

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis Untersuchungen zu Terfenadin am hERG-Kaliumkanal

verfasst von / submitted by Heimo Lehner

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2020/ Vienna, 2020

Studienkennzahl It. Studienblatt / degree programme code as it appears on the student record sheet:

Studienrichtung It. Studienblatt / degree programme as it appears on the student record sheet:

Betreut von / Supervisor:

UA 449

Diplomstudium Pharmazie

Univ.Prof.i.R.Dr.med.Steffen Hering/

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

Danksagung

Mein allerherzlichster Dank gilt meinem Betreuer, Univ.Prof. Dr.Steffen Hering, Vorstand des Departments für Pharmakologie und Toxikologie, für das Zustandekommen, sowie für die Korrektur und Beurteilen meiner Diplomarbeit.

Zu großem Dank bin ich auch Dr.Danijela Storck für ihre Unterstützung bei der praktischen Abwicklung der für meine Arbeit nötigen Versuche verpflichtet.

Danken möchte ich auch für so manchen guten Rat Dr.Igor Baburin, Univ.Prof.Dr.Evgeny Timin, Dr.Stanislav Beyl, sowie meiner Diplomarbeitskollegin Mag.Ras Cyrus in theoretischen wie in EDV-Angelegenheiten.

Besonderer Dank gebührt auch meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinen Freunden für ihre Geduld in dieser zeitweilig recht stressigen Periode.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung				
1.Einleitung	11			
1.1.Elektrophysiologie der Herzaktion	14			
1.1.1.Erregungsbildung und –weiterleitung	14			
1.1.2.Aktionspotential	14			
1.1.3.Automatie der Herzaktion	18			
1.1.4.Refraktärzeit	18			
1.1.5.Pathophysiologie der Herzrhythmusstörung	20			
1.1.6.EKG zur Kontrolle der Herzfunktion	22			
1.2.Kaliumkanäle im menschlichen Herz	24			
1.2.1.Strukturklassen von Kaliumkanälen	24			
1.2.1.1. 2 TM-1PK-Kanäle	25			
1.2.1.2. 6TM-1P Kanäle	26			
1.2.1.3. Andere myokardiale K ⁺ -Kanäle	30			
1.3.hERG – Kanal Structure Activity Relationship (SAR)	32			
1.3.1.Strukturanalyse des Kanals	32			
1.3.1.1. Die Pore	34			
1.3.1.2. Die N-Terminale	35			
1.3.1.3. Die C-Terminale	35			
1.3.1.4. Die akzessorische Beta-Untereinheit	36			
1.3.2. Das Gating (Öffnungs- und Schließungsaktivität) des Kanals und seine				
strukturellen Voraussetzungen	36			
1.3.3. Wirkstoffbindende Regionen des hERG-Kanals	38			
1.4.Faktoren, die die Funktion des hERG-Kanals modulieren	43			

1.4.1. Intrinsische Faktoren	43				
1.4.2. Extrinsische Faktoren					
1.5.Das QT-Syndrom	51				
1.5.1. Angeborene QT-Syndrome	53				
1.5.2. Erworbene QT-Syndrome	55				
1.6.Vorhersagbarkeit von Torsade de Pointes-Trends	59				
1.6.1. Die Grenzen der Testmethoden in der Bestimmung des TdP-Potentials	62				
1.6.1.1. hERG-assay	62				
1.6.1.2. ADP-assay	63				
1.6.1.3. EKG (QT) Verlängerung	64				
1.6.1.4. Schlußfolgerung für die Neuentwicklung von Arzneistoffen.	64				
1.6.2. Neue oder verbesserte Evaluationsmethoden	65				
1.6.2.1. In vitro Modelle	65				
1.6.2.1.1. Isolierte Zellen	65				
1.6.2.1.2. Isolierte Gewebe/Herzen	66				
1.6.2.2. In vivo Modelle	68				
1.6.3. Berücksichtigung pharmakokinetischer Aspekte	71				
1.6.4. Conclusio	72				
2.Methoden und Geräte	74				
2.1. Zwei-Mikroelektroden-Messung an Xenopus laevis-Oozyten	74				
2.1.1. Isolation, Präparation und Aufbewahrung von Xenopus laevis-Oozyten	76				
2.1.2. Injektion der cRNA	78				
2.1.3. Die Zwei-Mikroelektroden Spannungstechnik (TEVC)	79				
2.2. Das Perfusionssystem	81				

3.Experimente

5.Literaturverzeichnis	115
4.Ausblick	114
3.6.Zusammenfassung	113
hemmung	110
3.5.5.Wash-out-Verhalten des Terfenadins nach terfenadininduzierter h-ERG-Kanal-	
3.5.4.Recovery-Verhalten des terfinadinexponierten h-ERG-Kanals	108
des stimulierenden Pulses	104
3.5.3.Beeinflussung der h-ERG-Kanalaktivität durch Veränderung der Prepulslänge	
3.5.2.Beeinflussung der h-ERG-Kanalaktivität durch Veränderung der Pulsfrequenz	100
Konzentration	96
3.5.1. Beeinflussung der h-ERG-Kanalaktivität durch Änderung der Terfenadin-	
3.5.Ergebnisse	96
3.4.Zielsetzung	95
3.3.Auswertung	93
3.2.Meßvorgang	90
3.1.Terfenadin	85

Zusammenfassung

In der vorliegenden Diplomarbeit soll der Versuch unternommen werden, die Struktur-Wirkungsbeziehung des für Repolarisation und Entspannung des Herzmuskels notwendigen herg Kalium-Kanals aufzuzeigen.

Hierfür erschien es mir notwendig, eine kurze Darstellung der Elektrophysiologie der Herzaktion voranzustellen. Eine kurze Charakterisierung der daran beteiligten Kanäle, unter besonderer Berücksichtigung der Kalium-Kanäle, hebt deren Gemeinsamkeiten und Unterschiede hervor.

Im folgenden Teil meiner Arbeit soll ein kurzer Überblick über mögliche intrinsische (genetische Codierung, Processing, Membraneinbau) sowie extrazelluläre Einflussfaktoren (Wirkstoffe, Naturstoffe) gewonnen werden.

Die klinischen Auswirkungen (Long-QT-Syndrome, Torsade de Point) von (herg) Kalium-Kanalstörungen im Alltag eines Betroffenen, sowie deren Vorhersagbarkeit, können hier nur kurz skizziert werden.

Dem letzten Teil liegen experimentelle Untersuchungen am herg Kalium-Kanals unter Verwendung des Antihistaminikums Terfenadin zugrunde. Durch Veränderung von Parametern des Wirkstoffes und des Pulses, der das Aktionspotential am Kanal simuliert, konnten Aktivitätsänderungen im Funktionsablauf des Kanals festgestellt werden, die einer Interpretation bedürfen.

Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurde vom Autor ein kostengünstiges, leicht zu bedienendes Perfusions- und Wirkstoffapplikationssystem auf Funktionalität und Ökonomie getestet, seine Vor -und Nachteile dokumentiert.

1.Einleitung

1994 gelang eine ungewöhnliche Beobachtung bei Fruchtfliegen (Drosophila). Drosophila-Mutanten bewegten sich bei Etherkontakt in einer seltsamen Weise, die die Wissenschafter an Go-go-Tänzerinnen erinnerten. Das mutierte Gen wurde daher als "Ether-a-go-go" (EAG) bezeichnet. Im menschlichen Organismus wird das verwandte "human-ether-a-go-go-relatedgene" (hERG) hauptsächlich in Herz und Gehirn exprimiert (Warmke et al.,1994). Seine physiologische Bedeutung war zunächst unbekannt. Später wurde das Genprodukt als spannungsabhängiger Kaliumkanal identifiziert, der in Herzmuskelzellen den für die Repolarisation mitverantwortlichen I_{Kr}-Strom steuert (Sanguinetti et al., 1995).

Der hERG Kaliumkanal im Gehirn dürfte von untergeordneter Bedeutung sein, da hERG-Mutationen lebensbedrohliche kardiale Arrhythmien auslösen können, bisher aber keine zentralnervösen Störungen nachgewiesen wurden (Curran et al,1995).

Das angeborene Long QT Syndrom (LQTS) ist eine heterogene Erkrankung, die mit einer Häufigkeit von 1:5000 bis 1: 8000 auftritt. Mutationen von kardialen Ionenkanälen führen zu einer charakteristischen Verlängerung des sogenannten QT-Intervalls im EKG, bedingt durch eine Repolarisationsverzögerung der Herzmuskelzelle. Klinisch tritt diese Veränderung bereits im Kindesalter auf, manifestiert durch wiederholt auftretende Ohnmachtsanfälle (Synkopen) und birgt stets die Gefahr eines plötzlichen Herztodes bei sonst völlig gesunden Patienten (Hoorntje et al., 1999). 40% aller kongenitalen QT Syndrome sind, so Hoorntje et al.,1999, auf Mutationen des hERG Kaliumkanals zurückzuführen.

Als therapeuthisches Mittel der Wahl ist der β -Blocker anzusehen, der das meist stressinduzierte Auftreten der tachykarden Rhythmusstörung unterbinden soll. In einigen Fällen wird auch die Implantation eines Herzschrittmachersystems mit Defibrillatorfunktion (ICD) empfohlen. Kausaltherapeutische Ansätze existieren derzeit nur auf eperimenteller Ebene.

Genmutationen von hERG setzen an unterschiedlichen Phasen des Proteinbiosyntheseprozesses an (Thomas et al.,2003). So gibt es Mutationen, die zum Einbau defekter Kanäle in die Zellmembran führen. Hingegen zeigen andere Genveränderungen bei menschlicher Körpertemperatur Störungen des Proteinfaltungsprozesses, wodurch das Kanalprotein im Endoplasmatischem Reticulum der Herzmuskelzelle retendiert bleibt. Fischer et al.(2000) konnten in Laborversuchen nachweisen, dass bei Temperaturreduktion aus diesen mutierten hERG Kanälen intakte Kanäle werden.

Verschiedene Hemmstoffe des hERG Kanals korrigieren ebenfalls die Störung des Faltprozesses, sind allerdings kaum therapeutisch verwertbar, da sie gesunde und defekt gefaltete Kanäle blockieren und somit das Krankheitsbild weiter verschlimmern.

Als vielversprechende Ausnahme gilt Fexofenadin, das durch Mutation veränderte Faltungsstörungen korrigiert ohne hERG Kanäle zu blockieren (Rajamani et al.,2002). Es wird derzeit als Antihistaminikum zur Therapie der allergischen Reaktion eingesetzt. Klinische Studien zur Verwendung dieser Substanz bei Patienten mit LQTS stehen noch nicht zur Verfügung. Vor einem zukünftigen Einsatz wäre abzuklären, welche hERG Mutante vorliegt. In in-vitro Versuchen muß sowohl das veränderte Faltverhalten des hERG Proteins wie die Wirkung des Fexofenadins auf den fehlerhaft gefalteten Kanal nachgewiesen werden.

15 – 20% aller natürlichen Todesfälle in den westlichen Ländern sind auf Herzrhythmusstörungen zurückzuführen, die zum plötzlichen Herztod führen. Angeborene, wie medikamenteninduzierte Arrhythmien vom Typ des erworbenen QT Syndroms stellen eine wichtige Untergruppe dar (Thomas, 2007).

Erworbenen QT-Verlängerungen liegt eine Inhibition des repolarisierenden hERG Kaliumstromes durch verschiedene Arzneistoffe zugrunde. Die dadurch erzielte Verlängerung des Aktionspotentials wird, wie bei der Antiarrhythmikatherapie, bewusst therapeutisch eingesetzt, etwa um Herzrhythmusstörungen zu beheben, die Herzfrequenz zu senken und Herzrasen zu verhindern. Paradoxerweise kann diese verzögerte Herzaktion wiederum zu charakteristischen Rhyrhmusstörungen, Torsade de Pointes genannt, führen, die selten aber doch, plötzlichen Herztod bewirken.

Die Substanzen, die diese lebensbedrohenden Nebenwirkungen aufweisen, sind zahlreich und können den verschiedensten pharmakologischen Klassen zugerechnet werden. So findet man neben den Antiarrhythmika (Amiodaoron , Sotalol), Antibiotika (Clarithromycin, Erythromycin), Neuroleptika (Chlorpromazin, Haloperidol), Antidepressiva (Amitryptilin, Fluoxetin), Antihistaminika (Terfenadin), Malariamittel (Chloroquin, Halofantrin), Chemotherapeutika (Arsentrioxid, Tamoxifen) und viele andere mehr.

Die Therapie des erworbenen QT Syndroms beschränkt sich auf das Absetzen des auslösenden Medikamentes.

Um eine Risikostratifizierung neuer Arzneistoffe vor ihrer klinischen Anwendung zu ermöglichen, wurde von der pharmazeutischen Industrie eine Testkombination aus hERG assay an der Einzelzelle, in-vitro assay am isolierten Gewebe und in-vivo assay an Versuchstieren entwickelt. Die Vorhersagbarkeit von medikamentös induzierter TdP und plötzlichem Herztod auf Basis dieser Tests bleibt aber nach wie vor beschränkt. Zudem existieren nur wenige Untersuchungen in Hinblick auf die Gefährdung der Bevölkerung durch genetische Polymorphismen und Mutationen der zur QT Verlängerung führenden Gene.

hERG Kanäle unterliegen, wie Studien (Thomas et al.,1999,2004) beweisen, einer ausgeprägten Regulation durch das autonome Nervensystem. Unter Stress setzt der Organismus vermehrt Adrenalin und Noradrenalin frei. Je nach Zelltyp werden α -oder β -adrenerge Reptoren aktiviert. Durch die damit verbundene Aktivitätssteigerung der Proteinkinase A (β -Rezeptoren) und der Proteinkinase C (α -Rezeptoren) werden hERG Kaliumströme reduziert. Bei Patienten mit kongenitalem QT Syndrom kann somit physischer und psychischer Stress Herzrasen auslösen. Um Herzrhythmusstörungen vorzubeugen, wird dieses Phänomen mit Betablockern kontrolliert.

Auch nicht erregbare Zellen, wie Tumorzellen, exprimieren hERG Kanalproteine. Ihre Funktion war zunächst unklar. Maligne Zellen unterscheiden sich von gesunden durch eine unkontrollierte Zellteilung. Werden hERG Proteine in diesen Zellen exprimiert, steigt die Proliferationsrate signifikant. Inwiefern hERG-aktive Wirkstoffe zur Proliferationskontrolle eingesetzt werden können, bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

Bevor näher auf die Struktur-Funktionsbeziehung des hERG Kanals eingegangen wird, gilt es die Physiologie der Herzaktion kurz darzustellen und die Bedeutung der daran beteiligten Kaliumkanäle hervorzuheben.

1.1.Elektrophysiologie der Herzaktion

1.1.1.Erregungsbildung und -weiterleitung

Unter Ruhebedingungen entsteht in den Sinusknotenzellen des rechten Vorhofes alle 0,7–1s eine Erregung, die über die Vorhofmuskulatur den Atrioventrikularknoten erreicht. Der AV-Knoten bildet die einzige Überleitungsmöglichkeit zwischen Vorhof und Ventrikel. Die Weiterleitung der Erregung an die Ventrikel erfolgt stark verzögert (0,16 s) und unterliegt der sogenannten Siebwirkung. Dadurch können Aktionspotentiale hoher Frequenz nicht passieren. Fortgeleitet wird die Erregung über die beiden Schenkel des His'schen Bündels, über die Purkinje-Fasern an das Arbeitsmyokard. Sie breitet sich von der Herzspitze zur Herzbasis innerhalb von nur 0,1s aus. Daher kontrahieren die Ventrikel vom Apex zur Basis hin. Die rasche Erregungsausbreitung in den Ventrikeln garantiert vor allem eine rasche, synchrone und hämodynamisch effektive Kontraktion (Forth et al., 2001).



Abb1.Erregungsausbreitung im Herzen in Sekunden (linker Teil der Abb.), Form der Aktionspotentiale in den verschiedenenen Abschnitten des kardialen Erregungsbildungs-und Leitungssystems (rechter Teil der Abb.).(aus Forth, Pharmakologie und Toxikologie 7.Aufl.1996;363).

1.1.2. Aktionspotential

Der Erregungsbildung und -leitung im Herzmuskel liegt, wie oben beschrieben, eine sich unidirektional ausbreitende Membranpotentialänderung zugrunde. Transmembranöse Spannungen werden durch Konzentrationsunterschiede beidseits der Zellmembran vorkommender Ionen (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) erzeugt. Eine Spannungsänderung wird somit durch eine Ionenkonzentrationsänderung verursacht. Als deren Träger fungieren die mehr oder weniger ionenselektiv sind und unterschiedlichen Ionenkanäle. Steuerungsmechanismen unterliegen. So unterscheidet man spannungsabhängige Kanäle, deren Öffnung von der Änderung des Membranpotentials bestimmt wird und ligandengesteuerte Funktion durch Wechselwirken Ionenkanäle. deren das eines Transmitters (Agonist/Antagonist) mit einem Rezeptor reguliert wird.

Fließen Ionen durch einen offenen Kanal, folgen sie dem Konzentrationsgradienten (Ca²⁺und Na⁺fließen dem Gefälle folgend in die Zelle hinein, K⁺ aus der Zelle heraus). Dabei hinterlassen sie an der Herkunftsseite der Membran gegensinnige Ladungen, die einen elektrischen Gradienten erzeugen, der dem Konzentrationsgefälle entgegengesetzt ist. Beim sogenannten Equilibriumpotential stehen beide Gradienten im Gleichgewicht, sodaß der Ionenstrom zum Erliegen kommt.

Beschrieben wird dieses ionenspezifische Potential, V_{Ion}, von der Nernst'schen Gleichung.

$$V_{Ion} = RT/F \cdot log (c_a/c_i)$$

(R.....Gaskonstante, T.....absolute Temperatur, F.....Faraday'sche Konstante, c_a/c_i.....Konzentrationsgradient des frei beweglichen Ions zwischen der Außenseite a und der Innenseite b).

Für K⁺ liegt das Equilibriumpotential bei -90mV, für Na⁺bei +45mV. Unter Voraussetzung, dass die Ionenkanäle aller anderen Ionentypen geschlossen wären, könnte man dieses Potential an der Membran messen. In vivo wird das Membranruhepotential dem Equilibrium-potential von K⁺ sehr nahe kommen, da es hauptsächlich von Kaliumströmen bestimmt wird, während die Permeabilität für Na⁺ und Ca²⁺gering ist.

Die Veränderung des Membranpotentials zum Aktionspotential wird hingegen durch verschiedene Permeabilitätsänderungen erzeugt, die einen Nettostrom zur Folge haben, der von verschiedenen Einwärts- und Auswärtsströmen getragen wird (Forth et al., 2001; Spooner & Rosen, 2001).

Aktive Mechanismen (Ionenpumpen) sorgen gegen Ende des Aktionspotentials für die Wiederherstellung der vor dem Aktionspotential herrschenden Ionenkonzentrationsverhältnisse. Da sie Ionen gegen einen Gradienten transportieren, sind sie an energiebereitstellende Prozesse (z.B. ATP-Spaltung durch ATP-asen) gekoppelt (Haverkamp et al.,2001).

• Die Na⁺ /K⁺-ATP-ase pumpt eingeströmtes Na⁺ aus der Zelle, ausgeströmtes K⁺in die Zelle.

• Ein Na⁺ /K⁺-abhängiger Antiporter sorgt für die Abgabe von Na⁺-Ionen im Austausch gegen K⁺-Ionen.

- Die Ca²⁺-ATP-ase transportiert ATP-abhängig Ca²⁺ aus der Zelle.
- Der Na⁺/Ca²⁺- Austauscher nimmt Na⁺ im Austausch gegen Ca²⁺ auf.

Wie oben erwähnt, muß das Aktionspotential stets als Veränderung von Ionenströmen durch die Membran der Herzmuskelzelle betrachtet werden. In der Systole, der Kontraktion des Herzmuskels, lässt es vier Phasen erkennen.

• Phase 0: Sie ist die rasche Depolarisation zum Schwellenpotential und bestimmt die Erregungsleitungsgeschwindigkeit.

Das Auslösen eines Aktionspotentials erfordert einen Reiz, der so stark ist, dass er einen Einwärtsstrom initiert, der den K⁺-Auswärtsstrom übertrifft. Der Nettoeinwärtsstrom erzeugt eine mehr oder weniger schnelle Zunahme des Membranpotentials. Sobald das Schwellenpotential von etwa –75mV erreicht ist, öffnen schlagartig spannungsabhängige Na⁺-Kanäle. Dadurch kommt es zu einer raschen Zunahme des Membranpotentials, die dem "Aufstrich" des Aktionspotentials entspricht.

Wird also das Schwellenpotential überschritten, entsteht ein fortgeleitetes Potential (=Aktionspotential).

• Phase 1: Noch bevor das Equilibriumpotential für Na⁺ erreicht ist, schließen die Na⁺Kanäle (2ms nach Eröffnung). Ein kurzer K⁺-Auswärtsstrom (I_{Kto}) verursacht eine kurzfristig rasch verlaufende Repolarisation. Sie bildet die "Kerbe" der Repolarisationsphase.

• Phase 2: Der seit Beendigung der Phase 0 stetig zunehmende Ca²⁺-Einwärtsstrom erreicht ein Maximum und erhält gemeinsam mit K⁺-Auswärtsströmen das Membranpotential der "Plateauphase". Träger des Ca²⁺-Einwärtsstroms sind langsam inaktivierende, spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle vom L-Typ. Die Aufnahme extrazellulären Ca²⁺ führt zur Freisetzung des intrazellulären Ca²⁺ aus dem sarkoplasmatischen Reticulum, notwendige Vorrausetzung für die elektromechanische Kopplung und somit Kontraktion der Muskelzelle. Während der Plateauphase kommt es zu einer geringen Repolarisation, die von K⁺-Auswärtsströmen (I_{Kr} und I_{Ks}) getragen wird. Diese werden unter dem Begriff *delayed-rectifier* zusammengefasst und von K⁺-Kanälen reguliert, die bei Repolarisation langsam öffnen.

• Phase 3: entspricht einer raschen Repolarisation zum Membranruhepotential und wird von zwei Ionenströmen erzeugt: dem gerade erwähnten *delayed-rectifier*, der die Initialphase der raschen Depolarisation bis -50mV prägt und dem *inward-rectifier*, I_{K1}, der, spannungsabhängig, ab -50mV öffnet.

• Phase 4: (gehört streng genommen nicht mehr zum Aktionspotential, bzw. zur Systole). Sie bestimmt das Membranruhepotential in der Diastole und wird von zwei Ionenströmen aufrechterhalten:

I_{K1} ist dominierender Träger dieser Phase und in der Depolarisationsphase geschlossen.

 $I_{K(Ach)}$ ist mitverantwortlich für das Ruhepotential, bleibt aber während des Aktionspotentials in gewissem Ausmaß aktiv.

Die unterschiedlichen Formen des Aktionspotentiales in Sinusknoten, AV-Knoten, His-Bündel, Purkinje-Fasern und Arbeitsmyokard lassen sich durch die Art und Dichte der in den Muskelzellen zum Einsatz kommenden Kanäle erklären (im Sinusknoten fehlt z.B. der für I_{K1} verantwortliche K⁺-Kanal) (Forth et al.,2001; Haverkamp et al., 2003).



Abb.2. Ionenströme und Ionentransporter, die Ruhe- und Aktionspotential desHerzes bestimmen.Die rot gekennzeichneten Kurrven stellen Einwärts- die blauen hingegen Auswärtsströme dar.(aus Abriel, et al., Molecular and Clinical Determinants of Drug-induced LomgQT-Syndrome: an Iatrogenic Channelopathy, Swiss Med Wkly, 2004;134:688)

1.1.3. Automatie der Herzaktion

Die Fähigkeit einer Herzmuskelzelle als Schrittmacher zu agieren (=Automatie) basiert auf der Tatsache, dass ihr Membranpotential in der Diastole spontan zunimmt (=diastolische Depolarisation). Gebildet wird dieser leicht depolarisierende Nettoeinwärtsstrom durch eine

- langsame Abnahme der K⁺-Auswärtsströme (Deaktivierung der *delayed-rectifiers*)
- langsame Zunahme der Ca²⁺-Einwärtsströme und durch
- unspezifische Einwärtsströme (vor allem in Purkinje-Zellen)

Schrittmacherzellen können daher das Schwellenpotential ohne Reiz erreichen. Der primäre und daher physiologische Schrittmacher ist der Sinusknoten, da das Fehlen eines I_{K1} für die schnellste diastolische Depolarisation sorgt.

Fällt dieser übergeordnete Schrittmacher aus, werden im Erregungsbildungs- und leitungssystem nachgeschaltete Abschnitte mit langsamerer diastolischer Depolarisation (AV-Knoten oder Purkinje-Fasern) als potentielle oder subsidiäre Schrittmacher aktiv. Vorhof- und Kammermyokard kann unter pathologischen Bedingungen ebenfalls eine Automatie entwickeln.

Der Aufstrich des Aktionspotentials im Sinus- und AV-Knoten wird ausschließlich vom Ca²⁺-Einwärtsstrom getragen. Er verläuft daher flacher als der steile Aufstrich, der durch einen schnellen Na⁺-Einwärtsstrom zustande kommt. Zu beachten ist, dass bei beiden Knoten das Schwellenpotential bereits bei –40mV liegt. Man stellt solche durch langsamere 0-Phasen geprägte *slow-response*-Potentiale den *fast-response*-Potentialen gegenüber. *Slow-response*-Potentiale leiten die Erregung nur langsam weiter - eine Möglichkeit um eine Leitungsverzögerung im AV-Knoten zu erzielen (Forth et al.,2001;Haverkamp et al.,2003; Lüderitz,1998).

1.1.4.Refraktärzeit

Im Verlauf eines Aktionspotentials zeigen Na⁺-Kanäle drei Zustände. Unterhalb des Schwellenpotentials, in der Ruhephase, sind sie geschlossenen und nicht konduktiv. Oberhalb des Schwellenpotentials zeigen sie für 2ms einen offenen konduktiven Zustand. Danach, während der gesamten Plateauphase und der beginnenden Repolarisation, wird ein inaktivierter Kanalzustand beschrieben, der auch bei starker Reizung keine Natriumionenleitfähigkeit aufweist (absolute Refraktärzeit). Das morphologische Substrat für diese Inaktivierungsphase bildet eine ins Cytosol ragende und sich zwischen zwei Untereinheiten des Kanalproteins erstreckende Polypeptidschleife, die die intrazelluläre Öffnung der Kanalpore verschließt und ab –50mV mit zunehmender Repolarisation wieder freigibt. Bei voranschreitender Annäherung an das Membranruhepotential nimmt die Zahl der Kanäle im geschlossenen, nonkonduktiven Zustand zu, die Zahl der inaktivierten Kanäle hingegen ab. Diese Veränderung erklärt, warum in dieser, die Repolarisation abschließenden Phase, bei starker Reizung eine Natriumkanalöffnung induziert werden kann (relative Refraktärzeit).

Die absolute Refraktärzeit ist demnach jene Phase, in der kein weiteres Aktionspotential ausgelöst werden kann und definiert daher den Minimalabstand zweier Impulse, die ein Aktionspotential bewirken können. In der relativen Refraktärzeit, der Phase zwischen absoluter Refraktärzeit und vollständiger Repolarisation, kann hingegen bei höherer Stromstärke als nach vollständig abgeschlossener Repolarisation sehr wohl ein kürzeres und im Aufstrich flacher verlaufendes Aktionspotential erzeugt werden.

Die lange (absolute) Refraktärzeit des Aktionspotentials der Herzmuskelzelle von 200–400ms hat somit zwei Vorteile:

• Sie ermöglicht eine synchrone Kontraktion erst der Vorhöfe, dann der Kammern.

• Bei einer Ausbreitungszeit vom AV-Knoten bis zur letzten Ventrikelfaser von 100ms, trifft die Erregung am Ende jeder Herzaktion stets auf absolut refraktäres Gewebe. Dieser Umstand verhindert unter physiologischen Bedingungen das Kreisen einer Erregung und damit Kammerflattern und –flimmern (Forth et al., 2003).



Abb.3.Absolute und relative Refraktärzeit;der steigenden Aktionspotentialhöhe (AP 2-5) in der relativen Refraktärzeit entspricht die Zunahme geschlossener Na-Kanäle (aus Unterrrichtsunterlagen EKG-Praktikum, Uni Müchen, 2005)

1.1.5.Pathophysiologie der Herzrhythmusstörung

Man teilt Arrhythmien wie folgt ein:

 nach ihrem Ursprung: supraventrikuläre ventrikuläre
nach ihrer Manifestation: tachykarde
nach ihrer Genese: Störungen der Erregungsbildung Störungen der Erregungsleitung und Kombination beider

Die Ursachen der Herzhythmusstörungen sind zahlreich, zu den wichtigsten zählen die Ischämie, Störungen des Elektrolythaushaltes, pH-Verschiebungen und, für uns von besonderem Interesse, Arzneimittelinteraktionen.

Physiologischerweise zeigen die Sinusknotenzellen die rascheste spontane diastolische Depolarisation und geben daher die Herzfrequenz vor. Bei pathologischen Veränderungen kann diese Funktion von jeder anderen Herzmuskelzelle, auch von solchen, die physiologisch in der Diastole nicht spontan depolarisieren, übernommen werden, sofern sie rascher zum Schwellenpotential depolarisieren, als der Sinusknoten (heterotope Automatie). Gefördert wird diese Entwicklung durch steilere diastolische Depolarisation, sinkende Reizschwelle und durch Steigen des maximal diastolischen Potentials(Forth et al., 2003).

Unter getriggerter Aktivität versteht man eine Form der heterotopen Automatie, die durch einen normalen Herzschlag Extrasystolen erzeugt.(=triggert). Man unterscheidet frühe und späte Nachpotentiale:

• frühe Nachpotentiale (early-after-depolarisations, EADs)

Sie treten im besonderen bei niedriger Frequenz und stark verzögerter Repolarisation zwischen -40mV und -60mV auf. Es handelt sich daher entweder um Ca²⁺-Potentiale (*slow-response*) oder um abgeschwächte Na⁺-Aktionspotentiale (*depressed-fast-response*). Die Reaktivierung beider Kanäle ist vor allem auf eine Hemmung des I_{Kr}-Stroms - beispielsweise durch eine Therapie mit Antiarrhythmika der Klasse III - zurückzuführen, die eine Verzögerung der Repolarisation bewirkt.

Wirkstoffe wie Amiodaron und andere Klasse III-Antiarrhythmika verzögern den *rapid-delayed-rectifier* (I_{Kr}) der Repolarisationsphase. Die daraus resultierende Verlängerung der Aktionspotentialdauer bewirkt eine deutliche Verlängerung der Refraktärstrecke, die kreisende Erregungen zum Erliegen bringt, ohne selbst kreisende Erregungen auslösen zu können. Die Leitungsgeschwindigkeit wird von diesen Substanzen kaum beeinflusst. Durch die Verlängerung der Aktionspotentialdauer bei unveränderter Frequenz reduziert sich auch die Zeit für die Erregung einer Herzmuskelzelle, womit die Wahrscheinlichkeit, dass eine abnorme Erregung auf eine erregbare Zelle trifft, gesenkt wird. Dieser Effekt verhindert die Fortleitung von Aktionspotentialen in heterotopen Automatiezentren und somit das *reentry*-Phänomen.

Andererseits beobachtet man bei Amiodaron eine sogenannte *reverse-use-dependence*, die durchaus tödliche Konsequenzen haben kann. Da die repolarisierende Wirkung des I_{Kr} mit sinkender Frequenz zunimmt, steigt frequenzabhängig auch die hemmende Wirkung des Amiodarons gegenüber den I_{Kr} bestimmenden K⁺-Kanälen. Bei besonders starker Verzögerung der Repolarisation und niedriger Herzfrequenz kann das Membranpotential instabil werden und sekundäre Oszillationen am Ende der Plateauphase (EADs) auslösen. Sobald diese das Schwellenpotential überschreiten, entsteht ein neues Aktionspotential. Sollten dieserart entstandene Aktionspotentiale in eine repetitive Impulssequenz übergehen, kann sich eine tachykarde Arrhythmie mit charakteristischem EKG-Erscheinungsbild, *Torsade de Pointes* genannt, einstellen. In seltenen Fällen, vor allem aber bei Nichtabsetzen des Antiarrhythmikums der Klasse III, kann es zu tödlichem Kammerflimmern kommen.



Abb.4.Schema zur Entstehung von Torsade de Pointes :durch Verlängerung der Repolarisationsdauer kann es zu EADs kommen, die bei Überschreiten der Schwelle zur Auslösung eines AP eine getriggerte Aktivität erzeugen (untere Bildsequenz).Diese manifestiert im OberfläachenEKG als Torsade des Pointes mit exzessiver QT-Verlängerung, verlängerter T-Welle und überhöhter U-Welle.(obere Bildsequenz). (Übungsskript"Unerwünschte Wirkungen v.Arzneimitteln durch Blockierung von hERG-Kanälen",2006,Univ.Prof.S.Hering).

• späte Nachpotentiale (*late-after-depolarisations*, LAD) werden durch intrazelluläre Ca²⁺-Überlastung – beispielsweise im Gefolge einer Reperfusion oder Ischämie erzeugt (Haverkamp et al., 2003).

1.1.6. EKG zur Kontrolle der Herzfunktion

Während der Herzaktion breitet sich die Erregungswelle unidirektional aus. Jeder Erregungszustand wird von der Summe der erregten Zellen gebildet. Geht man davon aus, dass eine erregte Zelle und ihre nicht erregte Nachbarzelle einen Dipol bilden, dem man einen Elementarvektor zuordnen kann, so entsteht durch Vektoraddition ein für jeden Erregungszustand spezifischer Summationsvektor. Die Spitze dieses Vektors beschreibt im Verlauf der Herzaktion drei schleifenförmige Bahnen, die den über das EKG registrierbaren Herzaktionen (der Vorhoferregung, der Ventrikelerregung, der Rückbildung der ventrikulären Erregung) entsprechen. Für die Routineelektrokardiographie werden drei Ableitungstechniken genutzt, die die Veränderung des dreidimensionalen elektrischen Feldes in der Frontal- und der Horizontalebene messen. Ableitungselektroden registrieren die Spannungsunterschiede zwischen den beiden Ableitungspunkten. Die gemessene Spannung ist proportional der Projektion des dreidimensionalen elektrischen Summationsvektors auf die Verbindungslinie der Ableitungspunkte.

Standardmäßig kombiniert man zwei EKG-Ableitungsmethoden in der Frontalebene, die Verfahren nach Einthoven und nach Goldberger (beide Extremitätenableitungen), mit einer Ableitungsmethode in der Horizontalebene (der Brustwandableitung nach Wilson). Aus allen dreien lässt sich eine dreidimensionale Vektorkardiographie erstellen.



Abb.5.Standard-EKG, Ableitung 2 nach Einthoven (Referenzzeiten der Abschnitte wie angegeben).

Die P-Welle entspricht der Erregungsausbreitung der Vorhöfe. Während der PQ-Strecke ist der Vorhof vollständig erregt, die Erregung erreicht AV-Knoten und His'sches Bündel. Der QRS-Komplex entspricht der Erregungsausbreitung in den beiden Ventrikeln, die ST-Strecke hingegen zeigt die Totalerregung der Ventrikeln an. Die folgende T-Welle ist Ausdruck der Erregungsrückbildung. Manchmal entsteht nach der T-Welle noch eine kleinere U-Welle, als Ausdruck der späten Repolarisation der Purkinjefasern. Definitionsgemäß entsprechen alle von der isoelektrischen Linie aufwärts gerichteten Auslenkungen positiven Potentialen, alle abwärts gerichteten negativen Potentialen. Zu beachten ist, dass die T-Welle in die gleiche Richtung weist wie die R-Zacke, obwohl es sich um zwei gegenteilige Prozesse, Depolarisation und Repolarisation, handelt (Schmidt et al., 2004; Grimm,1996).

1.2.Kaliumkanäle im menschlichen Herz

Kaliumkanäle sind die häufigsten und vielfältigsten aller bekannten Ionenkanäle. Sie finden sich in Prokaryonten wie auch in Eukaryonten und stammen phylogenetisch von einer gemeinsamen Urform ab (Derst und Karschin,1998). Bei Menschen sind mehr als 92 verschiedene Kaliumkanalgene bekannt (Tamargo et.al.,2004). Sie sind in allen Geweben und Organen vertreten und an verschiedenen Funktionen wie Osmoregulation; K⁺-Homöostase, sekretorische Prozesse, Signaltransduktion und der Regulation des Membranpotentials sowohl erregbarer wie auch nicht erregbarer Zellen beteiligt.

Für die verschiedenen Funktionen sind unterschiedliche Kaliumkanaltypen verantwortlich. Ihre Vielfalt wird einerseits durch die große Zahl an Kaliumkanal definierenden Genen erzeugt, andererseits durch alternatives Splicing der mRNA ermöglicht (Coetzee et al.,1999).

Ein Kaliumkanal ist aus gleichen (homooligomeren) oder unterschiedlichen (heterooligomeren) Untereinheiten aufgebaut. Bis zu vier primäre oder α -Untereinheiten bauen einen Kanal auf. Vier Transmembrandomänen, je eine pro α -Untereinheit, bilden die innere Wand der Kanalpore. Proteine, die mit den α -Untereinheiten assoziiert sind, werden als akzessorische oder β -Untereinheiten bezeichnet (Doyle et a., 1998).

Allen Kaliumkanälen gemein sind drei funktionelle Abschnitte

• eine Pore, die Kaliumionen durch die Membran passieren lässt,

• ein Selektivitätsfilter, der ausschließlich Kaliumionen passieren lässt und

• ein Gating-Mechanismus, der das Umschalten vom konduktiven zum nicht-konduktiven Zustand ermöglicht (Hering, Übungsskript 2006).

1.2.1. Strukturklassen von Kaliumkanälen

Die Klassifikation der Kaliumkanäle richtet sich nach der Anzahl der transmembranösen Domänen (TM) und der die Pore auskleidenden Schleifen (P), die die für die Kaliumselektivität essentielle Aminosäuresequenz Gly-Tyr-Gly-(Gly-Phe-Gly) enthält. Die Strukturklasse bezieht sich stets auf eine α -Untereinheit.

1.2.1.1. 2TM-1P K⁺Kanäle

Kennzeichnend für diese Gruppe ist, dass die Kanäle einwärtsgleichrichtend (*inward rectifying*) sind. Die Kanalproteine werden als Kirx.y bezeichnet, die entsprechenden Gene gehören zur KCNJX-Genfamilie. Die zwei Transmembransegmente (M1,M2) entsprechen den Segmenten S5 und S6 der 6TM-1P-Kanäle (s.u.). Der funktionelle Kanal ist ein Tetramer. Drei Vetreter sind im Herz exprimiert (Brandts et al.,2000)



Abb.6 Schematische Darstellung des 2 TM/P-Kanals mit der für die Kaliumselektivität essentiellen G-Y/F-G-Sequenz (aus Tamargo et al. Cardiovascular Research, 2004;62:12)

IK1-Kanal (ubiquitärer, "klassischer" inward-rectifier-Kanal)

- Der Kanal ist vermutlich ein Kir2.x-Tetramer.
- Er wird nicht im Sinus- und Atrioventrikularknoten exprimiert.
- Aktiviert wird er konstitutiv, das bedeutet, zur Öffnung bedarf es keiner Potentialänderung.

• Bei negativem Potential fließt der Strom bis zum Gleichgewichtspotential (E_K), wenn auch gering, auswärts, bei negativerem Potential mit starker Spannungsabhängigkeit einwärts (daher einwärtsrektifizierend).

 $E_K = -61, 5 \cdot \log ([K^+]_i / [K^+]_a)$ definiert das Gleichgewichtspotential.

• Bei positiv werdendem Potential wird der Kanal durch intrazelluläres Mg²⁺ und Polyamine blockiert.

• Die Kanalleitfähigkeit ist der Plasmakonzentration $[K^+]_0$ (bzw.RTln $[K^+]_0$) proportional, sodass die Myokardmembran bei Hypokaliämie nicht hyperpolarisiert, sonder depolarisiert wird. Umgekehrt kann bei Zellen deren Ruhemembranpotential relativ depolarisiert ist, der Anstieg der Leitfähigkeit dieses Kanals bei einer Erhöhung der $[K^+]_0$ das Membranpotential sogar hyperpolarisieren. •.Der Kanal ist hauptverantwortlich für das Membranruhepotential. Die Kanalinaktivierung bei Depolarisation erklärt die verminderte Membrangesamtleitfähigkeit während der Plateauphase. Er trägt zur sehr späten Phase der Repolarisation bei, indem er ab –50mV abwärts wieder leitfähig wird.

(Brandts et al., 2000; Lopatin et al.2001; Schram et al.,2002)

IK (Ach) -Kanal

• Der Kanal ist vermutlich ein Doppeldimer von Kir3.1 (KCNJ3) und Kir3.4 (KCNJ5).

• Er wird hauptsächlich im Sinus- und Atrioventrikularknoten exprimiert, ist aber auch im Vorhof- und Ventrikelmyokard anzutreffen.

• Aktiviert wird er über das Pertussistoxin-sensitive G-Protein (Gi), und zwar über G-βγ. Daher zählt man ihn zur Familie der G-Protein-regulierten, einwärtsgleichrichtenden K⁺-Kanäle (GIRK-Kanäle).

• Verschiedene Ligand/Rezeptor-Kombinationen, die Gi aktivieren, aktivieren ebenfalls den Kanal (z.B. Adenosin über den A1-Rezeptor).

• Dieser Kanaltyp vermittelt die vagale negative Chronotopie (Brandts et al.,2000; Tamargo et al.,2004).

IK(ATP) – Kanal

• Es handelt sich vermutlich um ein Kir6.2 (KCNJ12) Tetramer, assoziiert mit der β-Untereinheit Sulphonylharnstoff-Rezeptor-2A (SUR2A;Gen ABCC9)

• Er wird bei Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration aktiviert, bei physiologischer intrazellulärer ATP-Konzentration ist er geschlossen.

• Die Kanalöffnung verkürzt (etwa bei Ischämie, Hypoxie) das Aktionspotential, vermindert die Kontraktilität und den Energieverbrauch, spielt aber beim physiologischen Aktionspotential keine Rolle.

1.2.1.2 6TM-1P-Kanäle

Diese Klasse zeichnet sich durch die Spannungsabhängigkeit der Kanalfunktion aus. Der Sensor des elektrischen Feldes wird in der S4-Domäne vermutet, die positiv geladene Aminosäuren wie Lys und Arg in regelmäßigen Abständen enthält. Dieser Kanaltyp ist auswärtsgleichrichtend.

Die Kanalproteine werden als Kvxy bezeichnet und entstammen verschiedenen Genfamilien u.a. KCNAX, KCNDX, KCNEX, KCNQX. Der funktionelle Kanal ist ein Tetramer, an dem β -Untereinheiten assoziiert sein können. Jede der vier α -Untereinheiten besteht aus sechs transmembranösen Domänen, die N- und C-Terminalen ragen ins Cytosol.(siehe nächste Seite,Abb.) S5 und S6 bilden das Porenwandsegment. Die Schleife zwischen S5 und S6, der *pore-loop*, bildet den Selektivitätsfilter. Einen ähnlichen Bauplan weisen Kaliumkanäle von Foto-Rezeptorzellen, Riechzellen und manchen Neuronen auf.

Die Leitfähigkeit auch dieser Kanäle ist in gewissem Maß, wenn auch nicht so stark wie bei I_{K1} -Kanälen, von der Plasmakonzentration des Kaliums abhängig, da die Leitfähigkeit des Kanales (G) von Permeabilität (P) und der über der Membran gemittelten Ionenkonzentration (C) bestimmt wird.



Abb.7 Struktur, Expression und Aufbau eines spannungsabhängigenKaliumkanals (Kv) (aus Nerbonne, 2000, Physiol 525:288)

A.α-Untereinheit mit 6 transmembranösen Domänen, intrazellulärer N- und C-Terminale, einer positiv geladenen S4-Domäne, die den Kanal als Vertreter der S4-Superfamilie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle ausweist; zwischen den beiden gelb-gekennzeichneten

Porendomänen S5 und S6 befindet sich der pore-loop.

 $B.Schematische Darstellung der Steigerung auswärtsgerichteter Kaliumströme bei zunehmender Expression der \alpha-Untereinheit von Kv4.2 \,.$

C.Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen Kaliumkanals, zusammen-gesetzt aus 4 α -Untereinheiten.

 $\label{eq:basic} D.Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen kardialen Kaliumkanals, bestehend aus blauen α-Untereinheiten, gelben β-Untereinheiten und roten MiRP1-Einheiten.$

Die große Variabilität der Form des Aktionspotentiales innerhalb des Herzes sowie auch zwischen den unterschiedlichen Spezies lässt sich einerseits durch die Expressionsunterschiede der verschiedenen Kanäle erklären. Andererseits wird sie durch die molekulare Zusammensetzung, - wieviele und welche α -Untereinheiten mit wieviel und welchen β -Untereinheiten kombiniert sind – festgelegt (Brandts et al., 2000; Nerbonne et al., 2000).

Die Hauptvertreter dieser Klasse spielen beim physiologischen Herzaktionspotential eine außerordentlich wichtige Rolle.

Ito1-Kanal (der transient-outwards-Kanal)

- Vermutlich zumeist aus Kv4.x-Tetrameren (KCNDX) gebildet
- Es lassen sich zwei Subtypen verifizieren: I_{to1,fast} (Kv4.2, Kv4.3, zu finden im Vorhof und Ventrikel), und I_{to1,slow} (Kv1.4, vor allem im Ventrikel vertreten)
- Diese Kanäle sind mitverantwortlich für die frühe Repolarisation (die "Kerbe" nach dem Aufstrich). Daneben spielen vor allem Chloridionenströme eine Rolle.
- Die Kanäle unterliegen einer schnellen Aktivierung, sie inaktivieren entweder schnell (I_{Kto1,fast}) oder langsam (I_{Kto1,slow})

• Bei Herzinsuffizienz reduziert sich ihre Expression, was eine Verlängerung des Aktionspotentials zur Folge hat. Die daraus resultierende partielle Erholung depolarisierender Einwärtsströme (I_{Na}, I_{Ca}) kann *early-after-depolarisations* (EADs) auslösen. Dadurch entsteht eine erhöhte Neigung zu Tachyarrhythmien, die die Gefahr des Kammerflimmerns und somit des plötzlichen Herztodes in sich bergen.

(Brandts et al.,2000; Nerbonne et.al.,2000; Shah et al.,2003)

Iks-Kanal(slow *delayed-rectifier*-Kanal)

• Es handelt sich um ein KvLQT1-Tetramer (KCNQ1), mit assoziierter β-Untereinheit (minK,KCNE1)

- Der Kanal trägt zur Plateauphase und der späten Repolarisation bei
- Er wird langsam aktiviert, langsam oder gar nicht inaktiviert.
- Mutationen in KCNQ1 oder KCNE1 können Ursache für ein kongenitales QT-Syndrom sein (Nerbonne et alt., 2000; Sanguinetti et alt.,1990).

Ikr-Kanal (rapid-delayed-rectifier-Kanal)

• Er besteht aus vier hERG-α-Untereinheiten (KCNH), mit assoziierten β-Untereinheiten [minK-related peptide-1 (MiRP1) und KCNE2]

• Charakteristisch ist die schnelle Aktivierung bei -30mV.

• Bei positiven Potentialen zeigt der Kanal eine spannungsabhängige-C-Typ Inaktivierung, die rascher ist als die Aktivierung. Das reduziert den Kaliumauswärtsstrom und erhält die Plateauphase

• Bei Rückkehr zu negativen Potentialen ist die Erholung von der Inaktivierung schneller, als die Deaktivierung (Rückkehr in den geschlossenen Zustand), so dass ein erheblicher "Tailstrom" entsteht, der die Initialphase der Repolarisation steuert. Er bestimmt somit die Dauer der Refraktärzeit mit.

• Mutationen der α -oder der β -Untereinheit können auch hier zum kongenitalen QT-Syndrom führen.

(Brandts et al.,2000; Tseng et al.,1990; Yellen et al.,2002)

Weitere IkKomponenten

I_{Kur}–Kanäle finden sich bevorzugt in atrialen Zellen, aktivieren ultrarapid und zeigen eine sehr langsame Inaktivierung.

Ikslow--Kanäle aktivieren schnell, inaktivieren langsam.

Iss-Kanäle aktivieren langsam und sind nicht inaktivierend.

(Feng et alt., 1997; Nerbonne et alt., 2000)



Zeitverlauf der Beiträge von IK1, Ito, IKs, IKr zum Ventrikelmyokard-Aktionspotential

Brandts,2000,Physiol,15:10-22

1.2.1.3. Andere myokardiale K⁺-Kanäle

Neben obigen I_K Komponenten sind Repräsentanten anderer K⁺-Kanalklassen im Herz exprimiert, wobei deren Funktion und physiologische Aufgabe noch weitgehend ungeklärt ist.

4TM-2P-K⁺Kanäle z.B. TWIK (two-pore-weakly- inwards-rectifying) oder TBAK (two-pore background K⁺ channel),über deren Bedeutung für die Herzfunktion noch wenig bekannt ist (Tamargo et al., 2004).

 Ca^{2+} -aktivierte K⁺-Kanäle (K_{Ca}), stellen eine strukturell unterschiedliche Gruppe dar, die sich dadurch charakterisieren, dass sie von $[Ca^{2+}]_i$ aktiviert werden. Auf Grund der Einzelkanalleitfähigkeit in BK ("big K", auch "maxi K", Leitfähigkeit 100 – 250pS, spannungsabhängig, Aktivierung durch mikromolaren $[Ca^{2+}]_i$), IK ("intermediate", 20 – 80 pS) und SK ("small K", 5-20pS) eingeteilt. IK- und SK-Kanäle sind nicht spannungsabhängig und werden durch submikromolaren $[Ca^{2+}]_i$ aktiviert (Brandts et al.,2000; Nerbonne et al.,2000; Roden et al.2002).

SK-1-Kanäle (Gene KCNN1-3) ähneln zwar dem 6TM-1P-Kanal in ihrer Struktur, sind jedoch trotz positiv geladener Aminosäurereste in S4 nicht spannungsabhängig. Die $[Ca^{2+}]_i$ – Empfindlichkeit wird durch das konstitutiv intrazelluläre Calmodulin (quasi als intrazelluläre-lokalisierte β-Untereinheit) bestimmt. Eine Halbmaximale Aktivierung erfolgt bei ~ 0,3 µM $[Ca^{2+}]_i$.Die Öffnung des Kanals im Kardiomyozyt beim Ca²⁺-Einstrom in der Plateauphase und könnte bei deren Dauer zur Begrenzung bzw. deren Kürzung bei sympathikusbedingter Erhöhung der Frequenz beitragen (Brandts et al.,2000: Nerbonne et al.,2000).

Neben den oben angeführten, gibt es auch K⁺-Kanäle, die durch einen Anstieg der $[Na^+]_i (I_{K,Na})$, durch Fettsäuren bzw. Arachidonsäure ($I_{K,FA}$) oder durch eine Änderung des Zellvolumens aktiviert werden. Diese Kanäle haben zwar für den Normalablauf des Aktionspotentials bzw. für dessen Ausbreitung keine Bedeutung, können allerdings (zusammen mit dem $I_{K,ATP}$ -Kanal) bei metabolischen Störungen wichtig werden (Nerbonne et al.,2000).

Einen Überblick der bisher identifizierten K⁺-Kanäle und deren Untereinheiten im Herz geben Tamargo et al. (Cardiovascular Research 2004;62:11). Tab.1 Die Aufstellung zeigt die verschiedenen α -Untereinheiten, der Kaliumkanäle, die für den in der linken Spalte angegebenen Kaliumstrom verantwortlich sind, deren Gene und Chromosomenlokalisationen. Rechts davon finden sich die dazu assoziierten β -Untereinheiten, deren Gene und Chromosomenlokalisationen (aus Tamargo et al., Cardiov Res 2004;62:11)

Current	α-Subunit			β-Subunit		
	Name	Gene	Human chromosomal location	Name	Gene	Human chromosomal location
IKs	Kv7.1 (KVLQT1)	KCNQ1	11p15.5	minK	KCNE1	21q22.1-q22.2
IKr	Kv11.1 (HERG)	KCNH2	7q35-36	minK MiRP1	KCNE1 KCNE2	21q22.1-q22.2 21q22.1
IKur	Kv1.5 (HK2)	KCNA5	12p13.3	Κνβ1 (Κνβ3) Κνβ2	KCNAB1 KCNAB2	3q26.1 1p36.3
I _{K1}	Kir2.1 (IRK1) Kir2.2 (IRK2)	KCNJ2 KCNJ12	17q23.1-24.2 17p11.1			
$I_{\rm KAch}$	Kir3.1 (GIRK1) Kir3.4 (GIRK4)	KCNJ3 KCNJ5	2q24.1 11q23			
IKATP	Kir6.2 (BIR)	KCNJ11	11p15.1	SUR2A	ABCC9	12p12.1
I _{to1}	Kv4.3 Kv1.4	KCND3 KCNA4	1p13.2 11p14.3-15.2	KChIP2	KCNIP2	10
	Kv4.1 Kv4.2	KCND1 KCND2	Xp11.23 7q31	KChIP1 KChIP2	KCNIP1 KCNIP2	5q35 10
К _{2Р}	K _{2p} 1.1 (TWIK-1) K _{2p} 2.1 (TREK1) K _{2p} 3.1 (TASK-1) K _{2p} 5.1 (TASK-2) K _{2p} 6.1 (TWIK-2)	KCNK1 KCNK2 KCNK3 KCNK5 KCNK6	1q42-43 1q41 2p24,1-23.3 6p21 19q13-1			
	K _{2P} 9.1 (1ASK-3) K _{2P} 10.1 (TREK-2) K _{2P} 13.1 (THIK-1) K _{2P} 17.1 (TASK-4)	KCNK9 KCNK10 KCNK13 KCNK17	8q24-3 14q31 14q24.1-24.3 6p21.1-2			

Genes encoding the α and β subunits of cardiac potassium channels^

1.3. hERG-K⁺-Kanal-Structure Activity Relationship (SAR)

1.3.1.Strukturanalyse des Kanals

Das heutige Verständnis der Struktur und Funktion von hERG Kaliumkanälen wird stark von Erkenntnissen beeinflußt, die man durch das Studium anderer spannungsabhängiger K⁺-Kanäle (Kv) gewonnen hat. Dazu zählen vor allem der Kv1.1 Shaker Kanal von Drosophila, verschiedene bakterielle Kanäle (KcsA, MthK und KvAP), sowie der bei Säugetieren anzutreffende Kv1.2 Kanal (Jiang Y et al.,2002,2003;Long et al.,2005).

Vor allem die Untersuchung von mutanten Kanälen gibt heute, in Ermangelung einer kristallisierten Form des hERG Kanals, Aufschluß über den Struktur-Funktions-Beziehung.

Der hERG Kanal wird in verschiedenen Zelltypen exprimiert, darunter Neurozyten, glatte Muskelzellen sowie Tumorzellen.

Die Gene für weitere ERG Kanäle (etwa ERG 2 und 3) finden sich im Zentralnervensystem von vielen Säugetieren (Chiesa et al.,1997;Farrelly et al.,2003;Shi et al.,1997;Smith,2002). ERG1, das Gen des hERG-K⁺-Kanals, wird aber vor allem im Herzmuskel lokalisiert. Hier wird auch die Funktion des aus dem Gen entstehenden Kanals am besten verstanden.

Wie dem ersten Kapitel zu entnehmen ist, gliedert sich das Aktionspotential eines ventrikulären Myozyten in fünf Phasen:

- Phase 0 entspricht der Depolarisation und ist geprägt von einem raschen Na⁺-Einwärtsstrom
- Phase 1 dauert nur wenige ms, repolarisiert kurz und rasch und geht in
- Phase 2 über, die durch eine sehr langsame Repolarisation bestimmt wird.

In diesem Abschnitt des Aktionspotentials, der Plateauphase, spielen K⁺-Kanäle eine Rolle, die langsam aktiviert werden und/oder bei positivem Membranpotential eine reduzierte Leitfähigkeit an den Tag legen und somit das Aktionspotential verlängern. Einerseits ist letzteres notwendige Voraussetzung, um genügend extrazelluläres Ca²⁺in die Muskelzelle eintreten zu lassen, das die elektromechanische Kopplung steuert. Andererseits erzielt man durch die verzögerte Repolarisation das Refraktärwerden der Zelle und schützt somit vor weiteren zu frühen Erregungen , die ein Reentry-Phänomen zur Folge hätten, also in Herzrhythmusstörungen bis hin zum Kammerflimmern münden würden (Forth)

- Phase 3 sorgt für die Rückkehr des Membranpotentials zum Ruhepotential
- Phase 4 entspricht dem Ruhepotential.

Phase 2 wird von einem *rapid delayed rectifier* genannten K⁺Strom kontrolliert, der von hERG-K⁺-Kanälen gesteuert wird (Sanguinetti et al.,1995;Trudeau et al.,1995). Diese zeigen sich bei negativem Membranpotential (z.B. –80 mV) geschlossen, öffnen sich ab etwa – 60 mV. Dann erfolgt ein dem Konzentrationsgradienten folgender K⁺-Auswärtsstrom, der bei weiterer Depolarisation plötzlich versiegt. Man nennt letzteres Inaktivierung.

Man kann also drei Kanalzustände unterscheiden:

Den Zustand <geschlossen> der langsam in <offen> übergeht. <Offen> hingegen wechselt schnell in <inaktiviert>. Die Abfolge dieser Zustände in der genannten Reihenfolge beobachten wir bei Depolarisation. Die umgekehrte Reihenfolge wäre hingegen bei Repolarisation gegeben.



Abb.9. Die Konformation eines hERG Kanals ist spannungsabhängig. Im geschlossenen Kanalzustand (links) bei negativem Membranpotential ist das cytosolnahe activation gate geschlossen, der Kanal nicht leitend.Bei zunehmender Depolarisation öffnet sich das activation gate langsam, der Kanal wird leitend. Bei positivem Membranpotential schließt das Inaktivierungsgate, bei geöffnet bleibenden Aktivierungsgate. Die C-Typ- Inaktivierung wird von einer Konstriktion des Selektivitätsfilters (roter Kreis) getragen. In diesem Zustand ist der Kanal nicht konduktiv.(aus Sanguinetti, 2006,Nature,440:464)

hERG-Kanäle unterscheiden sich von anderen Kaliumkanälen in zwei wichtigen Punkten:

• Die Inaktivierung verläuft wesentlich rascher als die Öffnung

Dadurch reduziert der Kanal bei positivem Membranpotential den K⁺-Auswärtsstrom, was zur Verlangsamung der Repolarisation (eben der Plateauphase oder der Phase 2) führt.

• Die Erholung von der Inaktivierung (der Übergang von<inaktiviert> zu <offen>) erfolgt ebenfalls rasch und leitet damit Phase 3, die rasche Repolarisation, ein (Sanguinetti et al.,19995;Trudeau et al.,1995).

K⁺-Kanäle wie Shaker, KvAP, Kv1.2 und hERG zeigen gewisse strukturelle Gemeinsamkeiten: • Sie sind alle aus vier identischen α -Untereinheiten aufgebaut, die wie vier Säulen den eigentlichen Ionenkanal umgeben.

- Jede Untereinheit besteht aus sechs α-helikalen transmembranösen Domänen (S1-S6)
- S4 erfaßt als Sensor das Membranpotential, S5 und S6, bilden die Pore.



Abb.10. Struktur der α-Untereinheit eines spannungsabhängigen Kaliumkanals. Zu sehen ist unter anderem die durch mehrere Aminosäurereste positiv geladene S4-Domäne, die Domänen S1-S3, in denenen saure Asp-Reste negative Ladungen erzeugen, die mit den S4-Ladungen während des Gatings Salzbrücken ausbilden. Die N-Terminale zeigt eine PAS-Domäne, die C-Terminale der Untereinheit wird von einer zyklischen-Nukleotid-bindenden Domäne (cNBD) geprägt.(aus Sanguinetti, 2006,Nature,440:466)

Jede der α -Untereinheiten zeigt folgende für die Funktion mehr oder weniger bedeutsame Strukturen.

1.3.1.1.Die Pore besteht aus Selektivitätsfilter und Zentralhöhle

Der Selektivitätsfilter ist asymmetrisch aufgebaut. Sein extrazelluläres Ende entspricht einem schmalen Kanal. Die Selektivität gegenüber K⁺ wird offensichtlich durch die hoch konservative, entwicklungsgeschichtlich kaum Mutationen unterworfene Aminosäure-sequenz Thr-Val-Gly-Tyr-Gly (K⁺Signatursequenz genannt) festgelegt. Sie befindet sich an der C-Terminale der Porenhelix (Doyle et al.,1998). Jede α -Untereinheit steuert für diese Selektivitätszone eine Seitenketten-OH-Gruppe und vier weitere Carbonyl-Sauerstoffe bei. So wird garantiert, dass ausschließlich dehydrierte K⁺-Ionen, getrennt von einzelnen Wassermolekülen, den Filter passieren (Zhou et al.,2001). Im hERG Kanal hingegen lautet die Aminosäurenabfolge des Filters Ser-Val-Gly-Phe-Gly. Sie dürfte ebenso hoch konservativ sein.

Die Zentralhöhle wird von den vier S6 α -Helices gebildet und ist wassergefüllt. Ist sie gegenüber dem Cytosol geschlossen, dann überkreuzen sich die S6-Enden so stark, dass keine K⁺-Ionen mehr in die Höhlung der Pore eintreten können. Bei Depolarisation eröffnen sie in einer blendenartigen Bewegung den Kanal gegenüber dem Cytosol (Doyle et al.,1998).



Abb.11. Blick von intrazellulär auf das Aktivierungsgate eines auskristallisierten kompletten tetramerischen Kv1.2 Kanals. Die Begrenzung der Kanalöffnung wird von einander blendenartig überlappenden S6-Helices gebildet.(aus Sanguinetti, 2006, Nature,440:466)

Das Scharnier zur Befestigung und Bewegung der S6 –,,Tore", des sogenannten *activation gate* (der Öffnung des Kanals gegenüber dem Cytosol) vermutet man in einer ebenfalls als hochkonservativ geltenden Aminosäuresequenz, die bei vielen bakteriellen K⁺-Kanälen von Glycin (Jiang et al.,2002), bei Kv1–Kv4 hingegen von Pro-Val-Pro (Webster et al.,2004), bei hERG von Ile-Phe-Gly geprägt ist. Mutationen dieser drei Aminosäuren finden sich bei Kanälen, die zwar die Zustände <open> und <inactivated>, nicht aber hingegen <closed> zeigen (Fernandez et al.,2004).

1.3.1.2. Die N-Terminale

Sie enthält eine bereits bekannten Domänen ähnliche Region, die als PER-ARNT-SIM (PAS)-Motif bezeichnet wird (Morais-Cabral et al.,1998). In Prokaryonten ist sie für das Sensing (das Erfassen der transmembranösen Spannung) der Membranumgebung notwendig. In Eukaryonten reguliert sie die Transkription (Taylor et al.,1999). Läßt man bei hERG diese Region durch Mutation weg, entsteht ein Kanal der wesentlich rascher schließt (London et al.,1997).

1.3.1.3.Die C-Terminale enthält einen Bindungsort für zyklische Nukleotide, etwa cAMP. Das Andocken dieser hat aber offensichtlich nur geringen Einfluß auf das Gating. Bedeutung hat sie aber für das Processing des hERG Kanals im Endoplasmatischen Reticulums, also jene weiteren Veränderungen des Primärtransktipts zum fertigen Kanal, sowie für sein Trafficking (dem Aufsteigen des fertigen Kanals als Bestandteil von Vesikelmembranen) zur Plasmamembran.

1.3.1.4.Die akzessorische Beta-Untereinheit kann an eine α -Untereimheit assoziiert sein

und ändert dann die Eigenschaften des spannungsabhängigen K⁺-Kanals. So sorgt die MinK β -Untereinheit durch ihre Verbindung mit KCNQ1 α -Untereinheiten für die Bildung sehr langsam öffnender I_{Ks}-Kanäle (Barhanin et al.,1996;Sanguinetti et al.,1996). hERG- α -Untereinheiten können MinK-related Protein 1 (MiRP1) binden und werden dadurch, wie Studien von Abbott G.W. et alt. zeigen, verringert in die Membranoberfläche integriert. Darüberhinaus steigt die Schließgeschwindigkeit desKanals (Abbott et al.,1999). MiRP1 wird vor allem in den Purkinje-Fasern und atrialen Schrittmacherzellen, in nur sehr geringen Mengen auch in der atrialen wie ventrikulären Arbeitsmuskulatur exprimiert (Lundquist et al.,2005;Pourrier et al.,2003). Das lässt darauf schließen, dass MiRP1 fast ausschließlich im Reizleitungssystem agiert. Mutationen von MiRP1 führen offensichtlich ebenfalls zu vertikulärer Arrhythmie und dem Long-QTSyndrom (Abbott et al.,1999).

1.3.2. Das Gating (Öffnungs- und Schließaktivität) des Kanals und seine strukturellen Voraussetzungen

Geklonte hERG Kanäle , exprimiert in Oozyten und Säugetierzellen, geben auch Auskunft über die Funktionsweise des Sensors der α -Untereinheit. Er registriert die Membran-spannung und damit das transmembranöse elektrische Feld, das die Kanalaktivität steuert.

Die primäre spannungssensende Einheit stellt die S4 α -helikale Domäne dar. Sie enthält mehrere positiv geladene Lys- und Arg-Reste. Wird die Membran depolarisiert, führt der Sensor eine transmembranöse Positionsänderung durch. Diese Bewegung lässt sich etwa als Änderung der Fluoreszenz eines Fluorophors, befestigt an S4 oder als kleine lokale Stromstärkenänderung messen (Piper et al.,2003). Der Großteil der Ladungsbewegungen von S4 ereignet sich langsam, es scheint zu einem Aufsummieren zu kommen, was die Annahme nährt, dass erst eine größere Energiebarriere überwunden werden muß, bis sich der Kanal öffnet. Substitutionsstudien (Subbiah et al.,2005) lassen vermuten, dass die S4-Helix eher locker zwischen ihren Nachbarhelices eingefügt ist.
Mutageneseversuche haben klargestellt, dass Arg 531, die für das Erfassen der Membranspannung wohl wichtigste positiv geladene Komponente darstellt. Sie korrespondiert mit vier basischen Resten (in S4 von Shaker) und bewegt sich beim Gating über das gesamte transmembranöse elektrische Feld (Larsson et al.,1996;Piper et al.,2005;Subbiah et al.,2005;Zhang et al.,2004).

Negativ geladene Aminosäurereste bilden mit den basischen Resten in S4 Salzbrücken aus, die der Stabilisation der drei Kanalzustände <offen>, <geschlossen> und <inaktiviert> dienen (Liu et al.,2003).

Die sauren Asp-Reste in S2 und S3, an den extrazellulären Abschnitten des Kanals gelegen, binden zweiwertige Kationen des extrazellulären Raums, verhindern vielleicht die Salzbrückenbildung und können, so die Annahme, die spannungsabhängige Öffnung der K⁺-Kanäle zu positiveren Membranpotentialen verschieben (Fernandez et al.,2005).

Biophysikalische Untersuchungen an Shaker-Kanälen, von Laine et al. 2004, und Posson,2005, lassen vermuten, dass die S4-Domäne bei der Depolarisation nur eine geringe Bewegung in der Membran (~5Angström) ausführt. Die Röntgenstrukturanalysen von Jiang et al.,2003 und Ruta et al.,2005, hingegen zeigen größere paddelartige Bewegung im Ausmaß von 15 –20 Angström.

Eine weitere interessante Region verbindet die beiden funktionellen Einheiten Pore und Sensor, der S4-S5-Linker. Es handelt sich um eine α -Helix, die parallel zur Membran an der Cytosolseite, unter der C-Terminale von S6 der selben α -Untereinheit verläuft.

Mac Kinnon et alt. vertreten die Meinung, dass S4-S5 die spannungsabhängige Konformationsänderung von S4 über S5 an S6-Helices weitergibt, sodass die letzteren die untere Kanalöffnung in Folge schließen (Long et al.,2005).

Im hERG Kanal besteht offenbar eine elektrostatische Beziehung zwischen Asp540 des Linkers und Arg 665, an der C-Terminale von S6 gelegen, die den geschlossenen Kanalzustand stabilisiert.

Für den Prozeß der Inaktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle konnte man schließlich zwei unterschiedliche Mechanismen nachweisen:

Die schnelle N-Typ-Inaktivierung wird von einer ballartigen Region, die am N-Terminus jeder α -Untereinheit befestigt ist und die Pore im Kanal verschließt, bewirkt. Dieser *ball and chain*-Mechanismus findet sich vor allem beim Shaker-Kanal und lässt sich durch Entfernen der N-terminalen Domäne beseitigen (Spector et al.,1996).

Die langsame C-Typ-Inaktivierung ist sowohl bei Shaker wie auch in wesentlich rascherer Form bei hERG und anderen spannungsabhängigen K⁺-Kanälen nachgewiesen worden. N-Terminaldeletionen zeigen hier keine Auswirkungen auf die Inaktivierung (Smith et al., 1996). Hingegen hemmt man den Mechanismus durch die Mutation Thr 449 Val in Shakerporenhelices oder durch den Wechsel Ser 631 Val (Fan et al.,1999) in Shaker-homologen hERG-Abschnitten. Man vermutet, dass dem Stop des K⁺-Auswärtsstromes beim C-Typ ein Konstriktion des Selektivitätsfilters zugrunde liegt (Baukrowitz et al.,1995), die erst dann aktiv wird wenn die extrazelluläre Öffnung des Kanals gerade nicht von Ionen besetzt ist (Kiss et al.,1998).

Somit können wir den Selektivitätsfilter der Pore von hERG als *inactivation gate* bezeichnen. Der offene Kanalzustand wird wird demnach von einem offenen *activation* und *inactivation gate* bestimmt, während der inaktivierte Zustand bei offenem *activation gate* ein geschlossenes inactivation gate aufweist.

1.3.3.Wirkstoffbindende Regionen des hERG-Kanals

Manche Wirkstoffe besitzen die Fähigkeit das QT-Intervall des EKGs zu verlängern (daher Long-QT-Syndrom) und dadurch eventuell eine Herzrhythmusstörung auszulösen. Tatsächlich zeigen nur einige wenige Arzneistoffe wie etwa Quinidin oder andere Antiarrhythmika diese Nebenwirkung mit einer Häufigkeit von 2-9% (d.h. immerhin, dass im Schnitt jeder zwanzigste behandelte Patient über Herzprobleme klagt!). Andere hingegen, und sie stellen die Mehrzahl, wie ein Drug-Monitoring der WHO (de Bruin et al.,2005) zeigt, können zwar selten (etwa Cisaprid bei einem von 120000 Patienten), aber erwiesen, zu Herzrhythmusstörungen führen. Da selbst ein geringes Arrhythmierisiko für Pharmahersteller inakzeptabel ist, wurden Drogen wie Cisaprid, Sertindol, Terfenadin oder etwa Astemizol vom Markt genommen oder eine striktere Indikationsstellung gefordert.

Nun weiß man heute, dass viele der sogenannten Drug-Induced-QT-Syndroms entweder durch eine direkte Hemmung der Funktion des hERG-Kanals oder durch eine Überführungshemmung des Kanals vom Endoplasmatischen Reticulums.über den Golgiapparat und seine Vesikeln an die Plasmamembran zustande kommen (Kuryshev et al., 2005; Recanatini et al., 2005).

Jene, die eine Arrhythmie des Herzmuskels durch Block des hERG-Kanals induzieren, benötigen eine oder mehrere Bindungsstellen am Corpus des Kanals.

Durch ihre Bindungsfähigkeit gegenüber bestimmten Substanzen, wie auch durch ihre Eigenheit, wirkstoffinduziert Herzrhythmusstörungen auszulösen, unterscheiden sich hERG-Kanäle von vielen anderen K⁺-Kanälen.

In Anbetracht der Vielzahl chemischer Strukturen moderner Wirkstoffe, erscheint die Suche nach *binding sites*, wie die daraus abzuleitende Vorhersagbarkeit für die Entstehung von Arrhythmien, als ausufernde nicht von schnellen Erfolgen gekrönte Aufgabe.

Darüberhinaus wird die Beurteilung eines pharmakonbedingten hERG-Blocks dadurch erschwert, dass weitere Wirkstoffeffekte, wie etwa der gleichzeitige Block des L-Typ-Ca²⁺-Kanals, die QT-Verlängerung wieder aufheben können (Recanatini et al.,2005). Trotzdem testen Pharmafirmen heute unter Zuhilfenahme von typischen Vertretern pharmako-chemischer Substanzklassen K⁺-Kanäle um aussagekräftige Werte im Sinne einer Vorhersage einer Herzrhythmusstörung zu gewinnen.

Gerade der hERG-Kanal scheint im Vergleich zu anderen K⁺-Kanälen besonders anfällig für kanalblockierende Arzneistoffe zu sein. Daraus kann abgeleitet werden, dass er eine oder mehrere Bindungsstellen besitzt, die typisch für hERG sind und für die blockierende Eigenschaft verantwortlich gemacht werden können.

Mitcheson J.S. et al. haben durch Ala-Scanning-Mutagenese-Versuche verschiedene Arzneistoffkontaktstellen in den Poren aufgezeigt. Die Substitution bestimmter Aminosäuren durch Ala verändert in vielen Fällen die Sensivität des Kanals gegenüber dem Blocker empfindlich.

So bewirkt etwa die Mutation zweier polarer Aminosäuren (Thr623 und Ser624) an der Basis der Poren oder der beiden aromatischen Aminosäuren, Tyr652 und Phe656 in der S6-Domäne

eine Affinitätsabnahme des Wirkstoffs MK-499, eines Antiarrhythmikums. Verschiedene Substanzen wie Cisaprid, Terfenadin und viele andere nutzen diese s*ites* als Bindungsstelle (Sanguinetti et al.,2005). In Anbetracht der Tatsache, dass die Seitenketten dieser Aminosäuren alle in die Zentralhöhle ragen, verwundert es nicht, dass ein Block erst eintritt, nachdem der Kanal geöffnet wurde und die Substanz eingedrungen ist.

Im Gegensatz zur oben ausgesprochenen Vermutung, dass eine hERG-Inhibition ausschließlich durch hERG-spezifische *binding sites* zustande kommt, steht die Erkenntnis, dass Thr623 und Ser624 hochkonservative Regionen sind, die praktisch in allen Kv-Kanälen vorkommen. Tyr652 und Phe656 stützen hingegen obige Annahme, da die meisten anderen Kanäle an homologen Positionen Ile und Val zeigen. Es handelt sich also um eine mutationsanfälligere Region.

Bindungsstudien mit hochpotenten hERG-Kanal-Blockern wie Terfenadin und Cisaprid zeigen zwei ringförmige in der Pore angeordnete *binding sites*. Einer der beiden Ringe besteht aus den aromatischen Resten von vier Tyr652, je eine pro α -Untereinheit, die ins Lumen des Kanals vorspringen. Ihre π -Elektronenwolken interagieren intensiv mit dem positiv geladenen Stickstoff, etwa eines Terfenadins. Andererseits üben die Phenylreste der vier Phe656, die den zweiten Ring bilden, eine stark hydrophobe Wechselwirkung zum lipophilen Körper des Terfenadins aus (Fernandez et al.,2004). Diese beiden ringförmigen *sites* in der Zentralhöhle der Pore kennt man heute als wichtigste Kontaktstellen vieler Pharmaka.



Abb.12.Modell des hERG drug-binding site. Homologiemodell des Porenmoduls (S5,S6 zweier α-Untereinheiten) eines hERG Kanals basierend auf der Kristallstruktur von KvAP,.Die Kontaktstellen der Interaktion mit vielen Arzneistoffen sind färbig hervorgehoben: Thr623 (orange), Ser624 (weiß), Tyr652 (gelb) und Phe656 (magenta). (aus Sanguinetti, 2006,Nature, 440:467)

Interessante Ergebnisse liefern auch Methansulfonanilid-Bindungsstudien. Methansulfonanilide sind hochspezifisch am hERG-Kanal ansetzende und sehr stark wirksame Klasse III-Arrhythmika, die einen meist ausgeprägten Block des I_{Kr}-Stromes erzeugen. Vertreter dieser Pharmaka dringen erst in die Zelle über die Plasmamembran ein, bevor sie primär im offenen Kanal binden. Einige unter ihnen, wie Dofetilid oder MK-499 können ihre Bindung bei negativem Membranpotential nur langsam wieder lösen. Man leitet daraus ab, dass die bei negativen Potentialen geschlossenen *activation gates* einerseits den Zutritt zum Kanalinneren und damit zum *binding site* verhindern, andererseits das Verlassen des Kanals unterbinden. Eine einmal in den Kanal eingedrungene Substanz ist somit gefangen (=trapped) (Carmeliet,1992).

Dieses Trapping-Phänomen bestätigen Studien an hERG-Kanalmutanten (D540K), die bei starker Membranhyperpolarisation öffnen. Ein durch MK-499 ausgelöster hERG-Block verschwindet dann bei negativem Membranpotential (Mitcheson et al.,2000;Sanguinetti et al.,1999).

Sanguinetti und seine Mitarbeiter (Mitcheson et al.,2000) haben schließlich darauf hingewiesen, dass die gegenüber anderen Kv-Kanälen außergewöhnlich große Zentralhöhle die Bindung verschiedener Arzneistoffe fördert. MK-499, immerhin 7 x 20 Angström groß, bindet ohne die Deaktivierung zu beeinflussen. Strukturelle Voraussetzung für eine große Zentralhöhle dürfte das Fehlen von Prolin-Resten in der S6-Helix von HERG sein. Bei anderen Kv-Kanälen finden sich mindestens 1-2x Prolin in der C-Terminale der S6-Domänen, was diese offensichtlich stark krümmt und unflexibel macht. Die hohe Flexibilität von S6 bei hERG hingegen erlaubt, so die Annahme von Sanguinetti, eine weitaus größere Höhlung im Kanal.

Bei vielen (etwa Methansulfonaniliden), aber nicht bei allen hERG blockieren Substanzen, (Visnarinon, Quinidin) spielt auch die hohe Geschwindigkeit der Inaktivierung für die Bindung eine Rolle. Versuche mit hERG-Mutanten, die die Inaktivierung des hERG Kanals unterbrechen, reduzieren auch die Sensibilität des Kanals gegenüber der blockierenden Substanz (etwa bei Methansulfonaniliden)(Ficker et al.,1998;Wang et al.,1997). Daraus hat man geschlossen, dass die Inaktivierung im Kanal zu einer allosterischen Änderung führt, die die Bindungsaffinität zur Substanz erhöht.

Auch eine starke gegenüber einer schwachen Depolarisation, senkt die Affinität zur Bindungsstelle, wie im Versuch mit Dofetilid bewiesen wurde (Lees-Miller et al.,2000).

Abschließend sei darauf hingewiesen, dass es Substanzen, wie etwa die Azimilide gibt, die völlig andere, nicht in der Pore gelegene Bindungsstellen, an hERG-Kanälen nützen, um allerdings einen agonistischen Effekt, also eine Zunahme des I_{Kr}-Stromes zu erzeugen. Da sie ohne in das Cytosol einzudringen wirken, vermutet man, dass sie über die Membran an die dem Extrazellulärraum näheren Abschnitte der S3-S4-Domänen gelangen.

Darüberhinaus darf nicht vergessen werden, dass eine den I_{Kr} -Strom fördernde oder hemmende Wirkung nicht ausschließlich durch den Kontakt zu einer *binding-site* zustande kommt, sondern ein multifaktorielles Geschehen darstellt, in dem auch die Transkription/ Translation, das Processing und Tafficking des hERG-Kanals sowie die Beeinflussung hERG-assoziierter Strukturen, wie der β -Untereinheit, eine Rolle spielen. Unberücksichtigt bleibt hier auch die Einflussnahme des Wirkstoffes auf den intrazellulären Stoffwechsel, der ebenfalls in den Prozeß der Kanalhemmung negativ oder positiv eingreift, man denke nur an eine Induktion der Abbauenzyme.

1.4. Faktoren, die die Funktion des hERG-Kanals modulieren

1.4.1.Intrinsische Faktoren werden von Myozyten selbst definiert.

Die **Expression von ERG-Protein** etwa im Herzen von Hasen, Meerschweinchen und anderen Spezies sind subepikardial stärker ausgeprägt als subendokardial. Bei vielen Säugetieren zeigt sich darüber hinaus eine Dichtezunahme des ERG-Kanals von der Herzbasis in Richtung der Herzspitze (London et al.,1997). Pond et alt. wiesen mittels Immunoblot und Voltage-Clamp-Technik nach, dass sowohl die I_{Kr} Stromdichte, wie auch der ERG-Protein-Spiegel in den Herzvorhöfen von Ratten höher ist, als in den Ventrikeln. Beim menschlichen Herzen werden hingegen die hERG-Kanäle in den Ventrikeln stärker exprimiert als in den Vorhöfen (Gong et al.,2005).

B.London und M.C.Trudeau (London et al.,1997) haben 1997 nachgewiesen, dass auch **Splicing Varianten von hERG und mERG** eine wichtige Rolle bei der Funktionsregulation von I_{Kr} -Kanälen spielen. Unter Splicing versteht man das Zurechtschneiden der Nukleotidsequenz der mRNA und/oder der Aminosäuresequenz des Primärproduktes der Translation durch Enzyme, um die für die Funktion von hERG notwendige Länge des Endproduktes (=die α -Untereinheit) zu erreichen. Längenunterschiede definieren somit die Isoformen.

N-terminale Splice-Varianten von hERG lassen zwei Typen erkennen:

• Die *full-length*-Isoform, auch Isoform 1a genannt, verfügt über 396 Aminosäuren in ihrer N-Terminale.

• Die *shortened*-Form, Isoform 1b, zeigt 36 Aminosäuren weniger im N-Terminus, darüber hinaus fehlt ihr das PAS-Motif. Bedingt durch diese strukturellen Defizite, deaktiviert sie zehnmal schneller als Isoform1a. Daraus ergibt sich, dass die langsame Deaktivierung von hERG an die Anzahl und Abfolge der Aminosäuren sowie an das Vorhandensein einer PAS-Einheit gebunden sein muß (Morais-Cabral et al.,1998;Wang et al.,1998 et 2000). Stellt man sich weiters vor, dass Herzmuskelzellen beide Isoformen variabel exprimieren und zu homound heteromultimeren (aus gleichen oder verschiedenen Isoformen bestehenden) hERG-Kanälen zusammensetzen, ergibt sich ein weiterer fein abstufbarer Mechanismus für die Regulation des I_{Kr}-Stroms (Lees-Miller et al.,1997;London et al.,1997) Erst jüngst haben Nerbonne und Kollegen die Expression der beiden Isoformen in adulten menschlichen, Rattenund Mausherzen durch Nutzung von Antikörpern gegen N- und C-Termini von hERG-Kanälen untersucht und sind zu einem erstaunlichen Ergebnis gekommen. In allen drei Adultherzen konnte Isoform1a nachgewiesen werden, Isoform 1b fehlt offen-sichtlich völlig.

hERG1b-Knock-Out-Versuche an neugeborenen Mäusen führen hingegen zu einer deutlichen Abnahme des I_{Kr} -Stroms und zur Verlangsamung der Deaktivierung (Lees-Miller et al.,2000). Daraus wäre abzuleiten, dass der neonatale und kindliche Herzmuskel entweder ausschließlich oder doch zumindest dominierend die Isoform1b exprimiert und damit eine raschere Deaktivierung des I_{Kr} garantiert Mit zunehmendem Alter sinkt die 1b-Expression und die langsame Deaktivierung des hERG-Kanals gewinnt an Bedeutung (Lees-Miller et al.,2000). Ob dieses An- und Abschalten der Gene für 1a und 1b auch im Sinne einer kurz- und mittelfristigen Regulation eingesetzt werden kann bleibt offen, ist aber eher unwahrscheinlich, wie weitere Studien interpretieren (Barajas-Martinez et al.,2000).

Das menschliche Herz verfügt ebenso über eine C-terminale Splice-Variante, hERG_{USO} genannt. Ausschließlich exprimiert formt sie keinen funktionstüchtigen Kanal, koexprimiert mit hERG, lässt sie eine Abnahme der Amplitude, eine Beschleunigung der Aktivierung und Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Kanalfunktion um –8,8mV erkennen. Interessanterweise ist der mRNA-Spiegel von hERG_{USO} in menschlichen Kardiomyozyten mehr als doppelt so hoch wie der von hERG. Zur Funktionsweise dieser Splice-Variante gibt es derzeit noch keine klare Vorstellung.

Die **Gating-Kinetik** stellt einen weiteren wichtigen zelleigenen Faktor in der Beeinflussung des I_{Kr} –Stroms dar. Wie im Kap.3 bereits kurz erwähnt, wird der hERG-Kanal im Aufstrich des Aktionspotentials und in der Plateauphase aktiviert. Beim Membranpotential um die 0mV versiegt der K⁺-Auswärtsstrom durch Kanalinaktivierung plötzlich. Man nennt diesen Prozeß die i*nward rectification*. Sobald das Potential unter 0mV fällt, die Phase 3 der Repolarisation eingeleitet wird, erholen sich die Kanäle ebenso plötzlich von der Inaktivierung und öffnen sich. Diese erneute Öffnung des Kanals hat wieder einen Kaliumauswärtsstrom zur Folge, der die Repolarisation zum Ruhepotential einleitet (Curran et al.,1995; Warmke et al.,1994).

Die Zeit- und Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung beeinflusst das Ausmaß der Kanalöffnung in Phase 2, während Erholung von der Inaktivierung und die Deaktivierung des Kanals den K⁺-Auswärtsstrom in Phase 3 kontrollieren.

Die Spannungsabhängigkeit der Kanalprozesse –Aktivierung, Inaktivierung, Erholung von der Inaktivierung – unterscheidet sich kaum in unterschiedlichen Herzregionen, wie in unter-

schiedlichen Spezies (Barhanin et al.,1996;Fernandez et al.,2004;Kagan et al.,2000;Morais-Cabral et al.,1998;Trudeau et al.,1995).

Kanalaktivierungen beginnen in etwa bei -40 - -30mV und erreichen ihr Plateau bei +20 - +30 mV. Während der Öffnung (=Aktivierung) wird der K⁺-Auswärtsstrom bei etwa 0 - +10 mV maximal und versiegt ab +10 mV aufwärts.

Studien an atrialen, vertikulären und Purkinje-Myozyten aus Hundeherzen zeigen hingegen ausgeprägte Unterschiede in der spannungsabhängigen Deaktivierung. Man vermutet die Ursache hierfür in verschiedenen ERG-Isoformen und/oder Variationen der ERG-Kanal-Untereinheiten (Abbott et al.,1999;Doyle et al.,1998;Sanguinetti et al.,1996).

Für subendokardiale Purkinje-Myozyten des Hundeherzens in Tyrodelösung, wurde nachgewiesen, dass selbst bei Membranpotentialen von bis zu +60mV kein *inward rectifying* feststellbar ist, dafür aber eine rasche Deaktivierung bei –40mV abwärts. Interessant sind deren ERG-Kanäle vor allem auf Grund der Tatsache, dass ihre Aktivierung mit der Höhe der Prepulsspannung variiert, eine Eigenschaft, die sie mit den hERG-Kanälen gemeinsam haben. Bis –40mV öffnen sie sehr zügig. Bei –90mV kann es allerdings bei Steigen des Membranpotentials, etwa bei +20mV zu Zeitfenster von etwa 40 – 50 ms kommen (Lundquist et al.,2005) in dem fast alle Kanäle öffnen.

Durch Behandlung mit antisensen Oligonukleotiden gegen minK in Vorhofzelllinien der Maus (AT-1) haben L.Kiss, D.Immke und J.LoTurco nachgewiesen (Kiss et al.,19998), dass der **akzessorischen β-Untereinheit** eine hERG-Kanal-modulierende Funktion zukommt.

Die Reduktion der minK-Expression hat eine ausgeprägte Abnahme der I_{Kr} -Amplitude zur Folge, was darauf schließen lässt, dass minK unter physiologischen Bedingungen zu einer Vergrößerung des K⁺-Auswärtsstromes führt und daher ebenfalls die Gating-Kinetik beeinflusst (Kupershmidt et al.,1999;Mc Donald et al.,1997;Yang et al.1995).

Mc Donald et alt. zeigten auf, dass eine hERG- und minK-Koexpression in HEK293-Zellen zu stabilen Komplexen aus hERG- und minK-Proteinen führen, die den I_{Kr} -Strom gegenüber Zellen, die hERG allein exprimieren, steigern können (Mc Donald et al.,1997). Bis dato hatte es noch keinen Beweis für solche hERG-minK-Verbindungen gegeben.

Erst 1999 konnten Goldstein und Mitarbeiter drei minK-related-Peptide (MiRP) decodieren.

Heute kennt man vier Gene KCNE1 – 4, die für minK und MiRP1-3 codieren und allesamt die Funktion von β -Untereinheiten haben (Abbott et al.,1999).

MiRP1, koexprimiert mit hERG, bildet einen stabilen Komplex und sorgt etwa für eine Beschleunigung der Deaktivierung, für eine Zunahme der spannungsabhängigen Kanalaktivierung, für eine Reduktion der Kanalsensibilität gegenüber einer extrazellulären K⁺-Erhöhung und vor allem für eine Sensibilisierung des Kanals gegenüber I_{Kr}-Blockern (Abbott et al.,1999). Darüberhinaus kennt man Mutationen von MiRP1, die zum kongenitalen LongQT6 oder zu erworbenem LQT-Syndromen führen können (Abbott et al.,1999; Sesti et al.,2000; Splawski et al., 2000). Man vermutet MiRP1 als akzessorische β -Untereinheit des nativen I_{Kr}-Kanals der menschlichen Herzmuskelzelle.

Aktuelle Studien zeigen, dass MiRP2 exprimiert mit hERG in Oozyten zu Suppression führt, also ebenfalls modulierenden Charakter hat.

Weiters erscheint es durchaus möglich, dass zumindest minK, MiRP1 und 2 mit den α -Untereinheiten mehrerer eag-Familien Verbindungen eingehen und auf diese Art und Weise sowohl die Expression wie auch die subzelluläre Verteilung der Kv-Kanaluntereinheiten regulieren. Diese Annahme wird durch die Koexpression von MiRP1 und Kv4.2 in Oozyten gestützt, die nachgewiesen nicht nur eine strukturelle Verbindung eingehen, sondern auch eine Veränderung der Gating-Kinetik von Kv4.2 zur Folge haben (Tseng et al.,2000).

1.4.2. Extrinsische Faktoren wirken extrazellulär auf den Myozyten ein.

Neben vielen anderen Einflüssen kommt der Form und Frequenz des Aktionspotentials ein bedeutender Stellenwert zu.

Aktionspotentiale, die von langen und positiven Plateauphasen geprägt sind (etwa das ventrikuläre Aktionspotential beim Meerschweinchen), zeigen eine weitaus stärkere Aktivierung des I_{Kr}-Stroms, als solche, die eine kurze und negative Plateauphase aufzuweisen haben, wie beispielsweise atriale und ventrikuläre Aktionspotentiale der Ratte oder Maus (Tseng,2001).

K⁺-Kanäle beim Meerschweinchen, die rasch aktivieren und deaktivieren, beeinflussen jedenfalls nicht frequenzabhängig die Repolarisation, sind also *use-independent* (Jurkiewicz et

al.,1993). Der IKr -Strom von Katzen-Myozyten, der an eine langsame Aktivierung/Deaktivierung gebunden ist, weist hingegen eine frequenzabhängige Funktion in der Repolarisation auf, gilt somit als use-dependent. An Bedeutung gewinnt diese Erkenntnis bei pathologischen Prozessen, die eine Verkürzung des Aktionspotentials bei Reduktion der IKr-Aktivierung zeigen und durch Teildepolarisationen gekennzeichnet sind., die mit einer Verlangsamung der I_{Kr}-Deaktivierung und einer erleichterten Akkumulation der I_{Kr}-Aktivierung bei rascher Abfolge von Aktionspotentialen einhergehen. Katzen-Myozyten zeigen use-dependence allerdings nur bei einem Haltepotential von -40mV, nicht aber bei -80mV (Barajas-Martinez et al.,2000).

Mindestens ebenso wichtig, weil I_{Kr} beeinflussend, ist die Veränderung des zellulären Milieus der Herzmuskelzelle unter physiologischen wie pathologischen Bedingungen. Zu berücksichtigen sind die lokale extrazelluläre Kaliumionenkonzentration, die lokale extrazelluläre Protonenkonzentration (der pH-Wert) und auch die β -adrenerge Stimulation des Herzmuskels.

Pathologische Prozesse greifen ebenfalls vielschichtig in das Geschehen ein. Bei all diesen Faktoren machen sich regionale Unterschiede bemerkbar. Chronische Herzerkrankungen können durchaus langfristig die Expression der Kaliumkanäle beeinflussen, sodass es zu Störungen der kardialen elektrischen Aktivität, mitunter sogar zu Herzrhythmusstörungen kommen kann.

Studien von M.C.Sanguinetti und N.K.Jurkiewicz (Sanguinetti et al.,1992) haben bewiesen, dass eine **Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration** eine Zunahme des I_{Kr} -Stromes zur Folge hat. Diese Erkenntnnis steht im Widerspruch zur Tatsache, dass mit der Abnahme eines Konzentrationsgradienten eines bestimmten Ions auch eine Reduktion des Ionenstroms einhergeht. Die beiden Autoren erklären sich dieses Verhalten auf folgende Art und Weise:

• Erstens sorgt die Erhöhung der $[K^+]_{ec}$ für eine Reduktion des Kanalüberganges zum inaktivierten Zustand. Ursache hierfür soll eine Abnahme der Konformationsänderung des dem Extrazellulärraum nahen Abschnittes des Kanals sein, wahrscheinlich ident mit dem *inactivation gate*.

Da die Inaktivierung der wichtigste limitierende Faktor für den I_{Kr} -Auswärtsstrom bei depolarisierten Potentialen darstellt, handelt es sich also hierbei um den bedeutsamsten Mechanismus (Baukrowitz et al., 1995 et 1996; Wang et al., 1997; Yang et al., 1997).

• Zweitens kann, laut Sanguinetti, eine hohe [K⁺]ec eine Kanalblockade durch extrazelluläre Na-Ionen aufheben. Bei den meisten Kv-Kanälen steht der Tryptophan-Stickstoff der N-Terminale des Porenloops (der schleifenförmigen S5-S6-Verbindung) mit den Hydroxygruppen der Tyrosinreste der K⁺-Signatursequenz über Wasserstoffbrücken in Verbindung. Dadurch wird eine Filterregion geschaffen, die eine hohe Selektivität gegenüber dehydratisierten Kaliumionen aufbaut und dehydratisierte Na-Ionen nicht mehr permeieren lässt. Gefördert wird dieser Effekt durch die Abstoßung zweier oder mehrerer gleichgeladener Ionen, die gemeinsam in den Kanal eintreten. Gerade letzteres garantiert einen perlschnurartigen Auswärtsstrom, bei dem einem Kaliumion stets ein Wassermolekül folgt Selektivitätsfilter). Bei hERG-Kanälen (siehe Kap.3, fehlen diese Wasserstoffbrückenbindungen in der Pore, was die geringe K⁺-Na⁺-Selektivität erklärt. Durch die größere Durchlässigkeit kann es daher zum "Verstopfen" des Kanals durch einströmendes Na⁺ kommen. Es ist daher nicht verwunderlich, dass der IC₅₀ von hERG-Kanälen bei nur 3 mmolar gelegen ist, während die Hälfte aller anderen spannungsabhängigen Kaliumkanäle erst bei 100 mmolar und darüber durch Natrium blockiert werden (Numaguchi et al.,2000).

• Drittens erhöht sich bei hohem extrazellulären Kaliumionenspiegel die Leitfähigkeit der Kaliumkanäle für Kaliumionen (Kiehn et al.,1996; Shibasaki,1987; Veldkamp et al.,1993; Zou et al.,1997).

Zu erwähnen ist allerdings, dass die letzten beiden ins Treffen geführten Faktoren zu einer Erhöhung sowohl des Kaliumeinwärts- wie auch des –auswärtsstromes führen.

Speziell unter pathologischen Bedingungen muß auch die Zunahme der extrazellulären Protonenkonzentration berücksichtigt werden. Senkt man den extrazellulären pH-Wert, so beobachtet man eine signifikante Beschleunigung der hERG-Deaktivierung. Auffällig ist, dass keine Änderung der Stromamplitude oder Spannungsabhängigkeit der anderen Gatingprozesse festzustellen ist. Das lässt den Schluß zu, dass der zugrunde liegende Vorgang weder durch eine Porenblockade noch durch die Belegung der negativ geladenen Membranoberfläche mit Protonen zustande kommt (Berube et al.,1999; Jiang et al.,1999; Vereecke et al.,2000). M.Jiang und W.Dun (Jiang et al.,1999) konnten in Versuchen diesen Einfluß des extrazellulären pH-Werts auf die hERG-Funktion beseitigen, indem sie die Aminosäuren 2 bis 354

der N-terminalen Domäne entfernten. Daraus ergibt sich, dass Protonierungen des extrazellulären Abschnittes des hERG-Kanals zu allosterischen Änderungen in der Kanalwand führen, die eine Destabilisierung der Bindung der N-Terminale zum Aktivierungs-Gate bei negativem Membranpotential erzeugt. Dies beschleunigt die Kanaldeaktivierung (Jiang et.al.,1999).

Der akuten Modulation der hERG-Kanalfunktion durch β -adrenerge Stimulation ordnet man man heute einen besonderen Stellenwert zu.

Analysiert man die Aminosäuresequenz des hERG-Kanals, stößt man unweigerlich auf vier Phosphorylierungsstellen für cAMP –abhängige Proteinkinase (PKA) und eine cAMP-Bindungsstelle. Untersuchungen stützen die Annahme,dass zyklische Nukleotide wie cAMP durch direkte Bindung die Kanalfunktion verändern können.

Studien an Oozyten (Kiehn et al.,1998; Thomas et al.,1999), wie an Säugetierzellen (Cui et al.,2000) weisen darauf hin, dass der Phosphorylierung der oben genannten Positionen eine Zunahme der spannungsabhängigen hERG-Aktivierung, eine Beschleunigung der Deaktivierung und eine Abnahme der Stromamplitude folgt. Eine Entfernung dieser vier Positionen führt zum Verschwinden der Effekte (Cui et al.,2000; Thomas etal.,1999). Zellmutanten, die keine Phosphorylierungs-Sites mehr aufweisen, erzeugen durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMPs eine Senkung der Kanalaktivierung. Eine Koexpression von minK oder MiRP1 verstärkt diese Wirkung.

Untersuchungen an ventrikulären Myozyten des Meerschweinchens, wie einiger anderer Versuchstiere zeigen wiederum keine β-adrenerge Modulation. Vielleicht lässt sich dieses Fehlen des symphatischen Einflusses durch eine Variation in der Aminosäuresequenz des Kanals erklären.

Gesichert ist auch eine langfristige Modulation der hERG-Funktion unter den Bedingungen einer **Herzerkrankung**. So hat man festgestellt, dass in Infarktzonen, die man durch Verschluß der linken vorderen absteigenden Koronararterie an Hundeherzen induziert hat, die I_{Kr} -Stromdichte in epikardialen Myozyten reduziert ist und die Aktivierungskinetik beschleunigt erscheint (Jiang et al.,2000). Zugrunde liegt , wie M.Jiang und C.Cabo nachge-wiesen haben,

eine verminderte ERG-Proteinexpression. Umgeben ist die Infarktzone von Regionen, die keine Änderung des I_{Kr} oder der ERG-Transkription zeigen.

Von subendokardialen Purkinje-Myozyten kennt man einen E4031-sensitiven Kaliumauswärtsstrom, der ähnliche Gating-Charakteristiken wie hERG aufzuweisen hat und dem wahrscheinlich eine neue ERG-Isoform zugrunde liegt. Spätestens 48 Stunden nach dem Infarkt kommt es subendokardial in der Infarktzone des Hundeherzens zu einer signifikanten Zunahme des I_{Kr}-Stromes, die offensichtlich auf eine Upregulation dieses E4031-sensitiven Kanals zurückzuführen ist. Sollte diese Beobachtung auf die subendokardiale Zone menschlicher Herzmuskel nach dem Infarkt übertragbar sein, bedeutet das eine deutliche Risikozunahme für die Anwendung von Antiarrhythmika der Klasse III in der Postinfarkttherapie (Pinto et al.,1998).

In hypertrophierten Ventrikeln von Katzenherzen beobachtet man eine Abnahme des *delayedrectifier*-Stromes, die mit einer Verlangsamung der Kaliumkanalaktivierung und einer Beschleunigung der Deaktivierung einhergeht. Substrat dieser Veränderung dürfte ebenfalls ein ERG-Kanal sein (Follmer et al.,1990).

Aus langfristigen Studien kann man entnehmen, dass auch Langzeittherapien zu einer mehr oder weniger starken Suppression des I_{Kr} führen (etwa eine chronische Amiodaron-Therapie beim Meerschweinchen).

Die enorme Heterogenität der hERG- wie ERG-Kanalfunktion muß als Ausdruck der Anpassungsfähigkeit der Herzfunktion unterschiedliche physiologische an wie pathophysiologische Bedingungen verstanden werden. Obwohl dadurch ein gewisser Spielraum zur Verfügung steht, können vor allem genetische Defekte sowie Pharmakaeinflüsse zur beträchtlichen Steigerung des Arrhythmie-Risikos führen. Um dieses in der Zukunft zu minimieren, wird es notwendig sein, die Rolle der KCNE-β-Untereinheiten zu durchleuchten, die elektrophysiologischen Auswirkungen, besonders der chronischen pathologischen und Herzveränderungen (wie Hypertrophie und Infarkt) zu erfassen die Strukturfunktionsbeziehung des hERG-Kanals auch in Verbindung mit der β-Untereinheit zu analysieren.

1.5. Das QT-Syndrom

Wie eingangs bereits erwähnt, kann eine Blockade des I_{Kr}-Stroms zu einer Verzögerung der Repolarisation führen. Die daraus in EKGs feststellbare Verlängerung des QT-Intervalls kann gefährliche Herzrhythmusstörungen auslösen, die als polymorphe ventrikuläre Tachykardien manifestieren.

Beschrieben wurde diese Veränderung erstmals vom französischen Kardiologen Francois Desertenne in den sechziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts, von ihm *Torsade de Pointes* genannt, zu deutsch "Spitzenumkehrtachykardie", da der QRS-Komplex um eine virtuelle isoelektrische Linie unduliert. Häufig zeigt das EKG vorangehend eine sogenannte short-longshort-Sequenz: es tritt eine vorzeitige Herzaktion auf, gefolgt von einer kompensatorischen Pause. Die der Pause folgende Erregung löst dann die *Torsade de Pointes*-Tachykardie aus. In den meisten Fällen terminiert sich diese Veränderung spontan, selten aber doch geht sie in Kammerflimmern über, das zum plötzlichen Herztod führt (Locati et al.1995)

Diese Funktionsabweichung der Herzmuskelzellen wird auch als QT-Syndrom bezeichnet.



Abb.13.Torsades de Pointes mit short-long-short-Sequenz (Thioridazine, Diarrhoea and TdP, Martin Denvir et al., April 1998)

Gemessen wird das QT-Intervall im Oberflächen-EKG, frequenzkorrigiert nach Bazett, vom Beginn der Q-Zacke bis zum meist nicht einfach auszumachenden Ende der T-Welle. Es entspricht der Dauer der ventrikulären Erregungsausbreitung (QRS-Komplex), der anhaltenden ventrikulären Erregung (ST-Strecke) und der ventrikulären Erregungs-rückbildung (T-Welle)und darf bei Frauen Maximalwerte von 470 ms, beim Mann Werte bis zu 450 ms annehmen(siehe Kap.1). In der Regel wird die II.Ableitung herangezogen (Moss,1993).



Abb.14.EKG eines Gesunden (kardionet.de)

Verschiedene Faktoren führen zu einer Veränderung des QT-Intervalls:

• Herzfrequenzänderungen (Brandes, 1998)

• Elektrolytstörungen, vor allem Hypokaliämie und Hypomagnesiämie-beide verlängern es-(Brandes 1998)

• Endokrinologische Veränderungen, wie Schilddrüsenstoffwechselstörungen (Brandes, 1998)

• das autonome Nervensystem, aber auch andere neuronale und rezeptorvermittelte Einflüsse (Brandes, 1998)

- ZNSErkrankungen wie Subarachnoidalblutungen, führen zu QT-Verlängerung (Witchel2000)
- kardiovaskuläre Erkrankungen wie arterielle Hypertonie und Herzinfarkt (Drici,1996)
- Alter; in der Pubertät ist androgenbedingt das QT-Intervall kürzer (Moss,1993)
- medikamentöse Einflüsse

Eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer, Ursache für ein abnorm langes QT-Intervall, wird entweder durch in Phase 2 oder 3 reduzierte Auswärtsströme und/oder durch erhöhte Einwärtsströme verursacht. Zu den im Ventrikelmyokard die Repolarisation begrenzenden Kanälen zählen vor allem die hERG-Kaliumkanäle, die die schnelle Komponente des verzögerten Kaliumgleichrichtstroms (I_{Kr}) kontrollieren und besonders in den Purkinjezellen wie den innermyokardialen M-Zellen verteten sind. Werden diese Kanäle blockiert oder ihre Expression reduziert, erfolgt eine Abnahme des K⁺⁻Nettoauswärtsstromes (Viswanathan,1999). Die Reduktion des K⁺⁻Auwärtsstromes kann wieder frühe Nachde-polarisationen erzeugen (Early-After-Depolarisations-EADs), die Ca²⁺–Kanäle vom L-Typ und/oder Na⁺-Kanäle in der Plateauphase reaktivieren und das Auftreten von TdP triggern. Es kommt darüber hinaus zu einer Zunahme der Dispersion der Repolarisation. Die meisten repolarisationsverändernden Pharmaka blockieren den I_{Kr}-Strom (Haverkamp,2000)



Abb.15 Torsade de Pointes (Monitorstreifen) mit typischer Undulation der an Amplitude zu- und abnehmenden QRS-Komplexe bei einer 54 jährigen Patientin unter Behandlung mit Chinidin (Tagesdosis 480 mg, Behandlungsindikation paroxysmales Vorhofflimmern). Journal Kardiologie 2001 8, S.402-406, Haverkamp et al.

Man unterscheidet die angeborenen von den erworbenen QT-Syndromen, nicht alle erworbenen werden durch einen I_{Kr} -Block erzeugt.

1.5.1. Angeborene QT-Syndrome

Unterschieden wird eine autosomal-dominante Form, die mit einer Häufigkeit von 1:5000 – 7000 auftritt und als Romano-Ward-Syndrom bezeichnet wird, von einer weitaus selteneren Variante, dem Jervell-und-Lange-Nielsen-Syndrom, das zusätzlich mit Taubheit einhergeht.

Für beide Erkrankungen gelten rezidivierend auftretende Synkopen, verursacht durch ventrikuläreTachyarrhythmien vom Typ TdP als charakteristisch. Klassisches Manifestationsalter ist die späte Kindheit und frühe Adoleszenz. Bei den symptomatischen Formen überwiegt das weibliche Geschlecht (Zareba,1998). Häufig wird das Krankeitsbild als vago-vagale. Synkope fehlinterpretiert. Da mit zunehmender Synkopendauer auch hypoxische Myoklonien. oder Krampfanfälle auftreten können, wird nicht selten die Fehldiagnose Epilepsie gestellt (Hördt,1995). Für die Störung aber nahezu charakteristisch ist die Synkope, da TdP dazu neigt, rasch zu terminieren.

Das angeborene QT-Syndrom zeigt sich als recht heterogen. Kopplungsanalysen haben ergeben, dass bei betroffenen Familien sechs Genorte an den Chromosomen 3,4,7,11 und 21 für die Erkrankung relevant sind. Fünf der Gene konnten bereits identifiziert werden. Alle kodieren entweder für Ionenkanäle oder deren Untereinheiten. Besonders häufig treten Mutationen von KCNO1 (LQT1) und hERG (LQT2) auf. Beim Jervell-und-Lange-Nielsen-Syndrom handelt es sich entweder um eine homozygote Mutation an KCNQ1 oder um eine heterozygote Mutationskombination unterschiedlicher Gene (Haverkamp,1997).

Bei allen bisher beschriebenen Mutationen des kongenitalen-QT-Syndroms konnte man eine Veränderung der Aktionspotentialdauer im Oberflächen-EKG nachweisen, die durch eine Verlängerung des frequenzkorrigierten QT-Intervalls (QTc) verursacht wurde.

Art	Lokus	Gen	Genprodukt	Vererbung	
JNL1	11p15.5	KCNQ1	K ⁺ Kanal (I _{Ks})	rezessiv	
JNL2	21q22.1-22	KCNE1	K ⁺ Kanal (I _{Ks})	rezessiv	
JNL3	?	?	?	rezessiv	
Tab.3 Unterformen des Romano-Ward Syndroms					
Art	Locus	Gen	Genprodukt	Vererbung	
LQT1	11p15.5	KCNQ1	K ⁺ Kanal(I _{Ks})	dominant	

Tab.2 Unterformen des Jervell-und-Lange-Nielsen-Syndroms

LQT2	7q35-36	hERG	K^+ Kanal (I_{Kr})	dominant
LQT3	3p21-24	SCN5A	$Na^{+}Kanal(I_{Na})$	dominant
LQT4	4q25-27	?	?	dominant
LQT5	21q22.1-22	KCNE1	$K^{+}Kanal(I_{Ks})$	dominant
LQT6	21q22.1-22	KCNE2	$K^{+}Kanal(I_{Ks})$	dominant
LQT7	?	?	?	dominant

Interessanterweise manifestieren LQT1 und LQT2 nahezu ausschließlich bei Sympathicusstimulation (also bei physischer und/oder psychischer Belastung) in Form von Synkopen. Bei Patienten mit LQT3 tritt hingegen die kurzfristige Bewusstlosigkeit bedeutend seltener und nur im Ruhezustand auf. Die Schwere des Krankheitsbildes ist variabel ausgeprägt, sie reicht von assymptomatisch bis schwer symptomatisch (Stramba-Badiale,2000).

Tab.4 Charakteristika der QT-Syndrome von LQT1-LQT3

Unterform (Gen)	LQT1	LQT2	LQT3		
	(KCNQ1)	(hERG)	(SCN5A)		
rel Häufigkeit	30	25	5		
Arrhythmietrigger	Belastung	Akust.Reize	Ruhe,Schlaf		
T-Welle	T-verlängert	T-gekerbt	spätes T		
Ereignisse* bis 40.Lj.					
> 1Ereignis (%)	62	46	18		
> 2Ereignisse (%)	37	36	5		
Letalität bezogen auf die Zahl					
der Ereignisse (%)	4	4	20		
Alter bei 1.Ereignis/Jahre	9	12	16		

*Synkopen, plötzlicher Herztod (die Häufigkeit bezieht sich nur auf symptomatische Patienten, die 5-10 % des Gesamtkollektivs ausmachen). (Tab.2,3,4 :: Journal Kardiologie 2001 8,Haverkamp et al.)

Häufig beobachtet man keine Manifestation für mehrere Generationen, dann einen plötzlichen Todesfall im Jugendalter. Die Ursache für die variable Penetranz des Gendefektes ist bis dato noch ungeklärt. Es ist dennoch durchaus sinnvoll eine genetische Untersuchung anzustrengen, wenn in der Familienanamnese Synkopen und plötzliche Todesfälle im Jugendalter auftreten und ein charakteristischer klinisch-elektrokardiographischer Befund vorliegt (Haverkamp, 2001). Beim Niedrigrisiko-Patienten setzt man heute therapeutisch auf β -Rezeptorblocker. Beim Hochrisiko-Patienten (der infolge TdP-bedingten Kammerflimmerns bereits reanimiert werden musste) kombiniert man β -Blocker mit der Implantation eines Defibrillators (Moss,2000). Zunehmend nutzt man heute auch die genspezifische Therapie .S.J.Compton et alt (1996) konnten etwa eine Verkürzung des QT-Intervalls nach K⁺⁻Supplementierung und gleichzeitiger Spironolacton-Gabe bei LQT2-Patienten nachweisen:[Mechanismus: die Hemmung der renalen Kaliumsekretion und die Applikation gewisser Kaliummengen erhöhen die extrazelluläre Kaliumkonzentration. Dadurch kommt es zu einer Zunahme des I_{Kr}-Stromes]. Standardtherapeutikum bei LQT ist aber nach wie vor der β -Blocker.

1.5.2. Erworbene QT-Syndrome

Die sekundär oder erworbene abnorme Verlängerung des QT-Intervalls, die ebenfalls zu TdP führt, unterscheidet sich von der genetisch bedingten in drei Punkten:

- anamnestisch ergibt sich kein Hinweis auf ein familiär congenitales QT-Syndrom
- das QT-Intervall ist vor der Einnahme repolisarisationsverlängernder Arzneistoffe unauffällig
- erst der Einsatz repolisarisationsverlängernder Medikamente führt zur Verlängerung des QT-Intervalls

Zu den Arzneistoffen, die ein erworbenes QT-Syndrom auslösen können, zählen vor allem Antiarrhythmika, der Klasse III (Sotalol) und Klasse I (Chinidin). Durch Prüfung an hERG-Kanälen konnte man nachweisen, dass auch viele nicht am Herzen ansetzende Arzneistoffe, wenn auch in wesentlich höherer Plasmakonzentration, zum QT-Syndrom führen können.

Hohe Konzentrationen von nicht medikamentös eingesetzten Substanzen im Blutplasma werden zum Beispiel bei Intoxikationen erzielt. Bei Arzneistoffen ist an eine Überdosierung oder zufällige Intoxikation zu denken. Organschäden an Leber und Niere können Stoffwechselveränderungen wie eine Reduktion des enzymatischen Abbaus erzeugen. So werden viele der in Tab.5 angeführten Substanzen vom Cyp450-System metabolisiert. Blockiert man deren Abbau durch gleichzeitige Verwendung von Azolantimykotika wie Ketoconazol oder durch Nutzung von Makrolidantibiotica wie Erythromycin kommt es zur zwangsläufigen Steigerung der Arzneistoffkonzentration im Plasma. Ein hoher Plasmaspiegel kann ein QT-Syndrom auslösen (Haverkamp,2000).

Antiarrhythmika	Amiodaron	Neuroleptika	Thioridazin
	Ajmalin		Chlorpromazin
	Chinidin		Haloperidol
	Disopyramid		Droperidol
	Dofetilid		Pimozid
	Ibutilid	Andere	Chloralhydrat
	Prajmalin	Psychopharmaka	Fluoxetin
	Propafenon		
	Solatol		
Antibiotika	Erythromycin	Antiparkinson-	Amantadin
	Clarythromycin	mittel	Budipin
	Spiramycin	Sympatho-	Adrenalin
	Trimethoprim	mimedika*	Etilefrin
	Sulfamethoxazol		Isoprenalin
	Sparfloxacin		Orciprenalin
	Pentamidin (i.v.)	Lipidsenker	Probucol
Zytostatika	Tamoxifen	Diuretika	Indapamid
Antihistaminika	Terfenadin	Mobilitätsanreger	Cisaprid
	Astemizol	Malariamittel	Chinin
	Hydroxyzine		Chloroquin
	Ebastin		Halofantrin
	Mizolastin		Mefloquin
	Dipohenhydramin		
Antidepressiva	Amitryptilin	Nootrope Geriatrika Vincamin	
	Clomipramin Röntgenkontrast-		
	Doxepin	mittel	Ioxaglinsäure
	Imipramin		
	Desipramin		
	Maprotilin		
	Sertindol		

Tab.5 Medikamente, die das QT-Intervall verlängern und Torsade de Pointes auslösen können

Diese Liste stellt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

*Die Auslösung von Torsade de Pointes durch Sympathomimetika gilt nur für das kongenitale QT-Syndrom. Bei medikamenteninduzierten Formen von TdP können Sympathomimetika (z.B. Orciprenalin), basierend auf ihrer positiv chronotropen Wirkung, therapeutisch eingesetzt werden- es resultiert eine Frequenzsteigerung mit konsekutiver Abnahme der Dauer des QT-Intervalls und verminderter Arrhythmieneigung (Tab.5: Journal Kardiologie 2001 8 Haverkamp et al.)

Vermutet wird, dass die Hälfte aller arzneistoffinduzierten TdPs in den ersten Tagen nach Therapiebeginn auftreten. Eine Reihe von Risikofaktoren, wie Bradykardie, Hypokaliämie und Hypomagnesiämie unterstützen den pathologischen Prozeß. Die Kombination von niedriger Herzfrequenz und Hypokaliämie kann selbst ohne medikamentöse Einflüsse TdP erzeugen.

Tab.6 Risikofaktoren für eine Torsade de Pontes unter repolarisationsverlängernden Pharmaka

- Weibliches Geschlecht
- Bradykardien
 - ° Sinusbradykardien, intermittierender Sinusknotenstillstand
 - ° höhergradigere AV-Blocks (AV-Block II. und III.Grades)
 - ° relativeBradykardie durch kompensatorische Pausen nach Extrasystolen
- Elektrolytstörungen
 - ° Hypokaliämie
 - ° Hypomagnesiämie
- Myokardiale Hypertrophie (z.B. bei arterieller Hypertonie oder Herzinsuffienz)
- Hohe Plasmakonzentrationen bei
 - ° Überdosierung
 - ° Intoxikation
 - ° normaler Dosierung aber gleichzeitiger Hemmung des Metabolismus und/oder der Ausscheidung
 - (z.B. Nieren-,Leberinsuffienz, Hemmung des Metabolismus durch eine entsprechende Begleitmedikation etwa Cytochrom P-450-Hemmer
 - °schneller Injektions-/Infusionsgeschwindigkeit
- Begleitmedikation mit anderen repolarisationsverlängernden Pharmaka
- Vorbestehende QT-Verlängerung
- Vorliegen eines kongenitalen QT-Syndroms
- Phasen der temporären elektrischen Instabilität (z.B. innerhalb der ersten Stunden nach elektrischer Kardioversion von Vorhofflimmern).

Die klinische Manifestation von arzneistoffinduzierten TdPs scheint ziemlich einheitlich, Studien (Haverkamp, 2001) haben gezeigt, dass es unabhängig von der verabreichten Dosis zu einer Verlängerung des QT-Intervalls um 25 - 30 % kommen muß, um TdP auszulösen Die Mehrzahl der drogeninduzierten Rhythmusstörungen haben überdies, wenn das Arzneimittel nicht abgesetzt wird und begleitende Risikofaktoren unbehandelt bleiben, Kammerflimmern zur Folge. TdP muss somit als potentiell tödliche Nebenwirkung eingestuft werden. Einem medikamenteninduzierten QT-Syndrom scheint nur selten eine okkulte Genmutation zugrunde zu liegen. Man vermutet die Pathogenese in einer individuellen Einschränkung der Repolarisationsreserve, die zu einer Senkung der Schwelle für proarrhythmogene Effekte führt. Mit welcher Häufigkeit ein Risikofaktor zu TdP führt, lässt sich allerdings nicht quantifizieren, womit eine klare Vorhersage nicht möglich ist (Roden,1998).

Die Behandlung einer erworbenen abnormen QT-Verlängerung setzt auf den sofortigen Abbruch der Therapie mit dem auslösenden Pharmakon. Eine begleitende Bradykardie wird unter Verwendung von positiv chronotropen Arzneistoffen (z.B. Orciprenalin) oder temporären Schrittmachern korrigiert (Beta-Sympathometika sind bei kongenitaler abnormer QT-Verlängerung kontraindiziert!).

Keinesfalls dürfen unter diesen Umständen β -Blocker verabreicht werden, da sie in vielen Fällen die gleichzeitig bestehende Bradykardie verstärken. Hypokaliämie wird supple-mentiert. Als besonders wirkungsvoll gilt auch die Applikation eines Magnesium-Bolus mit nachfolgender Infusion. Abschließend sei darauf hingewiesen, dass jegliche Therapie mit repolisarisationsverlängernden Pharmaka immer an eine regelmäßige elektrokardiographische Kontrolle wie an die Vermeidung von Risikofaktoren gebunden sein muss. Das gilt in besonderem Maß für Langzeittherapien (Haverkamp,2001).

1.6.Vorhersagbarkeit von Torsade de Pointes – Trends

Die Fähigkeit mancher Arzneistoffe eine polymorphe, ventrikuläre Tachykardie , besser bekannt als *Torsade de Pointes*, auszulösen, führt in steigendem Maße zur Nichtzulassung oder Zulassungsänderung von Arzneimitteln (Bellardinelli et alt., 2003).

TdP tritt selten auf und erzeugt, wie im vorangegangenem Kapitel erwähnt, Synkopen. Noch weitaus seltener kann es allerdings zu Kammerflimmern und plötzlichem Herztod führen. In den klinischen Untersuchungen , die der Zulassung vorangehen, sind wegen der geringen Häufigkeit (1-3/100.000) TdP fast nicht nachweisbar.

Die potentiell tödliche proarrhythmogene Wirkung, etwa des Terfenadins, wurde erst auf Grund der extensiven Anwendung weltweit (> 10 Millionen Verschreibungen/24 Millionen Patientenjahre) und eines umfassenden Patientenmonitorings von 1985 bis 1998 erkannt. Da es bei mindestens 125 Heuschnupfen-Patienten in den USA zu Kammerflimmern und plötzlichen Herztod geführt hat, wurde es schließlich 1998 vom Markt genommen (Rangno, 1997).

Anzumerken ist, dass durch Arzneistoffe erzeugtes Kammerflimmern nicht zwingend torsadogen sein muß. Sha et al.(2005) haben in ihrer Studie darauf hingewiesen, daß wirkstoffinduziertes Kammerflimmern häufiger nicht TdP assoziiert auftritt und dann eine bei weitem geringere Überlebensrate aufweist.

Das gegenwärtige Konzept, dass die Anforderungen der Gesundheitsbehörden sowie die Praxis der pharmazeutischen Industrie bestimmt, basiert auf folgender Vorstellung:

TdP wird von einer verzögerten Repolarisation verursacht, die als Verlängerung des QT – Intervalls im EKG manifestiert. Da verlängerte QT-Intervalle häufig mit TdP assoziiert sind, stellt die Zunahme des QT-Intervalls also einen wichtigen Marker für die Fähigkeit eines Arzneimittels TdP zu erzeugen, dar. Wirkstoffe, die eine QT-Verlängerung zeigen und daher als TdP auslösend gelten, zeigen fast immer auch eine Hemmung des für die Repolarisation bedeutsamen *rapid delayed rectifier* Kaliumstromes , I_{Kr}, gesteuert von hERG-Kanälen. Aus diesen Zusammenhängen leitet sich die Annahme ab, das TdP-Risiko bestimmen zu können, sofern

- subzellär die Blockade des hERG-Kanals,
- zellulär die Verlängerung der Aktionspotentialsdauer (durch Verlängerung der Repolarisation, Entstehung von EADs) und
- auf Organebene EKG-Veränderungen (wie QT-Verlängerung, Überhöhung und Verzögerung der T-Welle) durch zu prüfende Arzneistoffe nachgewiesen werden.

Dieses Konzept der arzneistoffinduzierten Torsadogenese durch hERG Kanalinhibition, wird durchaus gestützt, etwa durch Erkenntnisse, die man aus der Erforschung des kongenitalen QT-Syndroms, LQT2 (eine Erkrankung die durch einen hERG-Gendefekt ausgelöst wird) gewonnen hat(Moss, 2003; Roden , Kupershmidt 1999). Allerdings zeigen nicht alle Patienten mit hERG-Mutationen eine klare QT-Verlängerung. Auch andere Mutationen, wie etwa in KCNQ1 für I_{Ks} Kanäle oder SCN5A führen zum kongenitalen QT-Syndrom. Es ist also gerade der Vergleich zwischen dem erworbenen und angeborenen QT-Syndrom, der den Schluß zulässt, dass eine Reihe weiterer Faktoren und nicht ausschließlich die Blockade des hERG-Kanals oder die Prolongation des QT-Intervalls zur Entwicklung von TdP führen.

Ein Überblick über die aktuelle Praxis der pharmazeutischen Industrie (Hammond et al.,2001), Studien von opinion leaders zu diesem Thema (Gralinski, 2000; Haverkamp, Breithardt &Camm,2000), sowie die Entwicklungsrichtlinien von Kontrollbehörden (etwa der European Agency for the Evaluation of Medical Products, 1997; ICH S7B guideline Step 2, 2004) ergibt, dass gegenwärtig ein Verfahren aus drei präklinischen Tests herangezogen wird, um das TdP-Risiko einer Verbindung beurteilen zu können.

Es setzt sich aus einem in vitro-assay, der das Inhibitionspotential gegenüber I_{Kr} prüft, einem in vitro-Repolarisations-assay, der in einem integrierten elektrophysiologischen System (einer Purkinje-Faser oder einem Papillarmuskel) Veränderungen der Aktionspotentialdauer (APD) registriert, und einem in vivo-assay zusammen, der an Hund oder Primat (keinesfalls an Nagetieren) Veränderungen des QT-Intervalles im EKG erfasst. Da kein Test für sich alleine aussagekräftig wäre, hat man sich für diese Dreierkombination entschieden.

Die Annahme, dass die hERG-Kanalinhibition der zentrale TdP auslösende Mechanismus ist, hat weiters dazu geführt, neu entwickelte Wirkstoffe (new chemical entities, NCEs) in einem sehr frühen Entwicklungsstadium auf ihr hERG-inhibitorisches Potential zu prüfen, um einen hERG bedingten weitaus teureren Entwicklungsstop in einem späteren Stadium zuvorzukommen (Netzer, Bischoff & Ebneth, 2003).

Das Screening von chemischen Verbindungen wird in den frühen Phasen der *lead identification* wie *lead optimization* des pharmazeutischen Entwicklungsprozesses durchgeführt, da in beiden eine große Zahl chemischer Substanzen in kurzer Zeit mit minimalem Material –und Kostenaufwand getestet werden können. In der *lead identification* werden zwischen fünf und 50000 Verbindungen in automatisierten Prozessen auf ihre im therapeutischem Sinne positive Wirkung gegenüber dem therapeutischem Ziel geprüft. Dieser Entwicklungsschritt dauert in etwa vier bis sechs Monate und filtert 100-200 Substanzen heraus, die in der *lead optimization* auf ihre Verwendungsfähigkeit als Arzneistoff getestet werden. Unter Nutzung von in vitro-wie in vivo Systemen werden jene Verbindungen selektiert, die auf Grund ihrer pharmako-dynamisch-pharmakokinetischen Qualitäten effektiver sind als bekannte Substanzen. Die Dauer der *lead optimization* umfasst etwa vier bis sechs Monate und schließt mit der Festlegung auf ein bis fünf zur Weiterentwicklung geeigneter *drug candidates* ab (Hoffmann et al.,2005).

Um eine Bestimmung des hERG-Effekts von bekannten, wie auch neuen Arzneistoffen, zu ermöglichen, werden im Labor und in der Industrie Methoden unterschiedlichen physikochemischen Ansatzes verwendet. Binding assays versuchen die Wirkung einer Verbindung durch Ersetzen des radioaktiven [³H] - Dofetilids (eines hERG-Kanal –Antagonisten) zu quantifizieren. Rubidium flux assays nutzen die hohe Rb⁺Permeabilität spannungsabhängiger K⁺Kanäle. Fluorescence assays messen Membranpotentiale an lebenden Zellen durch spannungs-abhängige Fluoreszenzfärbungen. Alle diese Tests haben aber einen Nachteil, sie bestimmen indirekt Effekte am hERG Kanal und sind daher anfällig, artifizielle, also erst durch das Experiment aufoktruierte Ergebnisse zu liefern.

Im Gegensatz zu den eben erwähnten Techniken wird die patch-clamp Methode immer noch als das Nonplusultra für die Erfassung des hERG-aktiven Potentials einer Substanz gesehen, obwohl sie, da manuell durchzuführen, sehr zeitaufwendig ist und sich daher absolut nicht für ein Screening in der frühen Phase der Arzneistoffentwicklung eignet (Hoffmann et al.,2005). Durch Bestimmung der I_{Kr} Stromhemmung, des ADP und des QT-Intervalls ist es in den letzten Jahren gelungen, das Risiko eines drug-induced TdP massiv zu reduzieren. Nichtsdestotrotz sind einige Fragen bezüglich der Vorhersagbarkeit geblieben, da keine der verwendeten Methoden eine vollständige Risikoerfassung für QT-Verlängerungen,oder, bei weitem unangenehmer, für drug-induced TdP garantiert.

So sind sich die Kontrollbehörden bis dato nicht einig, ab welchem Ausmaß präklinische Daten ein klinisches Risiko eliminieren. Einige Institutionen zweifeln sogar an der Relevanz präklinischen Datenmaterials. Vielfach wird auch eine umfassende QT-Studie während der Phase I der Arzneistoffentwicklung, unabhängig vom Ergebnis der präklinischen Untersuchungen, gefordert.

In den letzten Jahren ist man zunehmend auf Risikofaktoren gestossen, die in der Pathogenese des arzneistoffinduzierten TdPs eine nicht zu unterschätzende Rolle spielen. Ein erhöhtes Risiko besteht offenbar eher bei Frauen als bei Männern, bei Hypokaliämie , bei Herzkrankheiten, bei deutlichen Erhöhungen der Arzneistoff-Plasmakonzentration als Folge intravenöser Applikation, sowie bei QT-Verlängerungen (Roden, 2004).

Auch bei eingehender Kenntnis der Pathogenese sowie der Risikofaktoren für arzneistoffinduziertes TdP, lässt sich gegenwärtig noch nicht zufriedenstellend von einer Grundgesamtheit auf das Individium im Sinne einer Vorhersage des TdP-Risikos schließen. Die Gründe hierfür sind vielfältig und sollen im folgenden kurz diskutiert werden.

1.6.1. Die Grenzen der Testmethoden, in der Bestimmung des TdP-Potentials

1.6.1.1. hERG assay

Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass eine hERG-Kanalinhibition nicht synonym für ein hohes TdP-Risiko steht. Aus der Sicht der Industrie wie auch der Kontrollbehörden, ist es von Bedeutung, dass hERG-assays eine viel zu hohe , also zum Teil falsch positive Ergebnisrate produzieren, wenn sie gemäß der Richtlinie ICHS7B bis zu Konzentrationen an der Grenze der Löslichkeit durchgeführt werden. Nach Untersuchungen von Shah et al.(2005), zeigen im frühen präklinischen Stadium der Entwicklung etwa 75-86% der NCEs eine Inhibition der hERG-Kanalaktivität. Die Schlussfolgerung lautet: setzt man die Konzentration im Test ausreichend hoch an, reagiert fast jede Substanz in vitro hERG-hemmend oder um es anders zu formulieren: *One only has to torture nature long enough – in its disparation it will give you the answer (*Hoffmann et al., 2005).

Verständlich wird die so erzeugte hohe Zahl an "falsch positiven" Ergebnissen, wenn man sich vor Augen hält, dass die Veränderung der Leitfähigkeit eines hERG-Kanals immer auch eine Leitfähigkeitsänderung anderer Kanäle, oder Ionentransporte zur Folge hat, ein Aktionspotential also stets die Folge eines sehr komplexes Geschehen ist, das aus vielen gegenseitg wechselwirkenden Komponenten besteht

"Falsch negative" Ergebnisse werden hingegen von Substanzen erzeugt, die in hohem Maße TdP erzeugen, allerdings nur ein geringes hERG-Inhibitionspotential aufweisen. Redfern et al. haben 2003 auf eine Reihe derartiger Substanzen hingewiesen (z.B. Nifedipin, Diphenhydramin, Arsentrioxide).

1.6.1.2. ADP assay

Nicht jede Inhibition des hERG-Kanals führt zu einer Aktionspotentialsverlängerung. Umfangreiche Studien mit ausgewiesenen hERG Blockern zeigten, dass nur 76% zu einer Verlängerung des Aktionspotential führten (Hondeghem,2005). Bei Blockern wie Terfenadin lässt sich ein ADP verlängernder Effekt an Hunde- und Schweine-Purkinjezellen nur schwer nachweisen (Gintant et al.,2001). Ebastin hingegen verlängert deutlich die APD-Dauer im isolierten Hasenherz, zeigt allerdings überhaupt kein TdP-erzeugendes Potential beim Menschen (Valentin et al., 2004).

Validierungsstudien des International Life Science Institutes (ILSI) haben auf die geringe Korrelation zwischen ADP-Verlängerung und dem TdP-Risiko für Patienten hingewiesen (ILSI-workshop "Cardiovascular Risk Assessment", Washington DC, 3.-4. Juni 2003).

Die Ergebnisse von Hondeghem, Carlsson und Duker, 2001, stützen wiederum die These vom sicheren Zusammenhang zwischen ADP-Verlängerung und TdP-Proarrhythmie.

(Herangezogen wurden 702 Verbindungen in 1071 isolierten Hasenherzen; ein nicht unbeträchtlicher Anteil zeigte aber auch hier zwar eine ADP-verlängernde Wirkung aber keine Proarrhythmie).

1.6.1.3. EKG (QT-Verlängerung)

Obwohl eine Verlängerung des QT-Intervalls, wirkstoffinduziert, bei Hunden wie auch bei Primaten in hohem Maße mit einer QT-Verlängerung beim Menschen korreliert, ist seine Vorhersagefähigkeit für TdP beim Menschen offensichtlich gering (ILSI-workshop "Cardiovascular Risk Assessment", Washington DC, 3.-4. Juni 2003)

Studien von Warner und Hoffmann, 2002, zeigten am Beispiel von sieben verschiedenen Antipsychotika, dass die freie therapeutische Plasmakonzentration aller dieser Substanzen zwar eine 10 – 20% Inhibition des hERG-Kanals erzeugt, sich allerdings in völlig unterschiedlicher Art und Weise auf die Dauer des Aktionspotentials auswirkt. Auch korreliert nicht das Ausmaß der Verlängerung des QTc (frequenzkorrigiertes QT-Intervall) mit der Höhe des TdP-Risikos. Haloperidol etwa bewirkt eine Verlängerung des QT-Intervalls um nur 5-7 ms (die physiologische QT-Länge wird in der Literatur mit 450 ms bei erwachsenen Frauen, bei erwachsenen Männern mit 430 ms angegeben; 470 ms bei Frauen sowie 450 ms bei Männern gelten als prolongiert). Trotzdem wird in therapeutischen Dosen angewandt beim Menschen häufig TdP festgestellt. Zibrasidon prolongiert das QT-Intervall wesentlich stärker als Haloperidol, wurde bis dato aber noch nie mit TdP oder plötzlichem Herztod in Verbindung gebracht (Taylor,2003). Erythromycin hebt die QTc-Dauer um immerhin 35 ms konnte allerdings bis heute noch nicht mit TdP in Verbindung gebracht werden (Redfern et al.,2003).

Alle diese Beispiele belegen, dass die zur Vorhersage des TdP-Risikos verwendeten Parameter nicht wirklich verlässlich sind.

1.6.1.4. Schlussfolgerung für die Neuentwicklung von Arzneistoffen

Da eine direkte Verbindung zwischen QT-Verlängerung und TdP-Risiko nach wie vor nicht geklärt ist, können wir nicht zwischen sicheren und TdP-induzierenden hERG-Blockern oder APD/QT-prolongierenden Wirkstoffen unterscheiden.

Pfizer versucht etwa eine Risikominimierung durch eine Kombination von präklinischen Tests und einer umfassenden QT-Studie, in der bis zu zehn Tage hindurch mehrmals täglich das EKG von Probanden nach Gabe von Placebos und potentiellen Wirkstoffen, in empfohlener und supratherapeutischer Dosis, gemessen wird. Allein 50 solcher Studien wurden von Pfizer 2002 induziert, jede im Wert von ca. \$ 1 Million (Fermini et al,2003).

In Anbetracht der Tatsache, dass die durch Kontrollbehörde und ICHS7B geforderten oben vorgestellten Tests zunehmend vielversprechende Substanzen als Gesundheitsrisiko einstufen und aus dem Entwicklungsprozeß eliminieren, gilt es neue Evaluationsmöglichkeiten zu erschließen und alte zu verfeinern.

Im folgenden seien neu Ansätze und deren Auswirkungen auf die Vorhersagbarkeit von druginduced TdP kritisch beurteilt.

1.6.2. Neue oder verbesserte Evaluationsmethoden

1.6.2.1. In vitro Modelle

Für die Beurteilung der Repolarisationsverzögerung setzt man nach wie vor auf isolierte Zellen. Um die elektrophysiologischen Aspekte eines TdP-induzierenden Effektes zu studieren, werden isolierte Gewebe oder präparierte Herzen herangezogen.

1.6.2.1.1. Isolierte Zellen

Die bisher verwendeten hERG-Kanal –Versuchsanordnungen nutzen vor allem transfizierte Säugetierzellen, wie *human embryonic kidney cells* (HEK293) oder *chinese hamster ovary cells* (CHO), da sie Messungen des I_{Kr} bei physiologischen 37 °C erlauben.

Cavero hat in einer Studie (2000) vorgeschlagen, hERG assays unter Bedingungen durchzuführen, die eine oder mehrere proarrhythmogene Risikofaktoren, etwa eine niedrige Kaliumkonzentration oder eine bradycardie-imitierende, niedrige Stimulationsfrequenz, simulieren. Badlösungen geeigneter Zusammensetzung könnten eine kardiale Ischämie vortäuschen.

Proteolytische Dispersion, bedingt zum Teil durch Lagerungsbedingungen, scheint des weiteren den Kaliumkanal zu schädigen und seine Expression zu beeinträchtigen, was zu einer Veränderung der Messwerte elektrophysiologischer Parameter führt (Saint et al.,1999). Sinnvoll wäre daher der Einsatz einer immortalen Zelllinie, fetaler oder adulter menschlicher Kardiomyozyten, die unter standardisierten zellulären Bedingungen auf Wirkstoffe reagiert.

1.6.2.1.2.Isolierte Gewebe/Herzen

In vitro Techniken, die isolierte Gewebe oder isolierte präparierte Herzen heranziehen, zielen darauf ab, die Beziehung der APD-Verlängerung zum TdP-Risiko zu erfassen. Eckhardt, Breithardt und Haverkamp haben 2001 erstmals an einem isolierten Hasenherz unter Bedingungen, die klinisch mit einem erhöhten TdP-Risiko assoziiert werden (Bradykardie und Hypokaliämie), gearbeitet. Die Bradykardie wurde durch einen AV-Block erzeugt und eine Perfusionslösung niedriger Kaliumkonzentration verwendet.

Von mindestens acht verschiedenen Stellen in zirkulärer Anordnung an beiden Ventrikeln wurden simultan monophasische Aktionspotentiale aufgezeichnet. Unter Verwendung verschiedener QT verlängernder Agentien wurde die Häufigkeit der Entstehung von EADs gemessen und der Bestimmung des TdP-Risikos zugrunde gelegt.

In der Versuchsanordnung von Hondeghem und Hoffmann (2001) wird ein isoliertes Hasenherz herangezogen, dessen HIS-Bündel durchtrennt wurde. Monophasische Aktionspotentiale wurden im linksventrikulären Epikard und Subendokard aufgezeichnet. Die Ergebnisse dieses Modells unterstützen vor allem die These der Assoziation von QT-Verlängerung und TdP-Risiko bei Terfenadin, Haloperidol und Quinidin.

Hondeghem konnte bereits 2001 bei TdP erzeugenden Substanzen auf weitere Phänomene hinweisen, die neben der APD-Verlängerung auftreten können:

• die Triangulation des Aktionspotentials, eine dreieckförmige Veränderung des Aktionspotentials, die durch eine selektive Verlangsamung der Phase 3 der Repolarisation entsteht(siehe Abb.),

• die Instabilität des Aktionspotentials, die sich als Variabilität des Schlag-zu-Schlag APDs zeigt,

• die *reverse use-dependence*, eine Zunahme des arzneistoffinduzierten Effektes bei Abnahme der Stimulationsfrequenz (siehe Kap.1.5), sowie

• die räumliche (intramurale) wie zeitliche (Schlag-zu-Schlag-)Dispersion der Repolarisation, werden als die proarrhythmischen Indices bezeichnet.



Abb.16. Beispiele für eine proarrhythmische (obere) und eine nicht proarrhythmische (untere) Verlängerung des AP am isolierten Hasenherzen (modifiziert nach Hondeghem, J of Pharmacological and Toxicological Methods.2006;53:91)

Dem TRIaD(Triangulation, Reverse use-dependence and Dispersion)-Konzept liegt die Vorstellung zugrunde, daß eine APD-Verlängerung, begleitet von den eben genannten vier Phänomenen mit hoher Wahrscheinlichkeit zu EADs und TdP führt, eine alleinige ADP-Prolongation aber einen anti-arrhythmischen Effekt aufweist (Hondeghem et al., 2001).

Bekräftigt durch eine Reihe von Studien nutzt die pharmazeutische Industrie in zunehmenden Maße dieses Konzept für die Frühcharakterisierung der NCEs.

Die oben beschriebenen isolierten Herzmodelle haben bereits in Testverfahren wie SCREENIT Eingang gefunden und werden von einigen Pharmafirmen vor allem auf Grund ihrer hohen Untersuchungsrate (high through puts, HTP) für das frühe Wirkstoffscreening in der *clinical* *candidates selection* verwendet (Valentin et al., 2004). Eingesetzt werden hierfür rechnergesteuerte Roboteranlagen, die in wenigen Wochen mehr als 100.000 chemische Verbindungen auf ihre biologische Wirkung prüfen.

Der Erfolg gibt dem TRIaD-Konzept recht: von 70 sehr häufig verwendeten Arzneistoffen haben alle Verbindungen mit bekanntem torsadogenem Potential TRIaD-Veränderungen gezeigt. Nicht eine Substanz, die erwiesenermaßen als nicht TdP-erzeugend gilt, hat hingegen zu TRIaD-Effekten geführt (Valentin et al., 2004).

Bellardini et al. (2003) sowie Antzelevitch (2004) konnten belegen, daß es drei Typen von Myokardialzellen gibt, eine epikardiale, eine midmyokardiale oder M-Zelle und eine endokardiale Zelle. Die Repolarisation der M-Zelle wird durch einen wesentlich geringeren I_{Kr} – Strom, durch einen größeren späten Na⁺ - Strom und durch einen stärkeren Na⁺/Ca²⁺-Austausch, verglichen mit Epi-und Endokardialzellen geprägt (Antezelevitch, 2004). M-Zellen verfügen unter physiologischen Bedingungen über das längste AP des Ventrikelmyokards, was sie besonders anfällig gegenüber Substanzen macht, die das AP verlängern (Poelzing &Rosenbaum, 2005). Auch sind die elektrischen Kontakte (gap junctions) zu Epikardialzellen nur gering entwickelt, sodass ein ausgeprägter APD-Gradient zwischen Epikardialzelle und M-Zelle entsteht.

Es ist zu vermuten, dass eine transmurale Dispersionszunahme der Repolarisation, in Kombination mit regionalen Expressionsunterschieden der für die Weiterleitung des AP verantwortlichen gap junctions durchaus zur Entwicklung von TdP-Arrhythmien führen kann.

Elektrophysiologische Veränderungen dieser Art können unmöglich in einem Oberflächen-EKG registriert werden und beweisen, dass die Messung der QT-Länge eine insuffiziente Methode zur Erfassung des TdP-Risikos darstellt.

1.6.2.2. In vivo Modelle

In vivo Modelle an nicht betäubten Tieren lassen die Vorstellung aufkommen, die besten Vorraussetzungen für die Vorhersage des TdP-Risikos einer QT-verlängernden Substanz zu liefern. Tatsächlich wird aber nur selten auf diese Versuchsanordnung zurückgegriffen.

Chezalviel und Davy (1995) haben ein Hundemodell vorgestellt, in dem unter den Bedingungen einer Bradykardie durch AV-Block und einer Hypokaliämie unter Diuretikaeinsatz, Quinidin, Sotalol, Almokalant nicht aber Lidocain und Propanolol, eine TdP ähnliche polymorphe ventrikuläre Tachykardie erzeugt haben.

Andersson, Duker und Schiller-Linhardt (1993) infundierten Dofetilid, Clofilium und Semaltilid in nicht betäubte Hasen und erzielten ebenfalls eine TdP ähnliche Wirkung.

Nichtsdestotrotz wird Modellen an betäubten Tieren, vor allem Hase und Hund, der Vorzug gegeben (Voss et al.,1995).

An anästhesierten Hasen konnte unter gleichzeitiger Verwendung von APD-prolongierenden Wirkstoffen und des α_1 –adrenergen Agonisten Methoxamin eine ausgeprägte TdP ähnliche polymorphe ventrikuläre Tachykardie erzeugt werden, eine wichtige Erkenntnis, zumal beim Menschen eine ähnlich hohe Dichte von α_1 –Rezeptoren besteht und eine Wechselwirkung zwischen hERG-Kanälen und Adrenorezeptoren vermutet wird (Carlsson et al.1993).

Alle Versuchsanordnungen an lebenden Tieren zeigen jedoch typische Nachteile:

• hohe Variabilität der TdP-Häufigkeit erzeugt von ein und derselben Substanz in ein und derselben Spezies

• zum Teil große Unterschiede in der Häufigkeit der arzneistoffinduzierten TdP im Vergleich zum Menschen (Terfenadin zeigt ein weitaus höheres TdP-Risiko beim Menschen als beim Tier)

• es gibt kein Modell mit einer Reproduzierbarkeit von 100%

• hoher Zeit- und technischer Aufwand, verbunden mit entsprechend hohen Kosten.

Um auch unter Verwendung der in vivo Versuchsanordnung eine Vorhersage über das TdP-Risiko machen zu können, werden Parameter herangezogen, die man aus in vitro Modellen abgeleitet hat (Abb.).Besonders die Messung der Schlag-zu-Schlag-Variabilität der T-Welle gilt als potente Methode, um Rückschlüsse auf das TdP-Risiko beim Menschen ziehen zu können (Brockmeier et al.,2001).

In vivo Modelle an anästhesierten Tieren werden heute vor allem dann verwendet, wenn die zu prüfende Substanz vom Versuchstier kaum vertragen wird (z.B. Tremor oder Erbrechen erzeugt). Sie werden für spezielle pharmakokinetische/pharmakodynamische Fragestellungen genutzt sowie bei Substanzen herangezogen, die keine Evaluation der Untersuchungsmethode zulassen (Riley et al.,1988).

Abschließend sei darauf hingewiesen, dass Interaktionen zwischen dem Anästhetikum und der potentiell pro-arrhythmogenen Substanz zu Veränderungen, wenn nicht gar zu Verfälschungen von Ergebnissen führen können.



Abb.17. In vivo Indices der TdP-Arrhythmie (wie Triangulation, Schlag-zu-Schlag-Variabilität des QT-Intervalls sowie zwei Parameter der T Wellenmorphologie), gemessen wurde das rechtsventrikuläre, endokardiale monophasische Aktionspotential (MAP) und ein Oberflächen-EKG. (modifiziert nach DeClerck& Galacher, 2005).

1.6.3. Berücksichtigung pharmakokinetischer Aspekte

Arzneistoffwechselwirkungen, vor allem auf Ebene des Cytochrom P450-Metabolismus haben zweifelsfrei einen besonders wichtigen pharmakokinetischen Stellenwert bei der Entstehung eines arzneistoffinduzierten TdPs und wurden auch vielfach in der Literatur (Brown, Farmer, Soderman, Eichner usw.) beschrieben. Zu wenig beachtet wurde hingegen die Wirkstoffaufnahme, - akkumulation und Verstoffwechselung im Myokard, obwohl bekannt ist, dass etwa die Konzentration des Terfenadins in Myokardialzellen nach Aufnahme zweihundertsechzig mal höher ist als die Plasmakonzentration und Werte erreicht, die der IC₅₀ der hERG-Kanalinhibition durchaus entsprechen (Cavero &Crumb,2001).

Viele Makrolidantibiotika akkumulieren ebenfalls im Herzmuskel (Yoshida & Furuta, 1999).

Minematsu et al.(2001) haben eine zeitabhängige Beziehung der myokardialen Tacrolimus-Konzentration und seiner QT-Prolongation im Meerschweinchen nachgewiesen. Das Ausmaß der QT-Verlängerung korrelierte mit dem verzögerten Konzentrationsanstieg pro Zeiteinheit im Ventrikelgewebe.

Inwiefern auch aktive Transporter eine Schutzfunktion für Herzmuskelzellen ausüben, indem sie die ins Gewebe einströmenden Substanzen rasch aus Muskelzellen pumpen, ist bis jetzt selten untersucht worden. P-Glykoproteine (Pgp) dürften eine solche Funktion innehaben. Colombo et al. (1996) haben nachgewiesen, daß der Einsatz von Pgp–Inhibitoren zu einer signifikanten Steigerung der Anthracyclinaufnahme führt.

Weiss & Kang (2002) fanden einen sättigbaren Idarubicintransport in die Myokardialzelle. Sie nehmen an, dass Idarubicin die Zelle Pgp vermittelt verlässt, bevor größere Mengen in die Zelle aufgenommen werden.

Unter Berücksichtigung dieser Studien erscheint es sinnvoll, bei Hinweis auf Akkumulation der zu prüfenden Substanz oder ihres Metaboliten, eine Adaption des präklinischen in vivo Tests vorzunehmen, der standardmäßig als Einzeldosistest an Nicht-Nagetieren vorgenommen wird. Denkbar wären auch Toxizitätstests bei wiederholter Gabe gleicher Dosis (Hoffmann&Warner, 2005).

1.6.4. Conclusio

Arzneistoffinduzierte TdP findet sich kaum während der Entwicklung neuer Arzneistoffe vor der Registrierung, da klinische Testphasen I –III selten mehr als 5000 Patienten einbeziehen.

TdP-Manifestationen neuer Arzneistoffe sind auch nach der Registrierung selten und betreffen vor allem Patienten mit Risikofaktoren (siehe Kap.4) oder kardiovaskulären Störungen. Roden (2004) nimmt an, dass 5% aller Patienten mit drug-induced TdP einen Gendefekt eines kardialen Ionenkanals aufweisen.

Die Ursache der geringen Manifestationsrate vermuten Roden et al. in der hohen Redundanz verschiedener physiologischer Mechanismen (Stoffwechsel, Genexpression, Trafficking, u.a.m.), die die Aufrechterhaltung der Herzfunktion auch unter widrigen Bedingungen gewährleisten. Roden hat hierfür den Begriff Repolarisationsreserve geprägt.

Unter dieser Annahme erscheint es fraglich, ob Ergebnisse von in vivo Tests junger, gesunder Tiere auf Menschen mit potentiell eingeschränkter Repolarisationsreserve anwendbar sind.

Keine der hier vorgestellten präklinischen Methoden kann Anspruch erheben, eine genaue Vorhersage über das TdP-Risiko eines NCE machen zu können. Nach wie vor setzt man auf die Kombination des hERG assays mit anderen in vitro oder in vivo Tests. Zeigt der hERG-assay ein hohes I_{Kr} -Inhibitionspotential bereits im nanomolaren Bereich so wird die Weiterentwicklung des Wirkstoffes meistens abgebrochen. Bei einem Inhibitionspotential im Bereich von einem Mikromolar gilt es die klinische Unbedenklichkeit in Abhängigkeit von der Indikationsstellung in weiteren Tests nachzuweisen.

Redfern et al.(2003) haben vorgeschlagen, als Grenze der klinischen Sicherheit eines NCEs den Quotienten zwischen der niedrigsten je gemessenen hERG-IC₅₀ (der Konzentration, bei der 50% der hERG-Kanäle blockiert werden) und der maximal gemessenen Plasmakonzentration heranzuziehen. Liegt der Wert über 30, ist das TdP-Risiko sehr gering.

Es wurde von Hoffmann und Warner 2005 ein verbessertes Testschema vorgelegt, um in gewissem Rahmen eine individuelle Beurteilung des NCE zu ermöglichen und die individuelle Vorhersagbarkeit für TdP zu erhöhen.
Tab.7.Konzept zur verbesserten Prüfung von NCE auf ihr torsadogenes Potential (Warner & Hoffmann, 2005)

test level	herkömmliche Testanordnung	verbesserte NCE-adaptierte Testanordnung
Kanalprotein/isolierte Zelle	manueller hERG-assay, erfasst Mechanismen des arzneistoffinduzierten TdP,produziert aber falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse	automat.patch-clamp:hat das Potential für H-P-T screens während der lead-identification/optimization. hERG-assay unter pathophysiol.Bedingungen pharmakodynamische Interaktionen am hERG-Kanal (am binding-site, allosterische Interaktionen berück- sichtigend. Isolierte Kardiomyocyten, selten verwendet, da techn. Anspruchsvoll. Tests auf Stereoselektivität, sofern das Racemat thera- peutisch genutzt werden soll. Expression des hERG-Proteins an der Zelloberfläche, nur notwendig, wenn elektrophysiol.in vitro Tests ergebnislos und in vivo Tests (bei Dosiswiederholung) zu Repolarisationsveränderungen führen. Effekte an anderen Ionenkanälen, nur wenn ein hERG Block in klinisch relevanten Konzentrationen nicht zu APD-oder QT-Verlängerung führt.
Repolarisations-assay in isoliertem Gewebe, Organ	Purkinjefasern/Papillarmuskel, mit dem Nachteil einer geringen Korrelation zu hERG-assay oder TdP-Potential	isolierte Herzen unter Verwendung von Proarrhyth- mieindizes (TRIaDkonzept): hohe Vorhersagbarkeit für TdP, wird von einigen Pharmafirmen bereits für die clinical candidate selection herangezogen. Arteriell perfundierte M-Zellgewebskeile, um die elektrophysiolog. Kopplung zu messen;ideal für fol- gende mechanistische Herzstudien, mit hoher TdP- Vorhersagewahrscheinlichkeit, aber techn aufwendig.
Tierischer Organismus	QT-Intervall in Nicht-Nagetieren, hohe Vorhersagewahrscheinlichkeit für eine QT-Prolongation beim Menschen, aber keine spezifisch Information zum TdP- Risiko.	 Nichtanästhesierte oder anästhesierte Nicht-Nagetiere unter Verwendung von in vivo Proarrhythmieindizes, abgeleitet aus den Parametern desTRIaDkonzeptes (z.B. Schlag-zu-Schlag-Variabilität,T-Wellenmorpho- logie), haben großes Potential für die Beurteilung des TdP-Risikos und eignen sich für die Ermittlung einer klinischen Sicherheitsgrenze. Proarrhythmiemodell: die Vorhersagewahrschein- Lichkeit für TdP muß noch festgelegt werden. Einfluß des vegetativen Nervensystems, fallspezifisch zu beurteilen. Intrakardiale Akkumulation, Metabolismus, Trans- porter:nur bei Repolarisationseffekten, die bei Dosen auftreten, die gemäß hERG-assay als klinisch sicher einzustufen wären.

2.Methoden und Geräte

2.1. Zwei-Mikroelektroden-Messung an Xenopus laevis-0ozyten

Für elektrophysiologische Messungen der durch hERG Kanäle mediierten I_{Kr}-Ströme werden zwei Systeme genutzt. Das homologe System bietet <native> hERG Ströme in Zellen, die über natürliche hERG Kanäle verfügen, etwa isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten (Jurkiewicz & Sanguinetti, 1993), Vorhofzelllinien (z.B. Maus AT-1 Zellen; Busch et al.,1998) oder Neuroblastomazelllinien (z.B. SH-SY5Y Zellen; Arcangeli et al.,1998). Die Mehrheit der Untersuchungen wird allerdings an Zellen durchgeführt, in die man mit molekularbiologischen Methoden hERG Kanal kodierende Gene eingebracht hat. Diese Zellen exprimieren somit zellfremde Ionenkanäle. Das Verfahren wird als heterologe Expression bezeichnet und definiert das heterologe System.

Ein Vorteil der heterologen Expression besteht darin, Zellen heranziehen zu können, die eine geringe elektrische Eigenaktivität aufweisen. Letztere stört I_{Kr}-Messungen vor allem bei Zellen mit nativen hERG Strömen (z.B. Kardiomyozyten) und muß entweder pharma-kologisch oder elektrophysiologisch unterdrückt werden (Witchel et al.,2003).

Zellen mit nativem I_{Kr} zeigen darüber hinaus häufig vergleichsweise kleine Stromamplituden. In heterologen Systemen lässt sich dieses Problem beseitigen, indem die Kanalgenexpression gesteigert wird.

Der große Nutzen der heterologen Expression liegt im Vergleich einer mutierten Variante des hERG Kanals mit nicht mutierten Formen (*wild type*). Daraus lassen sich etwa die molekularen Determinanten eines Kanalblocks ermitteln sowie die Funktionen der Kanal-untereinheiten (Domänen) studieren (Milnes et al.2003).

Den Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches (Xenopus laevis) gibt man aus verschiedenen Gründen den Vorzug:

- Xenopus laevis lässt sich problemlos und kostengünstig in Gefangenschaft halten.
- Seine Oozyten lassen sich ohne Komplikationen für den Frosch gewinnen
- Die Größe der Eizelle (1-1,2 mm)erlaubt eine vergleichsweise einfache Handhabung sowohl der Injektionsnadel wie auch der Mikroelektroden.

• Da Xenopus-Oozyten geeignet sind, lange Perioden außerhalb des Froschkörpers zu überleben, gelten sie als besonders robust, sofern sie mit einem Minimum an Frischwasser versorgt werden.

• Sie exprimieren nur eine geringe Zahl an Membrantransportern und -kanälen, da sie von exogener Versorgung unabhängig sind.

• Ein breites Spektrum unterschiedlicher mRNA kann injiziert werden, um etwa auch sehr große Proteinkomplexe zu untersuchen - ein Vorteil gegenüber transfizierten Säugetierzellen.

• Elektrophysiologische Standardmethoden (z.B.TEVC) lassen sich an Xenopus-Oozyten leicht anwenden(Gurdon,1973; Bianchi & Driscoll,2006).

Besonders für IKr Strommessungen bietet dieses heterologe System mehrere Vorteile.

• hERG Ströme zeigen in Oozyten von Xenopus laevis große Amplituden und sind gut definiert.

• Gegenüber der whole-cell patch-clamp Methode können weitaus größere Datenmengen gesammelt werden, da Oozyten auf Grund ihrer Robustheit im Meßsystem länger überleben (im Optimalfall über eine Stunde) und kein run down-Phänomen der hERG Stromamplitude im Verlauf der Untersuchung zeigen.

• Durch Veränderung der injizierten RNA-Menge kann die Kanalexpression entweder stark reduziert werden, etwa um Messungen an wenigen Kanälen durchzuführen (Einzelkanalmessung), oder gesteigert werden, um auch bei schlecht exprimierenden Eizellen noch gute Ergebnisse erzielen zu können.

• Oozyten eignen sich auch und besonders für Mutagenesestudien (Witchel, 2003).

Mehrere Faktoren setzen allerdings der Untersuchung einer hERG Blockade an Xenopusoozyten Grenzen:

• Die meisten hERG blockierenden Wirkstoffe weisen bei Oozyten von Xenopus laevis im Vergleich zu Säugetierzellen eine geringere hERG Kanalhemmung auf (Po et al.,1999; Weerapura et al.,2002). Da viele Substanzen erst nach ihrer Membranpassage in den Intrazellulärraum den hERG Kaliumkanal hemmen, wird eine Senkung der freien intrazellulären Substanzkonzentration durch Absorption an im Cytosol reichlich vorhandene Yolk-Partikeln vermutet (Mergenthaler et al.,2001; Zou et al.,1997).

• Der in Oozyten ermittelte IC₅₀(halbmaximale Hemmkonzentration) verschiedener hERG Blocker kann drei- bis zehnmal höher in Xenopus-Eizellen als in Säugetierzellen sein, was die Vorhersagbarkeit der Performance in vivo schwierig gestaltet. Nichtsdestotrotz entspricht die Ordnung der Verbindungen mit hERG blockierenden Eigenschaften in der Reihenfolge ihrer Hemmintensität gegenüber dem hERG Kaliumkanal durchaus der Reihenfolge, gemessen an Säugetierzellen. Wird ein starker hERG Blocker als interner Standard herangezogen (z.B.Methansulfonanilide), so kann die relative Intensität der Kanalhemmung durch NCEs ermittelt und eine Korrelation zur Hemmung in Säugetierzellen geschaffen werden (Witchel et al.,2003).

• Nicht alle Wirkstoffe, die hERG Kanäle in Säugetierzellen blockieren, hemmen gleiche Kanäle in Xenopusoozyten. Das Klasse III Antiarrhythmikum Sotalol sowie das Makrolidantibiotikum Erythromycin gelten als ausgeprägte hERG Blocker in Säugetierzellen, zeigen aber kaum Hemmpotential in heterologen Oozytensystemen. In diesem Fall muß auf Säugetierzelllinien zurückgegriffen werden (Daleau et al.,1995; Numaguchi et al.,2000).

2.1.1.Isolation, Präparation und Aufbewahrung von Xenopus laevis-Oozyten

Zur Oozytenentnahme sollten ausschließlich adulte, weibliche Frösche der Spezies Xenopus laevis- für unsere Versuche von der Firma NASCO, Fort Atkinson, WI, USA - herangezogen werden. Die Oozyten dieser Froschspezies reifen in kleinen Klumpen, Ovariallappen genannt, durch Bindegewebe zusammengefasst zu Ovarialsträngen und versorgt von Blutgefäßen, in der Abdominalhöhle des Tieres (Bianchi & Driscoll, 2006).

Nach Betäubung des Frosches 15–30 Minuten in einer 0,2% Tricain-Lösung (Methansulfonsäuresalz des 3-Aminobenzoesäureethylesters) wird die Bauchdecke des Tieres im Abdominalbereich, oberhalb des Ansatzes der unteren Extremität durch einen etwa 1 cm langen Schnitt eröffnet und mit einer stumpfen Pinzette möglichst viele Ovariallappen eines Ovarialstranges mobilisiert und entnommen.

Die Oozyten werden von Follikelgewebe, dem Bindegewebe und den Blutgefäßen durch mehrmaliges Waschen und eine folgende 90 minütige Inkubation mit enzymhältiger, Ca²⁺freier OR2-Lösung (2mg/ml Kollagenase Sigma Typ 1A in wässriger Lösung von 82,5mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, eingestellt auf pH 7,5 mit 1 mM NaOH) befreit. Letzteres setzt nicht nur die Einzeloozyten frei, sondern trennt auch die Follikelzellschicht, die der formgebenden Vitellinmembran extern an der Oberfläche des Oozyten aufliegt (siehe Abb.18), ab(Goldin,1993). Follikelzellen exprimieren im Gegensatz zur Vitellinmembran Ionenkanäle und sind zudem durch gap junctions miteinander elektrisch leitend gekoppelt,

beides Faktoren, die die I_{Kr} Strommessung empfindlich stören (Brown&Werner,1984). Die OR2-Lösung muß absolut Ca²⁺ Ionen frei sein, damit es zu keiner Aktivierung zellzerstörender, unspezifischer Proteasen kommt.

Nach Abdekantieren der Lösung werden die Oozyten, um die Kollagenase zu entfernen, erneut gewaschen und anschließend drei Stunden in ND96-Lösung (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1mM MgCl₂, 5 mM HEPES, mit 1 mM NaOH auf pH 7,5 eingestellt) bei 18 °C inkubiert.



Abb.18.Links:Oozyten des Reifegrad Dumont V (aus <u>www.genomembrane.com</u>) Rechts:Schematische Darstellung eines intraovariellen Oozyten mitVitellinmembran und Follikelzellschicht. (aus Heterologous expression of C.elegans ion channels in Xenopus Oocytes, Bianchi L et al.,2006).

Um aussagekräftige Messergebnisse zu erhalten, hat es sich als zweckdienlich erwiesen, Eizellen der Reifegrade Dumont V und VI zu verwenden (Goldin, 1993). Unter der Mikrolupe, bei schwacher Vergrößerung, sollten ausschließlich Oozyten selektiert werden, die eine Mindestgröße von 1mm erreicht haben und deren Grenze zwischen vegetalem und animalem Pol sich nicht mehr scharf abzeichnet. Der animale Pol sollte nicht mehr homogen dunkelbraun sondern hell– bis mittelbraun gesprenkelt erscheinen. Auch dürfen keine Reste der Follikelschicht oder gar Blutgefäße die Zelloberfläche bedecken. Abweichungen von der Kugelform oder Oberflächendefekte, wie Einsenkungen oder Erhebungen, kennzeichnen ebenfalls einen suboptimalen Oozyten.

Intakte, gesunde Xenopus-Oozyten lassen sich bis zu sechs Tagen in ND96-Lösung bei 18°C inkubieren, sofern täglich die Lösung gewechselt wird und tote Oozyten (formdefekt und mißfärbig) entfernt werden (Goldin, 1993; Witchel, 2003).

2.1.2.Injektion der cRNA

Um die selektierten Oozyten vor bakteriellem Befall bei cRNA-Injektion und der folgenden Inkubation zu schützen, wird eine ND96-Lösung mit Antibiotikazusatz (Gentamycin-30µg/ml) zubereitet.

Etwa hundert geeignete Oozyten (wie oben beschrieben) werden der Erstselektion entnommen und auf einem Polymergitter in einer Petrischale, gefüllt mit gentamycinhältiger ND96-Lösung, in mehreren Reihen geordnet, aufgebracht.

Die bei -80° C möglichst ohne Unterbrechung (Qualitätsverlust!) gelagerte komplementäre RNA (ein Poly(A⁺) cRNA-Transkript einer linearisierten cDNA, kloniert in einem pCMV-Vektor) wurde für meine Experimente im Verhältnis 1:2, 1:3 und 1:4 in DEPC-H₂O (Diethylpyrokarbonat) verdünnt.

Unter Verwendung von quasisterilen, selbstgezogenen Kapillarnadelpipetten werden 3 µl der auf Eis in Plastikeprouvetten gelagerten cRNA-Verdünnung aufgesaugt und durch einen Nanoinjektor unter der Mikrolupe möglichst gleichmäßig und ohne Zeitverlust (Qualitätsverlust!) in das Zytoplasma der Oozyten appliziert. Die durchschnittliche Menge injizierter cRNA-Verdünnung pro Oozyt entspricht 30 nl. Erfahrungsgemäß zeichnet sich eine optimale Applikation durch ein leichtes Anschwellen des Oozyten aus. Nach Herausziehen der Kapillarnadelpipette darf es an der Einstichstelle zu keinem Zytoplasmaaustritt – ein sicheres Zeichen für eine empfindliche Zellschädigung - kommen.

Es gilt, dann ebenfalls möglichst rasch die Oozyten mit einer Radpipette aufzusammeln, sie in eine kleine Petrischale, gefüllt mit ND96-Lösung + Gentamycin, zu verbringen und bei 18°C zu inkubieren.

Bei Transkriptverdünnungen von 1:2 zeigt sich eine für I_{Kr} -Stromamplitudenmessungen ausreichende hERG Kanalexpression nach 24 Stunden, somit am nächsten Tag, bei 1:3 Verdünnungen am folgenden Tag, bei 1:4 Verdünnungen einen weiteren Tag später. Daher besteht die Möglichkeit durch die Wahl unterschiedlicher Verdünnungsstufen, bei einer Lebensdauer der selektierten und beimpften Oozyten von sechs Tagen, an jedem der zur Verfügung stehenden Tage ausreichend mit gut exprimierten Eizellen versorgt zu sein.

2.1.3. Die Zwei-Mikroelektroden Spannungsklemmtechnik (TEVC)

Einer der wichtigsten elektrophysiologischen Methoden ist die Spannungsklemmtechnik, die bei vorgegebenem Membranpotential die Messung und Analyse von Zellmembranströmen, mediiert durch Kanäle und Transporter erlaubt.

Der ideale Schaltkreis für diese Versuchsanordnung besteht aus einer Spannungsquelle, die die Klemmspannung V_C erzeugt, einer Modellmembran mit dem Membranwiderstand R_M und der Membrankondensatorkapazität C_M, beide parallel geschalten, einem Amperemeter zur Messung des Membranstromes I_M, sowie einem Schalter zum Öffnen und Schließen des Schaltkreises. Solange die Spannungsquelle, das Amperemeter wie die Leitungen einen vernachlässigbaren Eigenwiderstand aufweisen, wird nach Schließen des Schaltkreises die Modellmembran die Spannung der Spannungsquelle annehmen, sobald der Membrankondensator seine maximale Ladekapazität erreicht hat (V_M = V_C).

Der wichtigste Unterschied zwischen einer idealen und realen Versuchsanordnung liegt darin, dass die Verbindung zwischen der zu untersuchenden Zelle und dem elektrischen Schaltkreis sehr wohl einen messbaren Widerstand zeigt. Für viele TEVC-Messungen werden Glasmikroelektroden verwendet, die die Zellmembran penetrieren. An diesen Elektroden werden Spitzenwiderstände im M Ω -Bereich gemessen, die dem Eingangswiderstand großer Zellen, – etwa von Froschoozyten, – durchaus ähnlich sind. Fügt man den Elektrodenwiderstand in den Schaltkreis des idealen Systems ein, bekommt man zwei in Serie geschaltene Widerstände, die als Spannungsteiler mit der Charakteristik $V_M = V_C \cdot (R_M / R_M + R_E)$ agieren. Unter der Voraussetzung, dass nur der Anteil ($R_M / R_M + R_E$) der Klemmspannung V_C die Zellmembran erreicht und unter der Bedingung, dass sich dieser Anteil kaum von der Ausgangsspannung unterscheidet (etwa dann, wenn R_M wesentlich größer ist als R_E), kann die Zellmembranspannung der Spannung der Quelle angeglichen (=geklemmt) werden ($V_M = V_C$).

Große Zellen mit geringem Eingangswiderstand ($R_M \le R_E$) benötigen eine zweite Elektrode, die der unabhängigen Einstellung der aktuellen Membranspannung dient (*current electrode*, CE). Die Spannungsquelle wird in diesem Fall so adjustiert, dass die Membranspannung der

gewünschten Klemmspannung (Haltepotential, Testpotential) entspricht. Um eine bestimmte Membranspannung V_M zu erzeugen, ist es notwendig eine Quellspannung V_C anzulegen, die groß genug ist, den durch den Elektrodenwiderstand R_{CE} erzeugten Spannungsabfall V_C zu kompensieren. Die Beziehung dieser drei Parameter lässt sich quantitativ als $V_C = V_M \cdot (R_M +$ R_{CE} / R_M) erfassen. Da sich sowohl der Membranwiderstand R_M wie auch der Elektrodenwiderstand R_{CE} während eines Experimentes ändern können, ist es unumgänglich das aktuelle Membranpotential V_M über eine Potentialelektrode (potential electrode, PE) kontinuierlich mit der gewünschten Spannung zu vergleichen und gegebenenfalls ersteres anzupassen. Um diese Angleichung nicht manuell vornehmen zu müssen, werden elektronische Steuerelemente herangezogen, die eine exakte und rasche Kommunikation zwischen gemessenem Membranpotential und gewünschtem Potential ermöglichen. Die wichtigste Rolle bei dieser Rückkopplungskontrolle spielen Operationsverstärker, die in zwei Weisen genutzt werden. Einerseits kann eine Spannungsdifferenz zwischen zwei Eingängen (e⁺ und e⁻) um einen Faktor A gesteigert werden, womit die Spannung am Ausgang des Verstärkers e⁰ die Größe von A·(e^+ - e^-) erreicht. Diese Anwendungsform wird als Differenzverstärker bezeichnet. Verbindet man den Verstärkerausgang mit dem negativem Eingang des Verstärkers, entspricht das Ausgangssignal dem negativem Eingangssignal und die Ausgangsspannung e⁰ erreicht die Größe von (A/A+1)· e⁺ \approx e⁺. Diese Nutzung bezeichnet man als Spannungsfolger. Beide Operationsverstärker finden in modernen TEVC-Schaltkreisen ihre Verwendung.

Der Spannungsfolger wird eingesetzt, um das membranspannungserfassende Signal der Spannungselektrode von den im Schaltkreis folgenden etwa aufzeichnenden Geräten zu entkoppeln und um als hoher Eingangswiderstand den Stromfluß durch die Spannungselektrode zu minimieren.

Der Differenzverstärker wird als negativer Rückkopplungsverstärker genutzt. Seinem positivem Eingang liegt das gewünschte Potential an (*command potential*,CP), dem negativen Eingang wird das Signal des Spannungsfolgers zugeführt. Diese beiden Eingangssignale definieren das Ausgangssignal des Verstärkers und gewährleisten ein rasches Klemmen des Membranpotentials an das gewünschte Potential. Der Stromfluß vom Rückkopplungsverstärker entspricht dem Membranstrom und wird entweder am Ausgang des Rückkopplungsverstärkers oder an der geerdeten Badelektrode gemessen.

In modernen TEVC-Systemen stehen häufig zwei Badelektroden (*bath electrode*,BE) zur Verfügung: eine stromleitende, geerdete Elektrode und eine nicht geerdete Elektrode, die als

Referenzelektrode zur intrazellulären Spannungselektrode dient. Der Vorteil liegt darin, dass große elektrische Ströme nur durch die geerdete Elektrode fließen, während die nicht geerdete Elektrode bei Stromflüssen nicht polarisiert werden kann.

(aus <u>www.biophys.uni-frankfurt/hauser/praktikum</u> elektro-physiologie; Hille, 2003; Schwarz & Rettinger, 2003).

2.2. Das Perfusionssystem

Zur Perfusion der Meßkammer wurde auf ein im wesentlichen manuell kontrollierbares, Schwerkraft gesteuertes System, das bath perfusion system BPS–8PG der Firma ALA Scientific Instruments zurückgegriffen. Es setzt sich aus einer Reservoirhalterung, einer Ventilsteuerung und deren Kontrollsystem, der Oozytenperfusionskammer und einer Kammerabsaugvorrichtung zusammen.

An der Reservoirhalterung werden acht 60 ml Standard-Luer-Spritzen auf gleicher Höhe (in meiner Versuchsanordnung 50 cm oberhalb der Bodenplatte) an einem Galgen montiert. Jeder der Spritzenausgänge ist durch einen Absperrhahn mit einem Silikonschlauch verbunden. Alle acht Silikonschläuche laufen durch ein Ventilsteuerungselement, das elektromechanisch durch Schlauchquetschung das Schlauchlumen schließt oder eröffnet. Durch Betätigung eines Kippschalters der Ventilkontrollbox kann jede der acht Schlauchleitungen selektiv mit einem 8→1-Kanalverteiler verbunden werden. Jeder der Schlauchleitungen unterliegt einer Perfusionsfeinkontrolle, die ebenfalls durch Quetschwirkung einer manuell adjustierbaren Schlauchklemme zwischen Reservoir und Ventilsteuerungselement, erfolgt. Der Verteiler steht durch eine Schlauchleitung mit der Zufuhrkanüle der Oozytenperfusionskammer in Verbindung. Die Einspeisung der Perfusionslösung erfolgt von der Kammerseitenwand in ausreichender Distanz (2mm) zum Oozyten. Die Absaugkanüle sollte ebenfalls in genügendem Abstand zum Oozyten, etwa 1mm vom Poolrand entfernt und in einer Höhe von 1mm über dem Poolboden der Kammer fixiert werden. Die Positionen der beiden Kanülen sind nach vielen Versuchen mit Bedacht gewählt, da sie eine Perfusion mit möglichst geringen Verwirbelungen auch bei höherer Perfusionsgeschwindigkeit gewährleisten, ohne dass der Oozyt durch die Flüssigkeitsturbulenzen bedingt, zu "tanzen" beginnt. Der von mir geprägte Ausdruck "tanzen" entspricht perfusionsbedingten seitlichen Zitterbewegungen, die den Oozyten, zumal fixiert durch zwei Mikroelektroden, in Sekunden zerstören.

Die Absaugkanüle steht über einen Silikonschlauch mit einer Woulff'schen Flasche in Verbindung, an der durch eine Wasserstrahlpumpe ein Vakuum angelegt wird. Steigt der Spiegel der Perfusionslösung in der Oozytenperfusionskammer bis zu einer gewissen Höhe, wird ein bestimmter Volumsanteil der Perfusionslösung diskontinuierlich abgesaugt.



Abb.19 Bad-Perfusionssystem BPS-8PG: zu sehen ist die Reservoirhalterung mit 8 60ml Standard-Luer-Spritzen, das Ventilsteuerungselement und die Ventilkontrollbox (aus www.alascience.com)

Das Volumen der Perfusionslösung in der Kammer beträgt kurz nach dem Absaugvorgang 0,3 ml und steigt bis zum Absaugvorgang langsam auf 0,5 ml an. Da die Oozytenperfusionskammer nach oben offen ist, wird die Steighöhe des Perfusionslösungsspiegels ausschließlich von der Position der Absaugkanüle zum Kammerrand und Kammerboden festgelegt (siehe oben).

Die durchschnittliche Perfusionsrate bei meinen Untersuchungen lag bei 3µl/sec. Bestimmt wird die Fließgeschwindigkeit der Perfusionslösung primär von der Höhe des Reservoirs an der Reservoirhalterung. Es handelt sich somit um ein gravitationsgesteuertes System. Festgelegt wurde die Reservoirhöhe bewusst auf 50 cm, da ein Unterschreiten erfahrungs-gemäß zum Versiegen des Perfusionsstromes bei Sinken der Reservoirfüllung unter 30 ml führt.



Abb.20.Schematische Darstellung der Oozytenperfusionskammer: dem hier der Übersichtlichkeit halber gewählten Verhältnis des Oozytendurchmessers zum Kammerdurchmesser von 1:15, steht in der Realität ein Verhältnis von 1:500 gegenüber. Aus dem selben Grund wurde auf die Darstellung der in die Perfusionslösung eintauchenden beiden Badelektroden verzichtet (Darstellung vom Autor in MS Paint entworfen).

Die Einstellung der Flussrate erfolgt nach Öffnung des Absperrhahnes des Reservoirs und Aktivierung der zugehörigen Schlauchleitung durch die Ventilkontrollbox unter langsamen Schließen der Schlauchklemme. Ausgehend von einem zunächst kontinuierlichen Absaugvorgang, der sich als kontinuierliches, deutlich hörbares Geräusch abzeichnet, wird der unkomprimierte Schlauch durch die Klemme langsam verengt bis ein periodisch auftretendes Absauggeräusch zu hören ist. Durch weitere Schlauchkompression wird der zeitliche Abstand zwischen dem Beginn zweier Geräusche vergrößert. Da vorangehend die Korrelation zwischen der Zeitdistanz zweier Absaugvorgänge und der Perfusionsrate (Volumenabnahme des Reservoirs/Zeit) bestimmt wurde, lässt sich durch das Einstellen des Zeitabstandes der Sauggeräusche, sofern dieser konstant bleibt, was von Zeit zu Zeit zu überprüfen ist, die Perfusionsrate festlegen. Bei meinen Untersuchungen betrug er 15 Sekunden, das entspricht einer Perfusionsrate von 3µl/sec. Keinesfalls sollte die Perfusion in dieser Versuchsanordnung Werte von über 10 µl/sec annehmen, da sonst mit Bewegungsartefakten des Oozyten zu rechnen ist. Flussraten von unter 0,1µl/sec durch Herabsetzen der Reservoirhöhe und/oder durch Betätigung der Schlauchklemme, haben sich als ungünstig erwiesen, weil sie zu drastischen Schwankungen der Perfusionsrate oder gar zum Versiegen des Perfusionsstromes geführt haben.

Eine erfolgreiche Nutzung bedarf auch bei diesem Perfusionssystem einer gewissen Wartung. Der Autor empfiehlt nach Abschluß der Arbeit am Set-up das Perfusionssystem, im besonderen die Oozytenperfusionskammer, mit Aqua destillata zu durchspülen, um Auskristallisationen der anorganischen Salze der ND96-Lösung zu beseitigen.. Vor Arbeitsbeginn sollte eine weitere Spülung mit antibiotikafreier ND96-Lösung vorgenommen werden. Da die verwendeten Silikonschläuche nur über eine bestimmte Elastizität verfügen, bleiben die über die Ventilsteuerung längere Zeit zusammengepressten Schlauchsegmente in gewissem Maße komprimiert. Dem beugt man durch Verschiebung des jeweils durch Klemmung beeinträchtigten Schlauchabschnittes vor (aus ALA Scientific Instruments BPS-8PG Instruction Manual).

Aus der Erfahrung der mehrmonatigen Arbeit des Autors mit diesem System lassen sich folgende Vorteile ableiten:

• es ist kostengünstiger als robotergesteuerte Systeme

• das System ist einfach aufzubauen, je nach Bedarf zu ergänzen, einfach im Handling und ohne größeren Zeitaufwand zu warten

• die großen Reservoirs (60 ml) sind für den Langzeitbetrieb ausgelegt, ideal um langsam blockierende Substanzen zu studieren

• die Konzentrationkonstanz der zu testenden Substanz, bei kontinuierlicher Perfusion des Oozyten, gewährleistet bei langsam blockenden Verbindungen eine kontinuierliche Senkung der hERG-Stromamplitude zum steady state. Häufig beobachtet man bei Systemen mit robotergesteuerter Wirkstoffapplikation, infolge von Konzentrationsschwankungen in der Oozytenkammer, einen eher treppenförmigen Abstieg der Stromamplitude zum steady state

• durch die weitgehend manuelle Kontrolle der Perfusion wird eine gewisse Störanfälligkeit, wie sie bei komplexen elektronischen Systemen (Roboter) zu verzeichnen ist, vermieden.

Die Nachteile des Systems sind evident:

• die manuelle Perfusionskontrolle erfordert eine gewisse Übung am Gerät

• bei einigem Geschick und gewisser Erfahrung, lässt sich eine annähernd gleichbleibende Perfusionsrate erzielen, eine exakt reproduzierbare darf nicht erwartet werden.

3.Experimente

Trotz umfangreicher internationaler Dokumentation der Wirkung von Terfenadin, einem seit 1997 von der FDA vom Markt genommenen nicht sedierenden Antihistaminikum, auf verschiedene humane und nicht humane Kaliumkanäle, soll in dieser Arbeit der Versuch unternommen werden, die unter Zuhilfenahme von hERG-transfizierten Oozyten des Xenopus laevis mit TEVC-Technik gewonnenen Ergebnisse mit den unter gleichen oder ähnlichen Bedingungen gewonnenen Resultaten meiner Vorgänger zu vergleichen, eventuell zu ergänzen.

3.1. Terfenadin

In den frühen Vierzigerjahren des 20.Jahrhunderts wurden die ersten Antiallergika, H₁-Rezeptorantagonisten, eingeführt. Sie reduzierten die Symptome des allergischen Anfalls wie Rhinitis, Conjunctivitis, Juckreiz und Urticaria so effektiv, dass sie in den USA bald zu den meistverkauften Over-The-Counter-Medikamenten (OTCs) zählten (Krause, 1992).

Obwohl erfolgreich in der Prävention der allergischen Symptomatik, wurde die Anwendung häufig durch Nebenwirkungen limitiert, die durch die unspezifische Bindung an cholinerge, adrenerge und serotoninerge Rezeptoren verursacht wurden. Im besonderen die zentraldämpfende (sedierende) Wirkung, die zur gefährlichen Einschränkung der Aufmerksamkeit, der Reaktionsfähigkeit und Spontanaktivität führte, leitete nach einigen mit Antihistaminika assoziierten Todesfällen bei Fahrzeuglenkern und Maschinenarbeitern die Entwicklung der zweiten, nicht sedierenden Generation, Tefernadin und Astemizol ein (Smith, 1994).

Zugelassen 1985, entwickelte sich Terfenadin unter der Präparatbezeichnung Seldane [®] der Firma Marion Merrell Dow bis Mitte des Jahres 1987 mit 55% zum meistverkauften und mit 46% zum meist verschriebenen Antihistaminikum auf dem US-Markt, ohne dass den vermutlich bereits aufgetretenen kardiovaskulären Nebenwirkungen Beachtung geschenkt wurde.

1989 wurde bei vier erwachsenen Patienten erstmals ein Zusammenhang zwischen der Einnahme von Terfenadin in Überdosis von 120 - 240 mg/d und der Verlängerung des QT-Intervalls im EKG festgestellt (Davies et al., 1989).

1990 beschrieb eine Gruppe von Ärzten (Monahan et al) das Auftreten einer arzneimittelbedingten TdP bei Patienten, die Terfenadin vorschriftsmäßig (60 mg 2 x täglich) eingenommen hatten. Die meisten Untersuchten wiesen eine ungewöhnlich hohe Terfenadinplasmakonzentration auf, der primäre Terfenadinmetabolit (Fexofenadin) lag in geringerer Konzentration als üblich vor. Die Erklärung fand sich in einer Komedikation durch Ketokonazol, Cefaclor, Medroxyprogesteron und anderen Inhibitoren des oxidativen P450-Stoffwechselweges der Leber. Wird dieser Abbauweg durch einen Inhibitor genutzt, führt das zu einer Verringerung des Terfenadinabbaus. Es kommt zum Rückstau des normalerweise nach Einnahme im Plasma kaum nachweisbaren, TdP auslösenden Terfenadins, während die Konzentration des für die Wirkung verantwortlichen Fexofenadin im Plasma sinkt.

Diese Publikation hatte zwei Konsequenzen: zum ersten steigerte sie die Sensitivität der verschreibenden Ärzte gegenüber Terfenadinwechselwirkungen mit kardiotoxischen Folgen, zum anderen zog sie die Aufmerksamkeit der FDA auf sich. Letzteres zwang Marion Merrell Dow eine Studie zur Wechselwirkung von Terfenadin und Ketokonazol zu initiieren. Gegen Ende des Jahres 1990 hatte die Firma mehr als 25 Patientenfälle dokumentiert, in denen entweder durch Überdosierung oder bei Einnahme der vorgeschriebenen Dosis unter gleichzeitiger Verwendung von Ketokonazol oder Makrolid-Antibiotika, bei Leberdysfunktion oder bei kardiovaskulärer Erkrankung, eine Prolongation des QT-Intervalls ohne Symptome oder mit polymorpher ventrikulärer Arrhythmie oder gar plötzlichem Herztod aufgetreten war (Smith, 1994). Die Daten wurden der FDA präsentiert.

Schon im Verlauf der Studie war von Marion Merrell Dow das Labeling für Seldane[®] geändert worden. Im Beipacktext wurde jetzt auf die gefährliche Wechselwirkung zwischen Terfenadin und Ketokonazol oder Makrolid-Antibiotika hingewiesen und auf das Risiko einer Einnahme bei eingeschränkter Leberfunktion aufmerksam gemacht (FDA, Medical Bulletin, 1991).

Weitere Studien im Rahmen des Product Surveillance Projects, einer langfristig angelegten klinischen Untersuchung jedes von Marion Merrell Dow entwickelten Arzneistoffes, bestätigten endgültig die Resultate von Monahan et al..

Bis Ende des Jahres 1992 werden der FDA 83 weitere Fälle gemeldet, darunter 15 mit tödlichem Ausgang, die vor allem entweder durch Überdosierung (240 bzw. 360 mg über mehrere Wochen) oder durch Störung der Leberfunktion bei Einnahme in vorgeschriebener Dosierung zu einer Verlängerung des QT-Intervalls, ventrikulären Arrhythmien, TdP, Kammerflimmern und plötzlichem Herztod geführt haben. Sechs der Todesfälle waren mit eingeschränkter Leberfunktion assoziiert (Special Drug Communication Conference, 1992).

Trotz der von der FDA empfohlenen Einführung eines "Black Box"-Warnhinweises im Beipacktext – eines durch schwarze Umrandung hervorgehobenen Hinweises, dass das Arzneimittel unter bestimmten Bedingungen tödlich wirken kann -, einer großangelegten Informationsaussendung an mehr als 1,6 Millionen US-Ärzte und –Apotheker und nach Einführung der Rezeptpflicht wird Seldane[®] zum zehntmeist verschriebenen Arzneimittel in den Vereinigten Staaten.

In den folgenden Jahren werden von Marion Merrell Dow pharmakokinetische und pharmakodynamische Studien durchgeführt, die vor allem die Wechselwirkungen des Terfenadins zu anderen Wirkstoffen untersuchten (Honig et al.,1993). In pharmakoepidemiologischen Tests versuchte man dem Mechanismus der TdP-Induktion durch Terfenadin auf die Spur zu kommen (Smith,1994).

Bis Ende des Jahres 1996 führte die Statistik der FDA 125 terfenadinbedingte Todesfälle in den Vereinigten Staaten an, in Großbritannien zählte man 14 Fälle mit letalem Ausgang. Die geringe Zahl an dokumentierten terfenadinassoziierten, kardiovaskulären Ereignissen in anderen europäischen Ländern beruht wahrscheinlich auf einem Mangel an Initiative auf Seiten der Gesundheitsbehörden (Rangno,1997).

In Anbetracht der Tatsache, dass die Liste der Substanzen, die mit Terfenadin mit negativen kardialen Folgen wechselwirken (weitere CYP3A4-Inhibitoren wie Clarithromycin, Fluconazol, Erythromycin, Inhaltsstoffe des Grapefruitsafts, oder Proarrhythmika wie Sotalol,Quinidin u.a.) stetig länger wurde und durch die Erkenntnis, dass auch andere Risikofaktoren wie Leber-oder Herzerkrankungen, Hypokaliämie oder Hypomagnesiämie, sowie kongenitale QT-Verlängerungen durchaus bei Einhalten der vorgeschriebenen Dosierung zu kardialen Problemen führen können, schlägt die FDA Anfang 1997 vor, Seldane[®] vom Markt zu nehmen. Marion Merrell Dow – jetzt Hoechst-Marion Merrell Dow, reagiert erst zu Beginn des Folgejahres mit dem Marktrückzug des Arzneimittels nach Registrierung des Folgepräparates Allegra[®], das den hERG-inaktiven und für die allergiepräventive Wirkung verantwortlichen Metaboliten Fexofenadin enthält.

Nach der Historie dieses Produkts scheint es durchaus auch angebracht, auf das Profil in wesentlichen Punkten einzugehen.



Abb.21 Chemische Struktur des Terfenadins.Die beiden Hydroxygruppen verhindern die Blut-Hirn-Schrankenpassage (aus www.neurosce.pharm.utoledo.edu)

Bei Terfenadin handelt es sich um ein 1-(4-tert-butylphenyl)-4-[4-[hydroxydi(phenyl)methyl]piperidin-1-yl]butan-1-ol (nach IUPAC), das der Klasse der Alkylamine angehört. Von den Vertretern der Antihistaminika der 1.Generation (Ethylendiamine, Ethanolamine) unterscheidet sich Terfenadin durch zwei Hydroxygruppen, die das Produkt für die Blut-Hirn-Schranke unpassierbar machen, wodurch die unerwünschte sedierende Wirkung ausbleibt (www.redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank).

Verwendet wurde der Wirkstoff bis 1997 in Tablettenform oder als orale Suspension bei über 12 jährigen in der Dosierung von 60mg Terfenadin 1-2 mal täglich zur Linderung der Symptome einer allergischen Rhinitis und Conjunctivitis oder allergischer Hautreaktionen. Eine Dosisreduktion um 50% wurde ausschließlich Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion, insbesondere bei einer Kreatinin-Clearance unter 40 ml/min anempfohlen (Austria Codex).

Der therapeutischen Klassifizierung zufolge handelt es sich um einen kompetitiven H1-Rezeptor-Antagonisten, der ausschließlich an peripheren H1-Rezeptoren wirksam wird und die konstriktorische Wirkung des Histamins an der glatten Muskulator der Bronchien, des Uterus und des Darms, die kapillarpermeabilitätserhöhende, venolische Konstriktion des Histamins und die Katecholaminfreisetzung des Nebennierenmarkes unterdrückt. Da Terfenadin aber ausreichend hydrophil ist, gelangt es nicht durch die Blut-Hirn-Schranke, wodurch die zentraldämpfende Wirkung (sedierender Effekt) vermittelt über zentralnervöse H1-Rezeptoren ausbleibt. Als problematisch erweist sich jedoch die Affinität zur α -Untereinheit des hERG-Kanals. Wie bereits in Kap.1.3.3. dargelegt, interagiert der positiv partialgeladene Stickstoff des Terfenadins mit den π -Elektronenwolken des aromatischen Restes von Tyr652, während der Phenylrest von Phe656 in hydrophobe Wechselwirkung zum lipophilen Körper des Terfenadins tritt. Der auf diese Art erzielte Kontakt zum *binding site* des hERG-Kanals verursacht zumindest eine Verlängerung der Repolarisationsphase des Aktionspotentiales im Herzmuskel (Fernandez et al.,2004). Der allergiewirksame Metabolit Carboxyterfenadin zeigt offensichtlich keine Affinität gegenüber der hERG-Untereinheit (Scherer et al.,2002).

Terfenadin wird rasch resorbiert und unterliegt nach oraler Gabe einer fast vollständigen Firstpass-Biotransformation zu zwei Metaboliten, die durch das Enzym CYP3A4 gebildet werden. Der Carboxyterfenadin-Metabolit (Fexofenadin) ist die aktive Form, das N-dealkylierte Terfenadin. Als Folge der ausgeprägten First-pass-Biotransformation in der Leber gelangt weniger als 1% nicht metabolisiertes Terfenadin in den systemischen Kreislauf. Die Elimination von Carboxyterfenadin erfolgt mit einer terminalen Halbwertszeit von etwa 20 Stunden. Bei Einmalgabe von bis zu 180 mg Terfenadin ist die Plasmakinetik des aktiven Metaboliten dosislinear. Bei therapeutischen Dosen (2 x täglich 60 mg) werden im steady-state mittlere Plasmaspitzenkonzentrationen von 1,7 ng/ml für Terfenadin und 340 ng/ml für Carboxyterfenadin gemessen. Letzteres wird zu einem Drittel renal, zu zwei Drittel fäkal ausgeschieden. Daher zeigt sich bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion (z.B. Leberzirrhose) ein signifikanter Anstieg der Terfenadinkonzentration, bei verminderter Carboxyterfenadinkonzentration im Plasma (Austria Codex).

Zu den im Beipacktext angeführten Nebenwirkungen zählen eine potentiell lebensbedrohende ventrikuläre Tachyarrhythmie, TdP, Kammerflimmern und Herzstillstand, Veränderungen, die mit einer Verlängerung des QT_Intervalls in Zusammenhang gebracht werden. Palpitationen gelten als Frühsymptome, Hypotonie, Schwindel, Synkopen und Krampfanfälle als Folgeerscheinungen. Verschiedene andere Nebenwirkungen wie Verwirrtheit, Schlaflosigkeit, Depression, Transaminaseerhöhung, Ikterus und Hepatitis (u.a.m.) wurden ausschließlich spontan beobachtet.

Kontraindiziert ist Terfenadin bei Überempfindlichkeit, bei deutlicher Einschränkung der Leberfunktion oder gleichzeitiger Behandlung mit Inhibitoren des hepatischen CYP3A4-Enzyms. Ebenfalls nicht anzuwenden ist es bei Patienten mit bekannter QTc-Verlängerung (>440 ms), angeboren oder erworben (Bradykardie, symptomatische Arrhythmie, klinisch relevante Herzerkrankungen, gleichzeitge Behandlung mit Antiarrhythmika Klasse I und III, Hypomagnesiämie oder Hypokaliämie).

Viele der Kontraindikationen werden gesondert im Beipacktext unter dem Kapitel Warnhinweise noch einmal deutlich hervorgehoben.

Zu jenen Wirkstoffen, die Wechselwirkungen mit Terfenadin hervorrufen, werden Inhibitoren des hepatischen CYP3A4-Systems (z.B. Azol, Antimykotika, Makrolid-Antibiotika, Serotonin-Reuptake-Hemmer, usw.) potentiell arrhythmogene Wirkstoffe (Klasse I und III-Antiarrhythmika, Bepridin, trizyklische Antidepressiva, usw.) sowie Arzneistoffe gezählt, die erwiesenermaßen eine Elektrolytstörung induzieren können (Diuretika und Laxantien).

3.2.Messvorgang

Das auf seine hERG-Wirkung zu untersuchende Terfenadin (bezogen von Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D) wird in Dimethylsulfoxid (DMSO) in 10 mM Konzentration zu 1 ml Stocklösung gelöst und bei –20°C gelagert. Eine Maximalkonzentration von 0,1% DMSO in gentamycinfreier ND96-Lösung konnte nachweislich nicht den hERG-Strom verändern, beeinträchtigt also in den folgenden Experimenten nicht die Wirkung des Terfenadins (Stork et al.,2007). Die Elektrolytzusammensetzung der ND96-Lösung ist physiologisch, um die Vergleichbarkeit zu extrazellulären Konzentrationsverhältnisssen zu gewährleisten. Wie bereits in Kap.1.4.2. beschrieben, steigert eine unphysiologische Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration den hERG-Kaliumstrom.

Nach Zubereitung von 100 ml Terfenadinlösung in ND96, gentamycinfrei, da die Anwesenheit dieses Aminoglykosid-Antibiotikums hERG-Kaliumströme durchaus beein-flussen kann, in vom jeweiligen Experiment vorgegebener Konzentration, wird jeweils ein Vorratsgefäß des Perfusionssystems (Luer-Spritze) mit 60 ml gentamycinfreier ND96-Lösung, ein weiteres mit 60 ml Terfenadinlösung gefüllt.

Durch Aktivieren der Perfusionseinheit spült man sowohl Leitungssystem wie Oozytenperfusionskammer zur Reinigung 5 min mit ND96-Lösung und versucht durch gleichzeitige Betätigung der Schraubklemme des Leitungsschlauches die Perfusionsgeschwindigkeit auf 3 μ l/sec zu regulieren. (siehe Kap.2.2.). Es empfiehlt sich nachzujustieren, bis die Flussrate geprüfte 5 min lang konstant bleibt. Der Vorgang wird, nach Schließen der ND96-Leitung, für die Terfenadinlösung wiederholt. Auch hier soll eine konstante Flussrate von 3 μ l/sec erreicht werden.

In weiterer Folge werden Kammer- und Leitungssystem, nach Schließen der Leitung für Terfenadinlösung, erneut wenige Minuten mit ND96-Lösung zur Reinigung von Terfenadin perfundiert.

Für die Datenaufzeichnung wurde pClamp10 data acquisition and analysis software (Axon Instruments, Union City, CA,USA) verwendet.

Sowohl die spannungsmessende wie die strominduzierende Mikroelektrode wurde mit 3M KCl und 10 mM HEPES-Lösung (pH 7,4) gefüllt. Ihr Widerstand soll zwischen 0,3 und 2 M Ω gelegen sein (Stork et al., 2007).

Zunächst werden beide Mikroelektroden auf die Oozytenoberfläche aufgesetzt, dann wird zügig mit einer, schließlich mit der anderen Elektrode durch die Membran ins Cytosol eingestochen.

Bevor cRNA-beimpfte Oozyten für Experimente herangezogen werden, sollten im Rahmen der Entnahme gleichartig behandelte, cRNA-freie, auf endogene Ströme getestet werden. Es lässt sich auf diese Art und Weise feststellen, ob ein batch (die Oozyten einer Entnahme) für die folgenden Experimente geeignet ist oder nicht.

An Oozyten werden verschiedene Ströme, meist mit niedriger Amplitude, beobachtet. Ein häufig festgestellter, auswärts gerichteter Chloridionenstrom, lässt sich etwa durch das Einbringen von 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) in die Perfusionslösung reduzieren. Es besteht auch die Möglichkeit, an Oozyten, die man vorangehend mit nukleasefreiem Wasser beimpft hat, einmalig für jeden batch, die durch das Spannungsprotokoll erzeugten endogenen Ströme zu messen und deren Amplitude später von den Stromamplituden, gemessen an cRNA beimpften Oozyten, zu subtrahieren (Witchel, 2003). Alles in allem sollten die Stromamplituden der endogenen Ströme eines verwendungsfähigen batches 0,15 μ A nicht überschreiten (Stork et al., 2007).

Jedes Experiment wird an hERG exprimierenden Oozyten (frühestens 1 Tag nach der cRNA-Injektion) in folgenden Schritten ausgeführt:

Bei Raumtemperatur und unter Perfusion mit ND96-Lösung überträgt die Spannungselektrode eine unbestimmte Pulsfolge definierter Frequenz (0,03Hz) auf den Oozyten. Die Summe aller hERG-Kanäle reagiert bei jedem Puls mit einem vollen Kanalzyklus (geschlossen \rightarrow offen \rightarrow inaktiviert \rightarrow offen \rightarrow geschlossen), wobei K⁺ aus der Zelle strömt, somit ein Stromfluß mit sich ändernder Amplitude entsteht. Gemessen wird allerdings nicht dieser Ionenstrom, sondern ein von der Stromelektrode injizierter Einwärtsstrom, der bei gleicher Amplitudenänderung wie der K⁺ Auswärtsstrom zur Aufrechterhaltung der vorgegebenen Spannungen eines Pulses Die dienen soll (siehe Kap.2.1.3.). vom Stromerfassungssystem registrierten Amplitudenänderungen pro Zeiteinheit zeigen zunächst eine Zunahme der Amplitudenhöhe (run-up Phänomen). Maximal 10 -15 min sollten vergehen, bis ein Oozyt sich an die Pulsbedingungen angepasst hat und eine gewisse Konstanz in Amplitudenhöhe und Verlauf der Stromkurve eingekehrt ist (Stabilisierungsphase).

Experimentell verwertbare hERG-Kaliumströme ohne Terfenadineinfluß zeichnen sich durch bestimmte Qualitätskriterien aus:

 \bullet Die Amplitudenhöhe des Tailstroms sollte zwischen 0,5 und 1,5 μA gelegen sein.

• Der Zeitverlauf des Kaliumstroms sollte stabil sein, die Amplitudenhöhe nicht zwischen höheren und niederen Werten schwanken

• Im Prepuls-Bereich (siehe unten) sollte der hERG-Strom eher asymptotisch und mit weitaus geringeren Werten als der Tailstrom verlaufen, keinesfalls darf er in einer Stromstärkenspitze zu höheren Werten münden. Der Tailstrom zeigt zu Beginn ein Amplitudenmaximum und sinkt dann langsam ab.

• Der Leak-oder Leckstrom, der ohne Kanalöffnung an der Membran auftritt und, bedingt durch die Membranverletzung der beiden Mikroelektroden, auch an den Einstichstellen fließt, sollte einen Wert zwischen -0,2 und 0 μ A aufweisen. Je stärker er sich in der Stabilisierungsphase an 0 μ annähert, desto höher ist die Vitalität des Oozyten in Anbetracht der folgenden Experimente einzuschätzen.

Erfüllen die aktuellen hERG Kaliumströme all diese Kriterien, hebt man die Pulsfrequenz auf die im Experiment genutzte Frequenz an und prüft erneut auf die eben beschriebenen Kriterien. Bei positiver Beurteilung wird der Stromstärkeverlauf von 40 bis 50 Pulsen bei Pulsfrequenz des Experimentes aufgezeichnet. Diese Aufzeichnung wird als Control bezeichnet. Nun wird die ND96-Lösungszufuhr gestoppt und die Perfusion der Oozytenkammer mit Terfenadinlösung einer bestimmten Konzentration aktiviert. In der nun folgenden dreiminütigen sogenannten Resting-time wird nicht nur das Kammer-Turnover (das vollständige Ersetzen der in der Kammer befindlichen ND96-Lösung durch Terfenadinlösung) erreicht, sondern dem Oozyten auch genügend Zeit eingeräumt, sich den neuen Verhältnissen anzupassen.

Im eigentlichen Experiment, bei definiertem Haltepotential, (meist –80mV) werden Pulse mit vorgewähltem Spannungsprotokoll (siehe unten) und definierter Frequenz über die Mikroelektroden auf den Oozyten übertragen. Der Oozyt reagiert unter zunehmender Besetzung der Kaliumkanäle durch Terfenadin mit steigender Blockade des hERG-Auswärtsstromes. Die zunächst hohe und später rasch abnehmende Blockadegeschwindigkeit erklärt sich aus der Tatsache, dass zunächst sehr viele freie Kaliumkanäle von Terfenadin blockiert werden, mit steigender Besetzung aber immer weniger unbesetzte Kanäle zur Verfügung stehen. Der steady state, das Gleichgewicht zwischen Neubesetzung der vorhandenen Kanäle und Dissoziation von denselben, wird durch das Konstantbleiben der reduzierten Amplitudenhöhe angezeigt. Bis zu diesem Punkt sollte die durch Terfenadin erzielte Hemmung der hERG-Kanalfunktion aufgezeichnet werden.

3.3.Auswertung

Jeder im Rahmen des Experimentes auf den Oozyten übertragene Puls imitiert durch eine zeitlich genau festgelegte Spannungsabfolge (Spannungsprotokoll) ein Aktionspotential. Nach einer 110 ms dauernden Ruhephase (Phase 1)) bei einem Haltepotential von -80 mV, erfolgt eine Spannungsänderung auf +20 mV, die 330 ms aufrecht erhalten wird (Phase 2). In diesem Zeitabschnitt reagieren die meisten Kanäle mit der Öffnung ihres Aktivierungs-Gates. Die Öffnung der Kanäle erzeugt einen etwa 1ms dauernden Kaliumauswärtsstrom, der sich als initialer Peak im Prepuls-Abschnitt der Stromkurve präsentiert und in etwa der Depolarisation oder dem Aufstrich des Aktionspotentiales entspricht. Da bei +20 mV viele hERG-Kanäle durch Schluß des Inaktivierungs-Gates vom offenen in den inaktivierten Zustand innerhalb weniger ms wechseln, bleibt der Kaliumnettoauswärtsstrom während der gesamtem verbleibenden Prepuls-Phase (mit Ausnahme des Initial-Peaks) gering. Dieser den größten Teil der Phase 2 bestimmende Abschnitt korreliert mit der Plateauphase der Repolarisation des

Aktionspotentials. In Phase 3 des Pulses wird die Spannung für weitere 330 ms auf –40 mV gesenkt. Viele Kanäle eröffnen dadurch erneut ihr Inaktivierungs-Gate, gehen somit in den offenen Zustand über und erzeugen einen ausgeprägten Kaliumauswärtsstrom, den sogenannten *tail-current*, dessen maximaler Amplitudenwert proportional zur Zahl geöffneter hERG-Kanäle ist. Nach einer erneuten Spannungsänderung auf –80 mV, wird in Phase 4 ein langsames Versiegen des hERG-Kaliumauswärtsstromes durch zunehmenden Schluß des Aktivierungs-Gates der Kanäle beobachtet. Phase 3 und 4 imitieren somit die rasche Repolarisation eines Aktionspotentials.



Abb.22 hERG-K-Stromhemmung durch Terfenadin bei Konzentration 0,3 µmol, Stimulationsfrequenz 0,3 Hz, Prepulslänge und Testpuls jeweils 300 ms

Im Rahmen der Experimente können Frequenz-und /oder Prepulsänderungen des Testpulses sowie Konzentrationsänderungen der Testsubstanzlösung zu Kanalaktivitätsänderungen führen, die sich als Reduktion des Amplitudenmaximums des Tail-Stromes der zeitlich aufeinanderfolgenden Stromstärke/Zeit-Kurven bis zu einem konstant bleibendem Minimum – dem steady-state - präsentiert.

Werden nun die, in einem durch die Parameter Frequenz, Prepuls und Konzentration definierten Experiment ermittelten normierten Amplitudenmaxima bezogen zur Pulszahl in einem Punktdiagramm dargestellt, so lässt sich dem daraus resultierenden Graphen die monoexponentielle Funktion $y = A1 \exp(-x/tl) + y0$ zuordnen. Die aus der Funktion abgeleiteten Parameter steady-state (y) und Zeitkonstante (τ) werden zur Analyse des Experimentes herangezogen.



Abb.23 Normierter Graph der hERG-K-Hemmung bei Terfenadinkonzentration 0,3 µmol, Stimularionsfrequenz 0,3 Hz

3.4. Zielsetzung

Unter Veränderung der Experimentparameter Substanzkonzentration, Stimulationsfrequenz und durch Variation der Prepulslänge des stimulierenden Pulses soll versucht werden, die Wechselwirkung des Terfenadins mit dem hERG-Kanal und die daraus resultierende Kanalaktivitätsänderung zu dokumentieren. Ferner gilt es auch das Dissoziationsverhalten der Substanz im geschlossenen Kanal bei anhaltender Substanzperfusion (Recovery) sowie das Dissoziationsverhalten in mit zunehmender Frequenz stimulierten Kanälen und unter Perfusion mit substanzfreier ND96-Lösung (Wash-Out) zu prüfen.

Nach eingehender Analyse des daraus gewonnenen Datenmaterials sollen unter Zuhilfenahme der Faktoren von steady state und Zeitkonstante τ Rückschlüsse auf die Affinität des Terfenadins auf die Kanalzustände <geschlossen>, <offen>und <inaktiviert>gezogen werden.

3.5. Ergebnisse

3.5.1. Beeinflussung der hERG-Kanalaktivität durch Änderung der Terfenadinkonzentration

Perfundiert man den mit hERG transfizierten Oozyten mit Terfenadinlösungen steigender Konzentration, lässt sich in Erfahrung bringen, in welchem Ausmaß eine Besetzung der hERG-Kanäle unter der Annahme, dass mit steigender Besetzung eine steigende Blockade der hERG-Funktion einhergeht, zustande kommt. Unter dieser Voraussetzung definiert die Sättigung der am Oozyten exprimierten Kanäle den Maximalblock des hERG-Stroms. Jedes steady-state stellt somit ein von der Terfenadinkonzentration bestimmtes Verhältnis von terfenadinbesetzten zu unbesetzten Kanälen dar, getragen vom Gleichgewicht zwischen Kanalbesetzung und Kanaldissoziation.

In den zugrundeliegenden Experimenten konnte in Ermangelung eines suffizienten Wash-Outs - das Auswaschen des Oozyten mit terfenadinfreier ND96-Lösung führte zu keiner Rückkehr zur ungeblockten Tailstromamplitude - jeder Oozyt nur für ein Experiment herangezogen werden.

Untersucht wurde die Änderung der hERG-Kanalaktivität bei Perfusion mit Terfenadinlösung in ND96 der Konzentration 0,3 μ M, 1,0 μ M und 3,0 μ M.Für das Experiment wurde eine Perfusionsgeschwindigkeit von 3 μ l/sec gewählt Die Stimulationsfrequenz lag bei 0,3 Hz, die Prepulslänge bei 300ms. Alle Experimente wurden ausgehend von einem Haltepotential von – 80mV und bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einer resting-time von 3min wurde die Veränderung des hERG-Stroms bis zum steady-state aufgezeichnet. Der leak-Strom lag zwischen -0,2 und 0 μ A.

Wie in Tabelle 8 ersichtlich, bewirkt die steigende Terfenadinkonzentration eine Abnahme des steady-states der normierten Tailstromamplitude. Bei $0,3\mu$ M liegt der mittlere steady-state (mean in der Tab.) bei $0,69878 \pm 0,0472$ (n=3), bei $1,0\mu$ M beträgt sie $0,4173 \pm 0,02227$ (n=4), um bei $3,0 \mu$ M auf $0,35992 \pm 0,04972$ (n=3) zu sinken.

Sowohl die Tabellendaten wie auch die graphische Darstellung (Abb.24) lassen den Schluß zu, dass mit steigender Kanalbesetzung durch Terfenadin, eine Zunahme der hERG-Kanalhemmung erfolgt, somit eine Konzentrationsabhängigkeit des Terfenadineinflusses vorliegt.



Abb.24 Graphische Darstellung des Zeitverlaufes der normierten Tailstromamplitude bei Terfenadinkonz.von $0,3\mu$ M, $1,0\mu$ M, $3,0\mu$ M; Die Stimulationsfrequenz lag bei 0,3Hz,die Prepulslänge bei 300ms;das Haltepotential bei –80 mV;die resting-time wurde mit 3 min festgelegt.Mit steigender Konzentration zeigt sich eine deutliche Zunahme der hERG-Kanalhemmung.

Terfenadine, Variation of Concentration



Abb.25 Terfenadine, Variation of Concentration : hERG-K-Stromhemmung bei Konzentration 0,3 μM (oben), 1,0 μM (Mitte), 3,0μM (unten) Stimulationsfrequenz 0,3 Hz; Prepulslänge 300 ms, Testpulslänge 300 ms.

Tab.8 Mittelwerte der steady states und Zeitkonstanten (τ) der hERG-Kanalhemmung bei den Terfenadinkonzentrationen 0,3 µM, 1,0 µM und 3,0µM. Die mit d eingeleiteten Zahlen bezeichnen die vom Autor durchgeführten Einzelexperimente.

Conc.of Terfenadine $0,3\mu M$ (n=3)

	steady state (nta*)	τ (pulses)
d 06710002	$0,75993 \pm 0,00151$	66,1 ± 1,2
d 06712002	$0,73166 \pm 0,00020$	38,9 ± 1,3
d 06802001	0,60474 ± 0,00656	86,3 ± 2,7
mean	0,69878 ± 0,04772	63,8 ± 13,8

Conc.of Terfenadine 1,0 μ M (n=4)

	steady state (nta*)	τ (pulses)
d 06621004	$0,38177 \pm 0,00150$	$28,2 \pm 0,5$
d 06621006	$0,37580 \pm 0,00058$	$22,5 \pm 0,2$
d 06621009	$0,45605 \pm 0,00061$	$19,5 \pm 0,1$
d 06621011	$0,45557 \pm 0,00050$	45,4 ± 0,2
mean	0,41730 ± 0,02227	$28,9 \pm 5,8$

Conc.of Terfenadine 3,0 μM ($n\!=\!3$)

	Steady state (nta*)	τ (pulses)
d 06713005	$0,39047 \pm 0,00182$	$15,4 \pm 0,3$
d 06713009	$0,42661 \pm 0,00176$	$12,4 \pm 0,3$
d 06713013	0,26269 ± 0,00133	16,5 ± 2,8
mean	0,35992 ± 0,04972	16,5 ± 2,8

*normalized tailcurrent amplitude

3.5.2. Beeinflussung der hERG-Kanalaktivität durch Veränderung der Pulsfrequenz

Um die Affinität einer Substanz zu den Kanalzuständen <offen> und <inaktiviert> (beide durch ein offenes Aktivierungsgate gekennzeichnet) beurteilen zu können, wird bei gleichbleibender Substanzkonzentration, ohne Änderung der Prepulslänge die Stimulations-frequenz variiert.

Eine Substanz, die eine hohe Affinität zu den beiden im Puls induzierten Kanalzuständen (<offen> und <inaktiviert>) und eine geringe Affinität zum geschlossenen Kanal (zwischen den Pulsen) aufweist, wird großteils im geschlossenen Zustand dissoziieren. Wird der Abstand zwischen den Pulsen durch Zunahme der Pulsfrequenz verringert, verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen zwei Pulsen in Richtung der geschlossenen Kanäle nicht in dem üblichen beträchtlichen Ausmaß. Dadurch sinkt die Dissoziation dieser Substanz vom bindingsite und die Kanalhemmung nimmt zu. Umgekehrt wird für alle Substanzen , die eine höhere Affinität zum geschlossenen Kanalzustand zeigen, eine Zunahme der Stimulationsfrequenz keine Änderung der hERG-Kanalblockade bewirkt, da die für die Dissoziation bedeutsamen Phasen <offen> und <inaktiviert>durch die Änderung der Pulsfrequenz nicht beeinflusst werden.

Die für die Ergebnisse herangezogenen Experimente wurden bei Raumtemperatur, einer Perfusionsgeschwindigkeit von 3 μ l/sec nach einer resting-time von 3 min und einem Haltepotential des Stimulationspulses von –80 mV aufgenommen. Bei gleichbleibender Terfenadin-Konzentration von 1 μ M und bei Prepulslänge von 300msec wurden die hERG-Kanäle (auch in dieser Untersuchung einer pro Experiment) mit einer Pulsfrequenz von 0,1 Hz, 0,3 Hz und 1 Hz stimuliert. Keine der Aufzeichnungen zeigt leak-Stöme von unter –0,2 μ A. Wie aus Tab.9 ersichtlich wird die normierte Tailstromamplitude bei einer Frequenz von 0,1 Hz auf einen mittleren steady-state von 0,32112 ± 0,06005 (n=6) gesenkt. Bei einer Frequenz von 1,0Hz beträgt er 0,43104 ± 0,05325 (n=3).

Terfenadine, Variation of Frequency



Abb.26 Graphische Darstellung des Zeitverlaufs der normierten Tailstromamplitude bei den Stimulationsfrequenzen 0,1Hz, 0,3 Hz, 1,0 Hz Die Prepulslänge betrug 300msec, die Konzentration 1,0 µM; das Haltepotential lag bei –80 mV; die resting-time wurde mit 3 min festgelegt. Die hERG-Kanalhemmung weist bei allen drei Frequenzen nur geringfügige Unterschiede auf.

Sowohl die drei mittleren steady-state Werte wie auch die graphische Darstellung (Abb.25) der terfenadinabhängigen hERG-Kanalhemmung bei den Frequenzen 0,1 Hz, 0,3 Hz und 1,0Hz weisen darauf hin, dass dieser Kaliumkanaltyp von Terfenadin zumindest nicht frequenzabhängig blockiert wird.

Dieses Verhalten wird in der Literatur als not-use dependant bezeichnet und lässt den Schluß zu, dass Terfenadin in den Kanalzuständen <offen> und <inaktiviert> keine besondere Affinität zum binding-site des Kanals aufzuweisen hat.

Terfenadine, Variation of Frequency



Abb.27 Terfenadine, Variation of Frequency: hERG-K-Stromhemmung bei Stimulationsfrequenz 0,1 Hz (oben), 0,3 Hz (Mitte), 1,0Hz (unten); Prepulslänge 300ms, Terfenadinkonzentration 1,0 μM

Tab.9 Mittelwerte der steady-states und Zeitkonstanten (τ) der hERG-Kanalhemmung bei den Stimulationsfrequenzen 0,1 Hz, 0,3 Hz und 1,0 Hz. Die mit d eingeleiteten Zahlen bezeichnen die vom Autor durchgeführten Einzelexperimente.

Frequency of Stimulation 0,1 Hz (n=6)

	steady state (nta *)	τ (pulses)
d 06608001	$0,18831 \pm 0,00604$	$79,7 \pm 1,3$
d 06608004	$0,\!22928 \pm 0,\!00253$	$33,4 \pm 0,5$
d 06609001	$0,\!42145\pm0,\!00188$	$15,8\pm0,3$
d 06614001	$0{,}50895 \pm 0{,}00260$	$39,0 \pm 0,6$
d 06615001	$0,\!15758\pm0,\!00092$	$18,5 \pm 0,1$
d 06621002	$0,42116 \pm 0,00109$	$18,3 \pm 0,2$
mean	$0,32112 \pm 0,06005$	34,1 ± 9,9

Frequency of Stimulation 0,3 Hz (n=4)

	steady state (nta *)	τ (pulses)
d 06621004	$0,\!38177\pm0,\!00150$	$28,2\pm0,5$
d 06621006	$0,\!37580\pm0,\!00058$	$22,5 \pm 0,2$
d 06621009	$0,\!45605\pm0,\!00061$	$19,5 \pm 0,1$
d 06621011	$0,\!45557\pm0,\!00050$	$45,4 \pm 0,2$
mean	0,41730 ± 0,02227	$28,9\pm5,8$

Frequency of Stimulation 1,0 Hz (n=3)

	steady state (nta *)	τ (pulses)
d 06622003	$0,34877 \pm 0,00138$	$17,7 \pm 0,3$
d 06622005	$0,\!41360\pm0,\!00462$	$17,6 \pm 0,2$
d 06830012	$0,53075 \pm 0,00222$	$37,5 \pm 0,7$
mean	0,43104 ± 0,05325	24,3 ± 6,6

*normalized tailcurrent amplitude

3.5.3 Beeinflussung der hERG-Kanalaktivität durch Veränderung der Prepulslänge des stimulierenden Pulses

Wird die Dauer des Prepulses variiert, lässt sich bei gleicher Frequenz und gleicher Konzentration, der auf hERG-Aktivitätsänderung zu untersuchenden Substanz, eine Aussage über die Affinität der Substanz gegenüber der Kanalbindungsstelle im inaktivierten Zustand machen.

Unter Berücksichtigung, dass mit der Zunahme der Prepulslänge die Anzahl der bei +20mV bereits größtenteils in inaktiviertem Zustand vorliegenden Kanäle weiter steigt, muß für Substanzen die eine hohe Affinität zu gerade diesem Kanalzustand haben eine Zunahme der Blockade des hERG-Stromes beobachtet werden.

Um zu den folgenden Ergebnissen zu gelangen, wurde jeweils ein Oozyt pro Experiment, bei Raumtemperatur, einer Terfenadinlösung von 1 μ M mit der Perfusionsgeschwindigkeit von 3 μ l/sec ausgesetzt. Die resting-time betrug 3 Minuten. Aufgezeichnet wurden die Änderungen des Stromstärke-Zeitverlaufes des hERG-Stromes bei einer Stimulationsfrequenz von 0,3 Hz für die Prepulslängen von 300 ms, 600 ms sowie 1000 ms. Das Haltepotential lag bei –80 mV.Ausschließlich Stromstärkekurven mit einem leak-Strom von über –0,2 mV wurden für die Analyse herangezogen.

Terfenadin verursacht auch in diesem Fall eindeutige Hemmungen des hERG-Stromes für alle drei gewählten Prepulslängen. Bei einer Prepulslänge von 300 ms liegt der mittlere steady-state bei $0,4173 \pm 0,0227$ (n= 4), bei 600 ms weicht er mit einem mittleren steady state von $0,38938 \pm 0,02166$ (n=4) kaum vom ersten Wert ab. Einzig der bei 1000 ms gemessene Mittelwert weicht mit $0,31098 \pm 0,04221$ geringfügig von den anderen beiden steady states ab (siehe Tab.10).

Auch die graphische Darstellung (Abb.26) bestätigt die Vermutung, dass durch Änderung der Prepulsdauer die Terfenadinexposition zu keiner wesentlichen Änderung des Ausmaßes der hERG-Kanalblockade führt. Daraus lässt sich schließen, dass keine besondere Affinität des Terfenadins zum binding-site im inaktivierten Zustand besteht. Diese Feststellung stützt die in 3.5.2 gewonnene Erkenntnis teilweise, da sie nur für den inaktivierten Zustand zutrifft.

Terfenadine, Variation of Prepulse



Abb.28 Graphische Darstellung des Zeitverlaufs der normierten Tailstromamplitude bei den Prepulslängen 300ms, 600ms, 1000ms; die Stimulationsfrequenz lag bei 0,3 Hz, die Terfenadinkonzentration betrug 1 μ M ; die resting-time wurde mit 3 min festgelegt; das Haltepotential lag bei –80mV.Die hERG-Kanalhemmung zeigt bei allen drei Prepulslängen nur geringfügige Unterschiede.

Terfinadine, Variation of Prepulse



Abb.29 Terfenadine, Variation of Prepulse: hERG-K-Stromhemmung bei Prepuls 300 ms (oben), 600 ms (Mitte), 1000 ms (unten); Terfenadinkonzentration 1,0 μM; Stimulationsfrequenz 0,3 Hz

 $Tab.10 \mbox{ Mittelwerte der steady states und Zeitkonstanten \ \tau \ der \ hERG-Kanalhemmung bei \ den \ Prepulslängen \ 300ms, \ 600ms, \ 1000ms \ . \ Die \ Terfenadinkonzentration \ betrug \ 1 \ \mu M, \ die \ Stimulationsfrequenz \ lag \ bei \ 0,3 \ Hz.$

Duration of Prepuls 300ms (n=4)

	steady state (nta *)	τ (pulses)
d 06621004	$0,\!38177\pm0,\!00150$	$28,2\pm0,5$
d 06621006	$0,\!37580\pm0,\!00058$	$22,5 \pm 0,2$
d 06621009	$0,\!45605\pm0,\!00061$	$19,5 \pm 0,1$
d 06621011	$0,\!45557\pm0,\!00050$	$45,4 \pm 0,2$
mean	0,41730 ± 0,02227	$28,9 \pm 5,8$

Duration of Prepuls 600ms (n=4)

	steady state (nta *)	τ (pulses)
d 06713021	0,42311 ± 0,00150	$29,1 \pm 0,3$
d 06802015	$0,\!41658\pm0,\!00250$	$47,9\pm0,6$
d 06802025	$0,32813 \pm 0,00189$	$15,3 \pm 0,2$
d 06830006	$0,\!38971\pm0,\!00188$	$27,5 \pm 0,4$
mean	0,38938 ± 0,02166	30,0 ± 6,7

Duration of Prepuls 1000ms (n=3)

	steady state (nta*)	τ (pulses)
d 06802028	$0,25473 \pm 0,00253$	$9,8 \pm 0,2$
d 06831018	$0,\!28459 \pm 0,\!00268$	$14,8 \pm 0,2$
d 06802030	$0,\!39363\pm 0,\!00250$	$12,6 \pm 0,2$
mean	0,31098 ± 0,04221	12,4 ± 1,5

* normalized tailcurrent amplitude

3.5.4. Recovery-Verhalten des terfenadinexponierten hERG-Kanals

Im Recovery-Experiment werden die hERG-Kanäle eines mit hERG-cRNA-transfizierten Oozyten bei definierter Substanzkonzentration, definierter Prepulslänge, sowie definierter Pulsfrequenz stimuliert bis die hERG-Kanalhemmung ein steady state erreicht hat. Unter Beibehaltung der Perfusion mit Substanzlösung, im Gegensatz zum Wash-Out, wird nach genau festgelegter Zeit, in der keine Stimulation stattfindet, exakt ein Puls übertragen.

Eine Substanz, die über geringe Affinität zum binding-site im geschlossenen Zustand verfügt, wird in der stimulationsfreien Zeit eher rascher von der Bindungsstelle in der zentralen Cavität des hERG-Kanals dissoziieren und zeigt somit beim nächsten Puls einen Rückgang der hERG-Stromhemmung, die als Zunahme der Tailstromamplitude manifestiert. Hingegen werden Substanzen, die in Folge einer hohen Affinität zum binding-site im geschlossenen Zustand kaum von der Bindungsstelle eines geschlossenen Kanals dissoziieren und daher mit dem nächsten Puls daher nur einen geringfügigen Rückgang der hERG-Stromblockade zeigen. Dieses Phänomen des Unvermögens, im geschlossenen Kanalzustand, dissoziieren zu können, wird als Drug-Trapping bezeichnet.

Vom Autor wurde die Analyse des Recovery-Verhaltens von Terfenadin nur stichprobenartig durchgeführt. Zuerst wurde nach einer resting-time von 3 Minuten bei einer Terfenadinkonzentration von 1 μ M, bei einer Pulsfrequenz von 0,3 Hz und Prepulslänge von 300ms eine Kanalhemmung zum steady state erzielt. Nach Wechsel des Haltepotentials von -80 mV auf – 120 mV wurde nach 330 sec exakt ein Puls gesetzt und die Tailstromamplitude aufgezeichnet.

Wie der Abb.27 zu entnehmen ist, nimmt die Recovery bei einer Stichprobenanzahl von n=3 einen Wert von 10% zur normierten Tailstromamplitude des ungeblockten hERG-Kaliumstromes an.

Daraus lässt sich nicht nur ableiten, dass Terfenadin ein Drug-Trapping-Phänomen zeigt sondern auch eine ausgeprägte Affinität zum binding-site des geschlossenen Kanals aufzuweisen hat.
Terfenadine, Recovery after 330 sec



Abb.30 Graphische Darstellung des Recoverys für Terfenadin: nach einer Kanalhemmung durch Terfenadin $(1\mu M)$ bei Pulsfrquenz von 0,3 Hz und Prepulslänge von 300ms wurden ausschließlich die gemittelten Werte der ungeblockten Tailstromamplitude sowie die niedrigste steady state Tailstromamplitude dreier Experimente herangezogen (n=3). Der Mittelwert der ungeblockten Tailstromamplitude wurde auf 1 normiert, der steady state –Mittelwert hingegen auf 0. Letzterer liefert daher den Nullpunkt der obigen Darstellung

Nach einem pulsfreien Intervall von 330 sec, zu dessen Beginn das Haltepotential auf –120 mV gesenkt wurde, wurde ohne Unterbrechung der Terfenadinexposition, exakt 1 Puls gesetzt. Die bei diesem Puls in den drei Experimenten gemessenen Tailstromamplitudenwerte wurden gemittelt, der Mittelwert auf der Zeitachse (siehe oben bei 5min30sec) auf der Zeitachse aufgetragen.

3.5.5. Wash-Out-Verhalten des Terfenadins nach terfenadininduzierter hERG-Kanalhemmung

Um das Wash-Out-Verhalten einer Substanz zu untersuchen, wird zunächst bei definierter Frequenz und Prepulslänge des Stimulationspulses, sowie bei definierter Substanzkonzentration, eine hERG-Kanalhemmung zum steady state durchgeführt. Ist der Gleichgewichtszustand des hERG-Blocks erreicht, wird die Perfusion mit Terfenadinlösung unterbrochen und die Oozytenkammer mit terfenadinfreier ND96-Lösung perfundiert. Die Stimulation wird mit der gewünschten Frequenz fortgesetzt, bis - im Idealfall – die Tailstromamplitude den Wert der ungeblockten Tailstromamplitude erreicht hat. Häufig stellt sich bei dieser "Rückkehr" der Stromamplitude zur ungeblockten Ausgangssituation ein steady state zwischen 80 und 90% des ungeblockten Ausgangswertes ein. Die Experimente werden bei unterschiedlichen Frequenzen durchgeführt.

Während das Recovery-Experiment das Dissoziationsverhalten von Substanzen untersucht, die vor allem im geschlossenen Zustand des Kanals dissoziieren und an seine nicht geschlossenen Zustände binden, prüft das Wash-Out-Experiment das Dissoziationsverhalten von Substanzen, die eine hohe Affinität zum geschlossenen Kanalzustand haben, hingegen von nicht geschlossenen Kanälen dissoziieren.

In den Wash-Out-Experimenten des Autors wurde zunächst bei Raumtemperatur, nach einer resting-time von drei Minuten, bei Perfusionsgeschwindigkeit von 3 µl/sec, eine hERG-Kanalhemmung zum steady state herbeigeführt. Es wurde mit einer 1µM Terfenadinlösung perfundiert. Das Haltepotential betrug –80 mV, die Prepulslänge des stimulierenden Pulses lag bei 300ms. Nach Erreichen des steady states der hERG-Kanalhemmung wurde unter fortgesetzter Stimulation bei 1 Hz, 0,3 Hz und 0,03 Hz die Zufuhr der Terfenadinlösung unterbrochen und der Oozyt mit terfenadinfreier ND96-Lösung perfundiert. Ausschließlich beim Wash-Out-Experiment mit 1Puls/10min hat der Autor den Kanal bei 0,3 Hz bis zum steady state geblockt, das Wash-Out aber bei 1 Puls/10 min nach Umstellung auf terfenadinfreie Perfusionslösung aufgezeichnet.

Für die Analyse wurden ausschließlich die dem tiefsten steady state Wert des Kanalblockes folgenden Wash-Out-Aufzeichnungen herangezogen. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet eine Minimum-Maximum-Normierung, in der der Minimumwert (0) dem tiefsten steady state Wert der Hemmung, der Maximumwert(1) dem Maximalwert der

Terfenadine, Wash-Out at Various Frequencies



Abb 31 Graphische Darstellung des Wash-Out von Terfenadin: der vorausgehende in der Graphik nicht berücksichtigte Kanalblock wurde bei einer Terfenadinkonzentration von 1µM und der jeweiligen Wash-Out-Frequenz bei Prepulslänge 300 ms, nach einer resting-time von 3min bei Raumtemperatur durchgeführt; das Haltepotential betrug –80 mV; nur der dem 1Puls/10in vorangehende Kanalblock wurde bei 0,3 Hz induziert.Die hier dargestellten Wash-Outs beginnen mit dem tiefsten steady state Wert des Kanalblocks, normiert auf 0, und enden meistens vor dem Erreichen des Wertes der ungeblockten Tailstromamplitude, der in obiger Graphik auf 1 normiert wurde. Aus dieser visuellen Präsentation geht klar hervor, dass mit steigender Frequenz eine Zunahme der Wash-Out-Geschwindigkeit einhergeht.

ungeblockten Tailstromamplitude entspricht. Der Leak-Strom lag bei allen Experimenten über– 0,2 µA. Für jedes Experiment wurde nur ein Oozyt herangezogen.

Wie Tab.11 dokumentiert, steigt mit zunehmender Frequenz auch die Geschwindigkeit des Wash-Out-Effektes für Terfenadin am binding site des hERG-Kanals. Der τ -Wert für die Frequenz von 1Puls/10min lag bei 15,68 ± 0,23 min (n=3), für 0,03 Hz bei 11,61 ± 0,50 min (n=3).Er sinkt bei der Frequenz von 0,3 Hz auf 6,60 ± 0,13 min (n=3) und unterscheidet sich bei 1 Hz mit einem τ - Wert von 6,64 ± 0,03 min (n=3) marginal vom Wert der vorangegangenen Frequenz.

Aus der graphischen Darstellung Abb.28 lässt sich entnehmen, dass bei einer Frequenz von 1Puls/10min das 50%-Wash-Out (die Dissoziation der Substanz von 50% der im steady state

von Terfenadin geblockten Kanälen) bei 16,2 min lag, das 50%Wash-Out bei einer Frequenz von 0,03 Hz 6,5 min, bei 0,3 Hz 4,4 min und bei 1 Hz 4,1 min betrug.

Die Frequenzabhängigkeit des Wash-Out-Effektes lässt sich wie folgt interpretieren: einerseits nimmt mit steigender Frequenz nicht nur die Zahl der Öffnungen pro Zeiteinheit für den einzelnen Kanal, sondern auch die Gesamtzahl der Kanäle im offenen Zustand zu. Für eine Substanz, die eine hohe Affinität zum geschlossenen Zustand aufweist und in einem der nicht geschlossenen Zustände (hier gemeinhin als offener Zustand bezeichnet) dissoziiert, kann die frequente Kanalöffnungdieser zu einer Zunahme der Dissoziationsrate führen.

Wash- Out –Frequency	mean τ (min)	sample (n)
1 Hz	$6{,}64\pm0{,}03$	3
0,3 Hz	$6,60 \pm 0,13$	3
0,03Hz	$11,61 \pm 0,50$	3
1 Pulse/10 min	15,68 ± 0,23	3

Tab.11 Mittelwerte der Zeitkonstanten τ für Wash-Outs bei den Frequenzen 1Puls/10 min, 0,03 Hz, 0,3 Hz, 1 Hz nach erfolgter Kanalhemmung

3.6. Zusammenfassung

Wie den Experimenten zu entnehmen war, nimmt mit steigender Terfenadinkonzentration auch die hERG-Stromhemmung zu. Jede höhere Konzentration führt zu Besetzung von mehr Kanälen bis zu einem gewissen steady-state, das sich aus dem Gleichgewicht von Kanalassoziation und -dissoziation der eingesetzten Substanz am binding-site ergibt. Für Terfenadin wurde vom Autor eine Abhängigkeit der Kanalfunktion von der Substanzkonzentration nachgewiesen.

Desweiteren zeigt sich, dass eine Steigerung der Stimulationsfrequenz im Experiment keine Zunahme der hERG-Stromhemmung bewirkt. Dieses Verhalten wird als <not-use-dependant> bezeichnet und beweist, dass in den Kanalzuständen <offen>, <inaktiv>, keine besonders hohe Affinität von Terfenadin zum binding-site vorliegt.

Experimente, die die Prepulslänge unter Beibehaltung von Stimulationsfrequenz und Substanzkonzentration variieren, lassen Schlüsse auf die Affinität der Substanz zum bindingsite im Zustand <inaktiv> zu. Durch Steigerung der Prepulslänge wird die Zahl der in inaktivem Zustand vorliegenden Kanäle grösser. Tritt eine Zunahme der hERG-Stromhemmung bei gleicher Substanzkonzentration und steigender Prepulslänge auf, erklärt sich dieses Phänomen durch eine hohe Bindungsaffinität der Substanz gegenüber dem binding-site. Dieses Verhalten konnte bei Terfenadin nicht nachgewiesen werden.

Beim Recovery-Experiment wird bei anhaltender Perfusion mit Substanzlösung, nach einer genau definierten stimulationsfreien Zeit, genau ein Puls gesetzt. Substanzen, die eine geringe Assoziation zum geschlossenen Zustand des Kanals haben, werden mit dem genau diesem Puls freigesetzt, die hERG-Kanalhemmung nimmt deutlich ab. Da Terfenadin nur eine Reduktion der normierten hERG-Stromhemmung um 10% zeigt, vermutet man eine hohe Bindungsaffinität zum geschlossenen Kanal.

Die Wash-Out-Versuche mit terfinadinfreier Perfusionslösung bestätigen eine rasche Dissoziation und eine geringe Bindungsaffinität des Terfenadins zu den nicht geschlossenen Zuständen.

4. Ausblick

Die Industrie wendet eine Kombination von in vitro und in vivo Methoden für die Frühphase der Entwicklung (screening mit HTP in der lead identification und optimization) an, um eine gewisse Vorhersagbarkeit des TdP-Risikos zu gewährleisten und potenziell torsadogene NCEs so früh wie möglich und kostenschonend ausschließen zu können.

Die Ergebnisse einiger dieser Verfahren, wie des hERG-Tests, müssen heute relativiert werden. Priyanka Saxena vom Team Prof.Dr.Hering am Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien konnte nachweisen, dass eine gleichzeitige Hemmung von hERG-Kaliumkanal und Calciumkanal vom L-Typ nicht zu TdP führt (British Journal of Pharmacology: hERG Inhibition and AP Prolongation, 2017 Juli 6). Berücksichtigt man diese Erkenntnis nicht beim Screening der NCEs, führt das zum Verlust von potenziellen Wirkstoffen, die zur Weiterentwicklung geeignet gewesen wären.

Ebenso haben die präklinischen in vivo-Modelle eine Verfeinerung erfahren. Die Prüfungen orientieren sich heute an in vivo proarrhythmogenen Indices, die man aus dem TRIaD-Konzept abgeleitet hat.

Die Forschung im Labor nutzt heute nach wie vor die Patch-Clamp Technik, das Nonplusultra zur Erfassung des hERG-Potenzials einer Substanz. Um optimale Perfusions-,wie Applikationsbedingungen zu schaffen, wird häufig auf eine computergestützte, kostenintensive Anlage zurückgegriffen. Vom Autor wurde diese durch ein einfaches manuell zu bedienendes System (Oozytenpool und Perfusionskatafalk, Kap.2.2) ersetzt. Dieses hat sich vor allem auf Grund seiner geringen Störanfälligkeit und einfachen Bedienung bei langer Versuchsdauer (mehrere Stunden bei gleichem Oozyten) äußerst bewährt.

5.Literaturverzeichnis

- Abbott GW et al.MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. Cell 1999; 97:175-187
- Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SAN. MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia.Cell 199;97:175-187
- Antzelevitch C. Arhythmogenic mechanisms of QT prolonging drugs: Is QT prolongation really a problem? J of Electrocard 2004;37:15-24
- Arcangeli A, Rosati B, Cherubini A, Crociani O, Fontana L, Passani B, Wanke E, Olivotto M.Long-term exposure to retinoic acid induces the expression of IRK1 channels in HERG channel-endowed neuroblastoma cells. Biochem and Biophys Res 1998;244:706-711
- Barajs-Martinez H, Ekizalde A, Sanchez-Chapula JA. Developemental differences in delayed rectifying outward current in feline ventricular myocytes. Am J Physiol 2000;278:H484-H492
- Barhanin J et al. KvLQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I_{Ks}cardiac potassium channel.Nature 1996; 384:78-80
- Baukrowitz T, Yellen G. Modulation of K⁺current by frequency and external [K⁺]:A tale of two inactivation mechanisms. Neuron 1995;15:951-960
- Baukrowitz T, Yellen G.Use dependent blockers and exit rate of the last ion from the multiion pore of a K⁺channel.Science 1996;271:653-656
- Belardinelli L,Antzelevitch C, Voss MA.Assessing predictors of drug-induced torsade de pointes.Trends in Pharmacological Science 2003;24:61-625
- Berube J, Chahine M, Daleau P.Modulation of HERG potassium channel properties by external pH.Pflugers Arch1999;438:419-422
- Brandes A, Potratz J, Bethge KP (1998). Die prognostische Bedeutung der QT-Verlängerung.Herzschr Elektrophys 9:203-211
- Bianchi L, Driscoll M, Heterologous expression of C.elegans ion channels in Xenopus oocytes.Worm book,2006
- Brandts BK, Poot L Kaliumströme und die Repolarisation des Herzaktions-potentials.Physiol 2000;15: 10-22
- Brockmeier K, Aslan I, Hilbel T, Eberle T, Ulmer HE, Lux RL.T-wave alternans in LQTS: Repolarization-rate dynamics from digital 12-lead Holter data. J of Electrocard 2001;34:93-96

- Brown CS, Farmer RG, Soberman JE, Eichner SF.Pharmacokinetic factors in the adverse cardiovascular effects of antipsychotic drugs.Clinic Pharmacokin 2004;43:33-56
- Busch AE, Eigenberger B, Jurkiewicz NK, Salata JJ, Pica A, Suessbrich H, Lang F.Blockade of HERG channels by the class III antiarrhythmic azimilide:Mode of action. Br J of Pharmacol 1998; 123:23-30
- Carlsson L, Abrahamson C, Andersson B, Duker G, Schiller-Linhardt G.Proarrhythmic effects of the class III agent almokalant:Importance of infusion rate, QT dispersion, and early afterdepolarization. Cardiovasc Res 1993;27:2186-2193
- Carmeliet E. Voltage- and time-dependent block of the delayed K⁺current in cardiac myocytes by dofetilide.J Pharm Exp Ther 1992;262:809-817
- Cavero I, Mestre M, Guillon JM, Crumb W. Drugs that prolong QT interval as an unwanted effect: assessing their likelihood of inducing hazardous cardiac dysrhythmias.Expert Opinion on Pharmacotherapy 2000;1:947-973
- Cavero I, Crumb W. Native and cloned ion channels from human heart:Laboratory models for evaluating the cardiac safety of new drugs.Eur Heart J 2001;3:K53-K63
- Chezalviel GF,Davy JM,Poirier JM,Weissenburger J. Mexiletine antagonizes effects of sotalol on QT interval duration and its proarrhythmic effects in a canine model of torsade de pointes.J o the Am Coll of Card 1995;26:787-792
- Chiesa N, Rosati B, Arcangeli A, Olivotto M, Wanke E, A novel role for HERG K⁺channels:spike –frequency adaptation.J Physiol Lon; 1997, 501:313-318
- Coetzee WA, Amarillo Y,Chiu J,Chow A,Lau D,Mc Cormack T,Moreno H,Nadal MS,Ozaita A,Pountney D, Saganich M,Vega-Saenz dM, Rudy B.Molecular diversity of K⁺channels.Ann.NY Acad Sci 1999; 868:233-285
- Colombo T, Conzales PO, D Incalci M.Distribution and activity of doxorubicin combined with SDZ PSC 833 in mice with P388 and P388/DOX leukemia.Brit J of Canc 1996;73:866-871
- Compton SJ, Lux RL, Ramsey MR, Strelich KR, Snguinetti MC,Green LS, Keating MT,Mason JW. Genetically defined therapy of inherited long-QT syndrome.Correction of abnormal repolarization by potassium.Circulation 1996; 94:1018-22
- Cui J, Melman Y, Palma E, Fishman GI, Mc Donald TV. Cyclic AMP regulates the HERG K⁺channel by dual pathways. Cur Biol 2000;10:671-674
- Curran ME et al.Amolecular basis for cardiac arrhythmia: HERG Mutations cause long Qtsyndrome.Cell 1995;80:795-803
- Daleau P, Lessard E, Groleau MF, Turgeon J.Erythromycin blocks the rapid component of the delayed rectifier potassium currentr and lengthens repolarization of guinea pig ventricular myocytes.Circ 1995; 91:3010-3016

- De Bruin ML, Petterson M, Meyboom RH, Hoes AW, Leufkens HG. Anti-HERG activity and the risk of drug induced arrhythmias and sudden death.Eur Heart J 2005; 26:590-597
- De Clerck F, Gallacher D.Drug-induced effects on dispersion and heterogeneity of ventricular repolarization beyond its duration in anesthetized dogs.Sci Meeting,Maastricht 2005
- Derst C, Karschin A.Evolutionary link between prokaryotic and eukaryotic K⁺channels.J Exp Biol 1998;201:2791-2799.
- Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, Mac Kinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺conduction ans selectivity, Science 1998;280:69-77
- Drici MD, Burklow TR, Haridasse V, Glazer RI, Woosley RL .Sex hormones prolong the QT-Interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart.Circulation 1996;94:1471-1474
- Eckhardt L,Breithardt G, Haverkamp W. Electophysiologic characterization of the antipsychotic drug sertindole in a rabbit heart model of torsade de pointes.Low torsadogenic potential despite QT prolongation.J of Pharm and Exper Therap 2001;300:64-71
- Fan JS. Jinag M, Dun W, Mc Donald TV, Tseng GN. Effects of outer mouth mutations on hERG channel function. A comparison with similar mutations in the Shaker channel.Biophys J 1999;76:3128-3140
- Farrelly AM et al.Expression and function of KCNH2(HERG) in the human jejunum.Am J Physiol, 2003; 284: G883-G895
- Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S. Antisense oligonucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺current in cultured adult human atrial myocytes. Circ Research 1997;80:572-579
- Fermini B, Fossa AA.The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development. Nature Rev Drug Disc 2003;2:439-447
- Fernandez D,Ghanta A, Kauffman GW, Sanguinetti MC.Physicochemical features of the hERG channel drug binding site.J Biol Chem 2004;279:10120-10127
- Fernandez D, Ghanta A, Kinard KI, Sanguinetti MC. Molecular mapping of a site for Cd²⁺induced modification of human ether-a-go-go-related gene (hERG) channel activation.J Physiol Lon 2005; 567:737-755
- Ficker E, Jarolimek W, Kiehn J, Baumann A, Brown AM. Molecular determinants of dofetilide block of HERG K⁺channels.Circ Res 1998;82:386-395
- Follmer CH, Colatsky TJ.Block of delayed rectifier potassium current, I_K, by flecainide and E-4031 in cat ventricular myocytes.Cic 1990;82:289-293
- Forth W, Henschler D, Rummel W, Forstermann U, Starke K.Pharmakologie und Toxikologie,8.Aufl.,2001, 429-437

- Gintant GA, Limberis JT, Mc Dermott JS, Wegner CD,Cox EF.The canine Purkinje fiber:An in vitro model system for acquired long QT syndrome and drug-induced arrhythmogenesis.J of Cardiov.Pharmacol. 2001;37:607-618
- Goldin AL. Xenopus Oocytes as an Expression System for Ion Channels.Molecular and Cellular Biology of Pharmacological Targets,NY, 1993
- Gong Q, Keeney DR, Molinari M, Zhou Z. Degradation of trafficking-defective long Qtsyndrom type II mutant channels by the ubiquitin-proteasome pathway.J Biol Chem 2005; 280:19419-19425
- Gralinski MR. The assessment of potential for QT intervalprolongation with new pharmaceuticals:Impact on drug development.J of Pharmacolog and Toxicolog Meth.2000;43:91-99
- Grimm W.Elektrokardiographie tachykarder Rhythmusstörungen, 1996;1-12
- Gurdon JB.The translation of messenger RNA injected in living oocytes of Xenopus laevis.Acta Endocrinol Suppl.1973;180:225-243
- Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Hördt M, Wedekind H, Funke H, Borggrefe M, Assmann G,Breithardt G. QT-Syndrome.Dt Ärztebl 1997;94: A667-A672
- Haverkamp W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antezelevich C, Escande D, Franz M, Malik M, Moss A, ShahR and the other speakers in the session and the chairs of the workshop (2000) The potential for QT prolongation and proarrhythmia by nonantiarrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a policy conference of the European Society of Cardiology. Eur Heart J21:1216-1231

Haverkamp W, Breithardt G. Moderne Herzrhythmustherapie, 2003; 8-28

- Hille B, Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Assoc.Mass.,2003
- Hoffmann P, Warner B.Are hERG channellinhibition and QT-interval prolongation all there is in drug-induced torsadogenesis?A review of emerging trends.J of parmacolog and Toxicolog Meth 2006;53:7'87-105
- Hondeghem LM, Carlsson L, Duker G. Instability and triangulation of the action potential predict serious proarrhythmia, but action potential duration prolongation is antiarrhythmic. Circ 2001;103:2004-2013
- Hondeghem LM, Hoffmann P. Blinded test in isolated female rabbit heart reliably identifies action potential duration prolongation and proarrhythmic drugs: Importance of triangulation, reverse use dependence, an instability.J of Cardiov.Pharmacol. 2003;41:14-24
- Honig PK, Wortham DC, Zamani K, et al.Terfenadine-ketoconazole interaction:pharmacokinetic and electrocardiographic consequences.J of Am Med Assoc 1993; 269:1513-1518

- Hoorntje T, Alders M, van Tintelen P, van derLip K, Sreeram N, van der Wal A, Mannens M, Wilde A.Homozygous premature truncation of the HERG protein. Circ 1999;100:1264-1267
- Hördt M, Haverkamp W, Oberwittler C,Lüdemann P, Borggrefe M, Ringelstein EB, Breihardt G.Das idiopathische QT-Syndrom als Ursache epileptischer und nicht epileptischer Anfälle.Nervenarzt 1995; 66:282-7
- Jiang M, Dun W, Tseng GN.Mechanism for the effects of extracellular acidification on hERG channel function.Am J Physiol 1999;277:H1283-H1292
- Jiang M, Cabo C, Yao J-A, Boyden PA, Tseng GN.Delayed rectifier K-currents have reduced amplitudes and altered kinetics in myocytes from infarcted canine ventricle.Cardiov Res 2000;48:34-43
- Jiang Y et al. Crystal structure and mechanism of calcium-gated potassium channel.Nature 2002; 417:515-522
- Jiang Y, Lee A, Cadene M, Chait BT, Mac Kinnon R, The open pore conformation of potassium channels. Nature 2002,417:523-526
- Jiang Y et al.X-ray structure of a voltage-dependent K⁺channel.Nature 2003,423:33-41
- Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, Mac Kinnon R. The principle of gating charge movement in voltage dependent K⁺channel.Nature 2003; 423:42-48
- Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC.Rate dependent prolongation of cardiac action potentials by methanesulfonilide class III anti-arrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺current by dofetilide.Circ Res 1993; 72:75-83
- Kagan A, Yu Z, Fishman GI, Mc Donald TV. The dominant negative LQT2 mutation A561V reduces wild-type HERG expression.J Biol Chem 2000;275:11241-11248
- Kiehn J, Lacerda AE, Wible B, Brown AM. Molecular physiology and pharmacology of HERG.Sindle-channel currents and block by dofetilide.Circ 1996;94:2572-2579
- Kiehn J, Karle C, Thomas D, Yao X, Brachmann J, Kubler W. HERG potassium channel activation is shifted by phorbol esters via protein kinase A-dependent pathways.J Biol Chem 1998;273:25285-25291
- Kiss L, Korn SJ. Modulation of C-type inactivation by K⁺at the potassium channel selectivity filter.Biophys J 1998;74:1840-1849
- Kiss L, Immke D, Lo Turco J, Korn SJ. The ineraction of Na⁺and K⁺ in voltage-gated potassium channels.Evidence for cation binding sites of different affinity.J Gen Physiol 1998;111:195-206
- Krause HF, Antihistamines and decongestants. Otolaryngology-Head and Neck Surgery 1992;107:835-840

- Kupershmidt S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Niswender KD, Magnuson MA, Roden DM.Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system.Circ Res 1999;84:146-152
- Kuryshev YA et al.Pentamidine induced long QTsyndrome and block of hERG trafficking.J Pharmacol Exp Ther 2005;312:316-323
- Laine M, Papazian DM, Roux B.Critical assessment of a proposed model of Shaker FEBS Lett 2004; 564:257-263
- Larsson HP, Baker OS, Dhillon DS, Isacoff EY.Transmembrane movement of the Shaker K⁺channel S4. Neuron 1996; 16:387-397
- Lees-Miller JP, Kondo C, Wang L, Duff HJ.Electrophysiological characterization of an alternatively processed ERG K⁺channel in mouse and human hearts. Cic Res 1997;81:719-726
- Lees-Miller JP, Duan Y, Tsen GQ, Duff HJ. Molecular determinant of high affinity dofetilide binding to HERG1 expressed in Xenopus oocytes: involvement of S6 sites. Mol Pharm 2000;57:367-374
- Lees-Miller JP, Swirp SL, Schade KJ, Thorstad K, Rancourt DE, Duff HJ. Selective knockout of the ERG1B potassium channel: a mouse model for the long QTsyndrome.Circ 2000;102:II-285
- Liu J,Zhang M, Jiang M, Tseng GN. Negative charges in the transmembrane domains of the HERG K channel are involved in the activation and deactivation-gating processes.J Gen Physiol 2003;121:599-614
- Locati EH, Maison-Blanche P, Dejode P, Cauchemez B, Coumel P.Spontaneous sequences of onset off torsade de pointes in patients with acquired prolonged repolarization quantitative analysis of holter recordings.Jam Voll Cardiol 1995;25:1564-1575
- London B et al.Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K⁺current.Cic Res 1997;81:870-878
- Long SB, Campbell EB, Mac Kinnon R, Crystal structure of mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺channel.Science 2005; 309:897-903
- Long SB, Campbell EB,Mac Kinnon R, Voltage sensor of Kv1.2. structural basis of electromechanical coupling.Science 2005; 309:903-908
- Lopatin AN, Nichols CG.Inward Rectifiers in the heart: an update on I_{K1} .J Mol Cell Cardiol 2001; 33:625-38
- Lundquist AL et al. Expression of multiple KCNE genes in human heart may enable variable modulation of I_{Ks}.J Mol Cell Cardiol 2005;38:277-287

- Lüderitz B.Therapie der Herzrhythmusstörungen- Leitfaden für Klinik und Praxis,5.Aufl., 1998:40-52
- Mc Donald TV, Yu Z, Ming Z, Palma E, Meyers MB, Wang KW, Goldsteine SAN, Fishman GI. A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I_{Kr}. Nature 1997;388:289-292
- Mergenthaler J, Haverkamp W, Huttenhofer A, Skryabin BV, Musshoff U, Borggrefe M, Speckmann EJ, Breithardt G, Madeja M. Blocking effects of the antiarrhythmic drug propafenone on the HERG potassium channel. Naunyn-Schmiedebergs Arch of Pharmacol 2001;363:472-480
- Milnes JT, Crociani O, Arcangeli A, Hancox JC, Witchel HJ. Blockade of HERG potassium currents by fluvoxamine: Incomplete attenuation byS6 mutations at F656 or Y652. Br J of Pharm 2003;139:887-898
- Minematsu T, Ohtani H, Yamada Y, Sawada Y, Sato H, Iga T.Quantitative relationship between myocardial concentration of tacrolimus and QT prolongation in guinea pigs.J of Pharmacokin and Pharmacodyn 2001;28:533-554
- Mitcheson JS, Chen J, Sanguinetti MC.Trapping of a methanesulfonanilide by closure of the HERG Potassium channel activation gate. J Gen Physiol 2000;115:229-239
- Monahan BP, Ferguson CL, Killeavy ES, et al.. Torsades de pointes occuring in association with terfenadine use.J of Am Med Assoc 1990; 264:2788-2790
- Morais Cabral JH et al. Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel.N terminus: an eukaryotic PAS domain. Cell 1998;95:649-655
- Moss AJ.Measurement of the QT-Interval and the risk associated with Qtc interval prolongation:a review.Am J Cardiol 1993;72:23B-25B
- Moss AJ,Zareba W, Hall WJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Benhorin J, Vincent GM,Locati EH, Prioi SG, Napolitano C, Medina A, Zhang L, Robinson JL, Timothy K, Towbin JA, Andrews ML.Effectiveness and limitations of β-blocker therapy in congenital long-QT syndrome.Circulation, 2000;101: 616-23
- Moss AJ.Long QT-syndrome.J Am Med Assoc;289:2041-2044
- Nerbonne J.Molecular basis of functional voltage-gated K⁺-channel diversity in the mammalian myocardium,J Physiol Lon2000; 525:285-298
- Netzer R, Bischoff H, Ebneth A.HTS techniques to investigate the potential effects of compounds on cardiac ion channels at early drug discovery.Current Opinion in Drug Discovery and Development.2003;6:462-469
- Numaguchi H, Johnson JPJ, Petersen Ci, Balser JR.A sensitive mechanism for cation modulation of potassium current.Nature Neuroscience 2000;3:429-430

- Numaguchi H, Mullins FM, Johnson jr. JP, Johns DC, Po SS, Yang IC, Tomaselli GF, Balser JR. Probing the interaction between inactivation gating and Dd-sotalol block of HERG.Circ Res 2000;87:1012-1018
- Pinto JMB, Boyden PA. Reduced inward rectifying and increased E-4031-sensitive K⁺current density in arrhythmogenic subendocardial Purkinje myocytes from the infarcted heart.J Cardiov Electrophysiol 1998;9:299-311
- Piper DR, Varghese A, Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. Gating currents associated with intramembrane-charge displacement in HERG potassium channels.Proc Natl Acad Sci,USA,2003;100:10534-10539
- Piper DR, Hinz WA, Tallurri CK, Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. Regional specificity of human ether-a-go-go-related gene channel activation and inactivation gating.J Biol Chem 2005; 280:7206-7217
- Po SS, Wang DW, Yang ICH, Johnson JP, Nie L, Bennett PB. Modulation of HERG potassium channels by extracellular magnesium and quinidine.J of Cardiovasc Pharm 1999;33:181-185
- Posson DJ, Ge P, Miller C, Bezanilla F, Selvin PR. Small vertical movement of a K⁺channel voltage sensor measured with luminescence energy transfer.Nature 2005;436:848-851
- Pourrier M, Zicha S, Ehrlich J, Han W, Nattel S. Canine ventricular KCNE2 expression resides predominantly in Purkinje fibers.Circ Rs 2003; 93:189-191
- Rajamani S, Anderson CL, Anson BD, January CT.Pharmacological rescue of human K⁺channel long-QT2 mutations: human ether-a-go-go-related gene rescue without block.Circ 2002;105:2830-2835

Rangno R.Terfenadine therapy:Can we jusrify the risk?.Can Med Assoc J 1997;157:37-38

- Recanatini M, Poluzzi E, Masetti M, Cavalli A, De Ponti F. QT prolongation through HERG K⁺channel blockade: current knowledge and strategies for the early prediction during drug development.Med Res Rev 2005;25:133 166
- RedfernWS, Carlsson L,Davis AS,Lynch WG, Mac Kenzie I, Palethoroe S, et al.Relationship between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT-interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs:Evidencefor a provisional safety margin in drug development. Cardiovasc Res 2003;58:32-45
- Riley DC, Schmeling WT, Al-Wathiqui MH,Kampine JP, Warltier DC.Prolongation of the QT interval by volatile anesthetics in chronically instrumented dogs.Anesth and Analg 1988;67:741-749
- Roden DM.Taking the "idio" out of "idiosyncratic":Predicting torsades de pointes.PACE 1998;21:1029-34
- Roden DM, Kupershmidt S. From genes to channels:Normal mechanisms.Cardiovasc Res 1999;42:318-326

- Roden DM, Balser JR, George AL Jr, Anderson ME. Cardiac iron channels .Annu Rev Physiol 2002; 64:431-75.Review.
- Roden DM.Drug-induced prolongation of the QT-interval.New Engl J of Med 2004;350:1013-1022
- Ruta V, Chen J, Mac Kinnon R. Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K⁺channel.Cell 2005;123:463-475
- Saint DA, Chung SH. Variability of channel sobconductance states of the cardiac sodium channel induced by protease. Receptors and Channels 1999;6:283-294
- Sanguinetti M, Jurkiewics N, Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ currents.Differential sensivity to block by classIII antiarrhythmic agents, J Gen Physiology 1990;96:195-215
- Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Role of external Ca²⁺and K⁺ in gating of cardiac delayed rectifier K⁺currents. Pflugers Archiv 1992;420:180-186
- Sanguinetti MC, Jiang, C, Curran ME, Keating MT, A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia:HERG encodes the I_{Kr} potassium channel.Cell 1995; 81:299-307
- Sanguinetti MC et al.Coassembly of KvLQT1 and minK(IsK) proteins to form cardiac I_{Ks}potassium channel.Nature 1996;384:80-83
- Sanguinetti MC, Xu QP.Mutations of the S4-S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in Xenopus oocytes. J Physiol 1999;514:667-675
- Sanguinetti MC, Mitcheson JS. Predicting drug-hERG channel interactions that cause acquired long QTsyndrome.Trends Pharmacol Sci2005;26:119-124
- Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia.Nature 2006;440:463-469
- Scherer CR, Lerche C, Decher N Dennis A, Maier P, Ficker E, Busch AE, Wollnik B, Steinmeyer K. The antihistamine fexofenadine does not affect I_{Kr} currents in a case report of drug-induced cardiac arrhythmia. Br J of Pharm 2002,137:892-900
- Schmidt R, Lang F, Thews G. Physiologie des Menschen, 29.Aufl.2004;564-574
- Schwartz PJ.The long QT syndrome.Futura Publishing, Armonk, New York, 1997
- Schwarz W, Rettinger J.Elektrophysiologie, Shaker Verl., Aachen, 2004
- Sesti F, Abbott GW, Wei J, Murray KT Saksena S, Schwartz PJ, Priori SG, Roden DM, George AL, Goldstein SAN. A common polymorphism associated with antibioticinduced cardiac arrhythmia. Pro Natl Acad Sci 2000;97:10613-10618

- Shah R, Ramirez RJ, Oudit GY, et alt. Regulation of cardiac excitation contraction coupling by action potential repolarization: role of the transient outward potassium current (Ito 1). Physiol 2003;546:5-18.
- Shah RR.Drug-induced QT-interval prolongation:Regulatory guidance and perspectives on hERG channel studies.Novartis found.symp., 2005;266: 251-280
- Shi W et al.Identification of two nervous system-specific members of the erg potassium channels gene family.J Neurosci 1997; 17:9423-9432
- Shibasaki T. Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart. J Physiol 1987;387:227-250
- Smith GA, et al.Functional up-regulation of HERG K⁺channels in neoplastic hermatopoietic cells.J Biol Chem,2002; 277:18528-18534
- Smith PL, Baukrowitz T, Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. Nature 1996;379:833-836
- Smith SJ, Cardiovascular toxicity of antihistamines.Otolaryngology-Head and Neck Surgery 1994;111:348-354
- Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC.Fast inactivation causes rectification of the I_{Kr} channel.J Gen Physiol 1996;107:611-619
- Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori SG, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. Spectrum of mutations in long Qtsyndrome genes KvLQT1,HERG,SCN5A, KCNE1 and KCNE2. Circ 2000;102:1178-1185
- Spooner P, Rosen M (editors). Foundations of Cardiac Arrhythmies- Basic Concepts and Clinical Approaches, 2001, 21-42
- Stramba-Badiale M, Priori SG, Napolitano C, Locati EH, Vinolas X, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Goulene K, Schwartz PJ.Gene-specific differences in the cicardian variation of ventricular repolarization in the long QT syndrome: a key to sudden death during sleep?Ital heart J 2000;1:323-8
- Subbiah RN, Kondo M, Campbell TJ, Vandenberg JI.Tryptophan scanning mutagenesis of the HERG K⁺channel: The S4 domain is loosely packed and likely to be lipid exposed. J Physiol Lon 2005;569:367-379
- Tamargo J,Caballero R, Gomez F, Valenzuela C, Delpon E.Pharmacology of cardiac potassium channels.Cardiovascular Research 2004;62:9-33
- Taylor BL, Zhulin IB. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential and light.Microbiol Mol Biol Rev 1999; 63:479-506

Taylor D.Ziprasidone in the management of schiziphrenia.CNS Drugs 2003;17:423-430

- Thomas D, Zhang W, Karle CA, Kathofer S, Schols W, Kubler W, Kiehn J.Deletion of protein kinase A phosphorylation sites in the HERG potassium channel inhibits activation shift by protein kinase A. J Biol Chem 1999;274:27457-27462
- Thomas D,Zhang W, Wu K, Wimm AB, Gut B, Wendt-Nordahl G, Kathöfer S, Kreye VAW,Katus HA, Schöls W, Kiehn J, Karle CA. Regulation of HERG potassium channel activation by protein kinase C independent of direct phosphorylation of the channel protein. Cardio Vasc Res.2003;59:14-26
- Thomas D, Karle CA, Kiehn J. Modulation of HERG potassium channel function by drug action. Ann Med 36.2004;36:41-46
- Trudeau M,Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA.HERG a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family.Science, 1995; 269:92-95
- Tseng GN, Abbott GW, Jiang M. hMiRP1 modulates the gating kinetics and pharmacology of transient outward current.Circ 2000;102:II-285
- Tseng GN. IKr-The hERG Channel, Mol Cell Cardiol 2002;33:835-849
- Valentin JP, Hoffmann P, De Clerck F, Hammond TG, Hondeghem L. Review of the predictive value of the Langendorff heart model (Screenit system) in assessing the proarrhythmic potential of drugs.J of Pharmacol and Toxicolog Meth 2004;49:171-181
- Veldkamp MW, van Ginneken ACG, Bouman LN.Single delayed rectifier channels in the membrane of rabbit ventricular myocytes.Circ Res 1993;72:865-878
- Vereecke J, Carmeliet E. The effect of external pH on the delayed rectifying K⁺current in cardiac ventricular myocytes.Pflugers Arch 2000;439:739-751
- Viswanathan PC, Rudy Y.Pause induced early afterdepolarizations in the long QT syndrome: a stimulation study.Cardiovasc Res 1999;42:530-542
- Voss MA, Verduyn SC, Gorgels APM, Lipcsei GC, Wellens HJJ.Reproducible induction of early afterdepolarizations and chronic atrioventricular block.Circ 1995;91:864-872
- Wang J, Trudeau MC, Zappia AM, Robertson GA.Regulation of deactivation by an amino terminal domain in Human ether-a-go-go-gene potassium channels.J Gen Physiol 1998;112:637-647
- Wang J, Myers CD, Robertson GA.Dynamic control of deactivation gating by a soluble smino-terminal domain in HERG K⁺channels.J Gen Physiol 2000;115:749-758
- Wang S, Morales MJ, Liu S, Strauss HC, Rasmusson RL. Modulation of HERG affinity for E-4031 by [K⁺]₀ and C-type inactivation.FEBS letters 1997;417:43-47
- Wang S, Liu S, Morales MJ, Strauss HC, Rasmusson RL. A quantitative analysis of the avtivation and inactivation kinetics of HERG expressed in Xenopus oocytes.J Physiol 1997;502:45-60

- Warmke JW, Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to eag in Drosophila and mammals.Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:3438-3442
- Warner B,Hoffmann P.Investigation of the potential of clozapine to cause Torsade de Pointes.Adv Drug React and Toxicolog Rev 2002;21:189-203
- Webster SM, Del Camino D,Dekker JP, Yellen G. Intracellular gate opening in Shaker K⁺channels defined by high-affinity metal bridges.Nature 2004; 428:864-868
- Weerapura M, Nattel S, Chartier D, Caballero R, Hebert TE.A comparison of currents carried by HERG , with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current.Is MiRP1 the missing link?.J of Physiol 2002;540:15-27
- Weiss M, Kang W. P-glycoprotein inhibitors enhance saturable uptake of idarubicin in the rat heart. J of Pharmac and Experim Therap 2002;300:688-694
- Witchel HJ, Hancox JC.Familial and acquired long QT syndrome and the cardiac rapid delayed rectifier potassium current.Clin Exp Pharmacol Physiol 2000; 27:753-766
- Witchel HJ, Milnes JT, Mitcheson JS, Hancox JC.Troubleshooting problems with in vitro screening of drugs for QT onterval prolongation using HERG K⁺channels expressed in mammalian cell lines and Xenopus oocytes.J of Pharmacol and Toxicol Methods, 2002/2003;48:65-80
- Yang T, Kupershmidt S, Roden DM.Anti-minK antisense decreases the amplitude of the rapidly activating cardiac delayed rectifier K⁺current.Circ Res 1995;77:1246-1253
- Yang T, Snyders DJ, Roden DM.Rapid inactivation determines the rectification and [K⁺]₀ dependence of the rapid component of the delayed rectifier K⁺current in cardiac cells.Circ Res 1997;80:782-789
- Yellen G, The voltage-gated potassium channels and their relatives.Nature 2002; 419:35-42
- Yoshida H,Furuta T.Tissue penetration properties of macrolide antibiotics.Jap J of Antibiotics 1999; 52:497-503
- Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent M, Robinson JL, Priori SG, Benhorin J, Locati EH, Towbin JA, Keating MT, Lehmann MH, Hall WJ. Influence of the genototype on the clinical course of the long-QT syndrome.N Engl J Med 1998;339:960—5
- Zhang M, Liu J, Tseng GN. Gating charges in the activation and inactivation processes of the HERG channel.J Gen Physiol 2004; 124:703-718
- Zou A, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC. Single HERG delayed rectifier K⁺channels expressed in Xenopus oocytes.Am J Physol 1997;272:H1309-H1314