Effekte nachgewiesen werden. Für andere hERG-Kanal-blockierende Substanzen, wie Nifekalant, Azimilid, Almokalant, Ketanserin und das Amiodaron-Derivat KB130015, konnten bei niedrigen Membranpotentialen ebenfalls stimulierende Effekte auf hERG-Ströme nachgewiesen werden (Review in Inanobe et al. 2008, Tu et al. 2008, Gessner et al. 2010).

Der duale Effekt dieser Substanzen beinhaltet die Steigerung von hERG-Strömen bei niedrigen Membranpotentialen und die Hemmung von hERG-Strömen bei positiveren Membranpotentialen. Im Fall von Azimilid wurde der duale Effekt durch unterschiedliche Wirkungen über zwei verschiedene Bindungsstellen des Arzneimittels am hERG-Kanal erklärt (Jiang et al. 1999). Die agonistische Wirkung soll auf einer Arzneimittel-induzierten Konformationsänderung in der extrazellulären Domäne beruhen (dort soll die agonistische Bindungsstelle liegen), so dass das Aktivierungstor bei negativen Spannungspulsen einfacher öffnen kann. Bei positiven Spannungen überwiegt die antagonistische Wirkung, die über eine in der Pore lokalisierte Bindungsstelle vermittelt werden soll (Jiang et al. 1999). Chlorbutanol wies ebenfalls duale Effekte an hERG-Kanälen auf und zeigte in Abhängigkeit von der Membranspannung sowohl stimulierende als auch hemmende Effekte auf hERG-Spitzen-Tail-Ströme. Die agonistische Wirkung von Chlorbutanol könnte durch eine Modifizierung des Aktivierungsprozesses ausgelöst werden. Dafür spricht auch die durch Chlorbutanol-induzierte Verschiebung der Aktivierungskurve zu negativeren Potentialen. Möglicherweise existiert neben der Bindungsstelle, welche die hemmenden Effekte auf hERG-Ströme vermittelt, eine zweite Bindungsstelle, die für die stimulierenden Effekte verantwortlich ist. Denkbar wäre auch, dass nur eine Bindungsstelle existiert, die spannungsabhängig die aktivierenden und die hemmenden Wirkungen vermittelt. Eine solche Hypothese wurde auch von Gessner et al. (2010) für das Amiodaron-Derivat KB130015 postuliert.

Eine spannungsabhängige Blockade von hERG-Strömen wurde für verschiedene Substanzen nachgewiesen, die eine Affinität zum offenen und/oder inaktivierten Zustand des Kanals besitzen, wie z.B. Cisaprid (Walker et al. 1999), Disopyramid (Paul et al. 2001), Propafenon (Paul et al. 2002), Chloroquin (Sanchez-Chapula et al. 2002), Halofantrin (Sanchez-Chapula et al. 2004), Maprotilin (Ferrer-Villada et al. 2006), Moxifloxacin (Alexandrou et al. 2006) und Ziprasidon (Su et al. 2006). Die Reduktion von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch Terfenadin, durch Chlorbutanol und durch die Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol war von der angelegten Membranspannung abhängig, da das Ausmaß der Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen mit positiveren Potentialen deutlich größer wurde (Kap. 3.3.1.2, Abb. 40). Zwischen +10 und +40 mV nahm die Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch Terfenadin um 19,4 % signifikant zu. Die spannungsabhängige Hemmung von hERG-Strömen durch Terfenadin konnte auch von Suessbrich et al. (1996) gezeigt werden. In dieser Arbeit stieg die Blockade von hERG-Strömen von 47,0 % bei -20 mV auf 66,2 % bei +20 mV. Dagegen konnten Roy et al. (1996) keine Spannungsabhängigkeit der Hemmung von

hERG-Strömen durch Terfenadin nachweisen. Die spannungsabhängige Blockade durch Terfenadin nahm in einem Membranpotentialbereich zu, in dem die Aktivierung der hERG-Kanäle und damit die Anzahl der offen/inaktivierten hERG-Kanäle zunahm, an die Terfenadin bevorzugt bindet. Die Blockade der hERG-Spitzen-Tail-Ströme durch Chlorbutanol nahm zwischen +10 und +40 mV um 30,0 % signifikant zu. Da Chlorbutanol zu einer Linksverschiebung der Aktivierungskurve führte, zeigte sich die Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen in einem Membranpotentialbereich, in dem hERG-Kanäle im geöffneten Zustand vorlagen.

In weiteren Untersuchungen wurde die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung untersucht. Terfenadin führte zu einer signifikanten Verschiebung der Inaktivierungskurve zu negativeren Potentialen ($\Delta -11,2$ mV). Terfenadin hält den hERG-Kanal demzufolge im inaktivierten Zustand fest und begünstigt die Inaktivierung. Eine Linksverschiebung der Inaktivierungskurve wurde für verschiedene Substanzen nachgewiesen, wie z.B. Fluoxetin (Thomas et al. 2001), Verapamil (Duan et al. 2007), Droperidol (Schwoerer et al. 2007), Mianserin (Scherer et al. 2008) und Capsaicin (Xing et al. 2010). Demgegenüber verschob Chlorbutanol die Inaktivierungskurve zu positiveren Potentialen ($\Delta +13,4$ mV), Chlorbutanol hemmte demzufolge die Inaktivierung und scheint den offenen Zustand des hERG-Kanals zu stabilisieren, was mit den stimulierenden Chlorbutanol-Effekten bei niedrigen Membranspannungen korreliert. Die Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination hatte keinen signifikanten Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung ($\Delta 0,3$ mV; Kap. 3.3.1.3, Abb. 42), die Effekte der Einzelsubstanzen scheinen sich in der Kombination zu kompensieren. Die gegensätzlichen Effekte von Terfenadin und Chlorbutanol auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung deuten auf unterschiedliche Mechanismen der hERG-Kanal-Blockade und damit auf unterschiedliche Bindungsstellen der beiden Substanzen am hERG-Kanal hin. Zur Anpassung der Inaktivierungskurven wurde eine modifizierte Boltzmann-Funktion verwendet. Die Kurven wurden an ein Plateau a angepasst, da sich die Inaktivierungskurven unter dem Einfluss von Terfenadin, von Chlorbutanol und der Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination nicht an Null annäherten. Dies deutet darauf hin, dass unter dem Einfluss von Terfenadin, von Chlorbutanol und der Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination auch bei Spannungen > 20 mV ein kleiner Teil der hERG-Kanäle nicht vollständig inaktiviert ist.

Mit Hilfe eines weiteren Pulsprotokolls wurde die Kinetik der Deaktivierung sowie die Kinetik der Erholung von der Inaktivierung untersucht. Der Deaktivierungsprozess des hERG-Kanals wird mit zwei Exponentialfunktionen beschrieben, woraus sich eine schnelle und eine langsame Deaktivierungszeitkonstante ableiten. In den vorliegenden Untersuchungen wiesen die schnelle und die langsame Zeitkonstante der Deaktivierung bei Auftragung der Spannung (x-Achse) gegen die Zeit (y-Achse) jeweils einen glockenförmigen Verlauf auf (Kap. 3.3.1.4, Abb. 45). Bei niedrigen Spannungen waren die Zeitkonstanten der Deaktivierung sehr klein, das bedeutet, dass der Kanal sehr schnell deaktiviert. Dagegen durchliefen die schnelle und die langsame Deaktivierungszeitkonstanten ein Maximum bei -40 bzw. -20 mV (Kap. 3.3.1.4, Abb. 45). Bei diesen Spannungen war die Deaktivierung des hERG-Kanals deutlich verlangsamt. Dieses Ergebnis veranschaulicht die physiologische Bedeutung des hERG-Kanals. Bei Spannungen um ca. -40 bis -20 mV während der Repolarisationsphase ist die Deaktivierung verlangsamt, der Kanal verbleibt länger im geöffneten Zustand und trägt so entscheidend zur Repolarisation des kardialen Aktionspotentials bei. Die Untersuchungen zeigten, dass Terfenadin, Chlorbutanol und die Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination keinen Einfluss auf die Deaktivierungszeitkonstanten hatten (Vergleich von τ_{fast} und τ_{slow} bei -40 mV; Kap. 3.3.1.4, Abb. 45).

Nach vollständiger Inaktivierung der hERG-Kanäle durch Applikation eines Spannungspulses auf +40 mV wurden Repolarisationspulse zwischen -120 und +20 mV appliziert, die zu einer unterschiedlich starken Erholung der hERG-Kanäle von der Inaktivierung führten. Unter dem Einfluss von Chlorbutanol wurde die Erholung von der Inaktivierung bei -40 mV signifikant beschleunigt (Kontrolle: $\tau_{Erholung}$ 12,6 ms, 7,4 mM Chlorbutanol: $\tau_{Erholung}$ 9,3 ms bei -40 mV; Kap. 3.3.1.4, Abb. 44). Terfenadin und die Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination hatten dagegen keinen Einfluss auf die Kinetik der Erholung von der Inaktivierung. Der unterschiedliche Einfluss von Terfenadin und Chlorbutanol auf die Erholung von der Inaktivierung deutet wiederum auf unterschiedliche Mechanismen der hERG-Kanal-Blockade hin.

Beim „Envelope of Tails“-Test wurden Aktivierungspulse mit zunehmender Dauer appliziert. Dadurch kam es zu einer immer stärkeren Aktivierung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen und die Anzahl der offenen hERG-Kanäle nahm zu. Mit diesem Test kann die Affinität einer Substanz zum offenen Zustand des hERG-Kanals untersucht werden. Die Hemmung der hERG-Spitzen-Tail-Ströme durch Terfenadin nahm während des „Envelope of Tails“-Tests mit steigender Dauer des Aktivierungspulses und damit mit zunehmendem Anteil geöffneter

Kanäle kontinuierlich, aber nicht signifikant ($p > 0,05$), zu. Die Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch Chlorbutanol und durch die Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination nahm monoexponentiell mit der Dauer des Aktivierungspulses zu und ging bei längeren Aktivierungspulsen in ein Plateau über (Kap. 3.3.2.1, Abb. 47). Die Zunahme der Blockade erfolgte in einem Bereich, in dem auch der Anteil offener hERG-Kanäle zunahm, sodass geschlussfolgert werden kann, dass für die Blockade von hERG-Strömen durch Chlorbutanol eine Öffnung der Kanäle erforderlich ist. Eine Zunahme der hERG-Strom-Blockade mit zunehmender Dauer des Aktivierungspulses im „Envelope of Tails-Test“ wurde für verschiedene Substanzen nachgewiesen, die eine Affinität zum offenen Zustand des Kanals besitzen, wie z.B. Disopyramid (Paul et al. 2001), Ketanserin (Tang et al. 2005, Dan-Na et al. 2008) und Droperidol (Schwoerer et al. 2008).

Mit Hilfe des Langen Puls-Protokolls kann untersucht werden, ob eine Testsubstanz bevorzugt den inaktivierten Zustand des Kanals hemmt. Während der Applikation eines langen Depolarisationspulses (10 s) kommt es zunächst zur Öffnung von hERG-Kanälen, welche aufgrund der Kinetik des hERG-Kanals sehr schnell inaktivieren, so dass der Anteil inaktivierter hERG-Kanäle stetig zunimmt. Während des Langen Puls-Protokolls nahm die Reduktion der hERG-Ströme durch Terfenadin stetig zu, was auf eine Affinität zum inaktivierten Zustand des hERG-Kanals hindeutet. Im Verlauf des Langen Puls-Protokolls nahm die Hemmung von hERG-Strömen durch Chlorbutanol sowie durch die Terfenadin/Chlorbutanol-Kombination monoexponentiell zu und ging mit Fortschreiten des Depolarisationspulses in ein Plateau über (Kap. 3.3.2.2, Abb. 49). Der Chlorbutanol-Block nahm innerhalb der ersten 3 s zu und blieb in den anschließenden 7 s unverändert (Stimulationsfrequenz 0,1 Hz). Chlorbutanol scheint daher nicht bevorzugt an inaktivierte hERG-Kanäle zu binden. In Anwesenheit von Chlorbutanol kam es zu einer Beschleunigung der hERG-Kanal-Aktivierung zu Beginn der Depolarisation, was auf agonistische Effekte zurückzuführen ist. Das unterschiedliche Verhalten von Terfenadin und Chlorbutanol bei Verwendung des Langen Puls-Protokolls deutet auf unterschiedliche Mechanismen der hERG-Strom-Blockade und damit auf unterschiedliche Bindungsstellen hin.

Die Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch Terfenadin entwickelte sich relativ langsam (5-7 min) und war nur langsam und unvollständig reversibel (Kap. 3.3.2.3, Abb. 51). Die langsame Reversibilität der Terfenadin-induzierten Hemmung von hERG-Strömen scheint durch das Einschließen der Substanz im Inneren der Pore verursacht zu werden. Das „molecular trapping“ des Porenblockers MK-499 (Klasse III Antiarrhythmikum) konnte

erstmalig von Mitcheson et al. (2000 B) anhand der D540K-hERG-Mutante gezeigt werden. Bei dieser Mutante öffnet das Aktivierungstor nicht nur infolge der Depolarisation, sondern auch nach Hyperpolarisation der Membran. Beim hERG-Wildtyp erholten sich nach 40-50 hyperpolarisierenden Pulsen nur 5 % der hERG-Kanäle vom MK-499-Block. Dagegen erholten sich 95 % der D540K-hERG-Kanäle vom MK-499-Block, da bei dieser Mutante auch infolge der Hyperpolarisation das Aktivierungstor geöffnet wurde und somit das Arzneistoffmolekül abdissoziieren konnte. Damit konnte gezeigt werden, dass die langsame Erholung vom Methansulfonanilid-Block auf das Einschließen des Moleküls in der Pore durch Schließen des Aktivierungstores zurückgeführt werden kann. Für Bepriidil, E-4031 und Domperidon konnte ebenfalls eine extrem langsame Reversibilität der hERG-Strom-Blockade nach Auswaschen der Testsubstanzen gezeigt werden (Stork et al. 2007), da diese Substanzen nur von geöffneten hERG-Kanälen abdissoziieren können. Die langsame Reversibilität des Terfenadin-Blocks kann also durch die feste Bindung von Terfenadin an den inaktivierten Zustand des hERG-Kanals (Perrin et al. 2008) und durch die langsame Dissoziation von geöffneten hERG-Kanälen erklärt werden (Stork et al. 2007). Im Gegensatz dazu entwickelte sich die Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch Chlorbutanol sehr schnell und war nach Auswaschen sehr schnell und vollständig reversibel. Die Beobachtung, dass die gleichzeitige Applikation von Terfenadin die Reversibilität der Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch Chlorbutanol stark verlangsamte, könnte darauf hinweisen, dass die verlangsamte Dissoziation von Chlorbutanol in Anwesenheit von Terfenadin für den synergistischen Effekt der Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol auf hERG-Spitzen-Tail-Strömen verantwortlich ist.

Die unterschiedlichen Einflüsse von Terfenadin und Chlorbutanol auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung sowie die unterschiedliche Zeitabhängigkeit der Blockade deuten auf unterschiedliche Bindungsstellen am hERG-Kanal hin. Die Bindungsstelle von Chlorbutanol am hERG-Kanal ist bisher nicht bekannt. Aufgrund der Lipophilie von Chlorbutanol wäre eine Wirkung über die Plasmamembran denkbar. Möglicherweise führt das lipophile Chlorbutanol ähnlich wie Cyclodextrine zu einer Modifikation der Membranlipidzusammensetzung. Hydroxypropyl- β -Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide und werden in pharmazeutischen Zubereitungen als Lösungsvermittler verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass diese Hilfsstoffe in einer Konzentration von 6 % (42,8 mM) hERG-Strom-hemmende Eigenschaften besitzen und zu einer Änderung der Cholesterolzusammensetzung der

Membran führen (Mikhail et al. 2007, Balijepalli et al. 2007). Die Beobachtung, dass Terfenadin zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Chlorbutanol-vermittelten hERG-Strom-hemmenden Effekte führte, spricht gegen unspezifische Effekte des Chlorbutanols und für eine spezifische Chlorbutanol-Bindungsstelle am hERG-Kanal. Dabei weisen zwei Beobachtungen auf eine Bindungsstelle auf der extrazellulären Seite des hERG-Kanals hin. Zum einen zeigte intrazellulär appliziertes Chlorbutanol keine Effekte auf hERG-Kanäle (Kap. 3.3.3, Abb. 52), was gegen eine Bindungsstelle spricht, die über die Lipidmembran zugänglich ist, zum anderen sind die Chlorbutanol-Effekte beim Auswaschen der Substanz sehr schnell (innerhalb von 1 min; Kap. 3.3.2.3, Abb. 51) reversibel.

4.4 Untersuchungen an der Tyr652Ala-hERG-Mutante

Für die Bindung der folgenden Substanzen (Porenblocker) am hERG-Kanal sind die aromatischen Aminosäuren Tyr652 und Phe 656 essentiell: Terfenadin, Cisaprid und MK-499 (Mitcheson et al. 2000), Chloroquin (Sanchez-Chapula et al. 2002), Chinidin (Sanchez-Chapula et al. 2003), Halofantrin (Sanchez-Chapula et al. 2004), Ibutilid und Clofilium (Perry et al. 2004), Bupivacain (Siebrands et al. 2005), Miconazol (Kikuchi et al. 2005), Ketanserin (Tang et al. 2005, Dan-Na et al. 2008), Ziprasidon (Su et al. 2006), Maprotilin (Ferrer-Villada et al. 2006), Verapamil (Duan et al. 2007), Doxepin (Duncan et al. 2007) und Clomipramin (Jo et al. 2008). Porenblocker zeigen an Tyr652Ala und Phe656Ala/Cys-mutierten hERG-Kanälen eine verminderte blockierende Wirkung gegenüber WT-hERG-Kanälen.

Der Porenblocker Terfenadin zeigte erwartungsgemäß eine um den Faktor 4,7 verminderte blockierende Wirkung an Tyr652Ala-hERG-Kanälen (IC_{50} -Wert: 130,0 nM) gegenüber WT-hERG-Kanälen (IC_{50} -Wert: 27,7 nM). Demgegenüber zeigte Chlorbutanol an Tyr652Ala-hERG-Kanälen (IC_{50} -Wert: 4,4 mM) eine ähnliche blockierende Wirkung wie an WT-hERG-Kanälen (IC_{50} -Wert: 7,4 mM). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass Chlorbutanol nicht mit der für Porenblocker typischen Bindungsstelle interagiert. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass Chlorbutanol nicht in der Pore bindet.

Eine Zunahme der hemmenden Effekte an Tyr652Ala-hERG-Kanälen gegenüber WT-hERG-Kanälen konnte erstmals von Xing et al. (2010) für Capsaicin gezeigt werden. Capsaicin weist an Tyr652Ala-hERG-Kanälen eine um den Faktor 4 erhöhte blockierende Wirkung auf, während die Phe656Ala-Mutation keinen Einfluss auf die Potenz des Arzneistoffes hat. Daraus wurde geschlussfolgert, dass Tyr652 an dem Mechanismus der Blockade durch

Capsaicin beteiligt ist. Da Chlorbutanol eine ähnliche blockierende Wirkung an Tyr652Ala-hERG-Kanälen und WT-hERG-Kanälen aufwies, scheint Tyr652 für die Bindung von Chlorbutanol an hERG-Kanäle keine wichtige Rolle zu spielen.

Bisher sind nur wenige hERG-Kanal-Blocker bekannt, deren Affinität zum hERG-Kanal durch Mutationen an den Positionen Tyr652 und/oder Phe656 nicht oder kaum beeinflusst werden. Für die Bindung des Fluorchinolons Moxifloxacin scheint Phe656 keine Rolle zu spielen, dagegen war die Blockade von Tyr652Ala-hERG-Strömen im Vergleich zur Blockade von WT-hERG-Strömen um den Faktor 3 reduziert (Alexandrou et al. 2006). Für Vesnarinon wurde der umgekehrte Fall gezeigt, die Bindung des Phosphodiesterase-Hemmers wird durch Tyr652 kaum beeinflusst, dagegen konnte an Phe656Ala-hERG-Kanälen eine stark verminderte Affinität nachgewiesen werden (Kamiya et al. 2001). Für die Bindung des Antiarrhythmikums Dronedaron scheinen weder Tyr652 noch Phe656 eine Rolle zu spielen (Ridley et al. 2004). Es wurde geschlussfolgert, dass Tyr652 und Phe656 nicht an der Bildung der hochaffinen Dronedaron-Bindungsstelle beteiligt sind.

Aus den dargestellten Untersuchungen kann geschlussfolgert werden, dass Terfenadin und Chlorbutanol unterschiedliche Mechanismen der hERG-Kanal-Blockade aufweisen. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen mit Tyr652Ala-hERG-Kanälen werden unterschiedliche Bindungsstellen für Terfenadin und Chlorbutanol am hERG-Kanal vermutet. Es wurde gezeigt, dass Chlorbutanol kein typischer Porenblocker ist.

4.5 Untersuchungen mit Hilfe der Spannungsrampe

In den Untersuchungen zur Spannungsabhängigkeit der hERG-Strom-Blockade konnten für Chlorbutanol stimulierende Effekte bei negativen Membranspannungen und hemmende Effekte bei positiveren Membranspannungen nachgewiesen werden (Kap. 3.3.1.2, Abb. 40). Es stellt sich die Frage, welchen Gesamteffekt die dualen Effekte des Chlorbutanols auf hERG-Ströme während des Aktionspotentials von Kardiomyozyten haben. Es wurde eine Spannungsrampe verwendet um die Repolarisation während des kardialen Aktionspotentials zu simulieren. Die mit der Spannungsrampe erzeugten Stromverläufe ähneln den Stromverläufen bei Verwendung ventrikulärer Aktionspotentiale und geben Aufschluss über die Eigenschaften des hERG-Kanals unter physiologischeren Bedingungen (Walker et al. 2000). Unter Kontrollbedingungen trat ein maximaler Strom bei -30 mV auf (Kap. 3.3.5, Abb. 63). Die Spannung, bei der die hERG-Stromamplitude während der Spannungsrampe

maximal war (-30 mV), entsprach den Spannungen, bei denen hERG-Ströme auch während der kardialen Repolarisation maximal sind. Chlorbutanol hemmte die durch die Spannungsrampe ausgelösten hERG-Ströme, wobei die Blockade der hERG-Ströme mit Fortschreiten der Rampe, also abnehmender Spannung, zunahm (+20 mV: 27,9 % Block, -70 mV: 88,8 % Block; Kap. 3.3.5, Abb. 64). Mit negativeren Potentialen erholen sich immer mehr hERG-Kanäle von der Inaktivierung und liegen in der offenen Konformation vor. Anhand verschiedener Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Chlorbutanol hERG-Kanäle bevorzugt in der offenen Konformation hemmt, was die Zunahme der Blockade von hERG-Strömen mit abnehmenden Spannungen erklären könnte. Eine Zunahme der hERG-Kanal Blockade mit abnehmender Spannung während der Rampe konnte auch für 3 μM Ambasilid gezeigt werden (Walker et al. 2000). Bei einer Repolarisationsspannung auf -40 mV wurden hERG-Ströme durch 7,4 mM Chlorbutanol bei Applikation des Rampenprotokolls stärker gehemmt (68,7 %) als bei Applikation des Rechteckpulsprotokolls (50 %). Das durch die verschiedenen Pulsprotokolle bedingte unterschiedliche Verhältnis offener/inaktivierter/geschlossener hERG-Kanäle bei -40 mV könnte eine mögliche Ursache sein.

4.6 Klinische Relevanz der Chlorbutanol-Effekte

Chlorbutanol wird in parenteralen Arzneizubereitungen in einer Konzentration von bis zu 0,5 % (30 mM) als Konservierungsmittel verwendet. Bei einer Patientin, die mit einer i.v.-Morphinzubereitung behandelt wurde, die mit 0,5 % Chlorbutanol konserviert war, wurden Plasmakonzentrationen von etwa 0,5 mM Chlorbutanol nachgewiesen (DeChristoforo et al. 1983). Das Verhältnis der IC_{50} -Konzentration der Blockade von hERG-Strömen (7,4 mM) zur freien Plasmakonzentration für Chlorbutanol beträgt etwa 15, und liegt damit unter der von Redfern et. al. (2003) vorgeschlagenen Sicherheitsspanne von 30, die die Abgrenzung zwischen Arzneistoffen mit TdP-Risiko und Arzneistoffen ohne ein solches Risiko darstellt. Die von DeChristoforo gemessene Plasmakonzentration von 0,5 mM liegt in einem Bereich, in dem hERG-Strom-hemmende Effekte (IC_{50} : 7,4 mM) und synergistische Effekte mit Terfenadin (2,5 mM Chlorbutanol) an hERG-Kanälen nachgewiesen wurden. Das durch die Blockade von hERG-Strömen hervorgerufene torsadogene Potential kann durch die Blockade von anderen kardialen Ionenkanälen (z.B. Na^+ - und L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle) kompensiert werden. Eine kombinierte Blockade von kardialen Auswärts- (I_{Kr}) und Einwärtsströmen (I_{Na} und I_{CaL}) wird als „Multi-Channel-Block“ bezeichnet. Sowohl Amiodaron (Klasse III-Antiarrhythmikum) als auch Ranolazin (Mittel gegen Herzinfarkt) blockieren den hERG-

Kanal und bewirken über diesen Mechanismus eine QT-Intervall-Verlängerung im EKG. Amiodaron weist zusätzlich Na^+ - und L-Typ- Ca^{2+} -Kanal blockierende Eigenschaften auf und besitzt ein geringes Potential zur Auslösung von TdP-Arrhythmien (Reviews in Hohnloser et al. 1994, Redfern et al. 2003). Ranolazin reduziert neben dem I_{Kr} den I_{CaL} und vor allem den späten I_{Na} und scheint aufgrund der bisherigen klinischen Erfahrungen nicht torsadogen zu wirken (Antzelevitch et al. 2004, Cavero und Crumb 2005, Valentin et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde nur die Wirkung von Chlorbutanol auf hERG-Kanäle, die in HEK 293-Zellen exprimiert wurden, untersucht. Weitere in-vitro und in-vivo elektrophysiologische Untersuchungen wären notwendig (Redfern et al. 2003, ICH S7B Guideline), um das torsadogene Potential von Chlorbutanol einschätzen zu können.

4.7 Intrazelluläre Applikation

Die hERG-Kanal-Blocker Terfenadin, Dofetilid, Chlorbutanol und Fluvoxamin wurden intrazellulär über die Pipettenlösung appliziert. Nach dem postulierten Wirkmechanismus (siehe Kap. 4.2.) diffundieren Porenblocker wie Terfenadin und Dofetilid bei extrazellulärer Applikation in neutraler Form von außen über die Lipidmembran und erhalten dann von der cytoplasmatischen Seite aus Zugang zu ihren Bindungsstellen im Poreninneren des hERG-Kanals (Mitcheson et al. 2000 A). Daher ist bei der intrazellulären Applikation von Porenblockern eine mindestens gleichstarke Blockade von hERG-Strömen wie bei der extrazellulären Applikation der Porenblocker zu erwarten, da die Bindungsstelle bei intrazellulärer Applikation leichter zugänglich sein müsste als bei extrazellulärer Applikation. Überraschenderweise war die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch Terfenadin bei intrazellulärer Applikation im Vergleich zur Kurve bei extrazellulärer Applikation sehr stark zu höheren Konzentrationen verschoben. Es kam zu einer Affinitätsabnahme um den Faktor 664 nach 10 min bzw. um den Faktor 465 nach 20 min (IC_{50} extrazellulär: 27,7 nM, IC_{50} intrazellulär 10 min: 18,4 μM , IC_{50} intrazellulär 20 min: 12,9 μM). Dieses Ergebnis war überraschend, da bereits im Jahr 2000 (Mitcheson et al. B) für Terfenadin eine Bindungsstelle im Poreninneren des hERG-Kanals an den aromatischen Aminosäuren Tyr652 und Phe656 nachgewiesen wurde. Ähnliche Befunde zeigten sich jedoch auch bei intrazellulärer Applikation von Astemizol. Bei einer über die Pipettenlösung applizierten Konzentration von 3 μM (~3000fache IC_{50} -Konzentration nach extrazellulärer Applikation), wurde eine nahezu vollständige Hemmung (>95 %) von hERG-Strömen erst 20 min nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration nachgewiesen (Tagliatela et al. 1998).

Dagegen führen permanent geladene, nicht membrangängige Derivate von Kokain (Zhang et al. 2001), von Verapamil (Zhang et al. 1999) und von Ranolazin (Rajamani et al. 2008) bei Applikation über die Pipettenlösung zu einer raschen Hemmung von hERG-Strömen (nach 5-10 min). Terfenadin weist einen pK_a -Wert von 9,6 auf und liegt in der Pipettenlösung bei einem pH-Wert von 7,15 zu über 99 % in protonierter, also positiv geladener Form vor. Daher stellt sich die Frage, warum die positiv geladene, nicht membrangängige Form von Terfenadin bei intrazellulärer Applikation keinen Zugang zur Bindungsstelle im Inneren der Pore erhält. Die Zeitkonstante der Diffusion von Terfenadin aus der Pipettenlösung in die Zelle wird bei einem Molekulargewicht von 471,7 g/mol nach einer empirischen Formel von Pusch und Neher (1988, Gleichung 16) mit ca. 1,5 min angegeben.

$$\tau = 0,6 \cdot R_A \cdot \sqrt[3]{M}$$

Gleichung 16

- τ : Diffusionszeit (s)
 R_A : Pipettenwiderstand ($M\Omega$)
 M : Molekulargewicht (g/mol)

Daher müsste eine Diffusionszeit von 10 min genügen, um eine ausreichende Terfenadin-Konzentration im Zellinneren zu erreichen. Der Einfluss des negativen Haltepotentials von -80 mV auf das Diffusionsverhalten positiv geladener Moleküle scheint gering zu sein (Pusch und Neher 1988). Zum Vergleich wurde der Porenblocker Dofetilid ebenfalls über die Pipettenlösung appliziert. Intrazellulär appliziertes Dofetilid führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion von hERG-Spitzen-Tail-Strömen. Dabei kam es zu einer deutlich geringeren Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve als bei Terfenadin. Die Affinität nahm bei der intrazellulären Applikation von Dofetilid um den Faktor 13 nach 10 min bzw. um den Faktor 4 nach 20 min ab (IC_{50} extrazellulär: 12,9 nM, IC_{50} intrazellulär 10 min: 169,2 nM, IC_{50} intrazellulär 20 min: 54,8 nM). Die hERG-Spitzen-Tail-Strom-Blockade entwickelte sich bei intrazellulärer Applikation von Dofetilid innerhalb von 20 min relativ langsam. Die Applikation von 100 nM Dofetilid (~8 fache IC_{50} -Konzentration nach extrazellulärer Applikation) von der cytoplasmatischen Seite in CHO-Zellen (Chinesische Hamster Ovarial-Zellen) verursachte nach 5 min eine nahezu vollständige Blockade von hERG-Strömen (Weerapura et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit hemmten 100 nM Dofetilid hERG-Spitzen-Tail-Ströme bei intrazellulärer Applikation um 59 % (20 min nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration). Dofetilid weist pK_a -Werte von 8,3 und 9,7 auf und liegt in der Pipettenlösung bei einem pH-Wert von 7,15 ebenfalls zu über 99 % in

protonierter, also positiv geladener Form vor. Dofetilid besitzt einen Wasser-Octanol-Verteilungskoeffizienten logP von 1,6, d.h. dass sich die nicht protonierte Form von Dofetilid ungefähr $10^{1,6}$ fach (~40fach) stärker in der lipophilen Phase anreichert als in der wässrigen Phase. Dagegen weist Terfenadin einen logP-Wert von 6,5 auf, Terfenadin ist also deutlich lipophiler als Dofetilid, die ungeladene Form von Terfenadin verteilt sich in einer um den Faktor $10^{6,5}$ höheren Konzentration in der lipophilen Phase als in der wässrigen Phase. Es konnte gezeigt werden, dass Dofetilid auch von der cytoplasmatischen Seite aus mit hERG-Kanälen interagiert. Die intrazelluläre Applikation eines Porenblockers, wie Dofetilid, führte also prinzipiell zu einer Blockade von hERG-Strömen. Die starke Affinitätsabnahme bei der intrazellulären Applikation scheint daher ein Terfenadin-spezifisches Phänomen zu sein.

Denkbar wäre, dass in HEK 293-Zellen exprimierte Transporter bei diesem Phänomen eine Rolle spielen. Transportsysteme ermöglichen die Aufnahme essentieller Nahrungsbestandteile und Ionen sowie die Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten und xenobiotischen Substanzen. Es ist bekannt, dass Membrantransporter existieren, die hERG-Kanal-Blocker über die Plasmamembran transportieren. McBride et al. (2009) konnten zeigen, dass die Co-Expression des organischen Kationentransporters OCTN-1 (Novel Organic Cation Transporter) in CHO-Zellen die hERG-Strom-Blockade durch Chinidin verstärkt, was durch die verstärkte Aufnahme von Chinidin in die CHO-Zellen erklärt wurde. hOCTN-1 wird in einer Vielzahl von humanen Geweben u.a. in der Niere, in der Lunge, in der Plazenta, im Knochenmark und im Herzen exprimiert (Tamai et al. 1997, Yabuuchi et al. 1999). Der Transport über hOCTN-1 ist ein multispezifischer, bidirektionaler, pH-abhängiger organischer Kationentransport (Wu et al. 2000). Da Terfenadin bei einem pH-Wert von 7,15 in der intrazellulären Lösung zu über 99 % in positiv geladener Form vorliegt, wäre es denkbar, dass Kationentransporter über den Auswärts-Transport von Terfenadin für die verminderte Affinität von intrazellulär appliziertem Terfenadin verantwortlich sind. Diese Transporter könnten intrazelluläres Terfenadin entsprechend dem Konzentrationsgefälle nach außen transportieren und so den Zugang des Terfenadins zum Inneren der Pore verhindern. Um diesen Ansatz zu prüfen, wurde der Kationentransporter OCTN-1 mit 0,5 mM Cimetidin gehemmt und anschließend 30 μ M Terfenadin intrazellulär appliziert. Das Ausmaß der Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch 30 μ M Terfenadin in Anwesenheit von Cimetidin unterschied sich nicht signifikant von der Blockade in Abwesenheit von Cimetidin (Kap. 3.3.4, Abb. 58). Eine Beteiligung des OCTN-1-Transporters am Efflux von Terfenadin in HEK-293-Zellen scheint unwahrscheinlich zu sein.

Terfenadin gehört zu den Antihistaminika der zweiten Generation. Für einige der Antihistaminika der zweiten Generation, wie Terfenadin, Cetirizin und Loratidin, konnte eine konzentrationsabhängige Sedation gezeigt werden. Demzufolge besitzen diese Substanzen ein gewisses Potential, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Es konnte gezeigt werden, dass die Cyclosporin A-vermittelte Hemmung des P-Glykoproteins (P-gp, MDR-1) zu einer verstärkten Aufnahme von Terfenadin ins Gehirn führt (Obradovic et al. 2007). Terfenadin ist demzufolge Substrat von P-Glykoprotein. P-Glykoprotein gehört zur Gruppe der ABC-Transporter (ATP-binding cassette) und ist das Genprodukt des MDR1-Gens (**M**ulti **D**rug **R**estistance). Da es sich bei P-Glykoprotein um eine Effluxpumpe handelt, ist es denkbar, dass Terfenadin über einen P-Glykoprotein-vermittelten Transport aus dem Zellinneren nach außen transportiert wird, was die geringe Hemmung von hERG-Spitzen-Tail-Strömen bei intrazellulärer Applikation erklären könnte. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde P-Glykoprotein mit dem potenten P-Glykoprotein-Inhibitor Cyclosporin A (10 μ M) gehemmt und anschließend 30 μ M Terfenadin über die Pipettenlösung ins Cytosol appliziert. Die in Anwesenheit von Cyclosporin A gemessene Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch 30 μ M Terfenadin unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen durch 30 μ M Terfenadin in Abwesenheit von Cyclosporin A (Kap. 3.3.4, Abb. 59). Eine Beteiligung von P-Glykoprotein am Efflux von Terfenadin in HEK-293-Zellen scheint ebenfalls unwahrscheinlich zu sein.

In weiteren Untersuchungen wurde 30 μ M Terfenadin in einer ATP-freien intrazellulären Lösung appliziert, was zur Ausschaltung ATP-abhängiger Transportprozesse führen sollte. Dabei betrug die Blockade von hERG-Spitzen-Tail-Strömen 45,2 % (Kap. 3.3.4, Abb. 60) und unterschied sich nicht signifikant von der Blockade durch 30 μ M Terfenadin in einer ATP-haltigen intrazellulären Lösung (54,1 %). Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Beteiligung ATP-abhängiger Transportprozesse am Efflux von Terfenadin. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die ATP-abhängigen Transportprozesse durch noch in den Zellen vorhandene ATP-Speicher weiterhin aufrecht erhalten wurden, sodass keine vollständige Abwesenheit von ATP an der cytosolischen Seite der Plasmamembran in dieser Messanordnung erzielt wurde. Wie in unserer und in anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, unterliegen hERG-Ströme bei Verwendung normaler ATP-haltiger intrazellulärer Lösung kaum einem „Rundown“ (Kap. 3.3.4, Abb. 61). Unter dem „Rundown“ versteht man die unabhängig von der Aktivierung der Ionenkanäle mit fortschreitender Dauer des Experimentes immer kleiner werdenden Ströme, was durch das Auswaschen intrazellulärer

Bestandteile wie ATP und dadurch bedingten Änderungen regulatorischer Vorgänge an den Ionenkanälen bedingt wird. Dagegen konnten Zhang et al. (2003 C) zeigen, dass der „Rundown“ von hERG-Strömen unter Verwendung einer ATP-freien intrazellulären Lösung nach 10 min etwa 46 % betrug. Es wurde vermutet, dass ATP als Substrat für die Phosphorylierung von Kanalproteinen durch die Proteinkinase B benötigt wird, was eine normale Funktionalität des hERG-Kanals ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit war der „Rundown“ nach 10 min bei Verwendung einer ATP-freien intrazellulären Lösung dagegen vernachlässigbar klein ($-3,0 \pm 6,7$ %; Kap. 3.3.4, Abb. 61).

Eine Beteiligung ATP-abhängiger Transportprozesse und die Beteiligung der Transporter OCTN-1 und P-Glykoprotein am Efflux von Terfenadin in HEK 293-Zellen scheinen unwahrscheinlich. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte noch nicht geklärt werden, warum Terfenadin bei Applikation über die Pipettenlösung eine deutlich verminderte Affinität an hERG-Kanälen aufweist. Gemäß der Arbeit von Pusch & Neher (1988) kann die intrazelluläre Bindung die Diffusionsgeschwindigkeit bei intrazellulärer Applikation signifikant reduzieren. Es wurde gezeigt, dass die Diffusion von NBD-Phalloidin aufgrund der Bindung an intrazelluläre Proteine stark verlangsamt wird. Möglicherweise bindet Terfenadin ebenfalls an intrazelluläre Proteine, was die an der Plasmamembran ankommende Konzentration deutlich reduzieren würde.

Mit Hilfe der konfokalen Laser-Mikroskopie konnten Claassen et al. (2008) zeigen, dass aminoterminal bzw. carboxyterminal mit EGFP markierte hERG-Kanal-Proteine, die transient in HEK 293-Zellen exprimiert wurden, in diskreten Mikrodomänen in der Plasmamembran sowie im gesamten cytoplasmatischen Raum lokalisiert sind. Es ist anzunehmen, dass überexprimierte WT-hERG-Kanal-Proteine in stabil transfizierten HEK 293-Zellen ebenfalls im Cytoplasma vorkommen, da hERG-Kanalproteine am Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und anschließend zur Plasmamembran transportiert werden. Möglicherweise bindet intrazellulär appliziertes Terfenadin mit hoher Affinität an diese im Cytoplasma vorhandenen hERG-Kanäle, sodass die an der Plasmamembran ankommende Terfenadin-Konzentration deutlich reduziert ist. Der Zustand der im Cytoplasma lokalisierten hERG-Kanäle ist unbekannt. Es ist nicht bekannt, ob es sich um funktionelle hERG-Kanäle handelt und ob Terfenadin überhaupt an diese Kanäle binden kann. Allerdings werden die verbreiteten Radioligandenbindungsexperimente mit Tritium-markierten Porenblockern ebenfalls an solubilisierten Membranen außerhalb eines elektrischen Feldes durchgeführt, wobei es zu einer Bindung der Porenblocker an hERG-Kanäle kommt, deren Zustand in

diesen Untersuchungen ebenfalls nicht bekannt ist. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diese Hypothese zu überprüfen. Die Applikation eines fluoreszenzmarkierten Porenblockers über die Pipettenlösung könnte zur Visualisierung des Diffusionsprozesses genutzt werden. Bei gleichzeitiger transients Expression von carboxyterminal mit GFP markierten hERG-Kanälen, welche die gleichen pharmakologischen Eigenschaften aufweisen wie WT-hERG-Kanäle (Claassen et al. 2008), könnte eine mögliche Interaktion zwischen dem über die Pipettenlösung applizierten fluoreszenzmarkierten Porenblocker und den im Cytoplasma vorhandenen hERG-Kanälen untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Die schnelle Komponente des verzögerten, einwärtsgerichteten K^+ -Stromes der Herzzelle (rapid delayed rectifier, I_{Kr}), die durch hERG (human ether-à-go-go-related gene) kodiert wird, ist für die Repolarisation des kardialen Aktionspotentials verantwortlich. Es sind über 160 nicht-kardiovaskuläre Arzneistoffe bekannt, die über die Hemmung des I_{Kr} zu einer bestimmten Form von lebensbedrohlichen ventrikulären polymorphen Tachykardien (Torsades de Pointes (TdP)-Arrhythmie) führen. Dieses arrhythmogene Potential hat in den letzten Jahren bei einigen Arzneimitteln zu einer veränderten Nutzen-Risiko-Bewertung geführt, und gemäß einer internationalen Richtlinie (ICH S7B Guideline, 2005) sind Untersuchungen an hERG-Kanälen zur Abklärung des arrhythmogenen Potentials neuer Arzneistoffe vor der Anwendung am Menschen durchzuführen. Zurzeit ist nicht bekannt, ob bei simultaner Einnahme mehrerer hERG-Kanal-blockierender Arzneimittel das kardiotoxische Potential über Interaktionen der Bindungsstellen am hERG-Kanal potenziert wird. Zur Untersuchung möglicher Interaktionen an hERG-Kanälen wurde der Porenblocker Terfenadin mit den folgenden Substanzen, die unterschiedliche Bindungsstellen aufweisen, kombiniert: Dofetilid, Fluvoxamin, CnErg1 und Chlorbutanol. Die Fragestellung wurde mit Hilfe von elektrophysiologischen (Patch-Clamp) Messungen an hERG-exprimierenden HEK 293-Zellen untersucht.

Zwischen Terfenadin und Dofetilid wurden additive Effekte am hERG-Kanal nachgewiesen, was auf die überlappenden Bindungsstellen der beiden Substanzen im Inneren der Pore des hERG-Kanals zurückgeführt wurde. Terfenadin und Dofetilid interagieren jeweils mit Thr623 und Ser624 an der Basis der Porenhelix, sowie mit Tyr652 und Phe656 in der S6-Domäne. Dofetilid interagiert zusätzlich mit Gly648 und Val659 in der S6 Domäne. Da jeweils nur eine der beiden Substanzen im Poreninneren gebunden sein kann, waren nur additive Effekte messbar.

Überraschenderweise wurden zwischen Terfenadin und Fluvoxamin keine Interaktionen nachgewiesen. Eine solche Interaktion wäre aufgrund der Annahme einer extrazellulären Bindungsstelle des Fluvoxamins (Milnes et al. 2003, Mitcheson 2003) denkbar. Für eine extrazelluläre Fluvoxamin-Bindungsstelle spricht die Beobachtung, dass über die Pipettenlösung appliziertes Fluvoxamin keinen Effekt auf hERG-Ströme hatte, dass die hERG-Strom-Blockade relativ insensitive gegenüber Mutationen an den Positionen Tyr652

und Phe 656 ist und der Block durch Fluvoxamin extrem schnell einsetzt (Milnes et al. 2003, Kommentar in Mitcheson, 2003). Dagegen deutet das von Stansfeld et al. (2007) postulierte *in silico*-Modell des hERG-Kanals auf eine Fluvoxamin-Bindungsstelle im Poreninneren des hERG-Kanals hin. Die beobachteten additiven Effekte von Terfenadin und Fluvoxamin an hERG-Kanälen lassen offen, wo Fluvoxamin bindet.

Zwischen Terfenadin und dem Skorpiontoxin CnErg1, das eine nachgewiesene extrazelluläre Bindungsstelle in der „Turret“-Helix aufweist, wurden leichte subadditive Effekte nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass die Bindung von Terfenadin keinen Einfluss auf die Wirkung von CnErg1 hatte, dagegen führte die Bindung von CnErg1 an seine extrazelluläre Bindungsstelle zu einer leichten Antagonisierung der Terfenadin-Effekte auf hERG-Ströme. Eine mögliche Ursache für diesen Effekt könnte die Behinderung des auf der extrazellulären Seite stattfindenden Inaktivierungsprozesses durch CnErg1 sein. Eine gestörte Inaktivierung könnte zu einer verminderten Terfenadin-Affinität führen, da die Interaktion des Terfenadins mit seiner Bindungsstelle im Poreninneren bevorzugt im inaktivierten Zustand erfolgt.

Zwischen Terfenadin und dem Konservierungsmittel Chlorbutanol wurden synergistische Effekte an hERG-Kanälen nachgewiesen. Terfenadin und Chlorbutanol verstärken sich gegenseitig konzentrationsabhängig in ihren hERG-Strom-hemmenden Effekten. Die Untersuchungen zur Zeit- und Spannungsabhängigkeit der hERG-Strom-Blockade durch Terfenadin und Chlorbutanol wiesen auf unterschiedliche Mechanismen der hERG-Strom-Blockade und damit auf unterschiedliche Bindungsstellen der beiden Substanzen am hERG-Kanal hin. Während Terfenadin bevorzugt mit dem inaktivierten Zustand des hERG-Kanals interagiert, scheint Chlorbutanol ein Offen-Kanal-Blocker zu sein. Die Untersuchungen mit Tyr652Ala-mutierten hERG-Kanälen stützen die Vorstellung, dass Chlorbutanol nicht mit der für Porenblocker typischen Bindungsstelle interagiert. Die bei Applikation der Kombination von Terfenadin und Chlorbutanol verlangsamte Reversibilität des Chlorbutanol-Blocks könnte für die synergistischen Effekte zwischen den beiden Substanzen verantwortlich sein.

Es ist nicht unwahrscheinlich, dass ähnliche synergistische Effekte an hERG-Kanälen zwischen Chlorbutanol und anderen hERG-Kanal-blockierenden Substanzen, die im Poreninneren des hERG-Kanals binden, auftreten. Chlorbutanol wird in parenteralen Arzneizubereitungen in Konzentrationen von bis zu 30 mM eingesetzt. Die von DeChristoforo et al. (1983) gemessene Plasmakonzentration von 0,5 mM liegt im Bereich hERG-Strom-

hemmender Konzentrationen (IC_{50} 7,4 mM), zusätzliche synergistische Interaktionen mit anderen hERG-Kanal-Blockern sind denkbar und können das kardiotoxische Risiko erhöhen.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Terfenadin hinsichtlich der Hemmung von hERG-Strömen wurde bei der Applikation der Substanz über die Pipettenlösung im Vergleich zur extrazellulären Applikation sehr stark zu höheren Konzentrationen verschoben. Da bereits im Jahr 2000 (Mitcheson et al. B) eine Terfenadin-Bindungsstelle im Poreninneren des hERG-Kanals identifiziert wurde, ist dieses Ergebnis überraschend. Eine Beteiligung von P-Glykoprotein, OCTN-1 oder ATP-abhängigen Transportprozessen am Efflux von intrazellulär appliziertem Terfenadin in HEK 293-Zellen, scheint unwahrscheinlich, da die Hemmung dieser Transporter nicht zu einer Steigerung der hERG-hemmenden Effekte von über die Pipettenlösung appliziertem Terfenadin führte. Möglicherweise bindet über die Pipettenlösung appliziertes Terfenadin mit hoher Affinität an intrazelluläre Proteine z.B. an die im Cytoplasma vorhandenen hERG-Kanäle, wodurch die an der Plasmamembran ankommende Terfenadin-Konzentration deutlich reduziert würde. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die verminderte Affinität von intrazellulär appliziertem Terfenadin an hERG-Kanälen zu klären.

6 Literaturverzeichnis

- Alexandrou A. J., Duncan R. S., Sullivan A., Hancox J. C., Leishman D. J., Witchel H. J. und Leaney J. L. (2006). Mechanism of hERG K⁺ channel blockade by the fluoroquinolone antibiotic Moxifloxacin. *Br J Pharmacol* 147:905-916.
- Antzelevitch C., Sicouri S., Litovski S. H., Lukas A., Krishnan S. C., Di Diego J. M., Gintant G. A. und Liu. D. (1991). Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial and M cells. *Circ Res* 69:1427-1449.
- Antzelevitch C., Belardinelli L., Zygmunt A. C., Burashnikov A., Di Diego J. M., Fish J. M., Cordeiro J. M. und Thomas G. (2004). Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. *Circulation* 110:904-910.
- Antzelevitch C. und Olivia A. (2006). Amplification of spatial dispersion of repolarisation underlies sudden death associated with catecholaminergic polymorphic VT, long QT, short QT and Brugada syndromes. *J Intern Med* 259:48-58.
- Antzelevitch C. (2007). Role of spatial dispersion of repolarization in inherited and acquired sudden cardiac death syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H2024-H2038.
- Antzelevitch C. (2008). Drug-induced spatial dispersion of repolarisation. *Cardiol J* 15:100-21
- Arcangeli A., Bianchi L., Becchetti A., Faravelli L., Coronello M., Mini E., Olivotto M. und Wanke E. (1995). A novel inward-rectifying K⁺ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. *J Physiol* 489:455-471.
- Aronov A. M. (2008). Tuning out of hERG. *Curr Opin Drug Discov Devel* 11:128-40.
- Balijepalli R. C., Delisle B. P., Balijepalli S. Y., Foell J. D., Slind J. K., Kamp T. J. und January C. T. (2007). Kv11.1 (ERG1) K⁺ channels localize in cholesterol and sphingolipid enriched membranes and are modulated by membrane cholesterol. *Channels* 1:263-272.
- Bernard G. und Shevell M. I. (2008). Channelopathies: a review. *Pediatr Neurol* 38:73-85.
- Cavero I. und Crumb W. (2005). ICH S7B draft guideline on the non-clinical strategy for testing delayed cardiac repolarisation risk of drugs: a critical analysis. *Expert Opin Drug Saf* 4:509-530.
- Chen J., Seeböhm G. und Sanguinetti M. C. (2002). Position of aromatic residues in the S6 domain, not inactivation, dictates cisapride sensitivity of HERG and eag potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12461-12466.
- Choe S. (2002). Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 3:115-21.
- Chou T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58:621-81.

- Claasen S., Schwarzer S., Ludwig J. und Zünkler B. J. (2008). Electrophysiological and fluorescence microscopy studies with hERG channel/EGFP fusion proteins. *J Membr Biol* 222:31-41
- Clancy C. E., Kurokawa J., Tateyama M., Wehrens X. H. und Kass R. S. (2003). K⁺ channel structure-activity relationship and mechanisms of drug-induced QT prolongation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:441-446.
- Clancy C. E. und Kass R. S. (2005). Inherited and acquired vulnerability to ventricular arrhythmias: cardiac Na⁺ and K⁺ channels. *Physiol Rev* 85:33-47.
- Curtis L. H., Ostbye T., Sendersky V., Hutchison S., LaPointe N. M. A., Al-Khatib S. M., Yasuda S. U., Dans P. E., Wright A., Califf R. M., Woosley R. L. and Schulmann K. A. (2003). Prescription of QT-prolonging drugs in a cohort of about 5 million outpatients. *Am J Med* 114:135-41.
- DeChristofero R., Corden B. J., Hood J. C., Narang P. K. und Magrath I. T. (1983). High-dose morphine infusion complicated by chlorobutanol-induced somnolence. *Ann. Intern. Med.* 98:335-336.
- Delisle B. P., Anson B. D., Rajamani S. und January C. T. (2004). Biology of cardiac arrhythmias: ion channel trafficking. *Circ Res* 94:1418-1428.
- Dessertenne F. (1966). Ventricular tachycardia with two variable opposing foci [in french]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 59:263-272.
- Doyle D. A., Morais Cabral J. H., Pfützner R. A., Kuo A., Gulbis J. M., Cohen S. L., Chait B. T. und MacKinnon R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.
- Duan J. J., Ma J. H., Zhang P. H., Zhang P. H., Wang X. P., Zou A. R. und Tu D. N. (2007). Verapamil blocks HERG channel by the helix residue Y652 and F656 in the S6 transmembrane domain. *Acta Pharmacol Sin* 28:959-67.
- Du L., Li M., You Q. und Xia L. (2007). A novel structure-based virtual screening model for the hERG channel blockers. *Biochem Biophys Res Commun* 355:889-94.
- Duncan R. S., McPate M. J., Ridley J. M., Gao Z., James A. F., Leishman D. J., Leaney J. L., Witchel H. J. und Hancox J. C. (2007). Inhibition of the hERG potassium channel by the tricyclic antidepressant doxepin. *Biochem Pharmacol* 74:425-37.
- El-Sherif N., Pedalino R. und Himel H 4th (2009). Role of pharmacotherapy in cardiac ion channelopathies. *Curr Vasc Pharmacol* 7:358-66.
- Fenichel R. R., Malik M., Antzelevitch C., Sanguinetti M. C., Roden D. M., Priori S. G., Ruskin J. N., Lipiecky R. J. und Cantilena L. R. (2004). Drug-induced torsades de pointes and implications for drug development. *J Cardiovasc Pharmacol* 15:475-495.
- Fernandez D., Ghanta A., Kauffman G. W. und Sanguinetti M. C. (2004). Physicochemical features of the HERG channel drug binding site. *J Biol Chem* 279:10120-10127.

- Ferrer-Villada T., Navarro-Polanco R. A., Rodriguez-Menchaca A. A., Benavides-Haro D. E. und Sanchez-Chapula J. A. (2006). Inhibition of cardiac HERG potassium channels by antidepressant maprotiline. *Eur J Pharmacol* 531:1-8.
- Ficker E., Jarolimek W., Kiehn J., Baumann A. und Brown A. M. (1998). Molecular determinants of dofetilide block of HERG K⁺ channels. *Circ Res* 82:386-395.
- Ficker E., Jarolimek W. und Brown A. M. (2001). Molecular determinants of inactivation and dofetilide block in ether a-go-go (EAG) channels and EAG-related K⁺ channels. *Mol Pharmacol* 60:1343-8.
- Ganapathi S. B., Kester M. und Elmslie K. S. (2009). State-dependent block of HERG potassium channels by R-roscovitine: implications for cancer therapy. *Am J Physiol Cell Physiol* 296:C701-10.
- Gessner G., Macianskiene R., Starkus J. S., Schönherr R. und Heinemann S. H. (2010). The amiodarone derivative KB130015 activates hERG1 potassium channels via a novel mechanism. *Eur J Pharmacol* 632:52-59.
- Gurrola G. B., Rosati B., Rocchetti M., Pimienta G., Zaza A., Arcangeli A., Olivetto M., Possani L. D. und Wanke E. (1999). A toxin to nervous, cardiac and endocrine ERG K⁺ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom. *FASEB Lett* 13:953-962.
- Hancox J. C., Levi A. J. und Witchel H. J. (1998). Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native "rapid" delayed rectifier K current during the cardiac ventricular action potential. *Pflugers Arch* 436:843-853.
- Hedley P. L., Jørgensen P., Schlamowitz S., Wangari R., Moolman-Smook J., Brink P. A., Kanters J. K., Corfield V. A. und Christiansen M. (2009). The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Hum Mutat* 30:1486-511.
- Hill A. P., Sunde M., Campbell T. J. und Vandenberg J. I. (2007). Mechanism of block of the hERG K⁺ channel by the scorpion toxin CnErg1. *Biophys J* 92:3915-3929.
- Himmel H. M. (2007). Suitability of commonly used excipients for electrophysiological in-vitro safety pharmacology assessment of effects on hERG potassium current and on rat Purkinje fiber action potential. *J Pharmacol Toxicol Methods* 56:145-58.
- Hohnloser S. H., Klingenhöben T. und Singh B. N. (1994). Amiodaron-associated proarrhythmic effects. A review with special reference to torsade de pointes tachycardia. *Ann Intern Med* 121:529-535.
- Huikuri H. V., Castellanos A. und Myerburg R. J. (2001). Sudden death due to cardiac arrhythmias. *New Engl J Med* 345:1473-82.
- Inanobe A., Kamiya N., Murukami S., Fukunishi Y., Nakamura H. und Kurachi Y. (2008). In silico prediction of the chemical block of human ether a-go-go-related gene (hERG) K⁺ current. *J Physiol Sci* 58:459-70.
- International Conference on Harmonization (ICH) E14 Guideline (2005). The clinical evaluation of QT/QTc interval prolongation and proarrhythmic potential for non-

- antiarrhythmic drugs. www.ema.europa.eu/pdfs/human/ich//000204en.pdf (02.06.2010)
- International Conference on Harmonization (ICH) S7B Guideline (2005). The nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarisation (QT intervall prolongation) by human pharmaceuticals. www.ema.europa.eu/pdfs/human/ich//042302en.pdf (02.06.2010)
- January C. T. und Riddle J. M. (1989). Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca²⁺ current. *Circ Res* 64:977-990.
- Jervell A. und Lange-Nielson F. (1957). Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the QT interval and sudden death. *Am Heart J* 54:59-68.
- Jiang M., Dun W., Fan J. und Tseng G.-N. (1999). Use-dependent 'agonist' effect of azimilide on the HERG channel. *J Pharmacol Exp Ther* 291:1324-1336.
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B. T. und MacKinnon R. (2002a). Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417:515-522.
- Jiang M., Zhang M., Maslennikov I. V., Liu J., Wu D. M., Korolkova Y. V., Arseniev A. S., Grishin E. V. und Tseng G. N. (2005). Dynamic conformational changes of extracellular S5-P linkers in the hERG channel. *J Physiol* 569:75-89.
- Jo S. H., Hong H. K., Chong S. H., Won K. H., Jung S. J. und Choe H. (2008). Clomipramine block of the hERG K⁺ channel: accessibility to F656 and Y652. *Eur J Pharmacol* 592:19-25.
- Kamiya K., Mitcheson J. S., Yasui K., Kodama I. und Sanguinetti M. C. (2001). Open channel block of HERG K⁺ channel by vesnarinone. *Mol Pharmacol* 60:244-53.
- Kamiya K., Niwa R., Mitcheson J. S. und Sanguinetti M. C. (2006). Molecular determinants of hERG channel block. *Mol Pharmacol* 69:1709-1716.
- Kamiya K., Niwa R., Morishima M., Honjo H. und Sanguinetti M. C. (2008). Molecular determinants of hERG channel block by terfenadine and cisapride. *J Pharmacol Sci* 108:301-307.
- Kaplan W. D. und Trout W. E. 3rd (1969). The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*. *Genetics* 61:399-409.
- Katchman A. N., Koerner J., Tosaka T., Woosley R. L. und Ebert S. N. (2005). Comparative evaluation of HERG currents and QT intervals following challenge with suspected torsadogenic and nontorsadogenic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 316:1098-1106.
- Kiehn J., Lacerda A. E. und Brown A. M. (1999). Pathways of hERG inactivation. *Am J Physiol* 277:H199-210.
- Kikuchi K., Nagatomo T., Abe H., Kawakami K., Duff H. J., Makielski J. C. Januray C. T. und Nakashima Y. (2005). Blockade of HERG cardiac K⁺ current by antifungal drug miconazole. *Br J Pharmacol* 144:840-8.

- Keating M. T. und Sanguinetti M. C. (1996). Molecular genetic insights into cardiovascular disease. *Science* 272:681-685.
- Kornick C. A., Kilborn M. J., Santiago P. J., Schulman G., Thaler H. T., Keefe D. L., Katchman A. N., Pezullo J. C., Ebert S. N., Woosley R. L., Payne R. und Manfredi P. L. (2003). QT_c interval prolongation associated with intravenous methadone. *Pain* 105:499-506.
- Korolkova Y. V., Tseng G. N. und Grishin E. V. (2004). Unique interaction of scorpion toxins with the hERG channel. *J Mol Recognit* 17:209-17.
- Lees-Miller J. P., Duan Y., Teng G. Q. und Duff H. (1999). Molecular determinant of high-affinity dofetilide binding to hERG1 expressed in *Xenopus* oocytes: Involvement of S6 sites. *Mol Pharmacol* 57:367-374.
- Lehnart S. E., Ackerman M. J., Benson D. W. Jr., Brugada R., Clancy C. E., Donahue J. K., George A. L. Jr., Grant A. O., Groft S. C., January C. T., Lathrop D. A., Lederer W. J., Makielska J. C., Mohler P. J., Moss A., Nerbonne J. M., Olson T. M., Przywara D. A., Towbin J. A., Wang L. H. und Marks A. R. (2007). Inherited arrhythmias: a national heart, lung, and blood institute and office of rare disease workshop consensus report about the diagnosis, phenotyping, molecular mechanisms, and therapeutic approaches for primary cardiomyopathies of gene mutations affecting ion channel function. *Circulation* 116:2325-45.
- Li G. R., Feng J., Yue L., Carrier M. und Nattel S. (1996). Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 78:689-696.
- Liu J., Zhang M., Jiang M. und Tseng G.-N. (2002). Structural and functional role of the extracellular S5-P linker in the HERG potassium channel. *J Gen Physiol* 120:723-737.
- Manual 2.3 EPC 10 / EPC 10 USB, Patch Clamp Amplifier, 2007-2008 HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH
- Margulis M. und Sorota S. (2008) Additive effects of combined application of multiple hERG blockers. *J Cardiovasc Pharmacol* 51:549-52.
- McBride B., Yang T., Liu K., Urban T. J., Giacomino K. M., Kim R. B. und Roden D. M. (2009). The organic cation transporter , OCTN1, expressed in the human heart , potentiates antagonism of the hERG potassium channel. *J Cardiovasc Pharmacol* 54:63-71.
- Mikhail A., Fischer C., Patel A., Long M. A., Limberis J. T., Martin R. L., Cox B. F., Gintant G. A. und Su Z. (2007). Hydroxypropyl-beta-cyclodextrins: a misleading vehicle for the in vitro hERG current assay. *J Cardiovasc Pharmacol* 49:269-74.
- Milnes J. T., Crociani O., Arcangeli A., Hancox J. C. und Witchel H. J. (2003). Blockade of hERG potassium currents by fluvoxamine incomplete attenuation by S6 mutations at F656 or Y652. *Br J Pharmacol* 139:887-98.
- Mitcheson J. S., Chen J. und Sanguinetti M. C. (2000 A). Trapping of a methanesulfonanilide by closure of the HERG potassium channel activation gate. *J Gen Physiol* 115:229-239.

- Mitcheson J. S., Chen J., Lin M., Culberson C. und Sanguinetti M. C. (2000 B). A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12329-12333.
- Mitcheson J. S. (2003). Drug binding to HERG channels: evidence for a “non aromatic” binding site for fluvoxamine. *Br J Pharmacol* 139:883-884.
- Mitcheson J. S. (2008). hERG potassium channels and the structural basis of drug-induced arrhythmias. *Chem Res Toxicol* 21:1005-1010.
- Morita H. Wu J und Zipes D. P. (2008). The QT syndrome. long and short. *Lancet* 372:750-63.
- Morais Cabral J. H., Lee A., Cohen S. L., Chait B. T., Li M. und MacKinnon R. (1998). Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell* 95:649-655.
- Moss A. J. (1993). Measurement of the QT interval and the risk associated with QTc interval prolongation: a review. *Am J Cardiol* 72:23B-25B.
- Mouhat S., Andreotti N., Jouirou B. und Sabatier J. M. (2008). Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Curr Pharm Des.*14:2503-18.
- Neher E. und Sakmann B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799-802.
- Newton-Cheh C. und Shah R. (2007). Genetic determinants of QT interval variation and sudden cardiac cell death. *Curr Opin Genet Dev* 17:213-21.
- Obradovic T., Dobson G. G., Shingaki T., Kungu T. und Hidalgo I. J. (2007). Assessment of the first and second generation antihistamines brain penetration and role of p-glycoprotein. *Pharm Res* 24:318-27.
- Pardo-Lopez L., Garcia-Valdes J., Gurrola G. B., Robertson G. A. und Possani L. D. (2000 A). Mapping the receptor site for ergotoxin, a specific blocker of ERG channels. *FEBS Lett* 510:45-9.
- Pardo.Lopez L., Zhang M., Liu J., Jiang M., Possani L. D. und Tseng G. N. (2000 B). Mapping the binding site of a human ether a-go-go-related gene-specific peptide toxin (ErgTx) to the channel’s outer vestibule. *J Biol Chem* 277:16403-11.
- Paul A. A., Witchel H. J. und Hancox J. C. (2001). Inhibition of HERG potassium channel current by the class 1a antiarrhythmic agent disopyramide. *Biochem Biophys Res Commun.* 280:1243-50.
- Paul A. A., Witchel H. J. und Hancox J. C. (2002). Inhibition of the current of heterologously expressed HERG potassium channels by flecainide and comparison with quinidine and propafenone and lignocaine. *Br J Pharmacol* 136:717-729.
- Perrin M. J., Kuchel P. W., Campbell T. J. und Vandenberg J. I. (2008). Drug binding to the inactivated state is necessary but not sufficient for high-affinity binding to human ether a-go-go-related gene channels. *Mol Pharmacol* 74:1443-42.

- Perry M., de Groot M. J., Helliwell R., Leishman D., Tristani-Firouzi M., Sanguinetti M. C. und Mitcheson J. S. (2004). Structural determinants of HERG channel block by clofilium and ibutilide. *Mol Pharmacol* 66:240-249.
- Pollard C. E., Abi Gerges N., Bridgland-Taylor M. H., Eater A., Hammond T. G. und Valentin J.-P. (2010). An introduction to QT interval prolongation and non-clinical approaches to assessing and reducing risk. *Br J Pharmacol* 159:12-21.
- Pusch M. und Neher E. (1988). Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflugers Arch* 411:204-211.
- Rajamani S., Shryock J. C. und Belardinelli L. (2008). Rapid kinetic interactions of ranolazine with HERG K⁺ current. *J Cardiovasc Pharmacol* 51:581-589.
- Raschi E., Vasina V., Poluzzi E. und De Ponti F. (2008). The hERG K⁺ channel: target and antitarget strategies in drug development. *Pharmacol Res* 57:181-95.
- Recanatini M., Poluzzi E., Masetti M., Cavalli A. und De Ponti F. (2005). QT prolongation through hERG K⁺ channel blockade: current knowledge and strategies for the early prediction during drug development. *Med Res Rev* 25:133-166.
- Redfern W. S., Carlsson L., Davis A. S., Lynch W. G., MacKenzie I., Palethorpe S., Siegl P. K., Strang I., Sullivan A. T., Wallis R., Camm A. J. und Hammond T. G. (2003). Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsades de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res* 58:32-45.
- Rees S und Curtis M. J. (1996). Which cardiac potassium channel subtype is the preferable target for suppression of ventricular arrhythmias? *Pharmacol Ther* 69:199-217.
- Ridely J. M., Milnes J. T., Witchel H. J. und Hancox J. C. (2004). High affinity hERG K⁺ channel blockade by the antiarrhythmic agent dronedarone: resistance to mutations of the S6 residues Y652 and F656. *Biochem Biophys Res Commun* 325:883-91.
- Roden D. M., Lazzara R., Rosen M., Schwartz P. J., Towbin J. und Vincent G. M. (1996). Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS. *Circulation* 94:1996-2012.
- Roden D. M. (1998). Taking the „idio“ out of „idiosyncratic“: predicting torsades de pointes. *PACE* 21:1029-1034.
- Roden D. M., Balser J. R., George A. L. Jr., und Anderson M. E. (2002). Cardiac ion channels. *Annu Rev Physiol* 64:431-75.
- Roden D. M. und Anderson M. E. (2006). Proarrhythmia. *Handb Exp Pharmacol* 171:73-97.
- Roden D. M. (2008). Cellular basis of drug-induced torsade de pointes. *Brit J Pharmacol* 154:1502-1057.
- Romano C., Gemme G. und Pongiglioni R. (1963). Rare cardiac arrhythmias of the pediatric age. II Syncopal attacks due to paroxysmal ventricular fibrillation (auf Italienisch). *Clin Pediatr (Bologna)* 45:656-83.

- Roy M., Dumaine R. und Brown A. M. (1996). HERG, a primary human ventricular target of the nonsedating antihistamine terfenadine. *Circulation* 94:607-609.
- Saenen J. B., Paulussen A. D., Jongbloed R. J., Marcelis C. L., Gilissen R. A, Aerssens J., Snyders D. J. und Raes A. L. (2007). A single hERG mutation underlying a spectrum of acquired long QT syndrome phenotypes. *J Mol Cell Cardiol* 43:63-72.
- Sanchez-Chapula J. A., Navarro-Polanco R. A., Culberson C., Chen J. und Sanguinetti M. C. (2002). Molecular determinants of voltage-dependent human ether-a-go-go related gene (HERG) K⁺ channel block. *J Biol Chem* 277:23587-23595.
- Sanchez-Chapula J. A., Ferrer T., Navarro-Polanco R. A. und Sanguinetti M. C. (2003). Voltage-dependent profile of human ether-a-go-go-related gene channel block is influenced by a single residue in the S6 transmembrane domain. *Mol Pharmacol* 63:1051-1058.
- Sanchez-Chapula J. A., Navarro-Polanco R. A. und Sanguinetti M. C. (2004). Block of wild-type and inactivation-deficient human ether-a-go-go-related gene K⁺ channels by halofantrine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370:484-491.
- Sanguinetti M. C. und Jurkiewicz N. K. (1990). Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differentiell sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 96:195-215.
- Sanguinetti M. C., Jiang C., Curran M. E. und Keating M. T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* 81:299-307.
- Sanguinetti M. C. und Mitcheson J. S. (2005). Predicting drug-hERG channel interactions that cause acquired long QT syndrome. *Trends Pharmacol Sci* 26:119-124.
- Sanguinetti M. C. und Tristani-Firouzi M. (2006). hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 440:463-469.
- Scherer D., von Löwenstern K., Zitron E., Scholz E. P., Bloehs R., Kathöfer S., Thomas D., Bauer A., Katus H. A., Karle C. A. und Kiesecker C. (2008). Inhibition of cardiac hERG potassium channel by tertacyclic antidepressant mianserin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 378:78-83.
- Scherer D., Hassel D., Bloehs R., Zitron E., von Löwenstern K., Seyler C., Thomas D., Konrad F., Bürgers H. F., Seemann G., Rottbauer W., Katus H. A., Karle C. A. und Scholz E. P. (2009). Selective noradrenaline reuptake inhibitor atomoxetine directly blocks hERG currents. *Br J Pharmacol* 156:226-36.
- Schönherr R. und Heinemann S. H. (1996). Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *J Physiol* 493:635-642.
- Schönherr R., Rosati B., Hehl S., Rao V. G., Arcangeli A., Olivetto M., Heinemann S. H. und Wanke E. (1999). Functional role of the slow activation property of ERG K⁺ channels. *Eur J Neurosci* 11:753-60.

- Schwoerer A. P., Blütner C., Brandt S., Binder S., Siebrands C. C., Ehmke H. und Friedrich P. (2007). Molecular interaction of droperidol with human ether-a-go-go-related gene channels: prolongation of action potential duration without inducing early afterdepolarization. *Anaesthesiology* 106:967-76.
- Shah R. R. (2005). Mechanistic basis of adverse drug reactions: the perils of inappropriate dose schedules. *Expert Opin Drug Saf* 4:103-128.
- Shah R. R. (2010). Drug-induced QT interval shortening: potential harbinger of proarrhythmia and regulatory perspectives. *Br J Pharmacol* 159:58-69.
- Siebrands C. C., Schmitt N. und Friedrich P. (2005). Local anesthetic interaction with human ether a-go-go-related gene (HERG) channel role. *Anesthesiology* 103:102-12.
- Smith P. L., Baukowitz T. und Yellen G. (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 379:833-836.
- Snyders D. J. und Chaudhary A. (1996). High affinity open channel block by dofetilide of HERG expressed in a human cell line. *Mol Pharmacol* 49:949-955.
- Spector P. S., Curran M. E., Zou A., Keating M. T. und Sanguinetti M. C. (1996). Fast inactivation causes rectification of the I_{Kr} channel. *J Gen Physiol* 107:611-619.
- Stansfeld P. J., Gedeck P., Gosling M., Cox B. und Mitcheson J. S. (2007). Drug block of the hERG potassium channel: insight from modeling. *Proteins* 68:568-580.
- Su Z., Chen J., Martin R., McDermott J. S., Cox B. F., Gopalakrishnan M. und Gintant G. (2006). Block of hERG channel by ziprasidone: biophysical properties and molecular determinants. *Biochem Pharmacol* 71:278-286.
- Suessbrich H., Waldegger S., Lang F. und Busch A. E. (1996). Blockade of HERG channels expressed in *Xenopus* oocytes by the histamine receptor antagonists terfenadine and astemizole. *FEBS Lett* 385:77-80.
- Suessbrich H., Schönherr R., Heinemann S. H., Attali B., Lang F. und Busch A. E. (1997). The inhibitory effect of the antipsychotic drug haloperidol on HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol* 120:968-974.
- Surawicz B. (1989). Electrophysiologic substrate of torsade de pointes: dispersion of repolarisation or early afterdepolarisations? *J Am Coll Cardiol* 14:172-184.
- Tagliatela M., Pannaccione A., Castaldo O., Giorgio G., Zhou Z., January C. T., Genovese A., Marone G. und Annunziato L. (1998). Molecular basis for the lack of hERG K^+ channel block-related cardiotoxicity by the H1 receptor blocker cetirizine compared with other second-generation antihistamines. *Mol Pharmacol* 54:113-21.
- Tamai I., Nakanishi T., Kobayashi D., China K., Kosugi Y., Nezu J., Sai Y und Tsuji A. (2004). Involvement of OCTN1 (SLC6A4) in pH-dependent transport of organic cations *Mol Pharm* 1:57-66.
- Tang Q., Li Z. Q., Li W., Guo J., Sun H. Y., Zhang X. H., Lau C. P, Tse H. F., Zhang S. und Li G.R. (2008). The 5-HT₂ antagonist ketanserin is an open channel blocker on human

- cardiac ether-a-go-go-related gene (hERG) potassium channels. *Br J Pharmacol* 155:363-373.
- Tamargo J., Caballero R., Gómez R., Valenzuela C. und Delpón E. (2004). Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 62:9-33.
- Tester D. J. und Ackermann M. J. (2009). Cardiomyopathic and channelopathic causes of sudden unexplained death in infants and children. *Annu Rev Med* 60:69-84.
- Thai K. M. und Ecker G. F. (2007). Predictive models for hERG channel blockers: ligand-based and structure-based approaches. *Curr Med Chem* 14:3003-26.
- Thai K. M., Windisch A., Stork D., Weinzinger A., Schiesaro A., Guy R. H., Timin E. N., Hering S. und Ecker D. F. (2010). The hERG potassium channel and drug trapping: insight from docking studies with propafenone derivatives. *ChemMedChem* 5:436-442.
- Thomas D., Gut B., Wendt-Nordahl G. und Kiehn J. (2001). The antidepressant fluoxetine is an inhibitor of human ether-a-go-go-related gene (HERG) potassium channels. *JPET* 300:543-548.
- Torres A. M., Bansal P., Alewood P. F., Bursill J. A., Kuchel P. W. und Vandenberg J. L. (2003). Solution structure of CnErg1 (Ergtoxin), a hERG specific scorpion toxin. *FEBS Lett* 539:138-42.
- Tristani-Firouzi M., Chen J., Mitcheson J. S. und Sanguinetti M. C. (2001). Molecular biology of K⁺ channels and their role in cardiac arrhythmias. *Am J Med* 110:50-59.
- Trudeau M. C., Warmke J. W., Ganetzky B. und Robertson G. A. (1995). HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* 269:92-95.
- Tu D. N., Zou A. R., Liao Y. H., Du Y. M., Wang X. P. und Li L. (2008). Blockade of the human ether-a-go-go-related gene potassium channel by ketanserin. *Sheng Li Xue Bao* 60:525-34.
- Valentin J.-P., Pollard C., Laine P. und Hammond T. (2010). Value of non-clinical cardiac repolarization assay in supporting the discovery and development of safer medicines. *Br J Pharmacol* 159:25-23.
- van den Brink F. G. (1977). General theory of drug-receptor interactions: drug-receptor interaction models. Calculations of drug parameters. In *Handbook of Experimental Pharmacology. Kinetics of Drug Action* (J. M. van Rossum, Ed). 47. Auflage, 169-254. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Vandenberg J. I., Walker B. D. und Campbell T. J. (2001). hERG K⁺ channels: friend and foe. *Trends Pharmacol Sci* 22:240-6.
- Vandenberg J. I., Torres A. M., Campbell T. J. und Kuchel P. W. (2004). The HERG K⁺ channel: progress in understanding the molecular basis of its unusual gating kinetics. *Eur Biophys J* 33:89-97.
- Viskin S. (1999). Long QT syndromes and torsade de pointes. *Lancet* 354:1625-1633.

- Wallis (2010). Integrated risk assessment and predictive value to humans of non-clinical repolarization assays. *Br J Pharmacol* 159:115-121.
- Walker B. D., Singleton C. B., Bursill J. A., Wyse K. R., Valenzuela S. M., Qiu M. R., Breit S. N. und Campbell T. J. (1999). Inhibition of the human ether-a-go-go-related gene (HERG) potassium channel by cisapride: affinity for open and inactivated states. *Br J Pharmacol* 128:444-450.
- Walker B. D., Singleton C. B., Tie H., Bursill J. A., Wyse K. R., Valenzuela S. M., Breit S. N. und Campbell T. J. (2000). Comparative effects of azimilide and ambasilide on the human ether a-go-go-related gene (HERG) potassium channel. *Cardiovasc Res* 48:44-58.
- Wang Z., Fermini B. und Nattel S. (1994). Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 28:1540-1546.
- Wanke E. und Restano-Cassulini R. (2007). Toxins interacting with ether a-go-go-related gene voltage-dependent potassium channels. *Toxicon* 49:239-248.
- Ward O. C. (1964). A new familial cardiac syndrome in children. *J Ir Med Assoc* 54:103-6
- Warmke J. W. und Ganetzky B. (1994). A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3438-3442.
- Witchel H. J., Dempsey C. E., Sessions R. B., Perry M., Milnes J. T., Hancox J. C. und Mitcheson J. S. (2004). The low potency, voltage-dependent hERG blocker propafenone - molecular determinants and drug trapping. *Mol Pharmacol* 66: 1201-12.
- Webster G. und Berul C. I. (2008). Congenital long-QT syndromes: a clinical and genetic update from infancy through adulthood. *Trends Cardiovasc Med* 18:216-24.
- Weerapura M., Hebert T. E. und Nattel S. (2002). Dofetilide block involves interactions with open and inactivated states of hERG channels. *Pflugers Arch* 443:520-31.
- Wu X., George R. L., Huang W., Wang H., Conway S. J., Leibach F. H. und Ganapathy V. (2000). Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta. *Biochim Biophys Acta* 1466:315-27.
- Wulff H. Castle N. A. und Pardo L. A. (2009). Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets *Nat Rev Drug Discov* 12:982-1001.
- Woosley R. L., Chen Y., Freiman J. P. und Gillis R. A. (1993). Mechanism of the cardiotoxic actions of terfenadine. *JAMA* 269:1532-1536.
- Xing J, Ma J., Zhang P. und Fan X. (2010). Block effect of capsaicin on hERG potassium currents is enhanced by S6 mutation at Y652. *Eur J Pharmacol* 630:1-9.
- Yabuuchi F., Beckamnn R., Wettwer E., Hegele-Hartung C. und Heubach J. F. (2007). Reduction of hERG potassium current by hyperosmolar solutions. *Eur J Pharmacol* 566:222-5.

- Yao J. A., Du X., Lu D., Baker R. L., Daharsh E. und Atterson P. (2005). Estimation of potency of HERG channel blockers: impact of voltage protocol and temperature. *J Pharmacol Toxicol Methods* 52:146-153.
- Yellen G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419:35-42.
- Yeung K. S. und Meanwell N. A. (2008). Inhibition of hERG channel trafficking: an under-explored mechanism for drug-induced QT prolongation. *ChemMedChem* 3:1501-2.
- Zhang S., Zhou Z., Gong Q., Makielski J. und January C. T. (1999). Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to hERG potassium channels. *Circ Res* 84: 989-998.
- Zhang S., Rajamani S., Chen Y., Gong Q., Rong Y., Zhou Z., Ruoho A. und January C. T. (2001). Cocaine blocks HERG, but not KvLQT1+minK, potassium channels. *Mol Pharmacol* 59:1069-1076.
- Zhang S., Kehl S. J. und Fedida D. (2003 A). Modulation of human ether-á-go-go-related K⁺ (hERG) channel inactivation by Cs⁺ and K⁺. *J Physiol* 548:691-702.
- Zhang M., Korolkova Y. V., Liu J., Jiang M., Grishin E. V. und Tseng G. N. (2003 B). BeKm-1 is a hERG-specific toxin that shares the structure with ChTx but the mechanism of action with ErgTx1. *Biophys J* 84:3022-36.
- Zhang Y., Han H., Wang J., Wang H., Yang B., und Wang Z. (2003 C). Impairment of human ether-a-go-go-related gene (hERG) K⁺ channel function by hypoglycaemia and hyperglycemia. Similar phenotypes but different mechanism. *J Biol Chem* 278:10417-10426.
- Zhou Z., Gong Q., Ye B., Fan Z., Makielski J. C., Robertson G. A. und January C. T. (1998). Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *Biophys J* 74:230-241.

7 Veröffentlichungen

Vollständig publizierte Arbeit

Friemel A., Zünkler B. J. (2010), Interactions at human ether-à-go-go-related-gene channels.
Toxicological Sciences 144:346-355

In Abstraktform publizierte Kongressmitteilungen

Friemel A., Zünkler B. J. (2008) Allosteric interactions on hERG channels.
DPhG Jahrestagung, Bonn

Friemel A., Zünkler B. J. (2009). Allosteric interactions between terfenadine and chlorobutanol on hERG channels. *46th Congress of the European Societies of Toxicology*, Dresden