



universität  
wien

# DISSERTATION

Titel der Dissertation

Kanalzustandsabhängige Dissoziation von hERG-Kanalblocker

angestrebter akademischer Grad

Doktor/in der Naturwissenschaften (Dr. rer.nat.)

|                          |                                |
|--------------------------|--------------------------------|
| Verfasserin / Verfasser: | Daniela Stork-Riedler          |
| Matrikel-Nummer:         | 9506972                        |
| Dissertationsgebiet:     | Pharmakologie und Toxikologie  |
| Betreuerin / Betreuer:   | Univ.-Prof. Dr. Steffen Hering |

Wien, am 07. März 2009

## Inhaltsverzeichnis:

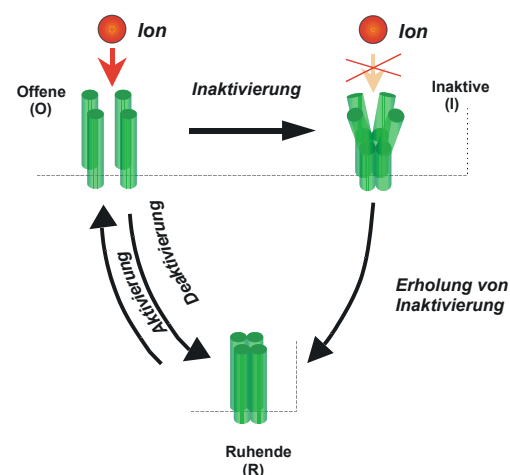
|          |                                                                                                    |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>                                                                                  | <b>1</b>  |
| 1.1      | <b>Ionenkanäle</b>                                                                                 | <b>1</b>  |
| 1.2      | <b>Das Aktionspotential im Herzmuskel</b>                                                          | <b>2</b>  |
| 1.3      | <b>Kaliumkanäle</b>                                                                                | <b>3</b>  |
| 1.3.1    | Der Selektivitätsfilter von Kaliumkanälen                                                          | 4         |
| 1.3.2    | Struktur und Klassifikation von Kaliumkanälen                                                      | 5         |
| 1.3.2.1  | „inward rectifier“ ( $K_{ir}$ )                                                                    | 6         |
| 1.3.2.2  | $K_{2p}$                                                                                           | 7         |
| 1.3.2.3  | Spannungsabhängige Kaliumkanäle ( $K_v$ )                                                          | 7         |
| 1.4      | <b><math>K^+</math>-Ströme während eines AP</b>                                                    | <b>7</b>  |
| 1.5      | <b>hERG:</b>                                                                                       | <b>10</b> |
| 1.5.1    | Gating                                                                                             | 10        |
| 1.5.1.1  | Langsame Aktivierung                                                                               | 11        |
| 1.5.1.2  | Langsame Deaktivierung                                                                             | 13        |
| 1.5.1.3  | Inaktivierung                                                                                      | 13        |
| 1.5.2    | Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen an hERG-Kanälen                                                 | 14        |
| 1.6      | <b>Das long QT Syndrom</b>                                                                         | <b>16</b> |
| 1.6.1    | Das angeborene long QT-Syndrom                                                                     | 16        |
| 1.6.2    | Das erworbene long QT-Syndrom                                                                      | 19        |
| 1.7      | <b>Pharmakologie des hERG-Kanals</b>                                                               | <b>22</b> |
| 1.8      | <b>„Trapping“</b>                                                                                  | <b>26</b> |
| 1.8.1    | D540K Mutante                                                                                      | 27        |
| 1.9      | <b>hERG-Kanalblocker</b>                                                                           | <b>28</b> |
| 1.9.1    | Antiarrhythmika                                                                                    | 28        |
| 1.9.2    | Psychopharmaka                                                                                     | 31        |
| 1.9.3    | Antihistaminika                                                                                    | 33        |
| 1.9.4    | Prokinetika                                                                                        | 33        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden</b>                                                                       | <b>35</b> |
| 2.1      | <b>Lösungen</b>                                                                                    | <b>35</b> |
| 2.2      | <b>Zellbiologische Methoden</b>                                                                    | <b>36</b> |
| 2.2.1    | Xenopus laevis Oozyten als Expressionssystem                                                       | 36        |
| 2.2.2    | Oozytenpräparation                                                                                 | 36        |
| 2.2.3    | Mikroinjektion von RNA                                                                             | 37        |
| 2.3      | <b>Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik</b>                                                  | <b>38</b> |
| 2.3.1    | Durchführung der Messung                                                                           | 39        |
| 2.3.2    | Spannungsprotokolle                                                                                | 40        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b>                                                                                  | <b>42</b> |
| 3.1      | <b>Inaktive Substanzen:</b>                                                                        | <b>43</b> |
| 3.2      | <b>Wirksame Substanzen</b>                                                                         | <b>44</b> |
| 3.2.1    | Tonische Blocker                                                                                   | 45        |
| 3.2.2    | „use-dependent“ Blocker                                                                            | 45        |
| 3.2.2.1  | Verschiedene Blockkinetik bei „use-dependent“ Blockern:                                            | 46        |
| 3.2.2.2  | Konzentrationsabhängigkeit des Blocks                                                              | 47        |
| 3.2.2.3  | Der Effekt der Pulsfrequenz auf die Blockentwicklung                                               | 47        |
|          | <u>Frequenzabhängige hERG-Kanalblocker</u>                                                         | 48        |
|          | <u>Frequenzunabhängige hERG-Kanalblocker</u>                                                       | 50        |
| 3.2.2.4  | Erholung des ruhenden hERG-Kanals vom Block mit Amiodaron,<br>Droperidol, Haloperidol und Cisaprid | 52        |
| 3.2.2.5  | Die Kanalaktivierung beschleunigt die Erholung vom Block                                           | 56        |

|            |                                                                                                                            |            |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.2.6    | Mutation D540K erlaubt den getrappten Substanten bei starker Membranhypervolarisierung vom hERG-Kanal zu dissoziieren..... | 57         |
| 3.2.2.7    | Die Abhängigkeit der IC <sub>50</sub> -Bestimmung von der Testpulsfrequenz..                                               | 58         |
| 3.2.2.8    | Abhängigkeit des Blocks von der Vorpulslänge .....                                                                         | 59         |
| 3.2.2.9    | Untersuchungen mit Hilfe der Doppelmutante G628C/S631C .....                                                               | 63         |
| <b>4</b>   | <b>Diskussion .....</b>                                                                                                    | <b>67</b>  |
| <b>5</b>   | <b>Anhang .....</b>                                                                                                        | <b>75</b>  |
| <b>5.1</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>                                                                                               | <b>75</b>  |
| <b>5.2</b> | <b>Abstract .....</b>                                                                                                      | <b>76</b>  |
| <b>5.3</b> | <b>Abkürzungen .....</b>                                                                                                   | <b>77</b>  |
| <b>5.4</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>                                                                                          | <b>79</b>  |
| <b>5.5</b> | <b>Lebenslauf .....</b>                                                                                                    | <b>98</b>  |
| <b>5.6</b> | <b>Publikation .....</b>                                                                                                   | <b>99</b>  |
| <b>5.7</b> | <b>Danksagung .....</b>                                                                                                    | <b>100</b> |

## 1 Einleitung

### 1.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind porenbildende Membranproteine, die Ionen das selektive Passieren der Zellmembran ermöglichen. Sie sind für die Signalübertragung im Herz, Nervensystem und in den Muskeln verantwortlich und werden in erregbaren, aber auch in nicht erregbaren Zellen exprimiert. Ionenkanäle sind selektiv für  $\text{Na}^+$  (Natriumkanäle),  $\text{K}^+$  (Kaliumkanäle),  $\text{Ca}^{2+}$  (Kalziumkanäle) und  $\text{Cl}^-$  (Chloridkanäle). Unselektive Ionenkanäle leiten verschiedene Ionenspezies (z.B. TRP-Kanäle, transient receptor potential channels). In der Regel öffnen oder schließen Ionenkanäle durch die Protein-Konformationsänderung. Es werden drei funktionelle Zustände eines Kanals (ruhend, offen, inaktiviert) unterschieden. Den Übergang vom ruhenden in den offenen Zustand nennt man Aktivierung und die Rückkehr in den ruhenden Zustand wird als Deaktivierung bezeichnet. Den Übergang vom offenen in den inaktivierten Zustand nennt man Inaktivierung. Die Kanäle im ruhenden und inaktivierten Zustand sind für die Ionen nicht durchlässig. Um den Ionenfluß in oder aus der Zelle zu gewährleisten, müssen sich die Ionenkanäle in offenem Zustand befinden. Die ruhenden Kanäle gehen direkt über die Aktivierung in offene über wobei die inaktiven Kanäle sich erst von der Inaktivierung erholen müssen um in den offenen Zustand überzugehen (Hille, 2001).



**Abb. 1** Illustration der Konformationsänderungen eines spannungsabhängigen Ionenkanals während einer Depolarisation.

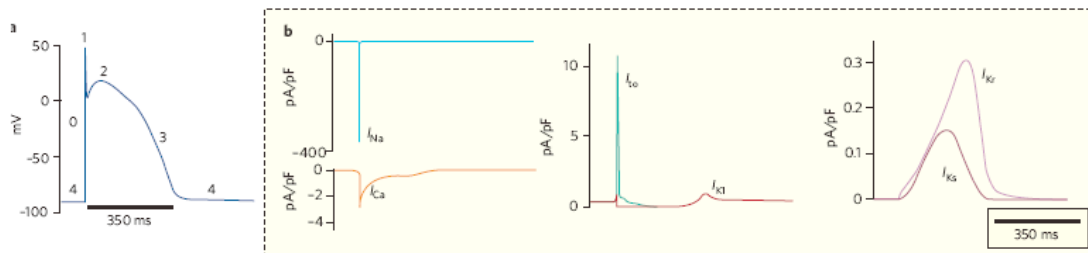
Die Kanalöffnungen können durch Spannungsänderung der Zellmembran (spannungsabhängige Ionenkanäle wie  $I_{Na}$ ,  $I_K$ ,  $I_{Ca-L}$ , siehe Abb.1) oder durch andere Reize z.B. Interaktion mit Hormonen oder Neurotransmittern (Liganden-gesteuerte Ionenkanäle) induziert werden. Die spannungsabhängigen Ionenkanäle können zusätzlich durch die Liganden moduliert werden, während Liganden-gesteuerte Ionenkanäle selten durch Spannungsänderung an der Membran beeinflusst werden (Hii Hui Tie, 2002). Ionen fließen passiv durch den Kanal, in Abhängigkeit vom chemischen Konzentrationsgradienten. Die Richtung hängt vom chemischen und elektrischen Konzentrationsgradienten ab. Da die Ionen geladen sind, bewegen sie sich ebenfalls in einem elektrischen Feld. Die Spannung bei der chemische und elektrische Triebkraft im Gleichgewicht stehen, nennt man das Nernst'sche Potential.

## **1.2 Das Aktionspotential im Herzmuskel**

Das Aktionspotential im Herzmuskel breitet sich mit Geschwindigkeiten von einigen Metern pro Sekunde aus und leitet eine Kontraktion ein. Nach Hodgkin und Huxley wird dieses Signal durch einen schnellen Feedback-Prozess ermöglicht, bei dem die Membrandepolarisation initial auf Ionenkanäle wirkt und  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  ins Zellinnere fließen (Hodgkin und Huxley, 1952). Die durch den Fluss positiver Ionen induzierte Depolarisation führt zur Öffnung weiterer Kanäle (positives Feedback), die ein weiteres positives Feedback induzieren oder aber ihm entgegen wirken (negatives Feedback). Beispiel für negatives Feedback sind  $K^+$  oder  $Cl^-$  Kanäle, welche das Membranpotential verringern und somit die Erregung beenden (Yellen, 2002).

Die Veränderungen des Membranruhepotentials während einer Herzaktion resultieren auch aus Aktivierungs- und Inaktivierungsvorgängen verschiedener ionaler Einwärts- und Auswärtsströme. (Yap und Camm, 1999). Der Natriumeinwärtsstrom bestimmt die Depolarisation (Phase 0). Das Membranpotential steigt von  $-90$  mV auf  $+30$  mV und das Aktionspotential steigt steil an. Innerhalb von 2 ms schließen sich die  $Na^+$ -Kanäle wieder, das Aktionspotential fällt nach einer kurzen, unvollständigen Repolarisation nur

leicht ab (Phase 1). Ein langsamer  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsstrom, der wichtig für die elektromechanische Kopplung ist, bedingt das Plateau des Aktionspotentials (Phase 2). Hier halten sich depolarisierende Einwärtsströme ( $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ ) und auswärtsgerichtete  $\text{K}^+$ -Ströme die Waage. Phase 3 repräsentiert die Repolarisation durch Kaliumkanäle und ist somit für die Wiederherstellung des Ruhezustandes (Phase 4) zuständig.



**Abb. 2** a) Aktionspotential einer humanen Ventrikelzelle mit Phasen von 0-4 b) Ionenkanalströme während des gesamten Aktionspotentials (aus Sanguinetti und Tristani-Firouzi, 2006)

Zum Auslösen eines Aktionspotentials ist ein Reiz (Depolarisation) ausreichender Stärke erforderlich. Nach Überschreiten des Schwellenpotentials (-75 mV) kommt es durch Öffnung der  $\text{Na}^+$ -Kanäle zu einer Depolarisation der Zellmembran, die so stark ist, dass eine fortgeleitete Erregung und die kaskadenartige Öffnung weiterer Kanäle folgt (Forth, 2001).  $\text{K}^+$ -Kanäle induzieren eine Repolarisation der Membran, durch die Aktionspotentiale häufig abgeschlossen werden. (MacKinnon, 2003)

### 1.3 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind selektiv für die  $\text{K}^+$ -Ionen. Neben ihrer Schlüsselrolle während der Repolarisation der Membran (Abb. 2) können Änderungen der intrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration die Regulation des Zellvolumens und die Hormonausschüttung beeinflussen (Coetzee *et al.*, 1999). Bei ligandengesteuerten Kaliumkanälen ist die Öffnung von der Pore energetisch mit der Bindung von einem Liganden gekoppelt, d.h. kleinen organischen Molekülen oder ggf. einem großen Protein. Bei spannungsabhängigen  $\text{K}^+$ -Kanälen ist die Öffnung der Pore an die Bewegung des geladenen

Spannungssensors gekoppelt. Der Spannungssensor wird von Arginin-hältigen S4 Segmenten der Proteine gebildet.

### 1.3.1 Der Selektivitätsfilter von Kaliumkanälen

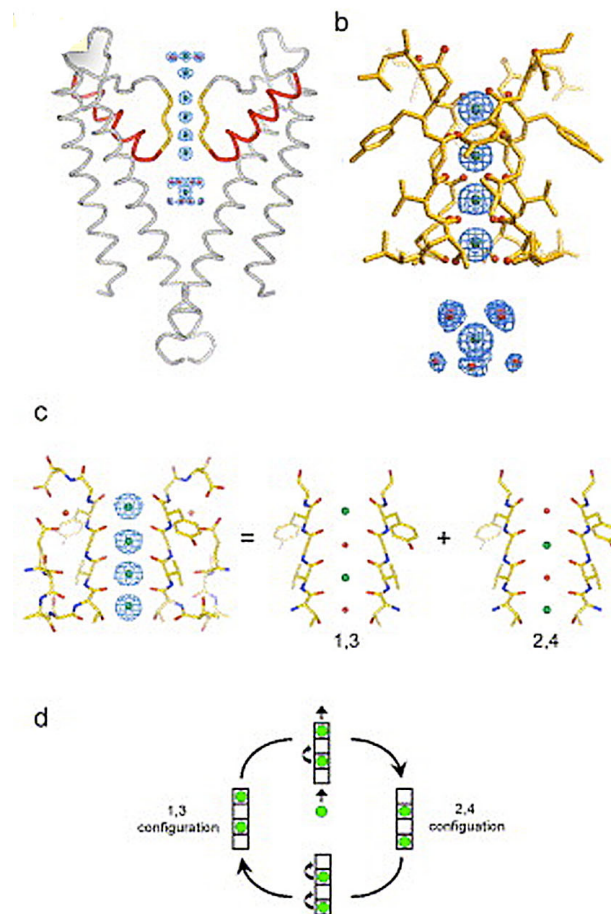
Die Rolle der Kaliumkanäle ist die selektive Durchlässigkeit von  $K^+$ -Ionen. Diese hohe Selektivität für  $K^+$ -Ionen (Radius 1.33 Å) gegenüber anderen (auch viel kleineren) Ionen ( $Na^+$  0.95 Å) wird durch den Selektivitätsfilter gewährleistet. Dieser besteht aus der Thr-Val-Gly-Tyr-Gly-Sequenz, die in allen Kaliumkanälen vorkommt und sich im carboxy-terminalen Ende des P-Loops (porenbildende Schleife) befindet. Die Carbonylgruppen der Peptidkette zeigen zu  $K^+$ -Ionen, die sich im Selektivitätsfilter befinden. Die lipophilen Seitenketten des Val und Tyr zeigen vom gebildeten Kanal weg. Gegenüber von Tyr78 liegen in der Porenhelix zwei Tryptophane, die im Gesamtkomplex einen aromatischen Ring um den Filter bilden und dadurch den Durchmesser des Filters fixieren.

Da alle hydratisierten Ionen zu groß für den Selektivitätsfilter sind, werden sie vorerst dehydratisiert. Die für die Dehydratisierung aufgebrauchte Energie wird durch Energie kompensiert, die durch Wechselwirkung zwischen Carbonylsauerstoffatomen im Selektivitätsfilter und dem dehydratisierten Ion gewonnen wird. Der passende Abstand, der für diese Wechselwirkung notwendig ist, ist bei  $K^+$ -Ionen gegeben. Bei  $Na^+$ -Ionen hingegen ist der Abstand zu gross, da diese zu klein sind. Dadurch kann es nicht zur Wechselwirkung der  $Na^+$ -Ionen mit Carbonylsauerstoffen kommen. Da die Dehydratisierungsenthalpie nicht kompensiert werden kann, bleiben  $Na^+$ -Ionen in ihrer Hydrathülle eingebettet und können den Selektivitätsfilter nicht passieren.

Die Carbonylsauerstoffatome bilden vier Bindungsstellen für  $K^+$ -Ionen entlang der Selektivitätsfilter. Die Kristallstruktur von KcsA-Kanal zeigte zwei durch ein Wassermolekül getrennte  $K^+$ -Ionen, die sich entweder in Position 1,3- oder 2,4- befinden.

Der Eintritt eines dritten  $K^+$ -Ions in die Pore bewirkt die kettenartige Bewegung von zwei sich schon im Selektivitätsfilter befindenden Ionen Richtung

Poreninneres. Das hat letztendlich die Freisetzung eines Ions in die Kanalpore zur Folge. Die Richtung dieses Ionenflusses ist durch den Konzentrationsgradienten gegeben. (Abb.3) (MacKinnon, 2003)



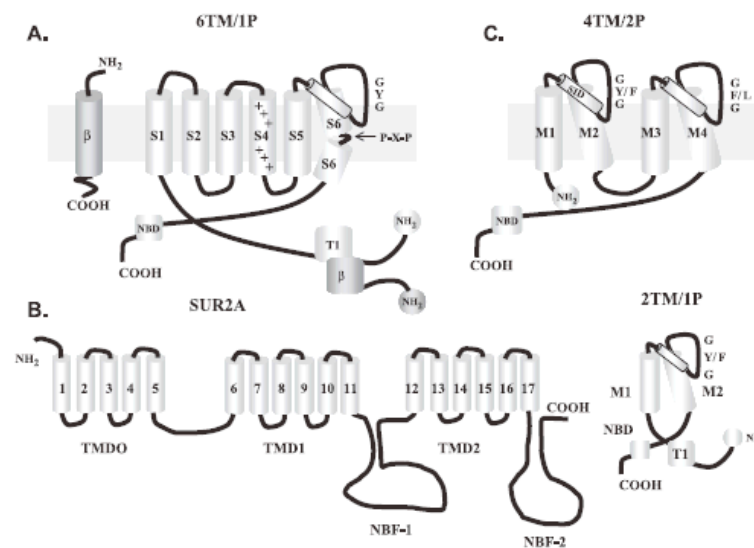
**Abb. 3** Der Selektivitätsfilter von Kaliumkanälen (aus MacKinnon, 2003)

**a)** Zwei  $\alpha$ -Untereinheiten der KcsA-Kanal. **Gold:**  $K^+$ -Selektivitätsfilter **Blau:**  $K^+$ -Ionen und Wassermoleküle **b)** Selektivitätsfilter mit dehydratisierten  $K^+$ -Ionen in Positionen von 1 bis 4 und mit hydratisiertem  $K^+$ -Ion in Poreninnenraum **c)**  $K^+$ -Ionen (grün) in Positionen 1,3 bzw. 2,4. Rote Punkte stellen die Wassermoleküle dar. **d)** Schematische Darstellung von  $K^+$ -Ionenpassage durch den Selektivitätsfilter des  $K^+$ -Kanals.

### 1.3.2 Struktur und Klassifikation von Kaliumkanälen

$K^+$ -Ionenkanäle gehören zu „Proteinfamilien“ und sind häufig strukturell verwandt. Mit Ausnahme eines Kaliumkanals, der in Viren eukaryotischer Algen (Phycodnaviridae) auftritt (Plugge *et al.*, 2000), kommen die Kaliumkanäle in prokaryotischen (bakteriellen) und eukaryotischen Zellen vor

(sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Organismen). Basierend auf der Struktur der  $\alpha$ -Untereinheit, werden  $K^+$ -Kanäle in drei Gruppen unterteilt:



**Abb.4** Schematisch dargestellte Struktur von drei Klassen von  $K^+$ -Kanal  $\alpha$ -Untereinheiten (aus Tamargo et al., 2004)

**a)** Die  $\alpha$ -Untereinheit der meisten spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanäle besteht aus 6 transmembranären Domänen und einem P-Loop, **b)** Die  $\alpha$ -Untereinheit von inward rectifier  $K^+$ -Kanälen besteht aus nur 2 transmembranären Domänen und einem P-Loop, **c)** Die  $\alpha$ -Untereinheit von  $K_{2p}$  besteht aus 4 transmembranären Domänen und 2 P-Loops

### 1.3.2.1 „inward rectifier“ ( $K_{ir}$ )

Die  $\alpha$ -Untereinheit der wahrscheinlich evolutionär ältesten  $K^+$ -Kanäle (Hii Hui Tie, 2002) besteht aus nur 2 transmembranären Domänen (M1 und M2) die durch eine porenbildende Schleife miteinander verknüpft sind. Das N- und das C-terminale Ende sind intrazellulär lokalisiert.  $K_{ir}$ -Kanäle sind entweder Homotetramere (aus vier identischen  $\alpha$ -Untereinheiten) oder Heterotetramere (aus vier unterschiedlichen  $\alpha$ -Untereinheiten derselben Familie). Zu dieser Gruppe der  $K^+$ -Kanäle gehören inward rectifier  $I_{K1}$  und Liganden gesteuerte  $K_{ATP}$ -Kanäle sowie und  $K_{ACh}$ -Kanäle. Alle  $K_{ir}$ -Kanäle leiten Einwärtsströme und haben eine tragende Rolle bei der Einstellung des Ruhemembranpotentials (Tamargo et al., 2004; Hii Hui Tie, 2002).

### 1.3.2.2 $K_{2p}$

Die  $\alpha$ -Untereinheit von  $K_{2p}$  besteht aus 4 transmembranären Domänen (M1-M4) und 2 porenbildenden Sequenzen.  $K_{2p}$  kommen als Homodimere oder Heterodimere vor. Diese  $K^+$ -Kanäle zeigen wenig Spannungsabhängigkeit (Tamargo *et al.*, 2004).

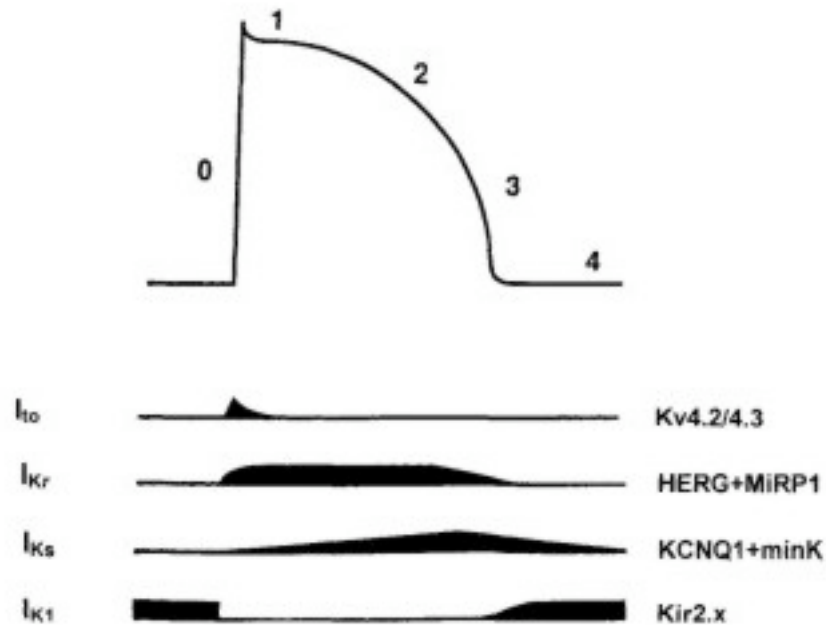
### 1.3.2.3 Spannungsabhängige Kaliumkanäle ( $K_v$ )

Spannungsabhängige Kaliumkanäle ( $K_v$ ) sind aus  $\alpha$ -Untereinheiten aufgebaut, die aus 6 Transmembran-Segmenten (S1-S6) und einer Pore bestehen, die von den Segmenten S6 gebildet wird. Die porenbildende Schleife zwischen S5 und S6 bildet den  $K^+$ -Selektivitätsfilter. S4 stellt den Spannungssensor dar, in dem etwa jede dritte Aminosäure positiv geladenen ist. C- und N-Terminus sind intrazellulär lokalisiert. Die  $K_v$  sind entweder Homo- oder Heterotetramere. Zu dieser Gruppe gehören Shaker -Kanäle ( $K_{v1-4}$ ), KCNQ-Kanäle und ether-a-go-go verwandte Kanäle (ERG) (Tamargo *et al.*, 2004).

Die  $\alpha$ -Untereinheiten der  $K^+$ -Kanäle können mit akzessorischen Proteinen, den  $\beta$ -Untereinheiten, interagieren und dadurch moduliert werden. Viele  $K^+$ -Ionenkanäle sind komplex aufgebaut (z.B. aus 4 $\alpha$  und 4 $\beta$  Untereinheiten).  $\beta$ -Untereinheiten können zytoplasmatische (z.B. *K<sub>v</sub>-Channel-interacting Protein* KChIP) oder transmembranere (z.B. *minimal K<sup>+</sup>-Channel* minK und *minK-related Peptide-1* MiRP1) Proteine sein. Sie modulieren die Spannungsabhängigkeit und/oder die Oberflächenexpression des Kanals und beeinflussen die Empfindlichkeit gegenüber Arzneimitteln (Tamargo *et al.*, 2004; Solth, 2005).

## 1.4 $K^+$ -Ströme während eines AP

Wie in Abschnitt 1.2 bereits ausgeführt, spielen  $K^+$ -Ionenkanäle eine wesentliche Rolle für die Ausbildung eines Herzaktionspotentials. Sie sind am Herzen unter anderem für die frühen ( $I_{to}$ ) und späten ( $I_{Ks}$ ,  $I_{Kr}$ ) repolarisierenden Auswärtsströme verantwortlich (Nerbonne, 2000).



**Abb. 5**  $K^+$ -Ströme durch verschiedene  $K^+$ -Kanäle während eines AP (aus Tamargo et al., 2004)

Nach der durch  $Na^+$ -Einstrom verursachten Depolarisation (Phase 0), folgt die kurze Repolarisation der Phase 1 (Notch), die durch den transienten Kaliumauswärtsstrom  $I_{to}$  hervorgerufen wird.  $I_{to}$  fließt durch einen Kanalkomplex aus  $Kv4.3$  und seiner  $\beta$ -Untereinheit KChIP2.  $Kv4.3$  ist ein spannungsabhängiger  $K^+$ -Kanal der Untergruppe 4 und die am häufigsten vorkommende Isoform der  $Kv4$ -Kanäle im menschlichen Myokard (Dixon et al., 1996; Zhu et al., 1999). Seine Kinetik ist durch schnelle Aktivierung und Inaktivierung während der Depolarisation gekennzeichnet.

In der Plateauphase (Phase 2) wirken dem  $Ca^{2+}$ -Einstrom drei Komponenten von delayed rectifier Kaliumauswärtsströme ( $I_K$ ) entgegen: der langsam aktivierende -  $I_{Ks}$ , der schnell aktivierende -  $I_{Kr}$  und der ultra schnell aktivierende  $I_{Kur}$  Strom.

$I_{Kur}$  aktiviert sehr schnell und inaktiviert langsam. Die Kanäle bestehen aus  $Kv1.5$   $\alpha$ -Untereinheiten die zusammen mit  $Kv\beta1.2$  den Kanalkomplex bilden.  $I_{Kur}$  sind nur in humanen Vorhöfen exprimiert und spielen keine Rolle bei ventrikulären Aktionspotentialen.

$I_{Ks}$  wird von einem Kanal-Komplex generiert, der aus dem spannungsabhängigen *Long-QT Syndrom 1*-assoziierten Kaliumkanal  $K_vLQT1$  (aufgebaut aus vier KCNQ1  $\alpha$ -Untereinheiten) und zwei *minimal K<sup>+</sup>-Channel* minK  $\beta$ -Untereinheiten besteht (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2003).

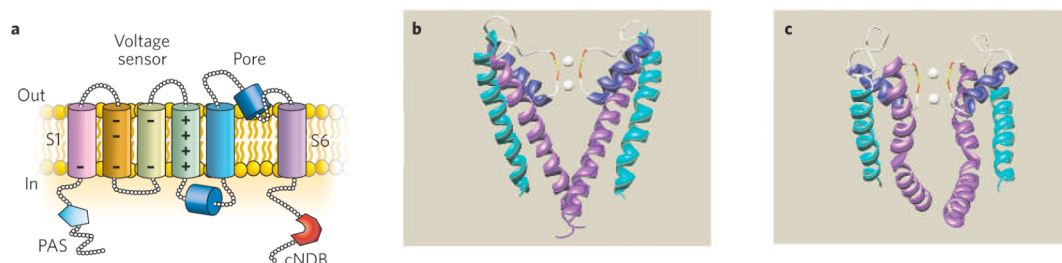
Trudeau *et al.* zeigten, dass  $I_{Kr}$  im Herzmuskel ein  $K^+$ -Strom durch hERG (*human ether-à-gogo-related gene*) Kanäle ist. Bei heterologer Expression in *Xenopus* Oocyten zeigten hERG  $K^+$ -Ströme sehr ähnliche biophysikalische Eigenschaften wie  $I_{Kr}$  (Sanguinetti *et al.*, 1995). Bei Koexpression von hERG und MiRP1 (*minK-related peptide 1*) wurden nahezu  $I_{Kr}$ -identische Ströme gemessen (Abbot *et al.*, 1999).  $I_{Kr}$ -Kanäle sind aus vier hERG  $\alpha$ -Untereinheiten und vier assoziierten MiRP1 ( $\beta$ -Untereinheiten) aufgebaut. Studien zur Rolle der MiRP1 als  $\beta$ -Untereinheit des hERG-Kanals lieferten unterschiedliche Ergebnisse. Es ist anzunehmen, dass sowohl der molekulare Aufbau von  $I_{Kr}$  in verschiedenen Geweben ein und derselben Spezies unterschiedlich sein kann als auch von Spezies zu Spezies variiert. Zusätzlich ist zu beachten, dass die Struktur des hERG-Kanals auch während der Entwicklung eines Organismus variiert (Anantharam und Abbot, 2005).

Die Phase 3 wird durch den anhaltenden Auswärtsstrom der  $K^+$ -Ionen hervorgerufen. In dieser Phase des Aktionspotentials fließen die  $K^+$ -Ionen vorwiegend durch den  $I_{Ks}$ -Kanal, dessen Inaktivierung langsamer als die Inaktivierung von  $I_{Kr}$  verläuft. Durch den  $K^+$ -Ausstrom während der Phase 3 kommt es zu einer Repolarisation in Richtung des Ruhepotentials (Phase 4). Nach abgeschlossener Repolarisation übernimmt der  $I_{K1}$ , zusammen mit  $Na^+$ -,  $Cl^-$ -Strömen sowie der  $Na^+/K^+$ -ATPase, die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials. Der  $I_{K1}$  ist ein Ausstrom der  $K^+$ -Ionen durch  $K^+$ -Kanäle aus einer ruhenden Zelle, die durch einen hohen  $K^+$ -Ionen Gradienten verursacht wurde. (Tamargo *et al.*, 2004)

## 1.5 hERG:

Der hERG (human *ether-a-go-go related gen*) -Kanal gehört zur Gruppe von ERG (*ether-a-go-go related gen*)  $K^+$ -Kanälen. Der Kanal wurde erstmals 1994 von Warmke und Ganetzky aus humanem Hippocampus isoliert. Obwohl hERG-Kanäle eine wichtige Rolle in der Herz AP spielen, ist diese nicht auf Herzmuskelzellen reduziert. Sie werden auch im Nervengewebe und in verschiedenen Tumorgeweben exprimiert (Arcangeli *et al.*, 1997; Crociani *et al.*, 2000; Bianchi *et al.*, 1998; Cherubini *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 1998).

Wie alle spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanäle, ist auch hERG ein Tetramär, welches aus 4  $\alpha$ -Untereinheiten aufgebaut ist. Jede Untereinheit besteht aus 6 Transmembran-Segmenten. S1-S4 dienen als Spannungssensor und S5-S6 sind am Aufbau der eigentlichen Kanalpore beteiligt. Der Aminoterminus der hERG  $\alpha$ -Untereinheit beinhaltet PAS (Per-Arnt-Sim) Domänen (Morais Cabral, 1998). Cyclic-nucleotid-binding Domänen befinden sich in Carboxyterminus der hERG  $\alpha$ -Untereinheit.



**Abb. 6** hERG-Kanal Struktur (aus Sanguinetti und Tristani-Firouzi, 2006)

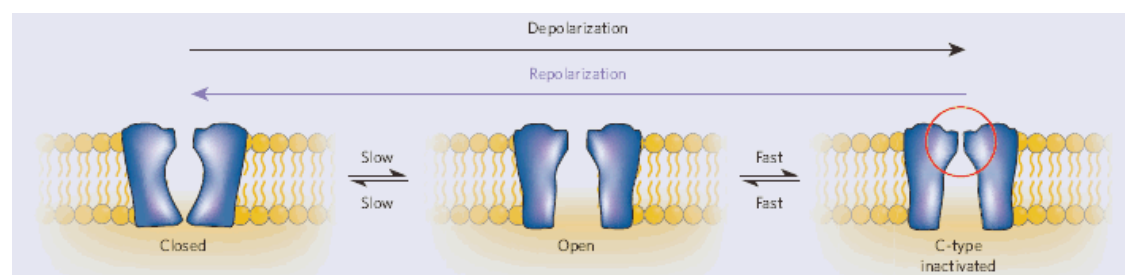
- a)** Schematische Darstellung der Struktur der hERG  $\alpha$ -Untereinheit **b)** Kristallstruktur des geschlossenen KcsA  $K^+$ -Kanals **c)** Kristallstruktur des offenen Kv1.2  $K^+$ -Kanals.

### 1.5.1 Gating

Das Öffnen und Schließen von hERG-Kanälen wird durch die Änderung des Membranpotentials reguliert.

Bei negativem Membranpotential (z.B. Ruhemembranpotential  $-80$  mV) sind die hERG-Kanäle in ruhendem und geschlossenem Zustand und somit nicht für die  $K^+$ -Ione durchlässig. Während der Depolarisation der Zellmembran werden die hERG-Kanäle aktiviert. In Abhängigkeit vom elektrochemischen

Gradienten strömen  $K^+$ -Ionen aus der Zelle. Während das Membranpotential weiter depolarisiert wird gehen die hERG-Kanäle aus dem aktiven in den inaktiven (geschlossenen) Zustand über. Während der Repolarisation durchläuft der hERG-Kanal die Zustandsänderung in umgekehrter Reihenfolge. Entscheidend dabei ist die Kinetik dieser Prozesse (Aktivierung und Inaktivierung). Die Aktivierung von hERG-Kanälen verläuft langsam und die Inaktivierung schnell. Während der Depolarisation wird die langsame Aktivierung durch schnelle Inaktivierung quasi „überholt“ und die Kanäle befinden sich vorrangig im inaktivierten Zustand, wodurch der Auswärtsstrom von  $K^+$  durch hERG-Kanäle während der Depolarisation (Plateauphase) minimiert wird. Während der Repolarisation erholen sich hERG-Kanäle schnell vom inaktivierten Zustand (öffnen) und deaktivieren vom offenen in den geschlossenen Zustand. Die Erholung von der Inaktivierung verläuft schnell und die Deaktivierung vergleichsweise langsam. Dadurch öffnen hERG-Kanäle während der Repolarisation schnell (sind für die  $K^+$ -Ionen permeabel) und gehen langsam in den ruhenden Zustand über.



**Abb. 7** Spannungsabhängige Konformationsänderungen von hERG-Kanälen (aus Sanguinetti und Tristani-Firouzi, 2006)

hERG und  $I_{Kr}$ -Ströme zeigen eine schnelle Inaktivierung, was zur Hemmung der  $K^+$ -Ströme während der Depolarisationsphase von Aktionspotentialen führt. Durch schnelle Erholung von der Inaktivierung (gefolgt von langsamer Deaktivierung) wird das AP terminiert.

#### 1.5.1.1 Langsame Aktivierung

Das Aktivierungstor vom hERG-Kanal wird durch die Spannungssensorbewegung in Gang gesetzt. Während der Depolarisationsphase von AP bewegt sich der Spannungssensor in extrazellulärer Richtung, was zu einer Konformationsänderung in den S6

Segmenten führt. Das wiederum hat die Öffnung des Aktivierungstors zur Folge (Tristani-Firouzi *et al.*, 2002). In der Literatur sind verschiedene Modelle als mögliche Erklärung der Bewegung des Spannungssensors (S4 Segments) zu finden: Gleiten der Helix (Bezanilla, 2000), Paddel Bewegung (Jiang *et al.*, 2003), Kippen von S4 (Bezanilla, 2005).

Die Aktivierung des hERG-Kanals erfolgt auch im Vergleich mit der Aktivierungsgeschwindigkeit von anderen K<sub>v</sub>-Ionenkanälen sehr langsam. Bei Spannungen zwischen 0 und +60 mV aktiviert hERG innerhalb von 60 - 250 ms, wobei Shaker in weniger als 2 ms (Zagota *et al.*, 1994) und EAG in weniger als 10 ms (Silverman *et al.*, 2000) aktiviert. Hauptursache für die langsame Kinetik der Aktivierung von hERG-Kanälen ist die langsame Bewegung von S4 (Piper *et al.*, 2003; Smith and Yellen, 2002). Eine mögliche Ursache für die langsame S4 Bewegung wird in einer fehlenden positiven Ladung im Spannungssensor gesehen. Zusätzlichen Einfluss auf die Aktivierungsgeschwindigkeit haben nicht nur Aminosäuren des S4 Segments, sondern auch negativ geladene AS in den anderen Transmembran-Segmenten. Es ist bekannt, dass in der Proteinkonformation des geschlossenen Kanalzustandes die Reste der negativ geladenen Aminosäuren in S1-S3 (Asp456 und Asp411) mit positiv geladenen Aminosäuren des Spannungssensors (Lys525 und Lys538) Salzbrücken bilden. Dadurch könnte die Kinetik des Spannungssensors beeinflusst werden (Tseng and Guy, 2005). Der Mechanismus, wie die Bewegung eines Spannungssensors eine Öffnung des Aktivierungsgates induziert ist noch unklar. Bei Studien an verschiedenen spannungsabhängigen Ionenkanälen könnte gezeigt werden, dass der S4-S5 Linker eine wichtige Rolle im Kanal gating spielt. Während der Repolarisation wird durch Einwärtsbewegung des Spannungssensors (S4) der S4-S5 Linker bewegt und wahrscheinlich in Richtung des C-terminalen Endes des S6 Aktivierungsgates geschoben, welches sich dadurch schließt (Long *et al.*, 2005). Im hERG interagiert der S4-S5 Linker direkt mit S6, sodaß das Aktivierungsgate in geschlossenem Zustand stabilisiert wird (Ferrer *et al.*, 2006; Asp540 interagiert mit Arg665 und Leu666 - Sanguinetti und Tristani-Firouzi, 2006).

### 1.5.1.2 Langsame Deaktivierung

Für die langsame Deaktivierung des hERG-Kanals spielt der N-Terminus eine wichtige Rolle. Die PAS Domäne des N-Terminus hat dabei besondere Bedeutung. Mutationen in PAS beschleunigen die Deaktivierung (Morais Cabral *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999). Wang *et al.* kreierten durch Ausschneiden der ersten 16 AS der PAS Domäne ein Kanalkonstrukt mit defekter N-terminaler Deaktivierung. Die ersten 16 N-terminalen Aminosäuren sind so positioniert, dass sie leicht mit dem Spannungssensor oder Gates interagieren, bzw. diese zwei Regionen miteinander koppeln und so den geöffneten Zustand des Kanals stabilisieren (Robertson *et al.*, 2005). In Einzelkanalstudien wurde gezeigt, dass Kanäle mit intaktem N-Terminus länger in offenem Zustand verweilen, was darauf hinweist, dass der N-Terminus den offenen Zustand stabilisiert und die Deaktivierung entsprechend verlangsamt (Wang *et al.*, 2000). Studien von Wang *et al.*, Sanguinetti und Xu und Tristan-Firouzi *et al.* belegen ebenfalls, dass die N-Terminale Stabilisierung des offenen Zustandes durch Interaktion der PAS Domäne des N-Terminus mit S4-S5 Linker an die Region der inneren Kanalmündung erfolgt.

### 1.5.1.3 Inaktivierung

Es sind zwei Mechanismen von  $K_v$  Inaktivierung bekannt. Die schnelle N-Typ Inaktivierung wird durch den N-Terminus induziert, der in Form einer Kugel (Ball) („ball and chain“ Mechanismus) die innere Mündung der Kanalpore schliesst. Die langsame C-Typ Inaktivierung erfolgt durch die Konformationsänderung in der Umgebung der äußeren Mündung der Pore. Dadurch kommt es zur Schließung der Pore und zur Unterbrechung des Ionenflusses. Obwohl die Inaktivierung des hERG-Kanals sehr schnell verläuft, handelt es sich nicht um eine N-Typ Inaktivierung, da durch die Entfernung des N-Terminus keine Aufhebung der Inaktivierung erfolgt. Die Inaktivierung wird jedoch durch die Mutation Ser631Val, die homolog zu der Mutation Thr449Val im Shaker-Kanal ist, aufgehoben. Diese Mutation im Shaker Kanal unterbindet die C-Typ Inaktivierung, was darauf hinweist, dass die hERG Inaktivierung eine C-Typ Inaktivierung ist (Sanguinetti und Tristani-Firouzi, 2006).

Die C-Typ Inaktivierung von hERG verläuft sehr schnell (innerhalb von Millisekunden) im Vergleich zur Inaktivierung der Shaker und Shaker-ähnlichen Kanäle (Smith *et al.*, 1996). Durch die unterschiedliche AS Sequenz in der äußeren Mündung der Pore (AS, die keine H-Brücken bilden können, im Unterschied zu anderen K<sup>+</sup>-Kanälen) besteht im hERG keine Möglichkeit durch die Wasserstoffbrückenbildung zwischen den Untereinheiten den offenen Zustand des Kanals zu stabilisieren. Dadurch kollabiert die Pore im hERG leichter und die Inaktivierung erfolgt entsprechend schneller als in anderen Kanälen (Larson und Elinder, 2000). Der S5-P Linker im hERG-Kanal ist länger als S5-P Linker in anderen K<sub>v</sub>-Kanälen (Liu *et al.*, 2002). Kутteћ *et al.* zeigten, dass der hERG S5-P Linker wahrscheinlich näher zur Porenachse steht als S5-P Linker in anderen K<sub>v</sub>-Kanälen und ein mögliches Hindernis für den K<sup>+</sup>-Ionenfluß durch die Pore des hERG-Kanals darstellt. Dass die S5-S6 Linker eine Rolle bei der Inaktivierung von hERG-Kanälen spielt, belegen Mutationen in dieser Region, die den Inaktivierungsprozess stören (Ser631Ala – Fan *et al.*, 1999; Ser620Thr - Herzberg *et al.*, 1998). (Tseng and Guy, 2005)

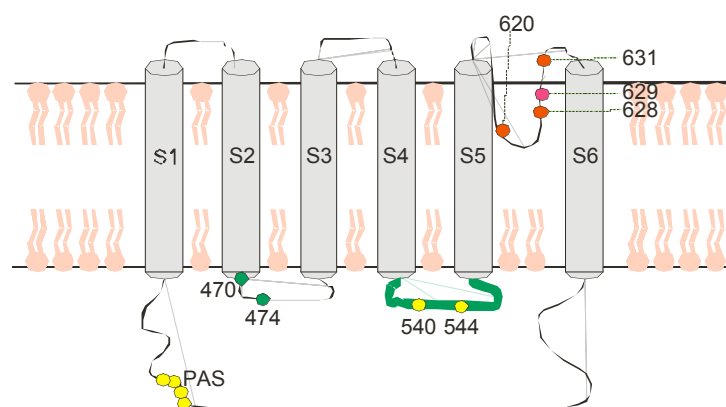
### 1.5.2 Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen an hERG-Kanälen

**Segment S2 und der intrazelluläre S2-S3 Loop** spielen wahrscheinlich eine Rolle bei der spannungsabhängigen Steuerung des hERG-Kanals (Zhou *et al.*, 1998). Mutationen im transmembranären Segment S2 oder im intrazellulären S2-S3 Loop beeinflussen die Kanalaktivierung. Die Thr474Ile Mutante aktiviert bei negativeren Potentialen als Wild Typ, wobei die I/V Kurve um -27.3 mV verschoben ist (Zhou *et al.*, 1998). Eine weitere S2 Mutation (Asn470Asp) verursacht ebenfalls eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Kanalöffnung in Richtung vermehrten negativen Potentials. Mutationen in S4 und S5 beeinflussen die Geschwindigkeit der Aktivierung des hERG-Kanals. Asp540Ala hERG-Kanal aktiviert 8x schneller und die Mutante Glu544Ala 2x schneller als der Wild Typ hERG-Kanal. Substitutionen von Glu544 durch das basische Lys verlangsamt die Kanalaktivierung (Sanguinetti und Xu, 1999).

Die S4-S5 Region beeinflusst offensichtlich nicht nur die Kinetik der Aktivierung sondern auch die Deaktivierung. Sanguinetti und Xu zeigten, dass

die Mutationen Asp540Ala, Glu544Ala und Glu544Lys zur Beschleunigung der langsamen Deaktivierung führen. Eine einzigartige Kinetik zeigt die Mutante D540K, die bei stark negativen Membranpotentialen öffnet, was darauf hinweist, daß die Deaktivierung des Kanals beeinflusst wird.

**Mutationen in der Kanalpore** beeinflussen in erster Linie die Kanal-Inaktivierung. Die Mutationen Ser620Cys, Asn629Asp und die Doppelmutation Gly628Cys/Ser631Cys führen dazu, dass die Kanäle permanent offen sind und nicht inaktivieren können. Die Mutation Ser631Cys beeinflusst die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung und verschiebt die I/V Kurve um +100mV (Piper *et al.*, 2005). Die Mutante Asn629Asp verliert zusätzlich die Selektivität für  $K^+$ - gegenüber  $Na^+$ -Ionen, was darauf hinweist, dass der Selektivitätsfilter ebenfalls an der Inaktivierung beteiligt ist (Smith *et al.*, 1996; Ficker *et al.*, 1998; Lees-Miller *et al.*, 2000; Hii Hui Tie, 2002).

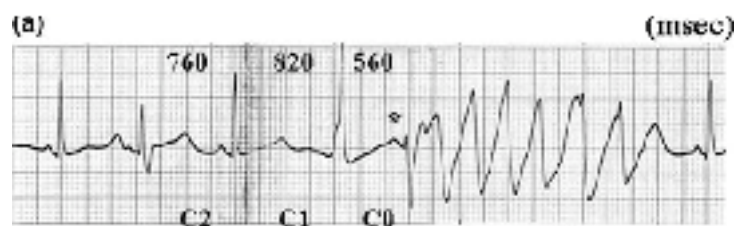


**Abb. 8:** hERG-Kanal Mutationen

**Gelb** – Mutationen, die die Deaktivierung des Kanals beeinflussen; **Grün** – Mutationen die die Aktivierung des Kanals verändern; **Rot** – „Inaktivierungsmutationen“; **Magenta** – Mutationen welche die Selektivität für  $K^+$  aufheben

## 1.6 Das long QT Syndrom

Das QT-Intervall im EKG spiegelt die Dauer des ventrikulären Aktionspotentials wieder. Bei Beachtung geschlechtsabhängiger Unterschiede gilt als oberer Grenzwert ein QTc (c für corrected) von 450 ms für Männer und von 470 ms für Frauen. Ein Wert zwischen 350 und 430 beziehungsweise 450 für Frauen wird als normal angesehen (Abriel *et al.*, 2004). Das Long QT Syndrom (LQTS) ist charakterisiert durch ein verlängertes QT-Intervall im Oberflächen-EKG und durch die Tendenz, Synkopen, die Entwicklung von fatalen ventrikulären Arrhythmien (Torsade de Point) und plötzlichen Herztod zu verursachen (Abb. 9). Man unterscheidet zwischen angeborenen und erworbenen Formen von LQTS (Witchel und Hencox, 2000).



**Abb.9:** Die Veränderung der Depolarisationsdauer verursacht Torsade de Pointes (TdP) (Aus Noda *et al.*, 2004)

Das EKG zeigt den plötzlichen Auftritt von aufeinander folgenden verlängerten QT Intervallen, die zu Torsad de Pointes führen.

### 1.6.1 Das angeborene long QT-Syndrom

Die Inzidenz des angeborene Long QT-Syndroms wird mit 1:5000 beziffert (Mark E Curran, 2002). Die Symptome sind häufige Tachyarrhythmien kurzer Dauer und ein labiles und verlängertes QT-Intervall im EKG. Arrhythmogene Synkopen werden unter anderem durch emotionalen Stress verursacht, die in TdP übergehen und ventrikuläre Fibrillation und/oder plötzlichen Herztod verursachen können (Witchel und Hancox, 2000).

Untersuchungen von Moss *et al.* zeigten, dass Patienten mit LQTS um 80% häufiger eine Ohnmacht, Kollaps oder Herzstillstand erleiden, einen Ruhepuls

von < 60 s.p.m. haben (31%), und an ventrikulären Tachyarrhythmien (47%) und kongenitaler Taubheit (7%) leiden.

Es sind zwei klinische Varianten von LQT zu unterscheiden. Das häufige autosomal dominant vererbte *Romano-Ward-Syndrom* (LQT1-6), das einen reinen Herzphänotyp darstellt und das selten vorkommende rezessive *Jervell, Lange-Nielsen Syndrom*, das zusätzlich zu den Herzanomalien auch mit kongenitaler Taubheit verbunden ist (KCNQ1 und KCNE1 haben eine wichtige Rolle im Innenohr) (January *et al.*, 2000; Camm *et al.*, 2000).

Es wurden mehr als 100 Mutationen in 6 verschiedenen Genen als Ursache für kongenitale LQTS identifiziert. 5 der 6 Gene kodieren myokardiale Ionenkanalproteine. Diese Mutationen verlängern das Aktionspotential entweder durch verstärkte depolarisierende Einwärtsströme („gain-of-function-Mutationen“) oder durch die Hemmung der Auswärtsströme während der Plateauphase und Repolarisation („loss-of-function-Mutationen“) (Abriel *et al.*, 2004).

Laut molekularer Klassifikation, die sich nach den von Mutation betroffenen Genen orientiert, werden 7 Formen von LQTS (LQT1-7) unterschieden. LQT1, 2, 5 und 6 sind loss-of-function-Mutationen von  $K^+$ -Kanälen die während Repolarisation aktivieren. LQT1 und 5 werden durch die Mutationen am KvLQT1 und MinK Genen, die  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheit für den  $I_{Ks}$ -Kanal kodieren, verursacht. Die Patienten, die heterozygot für die KvLQT1 Mutationen sind, erkranken am LQT1 Syndrom. Patienten, bei denen es sich um eine homozygote Mutation handelt, erkranken am Jervell-Lange-Nielsen Syndrom (JLN1). KvLQT1 wird im Innenohr exprimiert und spielt eine wichtige Rolle beim Hörvorgang (Neyroud *et al.*, 1997). Bei Vorliegen von 2 mutierten Allelen KvLQT1 kommt es zu Taubheit. Das klinische Bild von LQT1 sind typische Herzerscheinungen wie TdP, die hier häufiger als bei anderen LQTS in Folge von psychischem Stress auftreten. MinK ist ebenfalls im Innenohr exprimiert und die homozygote Mutation von MinK ist die Ursache für JLN2. (Hii Hui Tie, 2002)

LQT2 und 6 werden durch Mutationen der hERG und MiRP1 Gene (die  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheit des  $I_{Kr}$  Kanals kodieren) verursacht. hERG war das erste Gen, welches als Ursache für LQTS identifiziert wurde (Curran *et al.*, 1995). Mutationen in MiRP1 induzieren Veränderungen der  $I_{Kr}$ -Kinetik. Man geht davon aus, dass Mutationen in diesem Gen keinen klinischen Phänotyp induzieren, wenn kein zusätzlicher „Stress“ auftritt (Abbott *et al.*, 1999). Mutationen in diesem Gen wurden in Zusammenhang mit erworbenem LQT-Syndrom gebracht (Chiang und Roden, 2000; Witchel und Hancox, 2000).

LQT3 wird durch eine Mutation im  $Na^+$ -Kanal Gen SCN5A verursacht. Die mutierten  $Na^+$ -Kanäle inaktivieren unvollständig und es kommt zu einem verstärktem  $Na^+$ -Einwärtsstrom während der Plateauphase des APs, was zur Verlängerung der Repolarisation führt (Witchel und Hancox, 2000; Delisle *et al.*, 2004).

Das Ankyrin B Protein, dessen Mutation zu LQT4 führt, ist kein Ionenkanal. Dieses Protein ist wichtig für die Stabilisierung und die Integration von kardialen Ionenkanälen (aber auch  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  Untereinheiten der  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase, NCX ( $I_{Na-Ca}$ ), und  $InsP_3R$  (inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptoren)) in die Zellmembran. Durch die abnormale Expression der Ionenkanäle und der Ionenaustauscher wird die  $Ca^{2+}$  Homeostase gestört, was ebenfalls zur Veränderung des QT Intervalls führen kann (Yong *et al.*, 2003)

LQT wurde auch bei Patienten mit Andersen Syndrom (LQT7) beobachtet, wo es durch eine Mutation in  $I_{K1}$  ( $Kir_{2.1}$ ) verursacht wird. Diese „loss-of-function“ Mutation verzögert die Geschwindigkeit mit der das Ruhemembranpotential nach der Repolarisation des APs erreicht wird (Tristani-Firouzi *et al.*, 2002). LQT tritt ebenfalls bei *Arrhythmogenic right Ventricular Displasia* (ARVD) auf und wird in diesem Fall durch die Ryanodin-Rezeptor Mutation (RYR2) verursacht (Curran *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2004).

**Tabelle 1:** Genmutationen die zu LQTS führen (aus Delisle et al. 2004)

| <b>LQTS</b> | <b>Strom</b>                | <b>Chromosom</b> | <b>Betroffene Gen</b> | <b>Literatur</b>                           |
|-------------|-----------------------------|------------------|-----------------------|--------------------------------------------|
| LQT1        | $I_{Ks}$ ,<br>Amplitude ↓   | 11p15.5          | KvLQT1<br>(KCNQ1)     | Wang et al., 1996                          |
| LQT2        | $I_{Kr}$ ,<br>Amplitude ↓   | 7q35-q36         | Herg                  | Curran et al., 1995                        |
| LQT3        | $I_{Na}$ ,<br>late current↑ | 3p21-p24         | SCN5A                 | Wang et al., 1995                          |
| LQT4        | Änderung<br>$[Ca^{2+}]_i$   | 4q25-27          | ANKB                  | Schott et al., 1995<br>Mohler et al., 2003 |
| LQT5        | $I_{Ks}$ ,<br>Amplitude ↓   | 21q22.1-22.2     | MinK<br>(KCNE1)       | Splawski et al., 1997                      |
| LQT6        | $I_{Kr}$ ,<br>Deaktivierung | 21q22.1-22.2     | MiRP1<br>(KCNE2)      | Abbott et al., 1999                        |
| LQT7        | $I_{K1}$ ,<br>Amplitude ↓   | 17q23            | Kir2.1                | Tristan-Firouzi et al.<br>2002             |
| JLN1        | $I_{Ks}$ ,<br>Amplitude ↓   | 11p15.5          | KvLQT1<br>(KCNQ1)     | Neyroud et al., 1997                       |
| JLN2        | $I_{Ks}$ ,<br>Amplitude ↓   | 21q22.1-22.2     | MinK<br>(KCNE1)       | Schulze-Bahr et al.,<br>1997               |

### 1.6.2 Das erworbene long QT-Syndrom

Die zweite Form des LQT-Syndroms ist ein erworbenes, d.h. medikamenteninduziertes Long QT-Syndrom, das auch als „iatrogenes“ Syndrom bezeichnet wird (Abriel et al., 2004). Die medikamenteninduzierte Verlängerung der Repolarisationszeit des AP (des QT-Intervalls) ist der Wirkungsmechanismus der Klasse-III-Antiarrhythmika. Die Verlängerung des QT-Intervalls mit TdP als Folge tritt als Nebenwirkung vieler Medikamente mit unterschiedlichsten Indikationen auf (z.B. Antihistaminika, Antipsychotika oder Prokinetika). Ein Klasseneffekt liegt nur zum Teil vor; oft sind es nur einzelne Vertreter einer Medikamentenklasse, die eine Verlängerung der QT Zeit

hervorrufen (Antihistamika: Terfenadin und Astemizol; Antipsychotika: Sertindol und Haloperidol; Prokinetika: Cisaprid) (Haverkamp *et al.*, 2000).

Die QT-Verlängerung und dadurch verursachte letale Arrhythmien waren die Ursache für die Rücknahme der meisten betroffenen Medikamente oder die Einschränkungen von Verschreibungen in den letzten Jahrzehnten, weshalb der hERG-Kanal auch als „Drug-Killer“ bezeichnet wird (Roden und Viswanathan, 2005).

Obwohl TdP als Nebenwirkung bei Medikamenten, die nicht für kardiale Erkrankungen indiziert sind, viel seltener (Cisaprid 1:120 000) als bei Antiarrhythmika (Chinidin und Dofetilid 3-5%, Sotalol ca. 1,8 bis 2,3%) auftraten, mußten viele nicht kardiale Medikamente, die schon jahrelang am Markt waren, zurückgezogen werden bzw. ihre Indikation und Verschreibung wurde stark eingeschränkt. Diese Verschreibungseinschränkungen trotz relativ selten vorkommender Nebenwirkung sind in Abwägung von Nutzen (z.B. Behandlung von gastrointestinalen Beschwerden oder Allergien) und Risiko (mögliche lebensbedrohliche Arrhythmien) begründet (Sanguinetti und Tristan-Firouzi, 2006; Roden und Viswanathan, 2005; Fermini und Fossa, 2003). Trotz relativ seltenem Vorkommen ist bei einigen Medikamenten die absolute Häufigkeit von QT-Verlängerungen sehr hoch, wenn diese z.T. millionenfach verabreicht werden. Ein Beispiel dafür ist Cisaprid, von dem, trotz „seltener“ TdP, weltweit 386 Fälle schwerwiegender Arrhythmien berichtet wurden, die in 125 Fällen letal ausgingen (Haverkamp *et al.*, 2002). Vergleichbare Zahlen liegen für das Antihistaminikum *Terfenadin* vor, das viele Jahre lang rezeptfrei abgegeben wurde und im Zeitraum zwischen 1985 und 1998 zu den zehn meistverkauften Medikamenten zählte. Hier wird von 429 kardiovaskulären Zwischenfällen berichtet, 98 mit tödlichem Ausgang. Eine retrospektive Analyse zeigte eine Wahrscheinlichkeit von 0,25 Fällen pro einer Million Tagesdosen (Haverkamp *et al.*, 2002).

Theoretisch kann ein Arzneimittel ein LQT-Syndrom durch die Blockade von unterschiedlichen spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanälen, die während der ventrikulären Repolarisation öffnen, verursachen. Die überwiegende Zahl der Substanzen, von denen bekannt ist, dass sie das QT-Intervall verlängern,

greifen jedoch am hERG-Kanal an und reduzieren den  $I_{Kr}$ -Stromfluss während der ventrikulären Repolarisation (Mitcheson *et al.*, 2000).

Es gibt drei mögliche Wege den  $I_{Kr}$ -Strom durch Hemmung von hERG-Kanälen zu reduzieren:

- Direkte Blockade von hERG (Recanatini *et al.*, 2005)
- Interaktion mit dem Transportmechanismus des hERG-Kanals aus dem SR an die Zelloberfläche (Kuryshhev *et al.*, 2005; Eckhardt *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007)
- Drug-Drug Interaktion (durch Hemmung des Metabolismus des eigentlichen hERG-Kanalblockers).

Die noch unklare Struktur-Wirkungs-Beziehung von hERG-Kanalblockern erschwert die Entwicklung neuer Wirkstoffe (Cavalli *et al.*, 2002; Ekins *et al.*, 2002; Perlstein *et al.*, 2003).

Seit 1997 sind sowohl Pharmaindustrie als auch Gesundheitsbehörden bemüht, frühe präklinische Untersuchungen zu systematisieren, um proarrhythmische Wirkung neuer Wirkstoffe und deren Metaboliten möglichst frühzeitig zu entdecken (Fermini und Fossa, 2003; Recanatini *et al.*, 2005; EMEA ICH Guidelines 1997; EMEA ICH Guidelines 2005; Haverkamp *et al.*, 2000). Die bisherigen Studien zeigen, dass jene Substanzen, die proarrhythmisch wirken und TdP verursachen, eine hERG blockierende Wirkung ausweisen. Nicht jede Substanz, die den hERG-Kanal blockiert, induziert jedoch eine QT-Verlängerung. Zusätzliche Wirkungen auf andere Ionenkanäle können den hERG-blockierenden Effekt und die QT-Verlängerung wahrscheinlich aufheben. Beispiele dafür sind Amiodaron (Klasse III-Antiarrhythmikum) und Verapamil (Zhang *et al.*, 1999). Trotz erheblicher QT-Verlängerung ist die proarrhythmische Potenz des Kalziumkanalblockers Verapamil vergleichsweise niedrig, die Häufigkeit von TdP beträgt für den Natriumkanal- und hERG-Kanalblocker Amiodaron nur ca. 0,5% (Sanguinetti and Tristani-Firouzi, 2006). Derzeit sind über 100 Arzneistoffe bekannt, die das Aktionspotential verlängern und/oder Torsade de Pointes auslösen. Die Liste wird ständig erweitert ([www.arizona.com](http://www.arizona.com)).

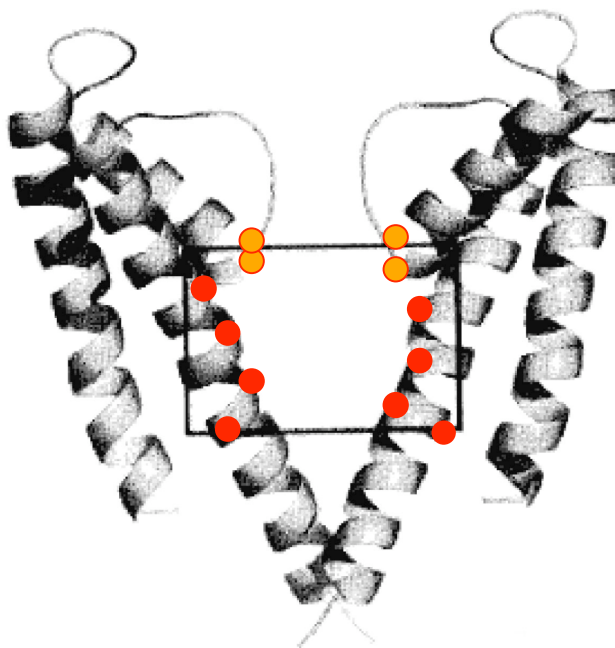
Obwohl das Risiko TdP zu entwickeln, proportional zur QTc Verlängerung ist, hängt die Entstehung der kardialen Komplikationen von mehreren Risikofaktoren ab. Zeltser *et al.* haben 249 Berichte von TdP, die nach der Behandlung mit nicht kardialen Medikamenten entstanden sind, analysiert und als stärksten Risikofaktor das weibliche Geschlecht (71% der Fälle) identifiziert. 41% der Patienten hatten ein Herzleiden, 28% der Patienten hatten Hypokaliämie und nur 18% der Patienten hatten in der Familienanamnese Fälle von TdP oder bereits diagnostizierte Verlängerung des QT-Intervalls. Als zusätzliche Risikofaktoren treten auch Bradykardie (<50 Schläge/min), kongenitales QT-Syndrom, Hypomagnesiämie, myokardiale Hypertrophie (bei arterieller Hypertonie und Herzinsuffizienz), Begleitmedikation mit anderen repolarisationsverlängernden Pharmaka sowie endokrine Dysbalancen (Hypothyreoidismus, Diabetes mellitus) auf (Abriel *et al.*, 2004; De Ponti *et al.*, 2002).

### **1.7 Pharmakologie des hERG-Kanals**

Für hERG-Kanalblocker „typische chemische Strukturelemente“ wurden bisher nicht identifiziert.

Erste Studien zur Identifizierung möglicher Bindungsstellen am hERG-Kanal wurden mit Dofetilid durchgeführt (Ficker *et al.*, 1998). Dofetilid erreicht seine Bindungsstelle von der intrazellulären Seite der Membran (Zou *et al.*, 1997). Die Bindungsstelle befindet sich vermutlich innerhalb der Pore zwischen Selektivitätsfilter und dem Aktivierungsgate (Mitcheson *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 1997; Mitcheson *et al.*, 2000b). Spätere Untersuchungen präzisieren die Lokalisation der Bindungsstelle auf dem S6 Segment. Lees-Miller *et al.* zeigten, dass die Mutation Phe656Val die Affinität von Dofetilid und Quinidin zu hERG stark reduziert. Mitcheson *et al.* postulierten, dass die Bindungsstelle von Aminosäuren, deren Reste in das Vestibül der Pore ragen, gebildet wird. Durch einen Alanin-Scan des S6 Segments und Testungen der Wirkung von hERG-Kanalblockern an einzelnen Ala-Mutanten, wurden vier AS in der S6 (Gly648Ala, Tyr652Ala, Phe656Ala und Val659Ala) und drei AS in der porenbildenden Schleife (Thr623Ala, Ser624Ala und Val625Ala) als sehr wichtig für die Bindung von vielen hERG-Blockern identifiziert.

Gly648, Tyr652, Phe656 sind voneinander durch eine  $\alpha$ -helikale Windung der Helix getrennt. Der Rest von Val659 ragt wahrscheinlich nicht in den Poreninnenraum. Die Mutante Val659Ala deaktiviert langsamer als WT und kann nicht zwischen zwei aufeinanderfolgenden Depolarisationen schließen, der Blocker verlässt in dieser Zeit den Kanal, was seine hemmende Wirkung vermindert. Val659 ist offensichtlich nicht am Aufbau der Bindungsstelle beteiligt, sondern die apparente Verminderung der Affinität ist eher durch die geänderten elektrophysiologischen Eigenschaften erklärbar. Die Mutation Gly648Ala beeinflusst die Wirkung von MK-499, Ibutilide und Clofilum und hat kaum oder keine Auswirkung auf die Wirkung von anderen Blockern wie z.B. Terfenadien oder Cisaprid, was darauf hinweist, dass diese Aminosäure nicht direkt am Aufbau der Bindungsstelle beteiligt ist. Substitutionen in dieser Position verursachen wahrscheinlich eher räumliche Behinderungen der Interaktion der Blocker mit der Bindungstasche (Mitcheson *et al.*, 2005).



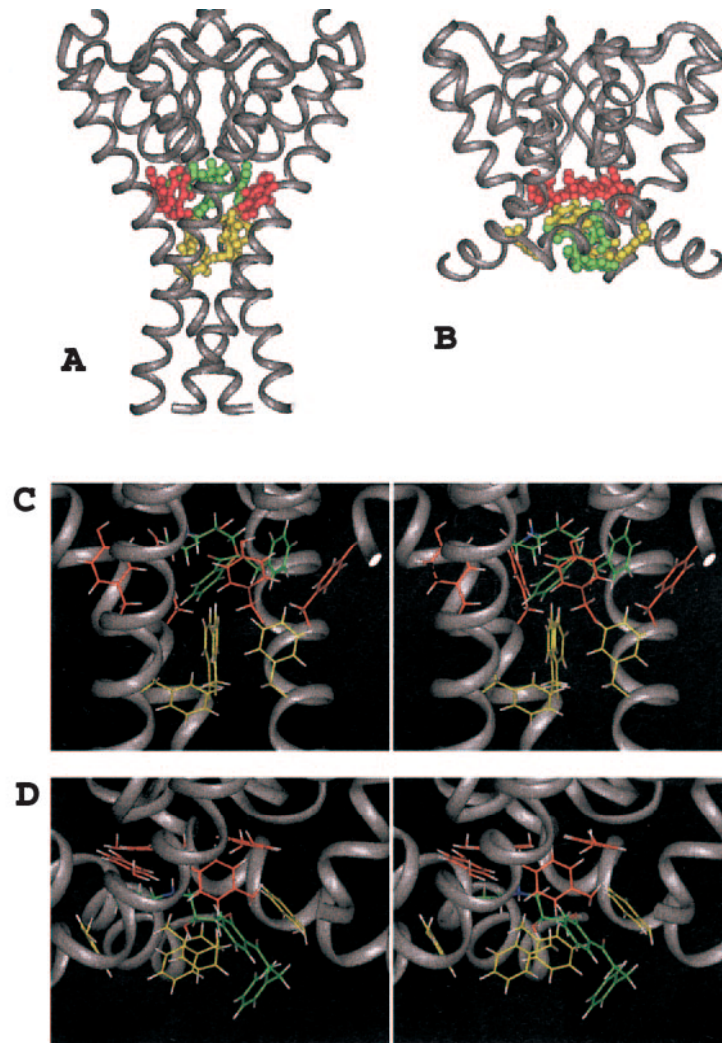
**Abb. 10** Seitenansicht der Segmente S5/S6 eines hERG-Kanal Homologimodells (modifiziert nach Mitchenson *et al.*, 2005) mit schematische Darstellung von AS die wichtig für die Bindung vielen hERG-Blockern sind

Die Mutationen Tyr652Ala und Phe656Ala verursachen für alle hERG Blocker eine Abschwächung der Wirkung, was daraufhin deutet dass diese Aminosäuren-Reste einen Teil der hERG Bindungsstelle bilden (Ridley *et al.*, 2004; Kanya *et al.*, 2001; Mitcheson *et al.*, 2000a; Lees-Miller *et al.*, 2000).

Andere K<sub>v</sub>-Kanäle haben in homologen Positionen aliphatische Ile und Val (Hanner *et al.*, 2001). Die aromatischen Tyr652 und Phe656 in hERG können  $\pi$  -  $\pi$  und Kationen -  $\pi$  Interaktionen mit hERG-Blockern eingehen, da viele Blocker einen basischen Stickstoff und die aromatische Reste in der Nähe dieses Stickstoffes haben (Recanatini *et al.*, 2005). (Mitcheson *et al.*, 2005)

Dass die Richtung, in der die Tyr652 und Phe656 angeordnet sind, wichtig für die Bindung von Blockern ist, zeigen Experimente mit Mutanten, bei denen die Position dieser zwei Aminosäurereste in beide Richtungen (C-Terminale und N-Terminale) verschoben wurden. Diese Mutanten zeigen für Cisaprid eine geringere Affinität als der WT (Chen *et al.*, 2002). Die acht aromatischen Aminosäuren (in jeder Untereinheit Tyr652 und Phe656) sind wahrscheinlich in zwei konzentrischen Ringen angeordnet, die sich den verschiedenen Blockerstrukturen anpassen können (Sanguinetti und Tristani-Firouzi, 2006). Anders als für die S6-Reste, haben die Aminosäuren in der Poren-Helix keine Bedeutung für die Bindung einer Großzahl der Blocker.

Neben funktionellen Untersuchungen, bei denen die Bindungsstellen von hERG-Blockern mit Hilfe von Alanin-Scanning-Mutagenese identifiziert werden, sind Docking Studien eine weitere Möglichkeit den Blockmechanismus verschiedener Substanzen zu untersuchen. Am Beispiel von Propafenon (Witchel *et al.*, 2004) wurde gezeigt, dass bei den Bindungsstudien an verschiedenen Mutanten nur die Mutation von Phe656 eine Auswirkung auf die Hemmwirkung hatte. Docking Studien von Propafenon in offenem (Kristallstruktur Koordinaten von MthK) und geschlossenem (Kristallstruktur Koordinaten von KcsA) Zustand eines Homologiemodells der Porenregion von hERG-Kanal zeigten, dass Propafenon an Phe656 ausschließlich im offenen Zustand bindet. In geschlossenem Zustand zeigten die Studien eine signifikante Interaktion von Propafenon mit Thy652 (siehe Abb. 11).



**Abb: 11** (aus Witchel et al. 2004)

Docking Modell für Propafenon im geschlossenen **a)** und offenen **b)** Zustand des Homologie Modells. **c)** und **d)** stellen die entsprechenden Propafenon Bindungsstellen im geschlossenen und offenen Zustand dar. Tyr652 (rot), Phe656 (gelb), C Atome von Propafenon (grün).

Der Block des hERG-Kanals durch Terfenadin und Cisapride (Mitchenson *et al.*, 2000) wird durch die Mutationen Thy652Ala und Phe656Ala stark abgeschwächt, beide aromatischen Aminosäuren sind offensichtlich für die Bindung von Terfenadin und Cisaprid erforderlich. Kamiya *et al.* zeigten, dass die blockierende Wirkung von E-4031 durch Mutationen von Thr623Ala, Ser624Ala, Val625Ala, Gly648Ala, Thy652Ala, Phe656Ala und Val659Ala vermindert wird. Beinahe identische Ergebnissen wurden für die Wirkung von zwei anderen Methansulfonaniliden MK-499 (Mitcheson *et al.*, 2000a) und Dofetilide (Kamiya *et al.*, 2006) erhoben. Der Block von Bepridil wurde durch die Thr623Ala, Ser624Ala, Val625Ala, Phe656Ala Mutationen reduziert

(Kamiya *et al.*, 2006). Ridley *et al.* zeigten, dass die Mutation Phe656Ala keine und Tyr652Ala nur sehr geringe Auswirkung auf den Block von hERG durch Amiodaron hat. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Pharmakon-Bindungsstellen an hERG-Kanälen offensichtlich durch wenige spezifische Aminosäurereste gebildet werden. Die Kombination der beteiligten Aminosäuren kann von Blocker zu Blocker verschieden sein.

## 1.8 „Trapping“

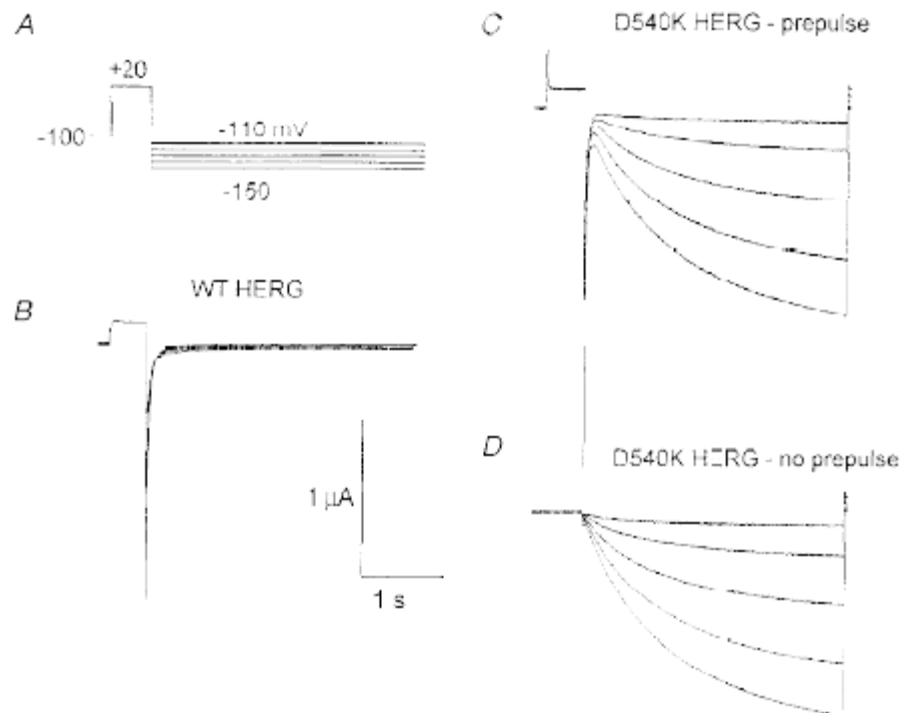
Experimente an  $I_K$ -Kanäle mit quartären Aminen (QA) zeigten, dass sich die Bindungsstelle für Blocker wie Triethylamin (TEA) und Tributylamin (TBA) wahrscheinlich in der Kanalpore befindet. QA erreichen die Bindungsstelle von der intrazellulären Seite der Membran und der Kanal muss dementsprechend öffnen, bevor QA ihn blockieren können. Nachdem die QA ihre Bindungsstelle erreicht haben und an diese binden, bleiben die Kanäle nach einer gängigen Hypothese offen, bis die QA von der Bindungsstelle vollständig dissoziiert sind („foot in the door“- Mechanismus). Danach schließen die Kanäle und gehen in den ursprünglichen, „nichtgeblockten“, geschlossenen Zustand über (Armstrong 1966, 1969, 1971). Weitere Untersuchungen zeigten, dass das Aktivierungstor die eigentliche Barriere für die Bindung von QA an den Rezeptor ist und dass dieses Tor sich an der zytoplasmatischen Seite der Membran befindet (Holmgren *et al.*, 1997). QA beeinträchtigen die Schließung des Aktivierungstors und verlangsamen die Deaktivierung.

Die „foot in the door“-Hypothese geht davon aus, dass der Blocker im offenen Kanal bindet und ein blockierter Kanal während der Repolarisation oder Hyperpolarisation nicht schließen kann, weil der Blocker als „foot“ die Schließung des Aktivierungstors „door“ hemmt. Dadurch kann der Blocker den Kanal wieder verlassen – recovery. Für den Fall, dass der Blocker das Schließen des Aktivierungstors nicht behindert, bleibt der Blocker während der Repolarisation oder Hyperpolarisation im Kanal gefangen - „trapped“ - und kann diesen während der Repolarisation nur sehr langsam verlassen (Mitcheson *et al.*, 2005).

Die meisten K<sub>v</sub>-Kanäle haben in der porenbildenden S6 Domäne ein Pro-Val(Ile)-Pro Motiv, welches einen Knick in den S6 Segmenten verursacht und dadurch das Innenvolumen der Pore verkleinert. Im hERG-Kanal fehlt dieses prolinhältige Motiv. Die Pore des hERG-Kanals ist somit wahrscheinlich größer als die Pore anderen K<sub>v</sub>-Kanäle. Je größer das Porenvolumen des Kanals im geschlossenen Zustand ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass auch große Moleküle im Kanal verschlossen (trapped) bleiben. Aus Untersuchungen der Block-Kinetik und „state-dependence“ des Blocks am hERG-Kanal ergaben sich vielfache Hinweise auf „drug-trapping“ (Mitcheson *et al.*, 2000; Perry *et al.*, 2004; Witchel *et al.*, 2004; Kamiya *et al.*, 2006).

### 1.8.1 D540K Mutante

Die Möglichkeit, ein „drug-trapping“ experimentell zu belegen, bietet die Verwendung der Mutante D540K. Die D540K Mutation destabilisiert den geschlossenen Zustand des Kanals wahrscheinlich durch eine elektrostatische Abstoßung durch Arg665, der sich am C-terminalen Ende von S6 befindet. Dadurch öffnet der D540K hERG-Kanal bei Hyperpolarisation, ohne dass die Leitfähigkeit des Kanals bzw. seine Selektivität für K<sup>+</sup>-Ionen beeinflusst werden (Sanguinetti und Xu, 1999; Tristam-Firouzi *et al.*, 2002).



**Abb. 12** (aus Sanguinetti und Xu, 1999)

**a)** Spannungsprotokoll für Untersuchungen der Wiederöffnung von Kanälen durch Hyperpolarisation der Zellmembran **b)** WT hERG: Nach der 0.5 s Depolarisation (bei +20 mV) des WT hERG-Kanals, wird die Zellmembran auf negativere Potentiale (<-110 mV) hyperpolarisiert. Die Hyperpolarisation verursacht einen kurzen transienten Einwärtsstrom, (recovery von der Inaktivierung), gefolgt vom 0 Strom **c)** D540K hERG-Strom reaktiviert nach der Deaktivierung durch die Hyperpolarisation.

**d)** Ströme durch den D540K hERG-Kanal, aufgenommen mit dem beschriebenen Spannungsprotokoll, bei dem jedoch die konditionierenden Depolarisierungen fehlen. Die Kinetik der langsamen Reaktivierung des D540K hERG-Kanals -aufgenommen mit und ohne Deaktivierungspräpuls - ist identisch, was darauf hinweist, dass die Öffnung der Kanäle durch eine vorangehende Depolarisation für die Reaktivierung von D540K während einer Hyperpolarisation nicht erforderlich ist.

## 1.9 hERG-Kanalblocker

### 1.9.1 Antiarrhythmika

**Amiodaron** wurde 1961 in Belgien zur Behandlung von Angina pectoris entwickelt. Heute wird Amiodaron als wirksames Antiarrhythmikum bei supraventrikulären und ventrikulären Arrhythmien eingesetzt. Seine

antiarrhythmische Wirkung erreicht Amiodaron über die Blockade von Kaliumkanälen und gehört aufgrund dieses Wirkungsmechanismus zur Klasse-III Antiarrhythmika. In Abhängigkeit von der Therapiedauer blockiert Amiodaron entweder  $I_{Kr}$ - (Kurzzeit-Therapie) oder  $I_{Ks}$ -Ströme (Langzeit-Therapie) (Kamiya *et al.*, 2000). Amiodaron zeigt aber auch blockierende Wirkung am  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Kanal und  $\beta$ - Rezeptoren, und weist damit Eigenschaften von Klasse IA, Klasse-II und Klasse-IV Antiarrhythmika auf. Ein zweiter möglicher antiarrhythmischer Wirkungsmechanismus von Amiodaron ist die Modulation von Genexpression von Ionenkanälen und anderen Proteinen (Kodama *et al.*, 1997).

Amiodaron induziert Nebenwirkungen wie gelbbraune Ablagerungen in der Hornhaut, Photosensibilität, Schilddrüsenfunktionsstörungen, Leberfunktionsstörungen und idiopathische pulmonale Fibrose. TdP's, die charakteristische Nebenwirkung der Klasse-III Antiarrhythmika, kommt selten vor (Bauman, 1997; Mutchler, 2001). Das Ausbleiben von TdP's als Nebenwirkung trotz der hERG-blockierenden Wirkung, ist durch die zusätzliche Wirkung von Amiodaron auf  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Kanäle und  $\beta$ -Rezeptoren zu erklären.

Der hERG-Kanal wird durch Amiodaron im geschlossenen, offenen und inaktivem Zustand blockiert. An *Xenopus* Oozyten gemessene  $IC_{50}$  lag bei 10  $\mu M$ , was der 3-4-fachen therapeutischen Plasmakonzentration entspricht. In wässriger Lösung dissoziiert Amiodaron in eine neutrale und eine positiv geladene Form. Die spannungsabhängige Komponente des Blocks kann durch die positiv geladene Form von Amiodaron hervorgerufen werden. In neutraler Form diffundiert Amiodaron durch die Membran oder akkumuliert (wegen seiner hohen Lipophilität) in der Membran. Der Block des hERG-Kanals in geschlossenem Zustand könnte durch die neutrale Form hervorgerufen werden (Kiehn *et al.*, 1999).

**E-4031** zusammen mit Dofetilid, MK-499 und Sotalol gehören zu Methansulfonaniliden der Klasse-III Antiarrhythmika ( $K^+$ -Kanalblocker). Es besteht bei allen Vertretern der Methansulfonanilide ein erhöhtes Risiko zur

Entwicklung von TdP-Arrhythmien. (Roden, 1993) Diese unerwünschte Wirkung entfalten die Methansulfonanilide über ihre hERG-blockierende Wirkung (Gwilt *et al.*, 1991).

Bei der Therapie von Tachykardien ist die Verlängerung des AP's erwünscht, jedoch bei Methansulfonaniliden ist die Verlängerung des AP's bei Tachykardie schwächer als bei Bradikardie ausgeprägt. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass die Methansulfonanilide in der Pore des hERG-Kanals gefangen (trapped) sind und sich der Kanal dadurch nicht vom Block erholen kann (Mitcheson *et al.*, 2000b, Kamiya *et al.*, 2006, Ishii *et al.*, 2003). Bei erhöhter Herzfrequenz ist die Blockakkumulation stärker ausgeprägt. Viele Methansulfonanilide binden an den hERG-Kanal in offenem und/oder geschlossenem Zustand (Spector *et al.*, 1996; Taglialatela *et al.*, 1998). Es wurde gezeigt, dass auch die Inaktivierung für den Block wichtig ist, da Mutanten, bei denen die Inaktivierung aufgehoben ist, weniger Affinität für Methansulfonanilide zeigen als WT hERG-Kanäle (Ficker *et al.*, 1998; Lees Miller *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1997)

Die  $IC_{50}$  von E-4031 für den hERG-Kanal, gemessen an *Xenopus* Oocyten, beträgt  $0.57 \pm 0.13 \mu M$  (Kamiya *et al.*, 2006). E-4031 teilt sich die Bindungsstelle mit anderen Methansulfonaniliden. Für den blockierenden Effekt am hERG sind Aminosäure Thr623, Ser624, Val625 sowie Gly648, Thr652, Phe656, Val659 wichtig (Kamiya *et al.*, 2006).

**Bepridil** gehört zur Klasse IV-Antarrhythmika ( $Ca^{2+}$ -Kanal Blocker) und weist zusätzlich eine starke hERG blockierende Wirkung auf (Fossa *et al.*, 2004; Chouabe *et al.*, 1998; Kamiya *et al.*, 2002). Der Block des hERG-Kanals durch Bepridil ist spannungsabhängig (Chouabe *et al.*, 1998). Bepridil wird im Kanal „getrapped“ und für die Kanalhemmung scheinen sowohl Thr623, Ser624, Val625 als auch Phe656 wichtig zu sein (Kamiya *et al.*, 2006).

### 1.9.2 Psychopharmaka

**Droperidol und Haloperidol** sind Butiropenon-Derivate mit stark neuroleptischer Wirkung. Haloperidol hat zusätzlich eine antiemetische Wirkung und wird bei neurologischen Erkrankungen mit Hyperkinesie und hirnorganisch bedingten Verhältnisstörungen und Unruhezuständen verabreicht.

In der klinischen Praxis verursacht Haloperidol bei Monotherapie keine signifikante Verlängerung des QT-Intervalls, wogegen in der Kombinationstherapie mit Antidepressiva signifikante QT-Verlängerungen beobachtet wurden (Sala *et al.*, 2005). Über das Auftreten von TdP nach intravenöser Gabe von Haloperidol sowie bei Haloperidolüberdosierungen wurde wiederholt berichtet (Henderson *et al.*, 1991; Wilt *et al.*, 1993; Perrault LP *et al.*, 2000; Hatta *et al.*, 2001; Tisdale *et al.*, 2001; Hassaballa *et al.*, 2003).

Haloperidol ist ein hochpotenter hERG-Kanalblocker (Katchman *et al.*, 2006). Suessbrich *et al.* zeigten, daß Haloperidol am inaktiven hERG-Kanal bindet. Droperidol hat eine starke Affinität zum D<sub>2</sub>-Rezeptor, sowie eine geringere Affinität zu D<sub>3</sub>-, 5-HT<sub>2</sub>- und  $\alpha_1$ -Rezeptoren. Wegen seiner D<sub>2</sub>-Rezeptoren blockierenden Wirkung wird Droperidol als Antiemetikum bei akuter postoperativer oder Chemotherapie-induzierter Übelkeit verwendet. (Mutschler, 2001)

Nach der Gabe von Droperidol in Dosierungen, die für die Anästhesie erforderlich sind (0.25 mg/kg), wurde über das Auftreten von TdP berichtet (Guy *et al.*, 1991). Obwohl keine Berichte über schwerwiegende Arrhythmie und Verlängerung des QT- Intervalls nach Verabreichung antiemetischer Droperidol-Dosierungen (0.625 – 1.25 mg) vorliegen, wurde seine Verschreibung als Antiemetikum stark reduziert (Scuderi, 2003; Habib und Gan, 2003; White *et al.*, 2005).

Droperidol blockiert den hERG-Strom (Drolet *et al.*, 1999). Für die Kanalhemmung sind die Reste Thr623, Ser624, Val625, Tyr652 und Phe656 von Bedeutung.

**Thioridazin** ist ein schwach wirksames Neuroleptikum und wird als Antipsychotikum–Tranquilizer verwendet. Es gehört zu den Phenothiazin-Verbindungen vom Pekazin-Typ und ist als einziger Vertreter dieser Neuroleptika-Gruppe am Markt (Mutschler). Seine Wirkung entfaltet Thioridazin über eine Blockade prä- und postsynaptischer Dopaminrezeptoren. Zusätzlich wirkt es blockierend auf serotonerge, noradrenerge, histaminerge und cholinerge Rezeptoren.

Kurz nach seiner Einführung in die klinische Praxis, wurden im Jahre 1963 kardiotoxische Wirkungen von Thioridazin bekannt (Kelly *et al.*, 1963). Es folgten weitere Berichte über QT-Verlängerungen und/oder Todesfälle, verursacht durch Gabe von Thioridazin (Mehtonen *et al.*, 1991; Reilly *et al.*, 2000; Buckley *et al.*, 1995; Haverkamp *et al.*, 2000; Desautels *et al.*, 1964; Huston and Bell, 1966; Schoonmaker *et al.*, 1966; Fowler *et al.*, 1976; Kemper *et al.*, 1983; Quieffin *et al.*, 1991; Hulisz *et al.*, 1994). Im Jahr 2000 forderte die FDA folglich die Einschränkung seiner Verschreibung.

Thioridazin blockiert sowohl  $I_{Kr}$  (Reilly *et al.*, 2000) als auch  $I_{Ks}$  (Young *et al.*, 1986). Die  $IC_{50}$  für die blockierende Wirkung am hERG-Kanal liegt zwischen 0.1 und 1  $\mu$ M (Milnes *et al.*, 2006). Es zeigt sehr geringe Selektivität für dopaminerge und serotonerge Rezeptoren im Vergleich zum hERG-Rezeptor (Kongsamut *et al.*, 2002). Dieser Mangel an Selektivität ist eine mögliche Erklärung für die häufig auftretenden Arrhythmien bei Gabe therapeutischer Dosen. Nach Milnes *et al.* diffundiert Thioridazin durch die Zellmembran und erreicht die Bindungsstelle in der Kanalpore nach Überwindung des „Aktivierungsgates“. Untersuchungen mit Ala-Mutanten zeigten, dass Phe656 und Tyr652 einen Teil der Bindungstasche sind.

### 1.9.3 Antihistaminika

**Terfenadin** gehört zu den Antihistaminika der zweiten Generation. Es wird in der Leber mit Hilfe des Isoenzym CYP3A4 des Cytochrom-P-450 Systems in einen aktiven Metaboliten (Fexofenadin) und in einen inaktiven Metaboliten biotransformiert. Der hERG-Kanal wird durch Terfenadin und nicht durch wirksame Metaboliten blockiert (Woosley *et al.*, 1993). Bei Störungen des Abbaus oder bei Überdosierungen können Plasmakonzentrationen erreicht werden, die zu hERG- Kanalblockierung führen (Yap und Camm, 1999).

Der erste Bericht über Kardiotoxizität von Terfenadin stammt aus dem Jahr 1989 (Davies *et al.* 1989). 1992 wurde dem FDA von 25 TdP- Fällen berichtet, die durch Terfenadin verursacht wurden (Woosley *et al.*, 1993).

An GPV blockt Terfenadin  $I_{Kr}$  mit einer  $IC_{50}$  von 50nM und  $I_{Ks}$  mit einer  $IC_{50}$  von 10  $\mu$ M (Delpon *et al.*, 1999; Suessbrich *et al.*, 1996; Salata *et al.*, 1995). Der hERG-Kanal wird von Terfenadin im inaktivierten Zustand blockiert (Suessbrich *et al.*, 1996). Die  $IC_{50}$  für den hERG-Kanalblock, gemessen am Oocyten, beträgt 1.8  $\mu$ M (Yang *et al.*, 2004). An der Terfenadin-Bindungsstelle sind Tyr652 und Phe656 beteiligt (Sanguinetti *et al.*, 2005).

**Diphenhydramin** ist ein Antihistaminikum, das wegen seiner starken sedierenden Wirkung auch als Sedativum eingesetzt wird. Es wurde sowohl eine  $I_{Kr}$ -hemmende ( $IC_{50}=30\mu$ M), eine hERG-hemmende ( $IC_{50}=27\mu$ M) als auch eine  $I_{Ks}$ -hemmende Wirkung ( $IC_{50}=130 \mu$ M) des Diphenhydramines beschrieben (Delpon *et al.*, 1999).

### 1.9.4 Prokinetika

Cisaprid ist ein gastrointestinaler Stimulant (Prokinetikum), der vor allem zur Therapie der Refluxkrankheit (GERD) eingesetzt wurde. Aufgrund von relativ häufigen QT- Verlängerungen, ventrikulären Arrhythmien und dadurch verursachten Todesfällen (341 Herzrhythmusstörungen und 80 Todesfälle) wurde Cisaprid im Jahr 2000 vom US Markt zurückgezogen (Janssen-Cilag, 2000). Diesem Beispiel folgten die Gesundheitsbehörden von Großbritannien

(2000) und der Schweiz (2004). In anderen Ländern ist Cisaprid noch immer mit eingeschränkter Indikation zugelassen (Wysowski und Bacsanyi, 1996). Für seine hERG-kanalblockierende Wirkung (Mohammad *et al.*, 1997) sind die Aminosäuren Tyr652 und Phe656 ausschlaggebend (Sanguinetti *et al.*, 2005).

**Domperidon** ist ein Dopaminrezeptorantagonist und wird als Antiemetikum verwendet. Neben seiner antiemetischen Wirkung, wirkt Domperidon auch prokinetisch. Nachdem Cisaprid vom Markt zurückgezogen wurde, gewann Domperidon als Ersatztherapeutikum bei GERD an Bedeutung. Nach intravenöser Gabe von Domperidon wurden QT-Verlängerung und das Auftreten von Tachyarrhythmien berichtet. Diese unerwünschte Wirkung kommt, wie bei Cisaprid, durch die Blockade des hERG-Kanals zustande (Drolet *et al.*, 2000; Rocha und Barbosa, 2005).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Lösungen

Alle Chemikalien und Lösungen wurden von Sigma Aldrich bezogen, die Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und bei Bedarf sterilfiltriert oder autoklaviert.

#### Lösung für die Präparation (OR<sub>2</sub>):

82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH 7.5 (NaOH)

#### Verdauungslösung:

20 mg Kollagenase Typ 1A in 10 ml OR<sub>2</sub>

#### SOS<sub>1</sub> Nährmedium für den ersten Tag (Tag der Injektion):

13.9 mM (2.5g) Glucose, 81.8 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.94 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.35 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 2.5 mM Na-Pyruvat, pH = 7.4 (NaOH)

Nach dem Autoklavieren: Zugabe von 1 ml sterilfiltrierter Penicillin/Streptomycin-Lösung, 6-10 ml steril filtriertem Pferdeserum und Glucose.

#### SOS<sub>2</sub> Nährmedium ab dem 2. Tag:

5.5 mM (1g) Glucose, 90.7 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.94mM MgCl<sub>2</sub>, 2.35 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 2.5 mM Na-Pyruvat, pH = 7.4 (NaOH)

Nach dem Autoklavieren: Zugabe von 1 ml sterilfiltrierter Penicillin/Streptomycin-Lösung, 6-10 ml steril filtriertem Pferdeserum und Glucose.

#### Penicillin/ Streptomycin- Lösung

Zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen wurden den Medien zusätzlich Antibiotika (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ ml Streptomycin) zugesetzt.

#### Extrazelluläre Lösung ( ND 96):

96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5 (NaOH)

Intrazelluläre Lösung:

3 M KCl, 10 mM HEPES (pH 7.4)

Extrazelluläre Lösung für die Testungen am D540K Mutant:

96 mM NaMes, 2 mM KMes, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM HEPES, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.6  
(Methansulfonsäure)

Pharmaka

Von den zu testenden Substanzen wurden jeweils 10 mM Stammlösungen angesetzt, wobei Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel diente. Diese Stammlösungen wurden am Tag des Experiments mit der Lösung ND96 entsprechend verdünnt. Die maximale DMSO Konzentration (0.1%) zeigte keinen Einfluss auf die hERG Ströme.

## **2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.1 *Xenopus laevis* Oozyten als Expressionssystem**

Gurdon *et al.* zeigten erstmals 1971, dass es möglich ist, exogene mRNA-Spezies durch Injektion in das Zytoplasma von *Xenopus laevis* Oozyten zu exprimieren. *Xenopus* Oozyten werden für verschiedene Studien von Rezeptoren beziehungsweise Ionenkanälen verwendet. Die Oozytenmembran ist aus 6 Membranschichten aufgebaut. Morphologisch unterscheidet man zwei Hälften: Die animalische, die aufgrund des Melaninpigments braungefärbt ist und die vegetative, gelbe Hälfte (Dascal, 1987). Nach Reifegrad und Aussehen können sechs Entwicklungsstadien unterschieden werden. Für experimentelle Zwecke eignen sich am besten Oozyten im Entwicklungsstadium V - VI (Goldin, 1991).

### **2.2.2 Oozytenpräparation**

Die Oocyten wurden von weiblichen *Xenopus laevis* (NASCO, USA) operativ entnommen. Der zu operierende Frosch wird zur Betäubung ca. 15 Minuten in 500 ml (Ethyl-3-aminobenzoatmethansulfonat) MSS Puffer gelegt (Goldin, 1991). Es wird ein ca. 1 cm langer Schnitt (Schnitt durch die Haut, mesenterium, Muskel) in der Lendenregion durchgeführt. Die Oocyten, die im

Bindegewebe eingebettet als Lappen vorliegen, werden entnommen und in den OR<sub>2</sub> Puffer gelegt. Der Schnitt wird mit 2-3 Nähten verschlossen. Nach Beenden der Operation wird der Frosch zum Aufwachen in Wasser gelegt. Dem entnommenen zellulären Material wird zur enzymatischen Verdauung des Bindegewebes die Verdauungslösung beigelegt und es wird für ungefähr 90 min bei 18°C inkubiert (Goldin, 1991).

Durch die Kollagenasebehandlung der Oocyten kann rasch eine große Zahl von einzelnen Oocyten präpariert werden. Da Kalzium-Ionen durch die Aktivierung von unspezifischen Proteasen toxisch wirken (Goldin, 1991), werden die Eizellen vor und besonders nach der Kollagenasebehandlung sorgfältig gewaschen und in Ca<sup>2+</sup>-haltige ND96-Lösung transferiert und bei 16-18°C einer weiteren Inkubation (etwa 3 Stunden) ausgesetzt. Nach dieser Inkubationsphase sind die Oocyten für die RNA Injektion bereit.

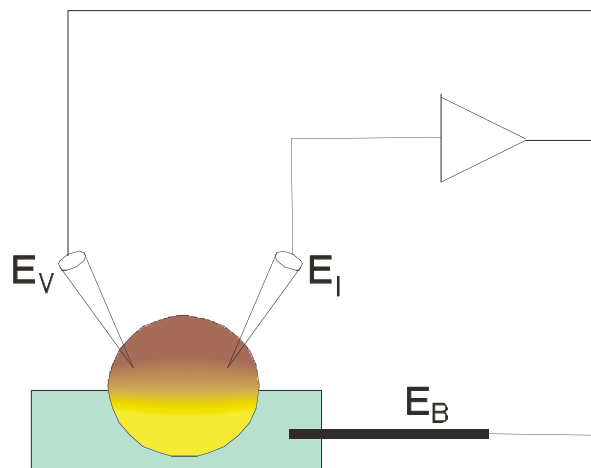
### 2.2.3 Mikroinjektion von RNA

Die cDNA des hERG-Kanals (Acc. NP\_000229) lag inseriert im Plasmid pSP64 Poly(A) vor und wurde freundlicherweise von Prof. Sanguinetti (Universität Utah, USA) zur Verfügung gestellt. Mittels in-vitro Transkription erfolgte dann die Umschreibung der cDNA in cRNA und wurde von Frau Dr. Annette Hohaus durchgeführt.

Für die Injektion der cRNA wurden die Elektroden am Mikroelektrodenpuller (L/M-3P-A, List-Medical) gezogen (Borosilikat Glaskapillare, 1.5 mm x 0.86 mm, Harvard apparatus) und dann deren Spitze unter dem Mikroskop vorsichtig abgebrochen. Die abgebrochene Mikroelektrode wurde auf den Mikroliterinjektor aufgesetzt. Danach wurde 2.5 µl cRNA Lösung (Konzentrationen 0.35, 0.7 und 3.5 µg/µl) luftblasenfrei in die Kapillare aufgesaugt und in die Oozyten injiziert. Um die Kontamination der RNA mit den RNAsen zu vermindern, ist dieser Arbeitsvorgang mit Handschuhen durchzuführen. Für unsere Experimente wurden in die einzelnen Oozyten jeweils ca. 75 nl hERG kodierende cRNA injiziert (Konzentrationen 3,5 µg/µl; 0,7 µg/µl; 0,35 µg/µl).

Je nach Konzentration der injizierten cRNA wurden die Oozyten 1, 2 oder 3 Tage inkubiert.

### 2.3 Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik



**Abb. 13:** Die Zwei-Mikroelektroden Spannungsklemmtechnik

Die Versuchsanordnung besteht aus einer intrazellulären Elektrode ( $E_V$ ) und einer extrazellulären Referenzelektrode  $E_B$  (im Bad) zur Messung des aktuellen transmembranären Potentials. Das gemessene Membranpotential wird mit einem Rückkopplungsverstärker verstärkt. Dieser Wert wird dann mit dem benötigten (vom Experimentator vorgegebenen) Membranpotential verglichen. Über die zweite intrazelluläre Mikroelektrode  $E_I$  wird die Menge an Strom, die notwendig ist, um das vorgegebene Membranpotential zu erreichen bzw. konstant zu halten, in die Zelle appliziert und gemessen. Der Verstärker funktioniert nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung, da der über die zweite Mikroelektrode injizierte Strom jeweils mit umgekehrtem Vorzeichen zum von der Zellmembran generierten Aktionsstrom fließt (Hille, 2001). Über die Messung des Stroms, der über die zweite intrazelluläre Elektrode appliziert wird, erfolgt die eigentliche transmembranäre Strommessung.

Für die „voltage clamp“ Messungen werden Borosilikatmikroelektroden verwendet, die mit intrazellulärer Lösung gefüllt wurden. In diese wurden Ag-

AgCl Drähte getaucht. Als extrazelluläre Referenzelektrode wurde ebenfalls ein Ag-AgCl Draht verwendet, der mit dem Bad in Verbindung stand.

### 2.3.1 Durchführung der Messung

Die Messungen wurden 1-3 Tage nach der Injektion der Oozyten durchgeführt. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur in ND96-Lösung vorgenommen. Die spannungsmessenden und stromgebenden Mikroelektroden waren mit intrazellulärer Lösung gefüllt und hatten einen Widerstand von 0,3 - 2 M $\Omega$ .

Die Amplitude von endogenen Strömen (gemessen in mit Wasser injizierten Oocyten) war nicht höher als 0.15  $\mu$ A. Die Ströme durch hERG-Kanäle, die größer als 3  $\mu$ A waren, wurden für die Messungen nicht verwendet, um eine fehlerhafte Spannungsquelle zu vermeiden.

Die Messkammer (Gesamtvolumen 300  $\mu$ l) wurde vor den Experimenten kontinuierlich mit ND96-Lösung perfundiert (1 $\mu$ l/sec). Um die Einstellung einer stabilen Stromamplitude (nach einer „run up“ Phase) zu beurteilen, wurde alle 30 Sekunden eine Depolarisation appliziert (Pulsfrequenz: 0,03Hz). Die Voraussetzung für den Beginn einer Messung waren stabile Stromamplituden über einen Zeitraum von mindestens 10 Minuten.

Die Zellen wurden dann nach Applikation mit einer Substanzlösung für 3 Minuten damit perfundiert. Dabei kam ein Perfusionssystem zum Einsatz, welches einen Lösungsaustausch innerhalb von 100 ms (Baburin *et al.*, 2006) ermöglicht. Nach der Gleichgewichtsperiode wurden mit unterschiedlicher Frequenz Spannungsänderungen appliziert und die gemessenen hERG Ströme aufgezeichnet.

Die Daten wurden mit dem DIGIDATA 1200- Verstärker (Amplifier) und der pClamp Version 8.0 (Axon Instruments, Inc, Union City, California, USA) aufgezeichnet. Für die Analyse der Ergebnisse, sowie für die Anpassung von Kurven wurde Microcal Origin 7.0 verwendet.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  S.E (Standardabweichung) dargestellt, wobei die Messungen von mindestens 3 verschiedenen Oocyten,

aus mindestens 2 verschiedenen Präparationen, stammen. Die statistische Signifikanz der Werte wurde mit ungepaartem Student's t-Test geprüft. Die statistische Signifikanz der Werte wurde durch  $p < 0.05$  definiert.

### 2.3.2 Spannungsprotokolle

#### ***Standardprotokoll***

Das Standardprotokoll für die Bestimmung der Hemmung von hERG Strömen bestand aus vier Potentialstufen unterschiedlicher Amplitude: -80 mV (50 ms), +20 mV (300 ms), -40 mV (300 ms) und -80 mV (100 ms).

Die Potentialsprünge wurden mit unterschiedlicher Frequenz appliziert (d.h. 1 s, 3 s, 10 s, 30 s Zeitabstand zwischen den Pulssequenzen).

#### ***Bestimmung der Inhibierung des hERG-Kanals bei verschiedenen Vorimpulslängen***

Um einen potentiellen Einfluss der Inaktivierung auf die Hemmung der hERG-Kanäle zu bestimmen, wurden verschiedene Vorimpulslängen (Spannungsstufe auf +20 mV) appliziert. Die Länge des Stufe betrug dabei 300 ms, 600 ms und 1000 ms.

#### ***Bestimmung der Konzentration für die halbmaximale Inhibierung ( $IC_{50}$ ) des hERG-Kanals***

Der use-dependent hERG-Kanal Block wurde durch die Messung der Hemmung der „tail“ Stromamplitude bestimmt. Die „tail“ Stromamplitude wurde bei einem Potentialsprung von +20 mV auf -40 mV gemessen. Die Konzentrations-Wirkung Kurven wurden mit Hilfe der Hill Gleichung gefittet:  $I_{\text{HERG,drug}}/I_{\text{HERG,control}} = (100-A)/(1+(C/IC_{50})^{n_H})+A$ . Die  $IC_{50}$  entspricht dabei derjenigen Konzentration, bei der 50% der Stromamplitude gehemmt wird, C ist die applizierte Substanzkonzentration, A ist die Fraktion des hERG Stroms, der nicht blockiert wurde und  $n_H$  ist der Hill Koeffizient.

#### ***Protokoll für Bestimmung der Kanaldeblockierung der Mutante D540K***

Es wurden zunächst 5 s lange Depolarisationspulse (auf 0 mV) alle 15 Sekunden, appliziert, um den Strom zu inhibieren. Anschließend wurde eine

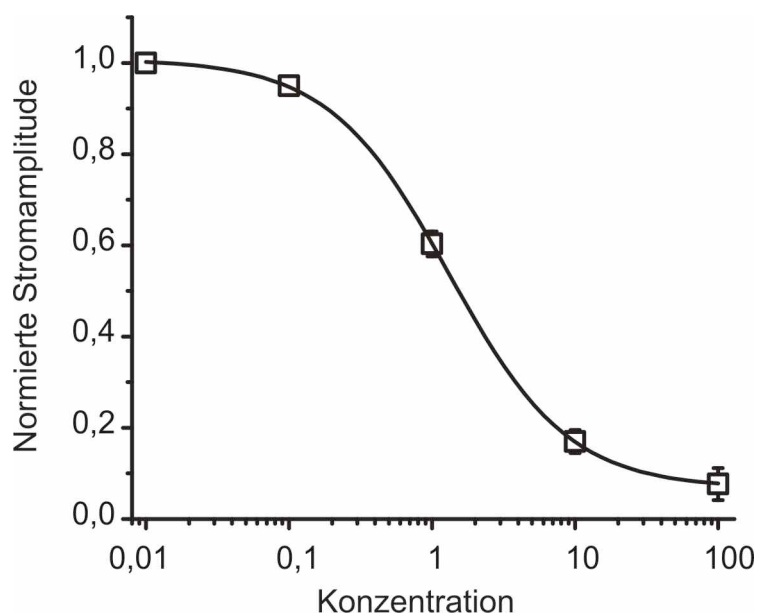
Serie von 20 Hyperpolarisationstestpulsen (-140 mV, ebenfalls 5 s lang) in Intervallen von 15 s appliziert, um die Erholung vom Block während der Hyperpolarisation zu beobachten. Die hyperpolarisierenden Pulse wurden in Anwesenheit der zu testenden Substanz durchgeführt. Anschließend wurde ein Depolarisationspuls appliziert, um das Ausmaß der Erholung vom Block zu bestimmen.

### 3 Ergebnisse

#### *Testung der Wirksamkeit am hERG-Kanal*

In der vorliegenden Arbeit wurden 17 Pharmaka hinsichtlich ihrer hERG-Kanal inhibierenden Wirkung verglichen. Ziel der Arbeit war es, aus der Kinetik der Stromhemmung durch Substanzen unterschiedlicher Struktur Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus zu ziehen. Im Mittelpunkt der Arbeit steht die Charakterisierung der kanalzustandsabhängigen Wirkung.

Zunächst wurde die jeweilige  $IC_{50}$  durch Anwendung des Standardsprotokolls (siehe Material und Methoden) bestimmt. Abbildung 14 illustriert die Bestimmung der  $IC_{50}$  für Bepridil. Die gemessenen  $IC_{50}$  aller Testsubstanzen sind in Tabelle 2 aufgelistet. Aufgrund der ersten experimentellen Ergebnisse wurden die getesteten Pharmaka in zwei grosse Gruppen unterteilt: aktive und inaktive Substanzen.



**Abb.14:** Ergebnisse von  $IC_{50}$ -Messungen am Beispiel von Bepridil

**Tabelle 2:**  $IC_{50}$ -Werte  $\pm$  S.D. für Stromamplitude

| Substanzen     | $IC_{50}$ (oder %-Inhibierung der Stromamplitude gemessen bei 100 $\mu$ M) | Hill Koeffizient |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Adriamycin     | $13 \pm 5\%$ (n=3)                                                         |                  |
| Captopril      | $< 5\%$ (n=3)                                                              |                  |
| Indapamid      | $< 5\%$ (n=3)                                                              |                  |
| Lidocain       | $< 5\%$ (n=3)                                                              |                  |
| Procain        | $42 \pm 20\%$ (n=4)                                                        |                  |
| Propranolol    | $63 \pm 3.7\%$ (n=3)                                                       |                  |
| Amiodaron      | $7.2 \pm 0.6 \mu$ M (n=4)                                                  | $0.63 \pm 0.13$  |
| Bepridil       | $1.3 \pm 0.4 \mu$ M (n=3)                                                  | $1.10 \pm 0.06$  |
| Cisaprid       | $651 \pm 345$ nM (n=3)                                                     | $1.46 \pm 0.31$  |
| Diphenhydramin | $22 \pm 10 \mu$ M (n=3)                                                    | $1.09 \pm 0.23$  |
| Droperidol     | $1.3 \pm 0.4 \mu$ M (n=2)                                                  | $0.95 \pm 0.15$  |
| Domperidon     | $4.61 \pm 1.4 \mu$ M (n=3)                                                 | $1.15 \pm 0.10$  |
| E-4031         | $2.6 \pm 0.3 \mu$ M (n=2)                                                  | $2.28 \pm 0.45$  |
| Haloperidol    | $2.25 \pm 0.1 \mu$ M (n=4)                                                 | $1.09 \pm 0.04$  |
| Chinidin       | $13 \pm 5 \mu$ M (n=2)                                                     | $1.03 \pm 0.01$  |
| Terfenadin     | $1.0 \pm 0.2 \mu$ M (n=3)                                                  | $2.37 \pm 0.85$  |
| Thioridazin    | $8.2 \pm 0.8 \mu$ M (n=3)                                                  | $1.62 \pm 0.12$  |

### 3.1 Inaktive Substanzen:

Substanzen, die keine oder nur eine sehr schwache inhibierende Wirkung auf die hERG Ströme zeigten ( $IC_{50} > 50 \mu$ M), wurden als inaktiv bezeichnet.

Zu dieser Gruppe gehören:

- Adriamycin (ein Zytostatikum aus der Gruppe der Anthrazykline)
- Captopril (ACE-Hemmer)
- Indapamid
- Lidocain (Antiarrhythmikum Klasse Ib und Lokalanästhetikum)
- Procain (Lokalanästhetikum vom Ester-Typ)

- Propranolol (nicht selektiver  $\beta$ -Blocker)

### 3.2 Wirksame Substanzen

Alle Pharmaka, für deren hERG-Kanal inhibierende Wirkung eine  $IC_{50} < 50$   $\mu$ M gemessen wurde, wurden als potente hERG Blocker klassifiziert (siehe Tabelle 2).

Zu dieser Gruppe gehören folgende getestete Substanzen:

- **Antiarrhythmika:** Amiodaron, Bepridil, E-4031, Chinidin
- **Antihistaminika:** Diphenhydramin, Terfenadin
- **Antipsychotika:** Droperidol, Haloperidol, Thioridazin
- **Prokinetika:** Domperidon, Cisaprid

#### „use-dependent“ oder Tonische –Blocker

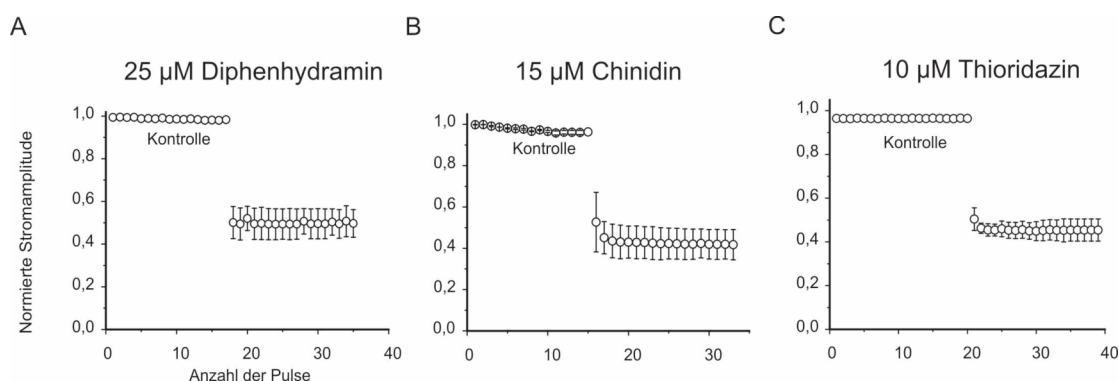
Die Kinetik des hERG-Kanals ist durch drei Kanalzustände beschrieben (geschlossener, offener und inaktivierter Zustand - siehe Einleitung). Um festzustellen in welchem Zustand des hERG-Kanals die Bindungsstellen für die jeweiligen hERG-Kanalblocker erreichbar sind, wurde die Kanalzustandsabhängigkeit der inhibitorischen Wirkung charakterisiert. In dieser Sinne wurde die Inhibitorische Wirkung jeweiliger Testsubstanz (Konzentration =  $IC_{50}$ ) mit Hilfe des Standardprotokolls (Testpulsfrequenz = 1 Hz) gemessen. Mit jedem Testpuls wurden die Kanäle aktiviert und somit in den offenen Zustand gebracht. Die Stromhemmung, induziert durch die Substanz, die am offenen hERG-Kanal bindet, akkumuliert mit jedem wiederholten Testpuls. Die testpulsabhängige Akkumulation der Strominhibierung wird als „use-dependent“ Block bezeichnet. Dementsprechend wurden die Substanzen, die einen „use-dependent“ Block hervorrufen, als „use-dependent“ Blocker bezeichnet.

Als „tonischer“ oder „resting state“ Blocker wurden jene Substanzen klassifiziert, deren strominhibierende Wirkung keine testpulsabhängige Akkumulation zeigt. Die wiederholte Öffnung des Kanals intensiviert die Inhibierung des Stromes nicht, was darauf hin deutet, dass diese Substanzen

nicht an den offenen Kanal binden. Tonische Blocker entfalten ihre hERG-Kanal inhibierende Wirkung während der hERG-Kanal in ruhendem Zustand verweilt.

### 3.2.1 Tonische Blocker

Die hERG Ströme wurden mit Diphenhydramin, Chinidin und Thioridazin in einer ruhezustandsabhängigen Weise, d.h. testpulsunabhängig - bei negativem Haltepotential (-80 mV) - gehemmt. Die wesentliche Strominhibierung trat ohne frequente Depolarisation der Membran ein. Die drei hERG-Kanalblocker wurden als tonik bzw „resting state“ Blocker charakterisiert.



**Abb.15:** Der ruhezustandsabhängige hERG-Kanal Block mit Diphenhydramin, Chinidin und Thioridazin.

Die Experimente wurden während einer Testpulsreihe (Spannungsprotokoll des Testpulses: siehe Abb.16B) bei einer Frequenz von 1 Hz durchgeführt. Identische Pulsprotokolle wurden in Abwesenheit der Substanz appliziert (Kontrolle). Die Tailströme bei +40 mV, aufgenommen unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von **A)** 25  $\mu$ M Diphenhydramin, **B)** 15  $\mu$ M Chinidin und **C)** 10  $\mu$ M Thioridazin, wurden auf die Kontrollamplitude normiert und gegen die Pulsnummer aufgetragen. Alle Experimente wurden bei einem Haltepotential von -80 mV durchgeführt.

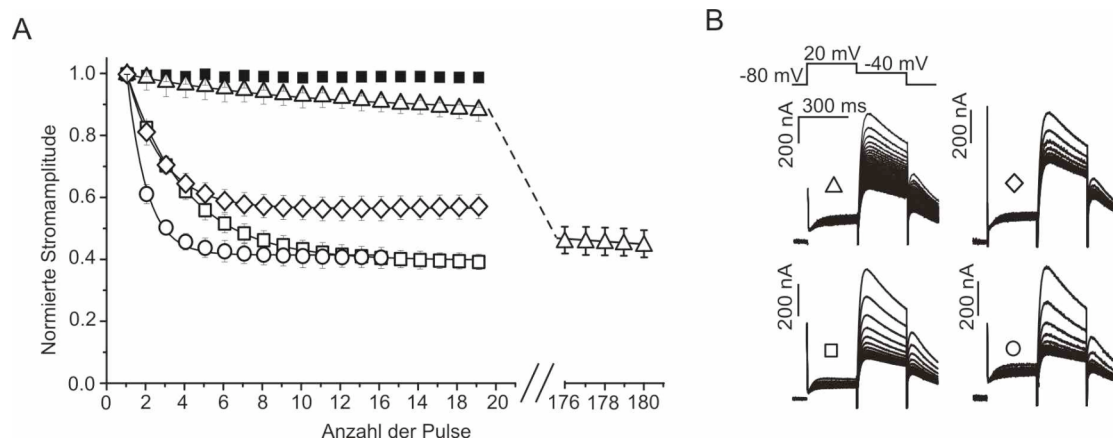
### 3.2.2 „use-dependent“ Blocker

Die Entwicklung der Stromhemmung während einer Serie von Standardprotokoll-Testpulsen, appliziert mit einer Frequenz von 1 Hz, wurde für Amiodaron, Bepridil, Cisaprid, Droperidol, Domperidon, E-4031, Haloperidol und Terfenadin gemessen. Im Gegensatz zur Stromhemmung mit

Diphehydramin, Chinidin und Thioridazin wurde in diesen Experimenten ein ausgeprägter testpulsabhängiger Block beobachtet. Der Zugang von diesen hERG-Kanalblockern zu ihren Bindungsdomänen ist jedoch in ruhendem Kanalzustand wesentlich eingeschränkt, was durch die Pulsabhängigkeit der Wirkung und durch eine vergleichsweise geringere Hemmung der Ströme in ruhendem Kanalzustand belegt wird.

### 3.2.2.1 Verschiedene Blockkinetik bei „use-dependent“ Blockern:

Bei den Messungen der Entwicklung der Stromhemmung mit verschiedenen „use-dependent“ Blockern wurden signifikante Unterschiede in der Blockkinetik beobachtet (Abb. 16). Die vollständige Strominhibition mit E-4031 wurde innerhalb von 180 Pulsen entwickelt (langsamer Block), wogegen Haloperidol ein Beispiel für einen sehr schnellen hERG-Kanalblocker darstellt. Der maximale Block mit Haloperidol wurde innerhalb von 5 Pulsen erreicht.



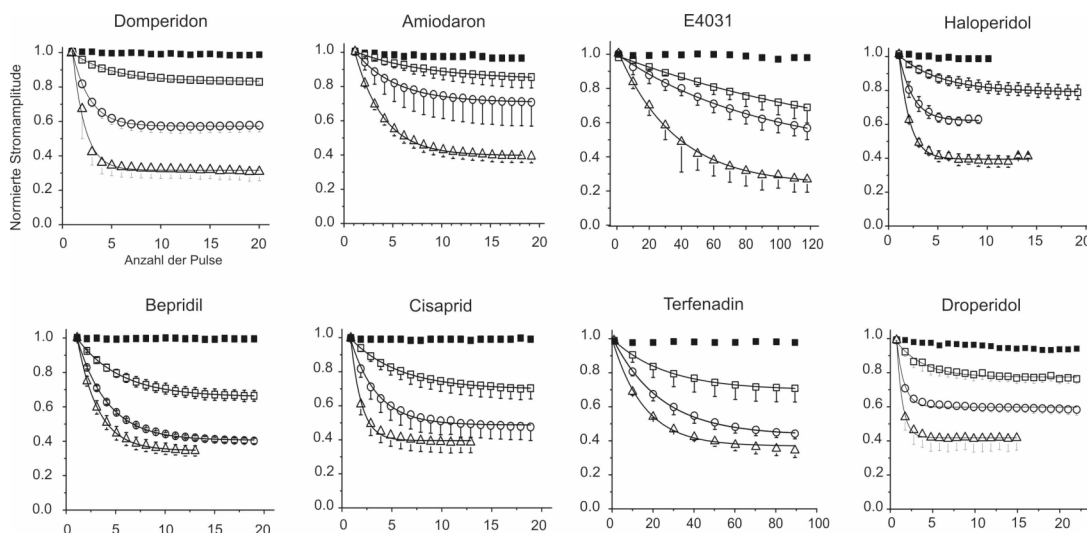
**Abb. 16:** Unterschiedliche Kinetik des hERG-Kanals Blocks

**A)** Die Entwicklung des hERG-Kanal Blocks mit Haloperidol (3 μM, ○), Bepridil (3 μM, □), E-4031 (3 μM, △) und Domperidon (3 μM, ◇) während der Applikation der Testpulsreihe (Standardprotokoll, siehe B). Die Frequenz der Testpulse betrug 0.3 Hz. Nach einer Equilibriumsphase von 3 Minuten wurde die Testpulsreihe appliziert. Die maximale Stromamplitude wurde als Funktion der Pulsnummer geplottet. Die maximalen Stromwerte verringern sich während der Pulsserie, bis sie ein Blockmaximum erreichen („use-dependent“ Block). Der vollständige Block mit E-4031 wurde erst nach 180 Pulsen erreicht (siehe unterbrochene X-Achse), während der Block mit Haloperidol schon nach 5 Pulsen sein Maximum erreichte.

**B)** Beispielströme für in A) dargestellte hERG-Strominhibierung: Die Ströme von sehr langsamer Blockentwicklung mit E-4031 ( $\Delta$ ) wurden durch die Darstellung jedes 10. Testpulses illustriert.

### 3.2.2.2 Konzentrationsabhängigkeit des Blocks

Die Abhängigkeit der Blockstärke und der Blockgeschwindigkeit („steady state“ und  $\tau$ ) von der Konzentration der Testsubstanz wurde mit Hilfe des Standardprotokolls getestet. Die Testpulse des Standardprotokolls wurden mit einer Frequenz von 0.3 Hz auf die Oozyte appliziert. Es wurden inhibitorische Effekte von drei Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz getestet ( $IC_{50}/3$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{50} \times 3$ ). Erwartungsgemäß verstärkte sich der Block bei steigender Konzentration (siehe Abb.17)



**Abb.17:** Konzentrationsabhängigkeit des hERG-Kanal Blocks durch Amiodaron, Bepridil, Cisaprid, Droperidol, Domperidon, E-4031, Haloperidol und Terfenadin:

Der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen der jeweiligen Substanz auf den hERG-Kanal bei einer Pulsfrequenz von 1 Hz: Amiodaron, Cisaprid, Domperidon, E-4031 und Haloperidol ( $\square$  1  $\mu$ M,  $\circ$  3  $\mu$ M,  $\Delta$  10  $\mu$ M), Bepridil ( $\square$  1  $\mu$ M,  $\circ$  3  $\mu$ M,  $\Delta$  5  $\mu$ M), Droperidol ( $\square$  0.7  $\mu$ M,  $\circ$  2  $\mu$ M,  $\Delta$  5  $\mu$ M) und Terfenadin ( $\square$  0.3  $\mu$ M,  $\circ$  1  $\mu$ M,  $\Delta$  3  $\mu$ M). Das Haltepotential lag bei -80 mV, die Prepulsdauer (Depolarisation auf +20 mV) betrug 300 ms. Die bei -40 mV gemessene „tail“ Stromamplitude wurde gegen die Pulszahl aufgetragen (siehe Pulsprotokoll Abb. 18).

### 3.2.2.3 Der Effekt der Pulsfrequenz auf die Blockentwicklung

Zur Untersuchung der Frequenzabhängigkeit der hERG-Kanal Hemmung mit „use-dependent“ Blockern wurde die Stromhemmung durch die jeweilige

Substanz bei verschiedenen Testpulsfrequenzen (0.03, 0.1, 0.3, und 1 Hz) gemessen.

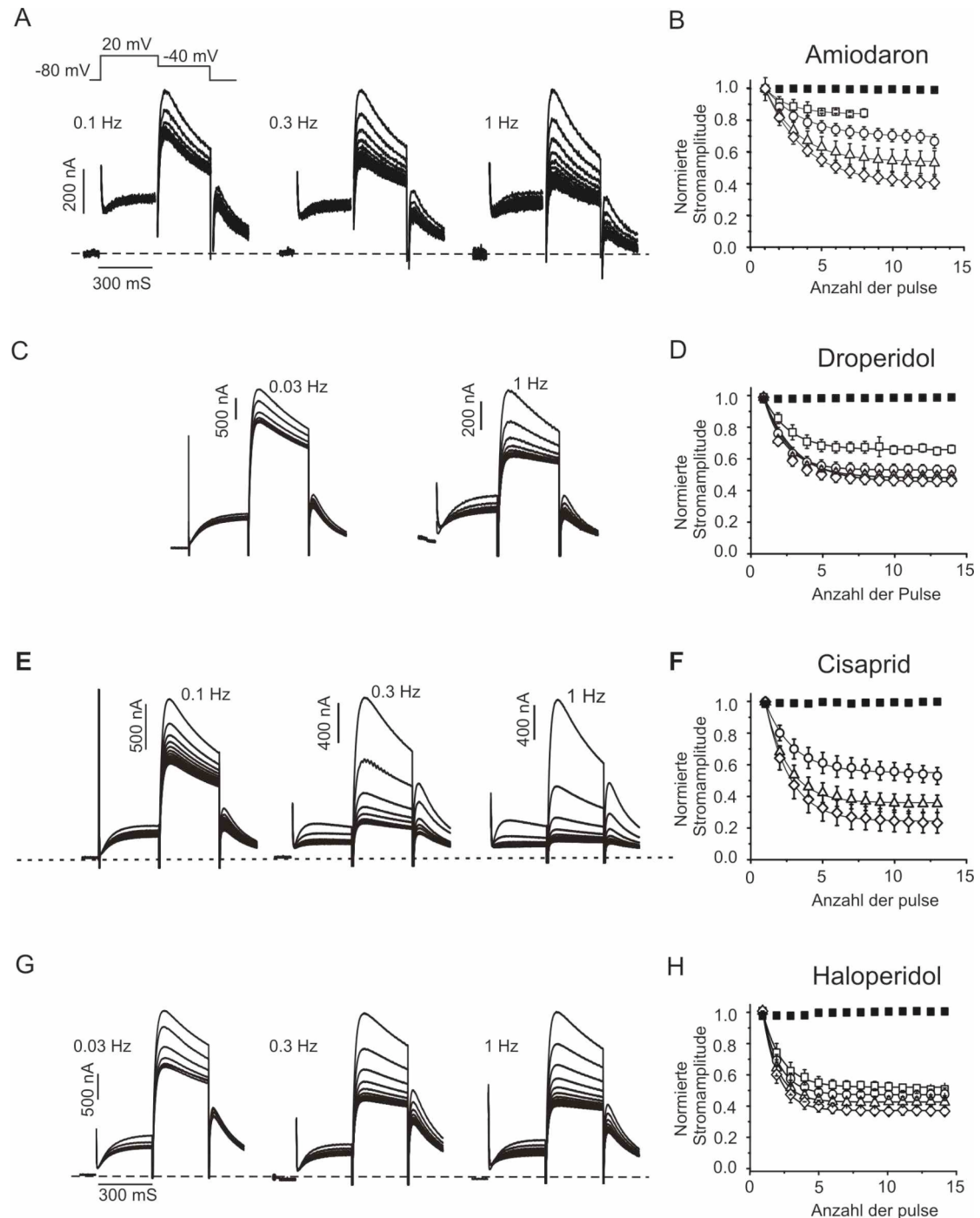
Alle Experimente wurden bei einem Haltepotential von  $-80$  mV durchgeführt. Durch die Änderung der Testpulsfrequenz (der Zeit zwischen den Pulsen) ergab sich eine Änderung der Verweildauer des Kanales im inaktivierten Zustand.

Anhand der Ergebnisse wurden „use-dependent“ Blocker in frequenzabhängige und frequenzunabhängige Blocker unterteilt.

### **Frequenzabhängige hERG-Kanalblocker**

Für die folgenden vier Blocker wurde eine frequenzabhängige Inhibierung beobachtet: Amiodaron (siehe auch Kiehn *et al.*, 1999), Cisaprid (siehe auch Walker *et al.*, 1999), Droperidol und Haloperidol (siehe auch Suessbricht *et al.*, 1997). Eine Frequenzerhöhung verursacht eine stärkere Strominhibition (Abb. 18).

Abbildung 18 zeigt Beispielströme für die jeweilige Substanz bei verschiedenen Frequenzen. Die gemittelten, normierten Maximalstromwerte wurden gegen die Pulsnummer aufgetragen. Die erhaltenen Datenpunkte wurden mit Hilfe einer monoexponentiellen Funktion gefittet. Diese Art der Auswertung wurde zur Veranschaulichung der kinetischen Unterschiede der hERG-Kanal Inhibierung durchgeführt und bei unterschiedlichen Messbedingungen verwendet. Die kinetikbeschreibenden Parameter (Geschwindigkeit der Inhibierung ( $\tau$ ) und Ausmaß am Block ( $I_{ss}$ )) der monoexponentiell angepassten Kurven, sind in Tabelle 3 zusammengefasst.



**Abb. 18:** Die frequenzabhängige hERG-Kanal Inhibierung mit Amiodaron, Cisaprid, Droperidol und Haloperidol.

Die hERG-Ströme wurden bei der Applikation einer Serie von 15 Pulsen mit unterschiedlichen Testpulsfrequenzen (0.03, 0.1, 0.3 und 1 Hz) und unter Einfluss von **A)** 10  $\mu$ M Amiodaron **C)** 3  $\mu$ M Cisaprid **E)** 2  $\mu$ M Droperidol und **G)** 3  $\mu$ M Haloperidol aufgenommen. Die Experimente wurden unter Anwendung des in A) abgebildeten Protokolls durchgeführt.

**B) D) F) H)** zeigen die gemittelte, normierte maximale Stromamplitude, gemessen in Anwesenheit der jeweiligen Substanz und geplottet als Funktion der Pulszahl. Die Kurven wurden mit Hilfe der monoexponentiellen Funktion ( $I_{\text{peak}} = A \cdot \exp(-N/N_{\text{const}}) + I_{\text{ss}}$ ) gefittet.

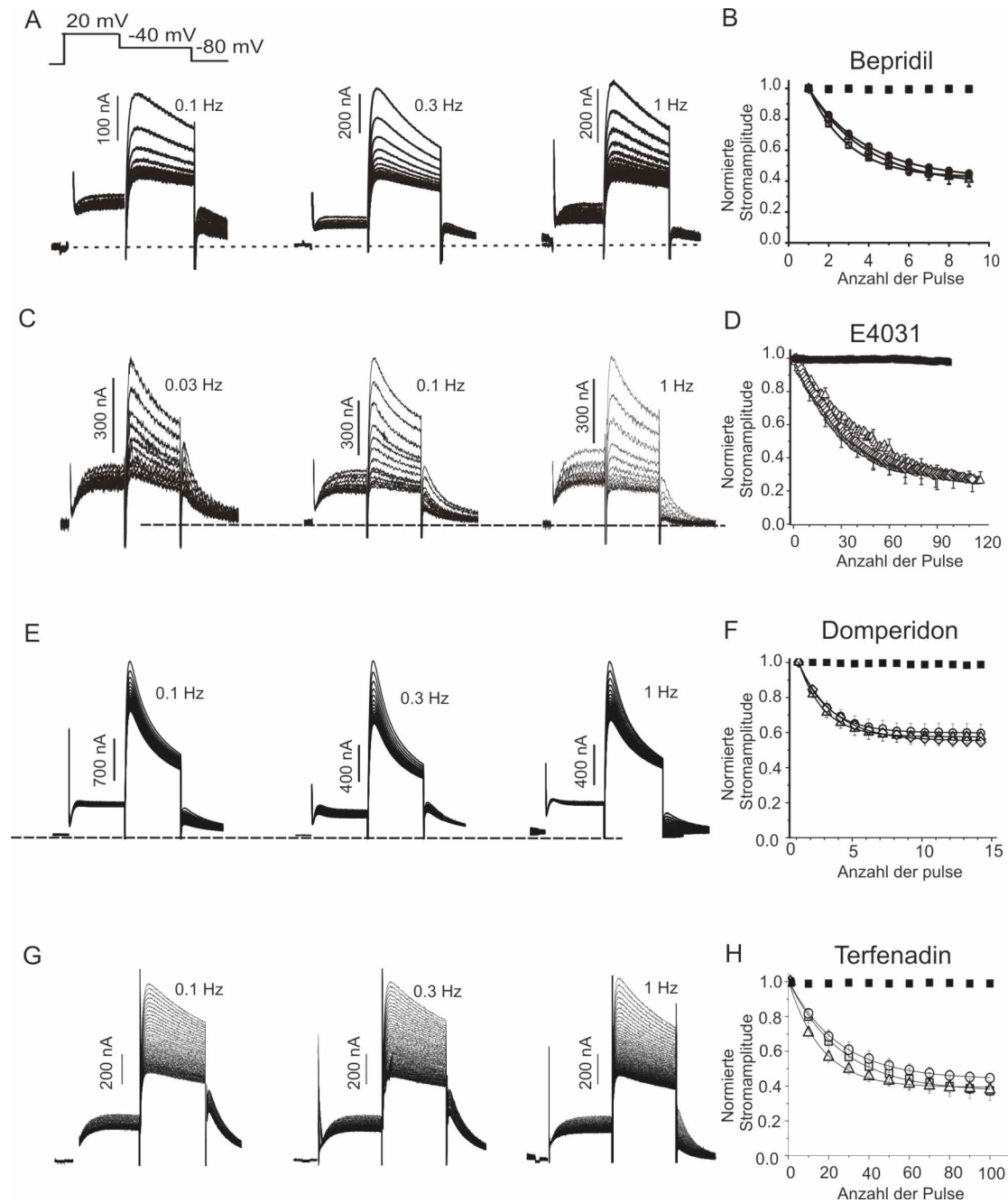
**Tabelle 3:**  $\tau$  und „steady state“ des hERG-Kanal Blocks mit Amiodaron, Haloperidol, Cisaprid und Droperidol, gemessen bei verschiedenen Testpulsfrequenzen.

|                         | Pulsfrequenz (Hz) | Geschwindigkeit der Inhibierung ( $\tau$ ) | Ausmaß am Block $I_{ss}$ |
|-------------------------|-------------------|--------------------------------------------|--------------------------|
| Amiodaron (10 $\mu$ M)  | 0.03 (n = 4)      | $1.45 \pm 0.25$                            | $0.84 \pm 0.01$          |
|                         | 0.1 (n = 5)       | $2.56 \pm 0.23$                            | $0.69 \pm 0.04$          |
|                         | 0.3 (n = 4)       | $2.74 \pm 0.27$                            | $0.52 \pm 0.08$          |
|                         | 1.0 (n = 4)       | $3.44 \pm 0.54$                            | $0.46 \pm 0.08^*$        |
| Haloperidol (3 $\mu$ M) | 0.03 (n = 3)      | $1.58 \pm 0.37$                            | $0.50 \pm 0.08$          |
|                         | 0.1 (n = 4)       | $1.24 \pm 0.18$                            | $0.48 \pm 0.02$          |
|                         | 0.3 (n = 4)       | $1.19 \pm 0.25$                            | $0.44 \pm 0.02$          |
|                         | 1.0 (n = 5)       | $1.20 \pm 0.33$                            | $0.39 \pm 0.02^*$        |
| Cisaprid (3 $\mu$ M)    | 0.1 (n = 5)       | $2.49 \pm 0.53$                            | $0.53 \pm 0.06$          |
|                         | 0.3 (n = 4)       | $1.59 \pm 0.17$                            | $0.37 \pm 0.06$          |
|                         | 1.0 (n = 5)       | $2.05 \pm 0.38$                            | $0.23 \pm 0.06^*$        |
| Droperidol (2 $\mu$ M)  | 0.03 (n = 6)      | $2.14 \pm 0.50$                            | $0.66 \pm 0.25$          |
|                         | 0.1 (n = 6)       | $1.47 \pm 0.27$                            | $0.54 \pm 0.03$          |
|                         | 0.3 (n = 8)       | $1.46 \pm 0.13$                            | $0.50 \pm 0.23$          |
|                         | 1.0 (n = 7)       | $1.48 \pm 0.23$                            | $0.47 \pm 0.03^*$        |

\*Statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0.05$ ) zum Vergleich mit Ausmaß am Block, gemessen mit entsprechende Substanz bei niedrigeren Testpulsfrequenzen (0.03, 0.1 oder 0.3 Hz).

### Frequenzunabhängige hERG-Kanalblocker

Im Gegensatz zu den Experimenten mit frequenzabhängigen Blockern, konnte in Messungen mit Domperidon, Bepridil, E-4031 (Ishii *et al.*, 2003) und Terfenadin (Suessbrich *et al.*, 1996) keine signifikante Zunahme der Blockintensität und der Blockgeschwindigkeit durch Frequenzerhöhung verzeichnet werden. Die 10-fache Frequenzerhöhung übte keinen Einfluss auf die Blockkinetik dieser Substanzen aus (Abb. 19 und Tabelle 4).



**Abb.19:** Die frequenzunabhängige hERG-Kanal Inhibierung mit Bepridil, Domperidon, E-4031 und Terfenadin

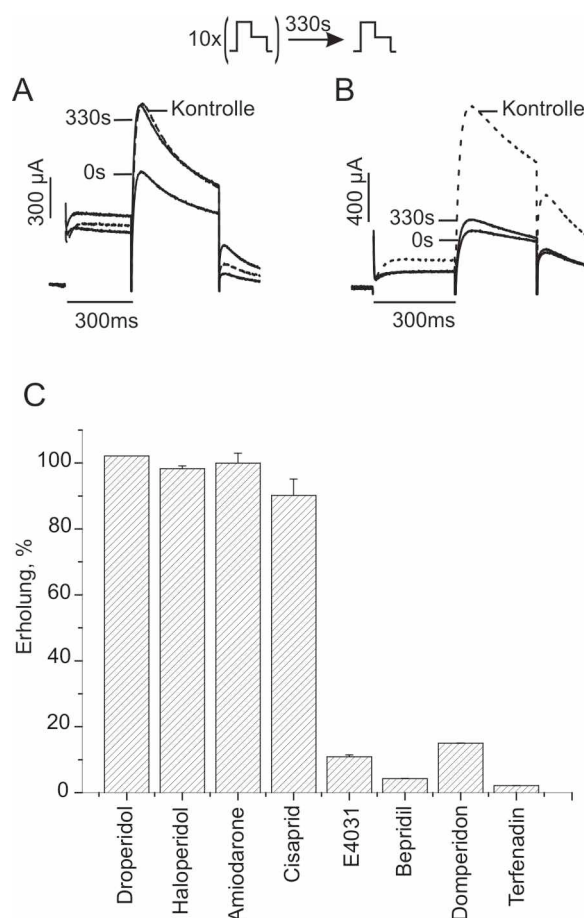
hERG-Ströme aufgenommen bei unterschiedlichen Testpulsfrequenzen (0.03, 0.1, 0.3 und 1 Hz) unter Einfluss von **A)** 3  $\mu\text{M}$  Bepridil **C)** 3  $\mu\text{M}$  Domperidon, **E)** 3  $\mu\text{M}$  E-4031 und **G)** 1  $\mu\text{M}$  Terfenadin. **B) D) F) H)** zeigen die gemittelte, maximale Stromamplitude, gemessen während der Experimente mit Bepridil (3  $\mu\text{M}$ ), Domperidon (3  $\mu\text{M}$ ), E-4031 (3  $\mu\text{M}$ ) und Terfenadin (1  $\mu\text{M}$ ), aufgetragen gegen die Anzahl der Pulse. Die Kurven wurden mit Hilfe der monoexponentiellen Funktion ( $I_{\text{peak}} = A \cdot \exp(-N/N_{\text{const}}) + I_{\text{ss}}$ ) gefittet.

**Tabelle 4:** Die  $\tau$  und „steady state“ des hERG-Kanal Blocks mit Bepridil, E-4031, Domperidon und Terfenadin, gemessen bei verschiedenen Pulsfrequenzen

|                           | Pulsfrequenz (Hz) | Geschwindigkeit der Inhibierung ( $\tau$ ) | Ausmaß am Block $I_{ss}$ |
|---------------------------|-------------------|--------------------------------------------|--------------------------|
| Bepridil<br>(3 $\mu$ M)   | 0.1 (n = 3)       | $1.92 \pm 0.20$                            | $0.43 \pm 0.02$          |
|                           | 0.3 (n = 3)       | $3.13 \pm 0.28$                            | $0.40 \pm 0.02$          |
|                           | 1.0 (n = 3)       | $3.16 \pm 0.31$                            | $0.36 \pm 0.04$          |
| E-4031<br>(10 $\mu$ M)    | 0.03 (n = 2)      | $38.00 \pm 0.95$                           | $0.19 \pm 0.01$          |
|                           | 0.1 (n = 3)       | $60.66 \pm 3.33$                           | $0.12 \pm 0.02$          |
|                           | 1.0 (n = 3)       | $34.12 \pm 0.74$                           | $0.25 \pm 0.01$          |
| Domperidon<br>(3 $\mu$ M) | 0.1 (n = 3)       | $2.06 \pm 0.26$                            | $0.59 \pm 0.05$          |
|                           | 0.3 (n = 3)       | $1.75 \pm 0.6$                             | $0.57 \pm 0.04$          |
|                           | 1.0 (n = 3)       | $1.88 \pm 0.12$                            | $0.49 \pm 0.03$          |
| Terfenadin<br>(1 $\mu$ M) | 0.1 (n = 6)       | $34.12 \pm 9.88$                           | $0.32 \pm 0.06$          |
|                           | 0.3 (n = 4)       | $28.9 \pm 5.78$                            | $0.42 \pm 0.02$          |
|                           | 1.0 (n = 2)       | $17.65 \pm 0.07$                           | $0.38 \pm 0.03$          |

### 3.2.2.4 Erholung des ruhenden hERG-Kanals vom Block mit Amiodaron, Droperidol, Haloperidol und Cisaprid

Um die Untersuchungen der möglichen Dissoziation der Substanzen vom inaktivierten Kanal zu vertiefen, wurde die Erholung vom „use-dependent“ Blocker bestimmt. Zunächst wurde ein signifikanter Kanalblock mit einer Serie von Standardtestpulsen induziert. Die Pulse wurden mit einer Frequenz von 1 Hz, bis zur „steady state“ Einstellung appliziert. Anschließend wurde die Oozyte in einer Ruhephase von 330 s bei  $-80$  mV in Gegenwart der Testsubstanz belassen. In dieser Zeit befanden sich die hERG-Kanäle ebenfalls in ruhendem Zustand. Danach wurde die eventuelle Erholung der hERG Ströme mit einem Standardtestpuls erfasst. Es wurde eine nahezu 100%-ige Erholung des Stroms vom Block mit Amiodaron, Haloperidol, Droperidol und Cisaprid beobachtet, wogegen nach dem Block mit frequenzunabhängigen Blockern die Strommaximalwerte nur zu einem kleinen Prozentsatz wiederkehrten (Abb.20).



**Abb. 20:** Erholung der hERG Ströme vom Block mit „use-dependent“ Blockern

Die Experimente wurden nach abgebildetem Protokoll und unter ständiger Anwesenheit der Substanzen durchgeführt. Der Kontrollstrom (unterbrochene Linie) wurde vor der Applikation der Substanz auf die Oozyte aufgenommen, der 0s Strom während des letzten Pulses der blockinduzierenden Pulsserie und der 30s Strom während des erholungsmessenden Pulses aufgenommen.

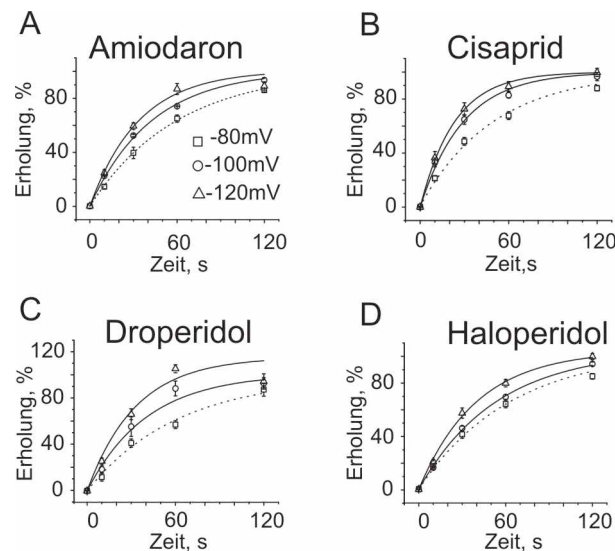
**A)** stellt die Erholung vom Block mit 10  $\mu$ M Amiodaron und **B)** fehlender Erholung vom Block mit 3  $\mu$ M Bepridil dar.

**C)** Nach einer 330 s Pulspause war eine nahezu komplette Erholung der hERG-Ströme vom Block mit Amiodaron ( $n = 7$ ), Cisaprid ( $n = 9$ ), Haloperidol ( $n = 7$ ) und Droperidol ( $n = 6$ ) sowie eine unwesentliche Erholung vom Block mit Domperidon ( $15 \pm 1.2\%$ ;  $n = 3$ ), Bepridil ( $4.3 \pm 0.5\%$ ;  $n = 3$ ), E-4031 ( $11 \pm 0.9\%$ ;  $n = 3$ ) und Terfenadin ( $2 \pm 0.3\%$ ;  $n = 3$ ) zu beobachten.

Um die These, dass Amiodaron, Cisaprid, Haloperidol und Droperidol vom inaktivierten hERG-Kanal abdissoziieren können, weiter zu verfolgen, wurde im Anschluss zur Strominhibierung die Erholung der Ströme nach 10, 30, 60, 120, 210, 330 Sekunden Erholungsperiode und bei drei verschiedenen

Haltepotentialen (-80, -100 und -120 mV) gemessen. Die Experimente wurden unter ständiger Anwesenheit der Substanzen durchgeführt.

Die Erholung vom Block war monoexponentiell, mit der Steigerung des Haltepotentials wurde diese beschleunigt (Abb. 21). Die gemessenen Zeitkonstanten für die Erholung bei verschiedenen Haltepotentialen für die entsprechende Substanz sind in Tabelle 5 aufgelistet.



**Abb. 21:** Erholung des hERG-Kanals vom Block, gemessen bei unterschiedlichen Haltepotentialen.

Die maximale Stromamplitude der erholungsmessenden Pulse (normalisiert auf die Stromamplitude bei maximalem Block) wurde als Funktion der Zeit geplottet. Die Linien stellen die monoexponentiellen Fitts für die Erholung vom Block mit **A)** 10  $\mu$ M Amiodaron, **B)** 3  $\mu$ M Cisapride, **C)** 2  $\mu$ M Droperidol und **D)** 3  $\mu$ M Haloperidol bei -80 mV, -100 mV und -120 mV dar.

**Tabelle 5:** Die Zeitkonstanten der Erholung vom Block, gemessen bei verschiedenen Haltepotentialen.

| Haltepotential | Amiodaron<br>(10 $\mu$ M)   | Cisaprid<br>(3 $\mu$ M)    | Droperidol<br>(2 $\mu$ M)  | Haloperidol<br>(3 $\mu$ M) |
|----------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| -80 mV         | 66.4 $\pm$ 2.8 s<br>n = 7   | 50.7 $\pm$ 4.2s<br>n = 9   | 61.5 $\pm$ 5.6 s<br>n = 6  | 66.4 $\pm$ 6.1 s<br>n = 7  |
| -100 mV        | 46.8 $\pm$ 3.58 s*<br>n = 3 | 29.3 $\pm$ 2.5 s*<br>n = 5 | 35.8 $\pm$ 5.1 s*<br>n = 4 | 54.7 $\pm$ 2.6 s*<br>n = 5 |
| -120 mV        | 34.3 $\pm$ 2.1 s*<br>n = 3  | 24.3 $\pm$ 3.4 s*<br>n = 6 | 26.0 $\pm$ 2.5 s*<br>n = 5 | 40.9 $\pm$ 3.2 s*<br>n = 4 |

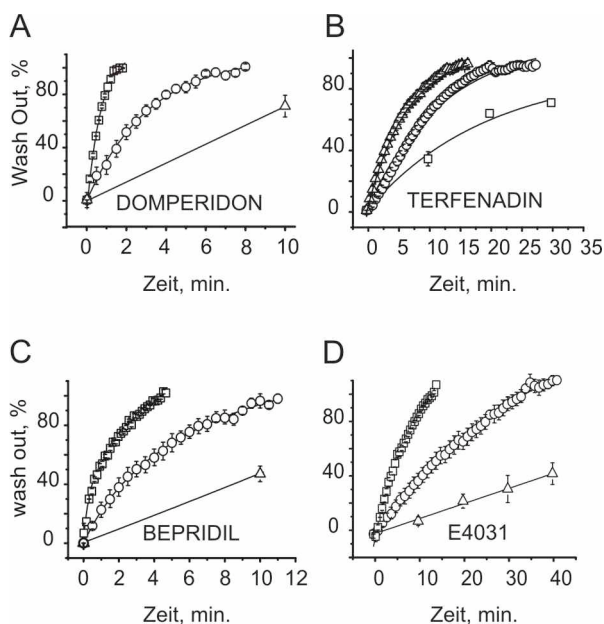
\*Statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0.05$ ) zum Vergleich mit der entsprechenden Zeitkonstante für die Erholung, gemessen bei -80 mV.

### 3.2.2.5 Die Kanalaktivierung beschleunigt die Erholung vom Block

Bei der Messung der Kanalinhition mit Hilfe der Testpulssalve stellt resultierende Gleichgewicht („steady state“) das Gleichgewicht zwischen Substanzbindung an ihre Bindungsstelle und der Dissoziation von der Bindungsstelle dar. Die Substanzen der zweiten Gruppe (Domperidon, Bepridil, E-4031 und Terfenadin) bleiben nach durchgeführtem Block im Kanal „gefangen“. Aus den Experimenten in Abb. 21 ist jedoch ersichtlich, dass es zur Dissoziation der Substanz während der Testpulsreihe kommt, da bei keinem von diesen Blockern eine absolute Stromhemmung erreicht wurde („steady state“ Wert immer  $>$  als 0).

Für diese Substanzen wurde untersucht, ob die wiederholte Kanalöffnung einen Einfluss auf die Erholung des Blocks ausübt. Die Experimente wurden in extrazellulärer (substanzfreier) Lösung bei drei Testpulsfrequenzen durchgeführt. Diese Experimente zeigten dass die Erholung des Kanals vom Block mit Domperidon, Bepridil, E-4031 und Terfenadin in abhängig von der Frequenz der Kanalaktivierung ist. Je höher die Frequenz der Aktivierung desto schneller die Erholung des Kanals vom Block (Abb. 24). Im Fall von Domperidon wurde mit der wiederholten Aktivierung des Kanals mit 1 Hz eine komplette Erholung vom Block innerhalb von 2 Minuten erzielt. Die Erholung von E-4031 dauerte 15 Minuten und von Terfenadin 17 Minuten.

Die Stimulation der Kanäle mit niedriger Frequenz (0.03 Hz) zeigte eine sehr langsame Erholung. Durch die starke Herabsetzung der Stimulation (alle 10 Minuten) wurde die Erholung vom Block viel schwächer.



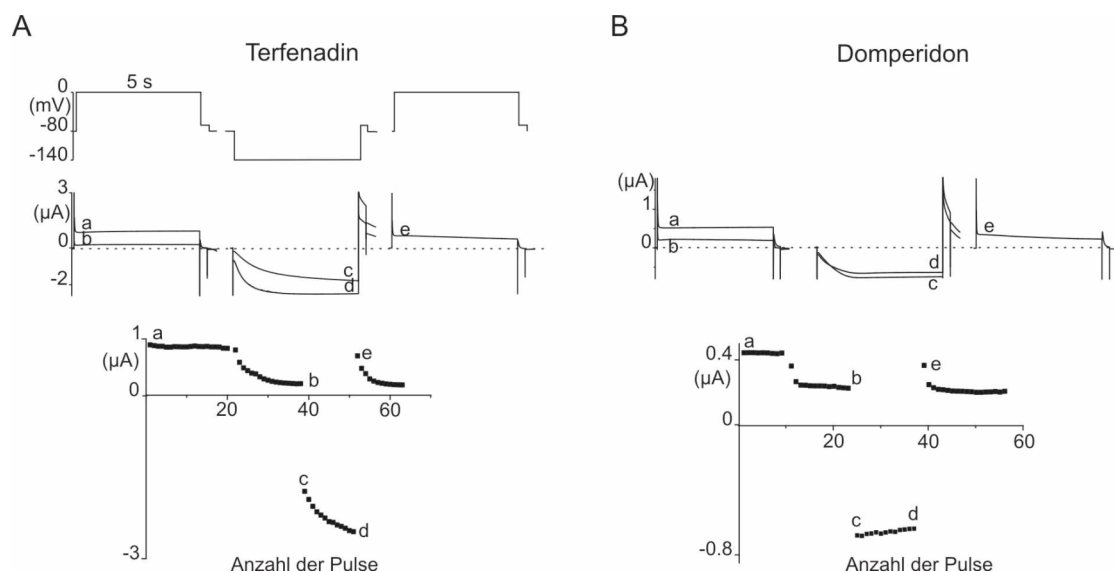
**Abb.22:** Die wiederholte Stimulation der Kanäle beschleunigt das Auswaschen der Substanzen aus der 2. Gruppe.

**A)-D):** Auswaschen der Blocker während der seltenen Aktivierung des Kanals (alle 10 Minuten 1 Puls), während 0.03 Hz Testpulsfrequenz und bei frequenter Aktivierung der Kanäle (Testpulsfrequenz 1 Hz). Das Haltepotential zwischen den Pulsen war -80 mV. Die maximale Stromamplitude wurde auf die maximale Stromamplitude der Kontrolle normiert (Stromamplitude, aufgenommen vor der Substanz-Applikation).

### 3.2.2.6 Mutation D540K erlaubt den getrappten Substanzen bei starker Membranhyperpolarisierung vom hERG-Kanal zu dissoziieren

Der D540K hERG-Kanal öffnet bei Hyperpolarisation, was theoretisch die Deblockierung des Kanals von getrappten Substanzen ermöglichen sollte. Um das Trapping von Terfenadin, Domperidon, E-4031 und Bepridil zu bestätigen, wurde die Erholung der D540K hERG-Mutante von der Inhibition bestimmt (Abb.23). Zunächst wurden, um den Block zu induzieren, 5 s lange Depolarisationstestpulse (0 mV) wiederholt (alle 15 s) appliziert. Anschliessend wurde eine Reihe von 20 Hyperpolarisationstestpulsen (-140 mV, 5 s) im Intervall von 15 s in kontinuierlicher Anwesenheit der Testsubstanz appliziert. Dieser Protokollschritt ermöglichte die Erholung vom Block bei Hyperpolarisation. Letztendlich wurde die erfolgte Erholung mit Hilfe eines Depolarisationspulses gemessen.

Die Erholung während der Hyperpolarisation wurde mit der Formel  $x = (e-b)/(a-b) \cdot 100$  definiert (e- die Stromamplitude während des Depolarisationspulses nach Erholung vom Block; a- die Stromamplitude während der Kontrolle; b- die Stromamplitude nach Blockentwicklung). Die Experimente zeigten eine Erholung von  $86.5 \pm 7.3\%$  (n=4) für Terfenadin und  $93.3 \pm 4.0\%$  (n=4) für Domperidon. Ähnliche Ergebnisse wurden in Experimenten mit E-4031 ( $62.7 \pm 9.3\%$ , n=4) und Bepridil ( $68.3 \pm 10.5\%$ , n=3) erzielt.



**Abb. 23:** Der Block des hERG-D540K-Kanals mit 3 μM Terfenadin (A) und 10 μM Domperidon (B) und die Erholung vom induzierten Block

**Oben:** Spannungsprotokoll (5 s Pulse bei 0 bzw. -140 mV, appliziert alle 15 s)

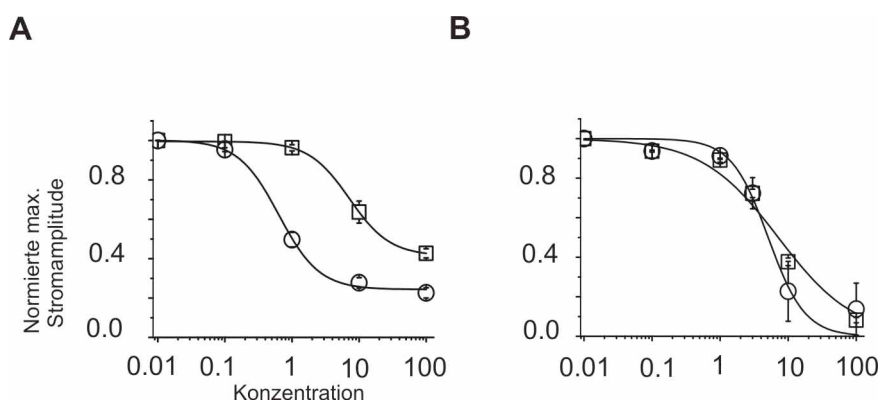
**Mitte:** Beispielströme a, b: Der Stromverlauf während des 1sten und 20sten Pulses der Depolarisationspulsreihe (bei -80 mV). c und d: Der Stromverlauf während des 1sten und 20sten Pulses der Hyperpolarisationspulsreihe (bei -140 mV). e: Der Stromverlauf während des Depolarisationspulses nach der Erholung.

**Unten:** Die maximale Stromamplitude, aufgenommen beim jeweiligen Protokollschritt, wurde gegen die Pulszahl aufgetragen.

### 3.2.2.7 Die Abhängigkeit der IC<sub>50</sub>-Bestimmung von der Testpulsfrequenz

In den folgenden Experimenten wurde die IC<sub>50</sub> für einen frequenzabhängigen (Amiodaron) und einen frequenzunabhängigen Blocker (Domperidon) bei zwei

verschiedenen Frequenzen gemessen (0.03 Hz und 0.3 Hz) (Abb. 24). Für Amiodaron wurde bei 0.03 Hz ein  $IC_{50}$  von  $7.17 \pm 2.05 \mu M$ ,  $nH = 1.4$ , und bei 0.3 Hz ein  $IC_{50}$  von  $1.08 \pm 0.65 \mu M$ ,  $nH = 1.43$  ermittelt. Andererseits wurde für Domperidon kein signifikanter Unterschied in der  $IC_{50}$ , gemessen bei unterschiedlichen Pulsfrequenzen, beobachtet (bei 0.03 Hz  $IC_{50} = 4.6 \pm 1.4 \mu M$ ,  $nH = 2.29$  und bei 0.3 Hz  $IC_{50} = 5.6 \pm 0.4 \mu M$ ,  $nH = 1.47$ ).

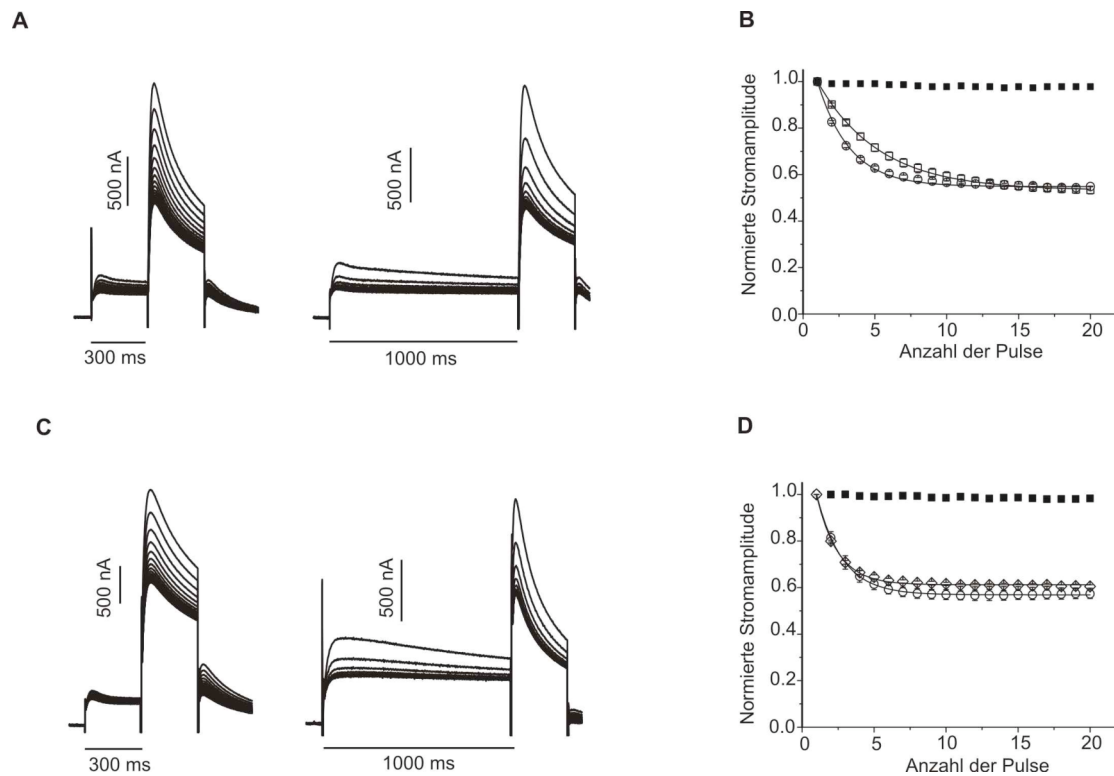


**Abb. 24:** Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung für Amiodaron (A) und Domperidon (B) gemessen bei verschiedenen Frequenzen.

### 3.2.2.8 Abhängigkeit des Blocks von der Vorpulslänge

Eine mögliche Interaktion der Substanzen mit dem inaktivierten hERG-Kanal wurde in den folgenden Experimenten untersucht. Die Stromhemmung mit der jeweiligen Substanz wurde mit Hilfe einer Standardtestpulsreihe mit 0.3 Hz induziert. Die Dauer des Vorpulses (+20 mV) wurde variiert (300 ms, 600 ms und 1000 ms). In Abb. 25 ist die Blockentwicklung mit Amiodaron und Domperidon bei 300 ms und 1 s Vorpulslänge dargestellt. Es wurde kein signifikanter Unterschied sowohl beim Block mit Amiodaron als auch mit Domperidon bei dreifacher Verlängerung der Vorpulslänge beobachtet.

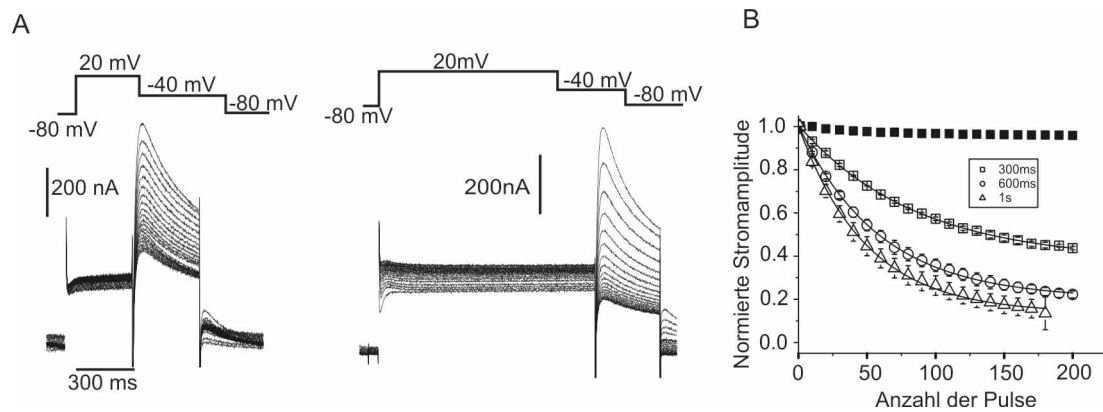
Nur beim Block mit E-4031 wurde eine Abhängigkeit von der Vorpulslänge beobachtet (Abb. 26). Alle anderen use-dependent hERG-Kanalblocker zeigten eine ähnliche Reaktion auf die Änderung der Vorpulslänge wie Amiodaron und Domperidon (Daten nicht gezeigt). Die gemessenen Zeitkonstanten für die Blockentwicklung bei verschiedenen Vorpulsängen mit use-dependent Blockern sind in Tabelle 6 aufgelistet.



**Abb. 25:** *hERG-Kanal Block mit Amiodaron und Domperidon, gemessen bei unterschiedlichen Vorpuls­längen:*

hERG Ströme wurden während 300 ms bzw. 1000 ms langer Depolarisation von  $-80$  mV auf  $+20$  mV und anschliessender 300 ms Repolarisation von  $+20$  auf  $-40$  mV in Anwesenheit von **A)**  $10 \mu\text{M}$  Amiodaron und **C)**  $3 \mu\text{M}$  Domperidon gemessen. Die Testpulse wurden mit einer Frequenz von  $0.3$  Hz appliziert.

Die maximalen Stromamplituden, gemessen in Anwesenheit von **B)** Amiodaron und **D)** Domperidon wurden gegen die Pulsnummer aufgetragen. Die Kurven wurden mit Hilfe der monoexponentiellen Funktion ( $I_{\text{peak}} = A \cdot \exp(-N/N_{\text{const}}) + I_{\text{ss}}$ ) gefittet.



**Abb. 26:** *hERG-Kanal Block mit E-4031, gemessen bei unterschiedlichen Vorpulslängen:*

- A)** hERG-Ströme unter Einfluss von 3  $\mu\text{mol}$  E-4031 bei 300 ms und 1000 ms langem Vorpuls. Gemessen mit entsprechenden Spannungsprotokollen. Die Testpulse wurden mit einer Frequenz von 0.3 Hz appliziert. Um eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten, ist nur jede zehnte Stromlinie dargestellt.
- B)** Die gemittelten Maximalstromwerte, gemessen bei drei Vorpulslängen (300 ms, 600 ms und 1 s) in Anwesenheit von 3  $\mu\text{M}$  E-4031, wurden als Funktion der Pulsnummer geplottet. Die Kurven wurden mit Hilfe der monoexponentiellen Funktion ( $I_{\text{peak}} = A \cdot \exp(-N/N_{\text{const}}) + I_{\text{ss}}$ ) gefittet. Bei 1000 ms Vorpuls erfolgt der Abfall bei geringeren Pulszahlen zu einem niedrigeren steady state Level als bei 300 ms Vorpulsdauer.

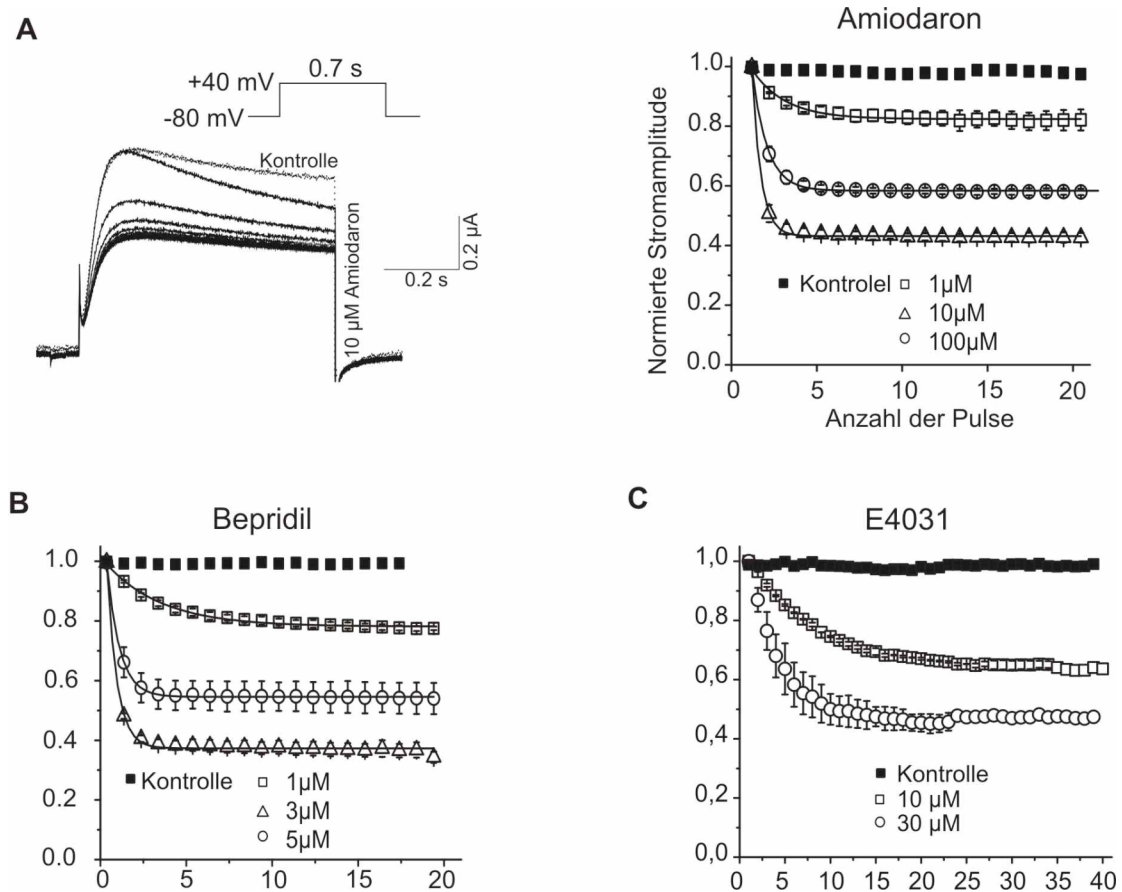
**Tabelle 6:** Die  $\tau$  und „steady state“ der hERG-Kanal Inhibition, gemessen für alle use-dependent Blocker bei verschiedenen Vorpulslängen

|                         | Vorpulslänge (ms) | Geschwindigkeit der Inhibierung ( $\tau$ ) | Ausmaß am Block $I_{ss}$ |
|-------------------------|-------------------|--------------------------------------------|--------------------------|
| Amiodaron (3 $\mu$ M)   | 300 (n = 3)       | $2.79 \pm 0.53$                            | $0.60 \pm 0.02$          |
|                         | 600 (n = 3)       | $2.67 \pm 0.23$                            | $0.63 \pm 0.02$          |
|                         | 1000 (n = 3)      | $2.40 \pm 0.15$                            | $0.62 \pm 0.01$          |
| Bepridil (3 $\mu$ M)    | 300 (n = 3)       | $3.13 \pm 0.28$                            | $0.40 \pm 0.021$         |
|                         | 600 (n = 3)       | $2.46 \pm 0.23$                            | $0.44 \pm 0.03$          |
|                         | 1000 (n = 3)      | $1.57 \pm 0.04$                            | $0.46 \pm 0.03$          |
| Cisaprid (3 $\mu$ M)    | 300 (n = 3)       | $2.22 \pm 0.06$                            | $0.43 \pm 0.04$          |
|                         | 600 (n = 3)       | $2.42 \pm 0.45$                            | $0.37 \pm 0.09$          |
|                         | 1000 (n = 3)      | $1.55 \pm 0.20$                            | $0.36 \pm 0.02$          |
| Domperidon (3 $\mu$ M)  | 300 (n = 3)       | $1.75 \pm 0.60$                            | $0.57 \pm 0.04$          |
|                         | 600 (n = 3)       | $1.52 \pm 0.10$                            | $0.47 \pm 0.03$          |
|                         | 1000 (n = 3)      | $1.49 \pm 0.52$                            | $0.61 \pm 0.01$          |
| Droperidol (2 $\mu$ M)  | 300 (n = 3)       | $0.94 \pm 0.15$                            | $0.60 \pm 0.03$          |
|                         | 600 (n = 3)       | $0.83 \pm 0.07$                            | $0.61 \pm 0.02$          |
|                         | 1000 (n = 3)      | $0.89 \pm 0.14$                            | $0.68 \pm 0.03$          |
| E-4031 (3 $\mu$ M)      | 300 (n = 3)       | $89.44 \pm 8.30$                           | $0.35 \pm 0.06$          |
|                         | 600 (n = 3)       | $57.6 \pm 5.37$                            | $0.2 \pm 0.03$           |
|                         | 1000 (n = 3)      | $47.49 \pm 3.3$                            | $0.14 \pm 0.04^*$        |
| Haloperidol (3 $\mu$ M) | 300 (n = 3)       | $0.88 \pm 0.07$                            | $0.37 \pm 0.06$          |
|                         | 600 (n = 3)       | $0.86 \pm 0.24$                            | $0.55 \pm 0.04$          |
|                         | 1000 (n = 3)      | $0.54 \pm 0.09$                            | $0.58 \pm 0.01$          |
| Terfenadin (1 $\mu$ M)  | 300 (n = 3)       | $14.47 \pm 1.1$                            | $0.67 \pm 0.16$          |
|                         | 600 (n = 3)       | $9.6 \pm 1.5$                              | $0.53 \pm 0.03$          |
|                         | 1000 (n = 3)      | $7.64 \pm 0.8$                             | $0.50 \pm 0.04$          |

\*Statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0.05$ ) des Ausmaß am Block mit - E-4031 bei 1000 ms Vorpulslänge – im Vergleich zum Ausmaß am Block, gemessen bei kürzeren Vorpulslängen (300 oder 600 ms).

### 3.2.2.9 Untersuchungen mit Hilfe der Doppelmutante G628C/S631C

Die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit des Blocks der nichtinaktivierenden hERG-Kanal-Mutante (G628C/S631C) wurde für Amiodaron, Bepridil und E-4031 durchgeführt. Weil die Amplitude, gemessen bei  $-40$  mV, zu klein war, wurde die Strominhibierung mit 700 ms depolarisierenden Testpulsen von einem Haltepotential von  $-80$  mV auf  $+40$  mV bei einer Frequenz von 0.3 Hz gemessen (Abb. 27). Der Vergleich der Strominhibierung des WT mit der Mutante in Anwesenheit von 1, 3 und 5  $\mu$ M Bepridil ergab keinen signifikanten Unterschied in der Blockintensität und Blockkinetik. In Anwesenheit von 10  $\mu$ M Amiodaron wurde der Ström der Mutante um  $42 \pm 1\%$  gehemmt. Die  $IC_{50}$  für Amiodaron, gemessen am WT-Kanal, betrug 7.2  $\mu$ M. Die Ähnlichkeit dieser zwei Werte deutet darauf hin, dass die Hemmaktivität von Amiodaron wenig bzw. gar nicht durch die aufgehobene Kanalinaktivierung beeinflusst wird. Die halbmaximale Inhibierung des Strömes der Mutante mit E-4031 wurde durch 10-fache E-4031- $IC_{50}$  der hERG-WT erreicht (Abb. 27). Zusätzlich zur Konzentrationsabhängigkeit wurde der Block der Mutante durch Bepridil und Amiodaron auch hinsichtlich der Frequenzabhängigkeit getestet (Abb. 28). Die Experimente wurden mit Anwendung des oben beschriebenen Protokolls und bei Anwesenheit von 10  $\mu$ M Amiodaron und 3  $\mu$ M Bepridil durchgeführt. Die Pulsfrequenz wurde variiert (0.1, 0.3 und 1 Hz). Die Zeitkonstanten ( $\tau$ ) und die steady-state Werte der Inhibition, gemessen in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen bzw. bei unterschiedlicher Frequenz, wurden in den Tabelle 7 und Tabelle 8 zusammengefasst.



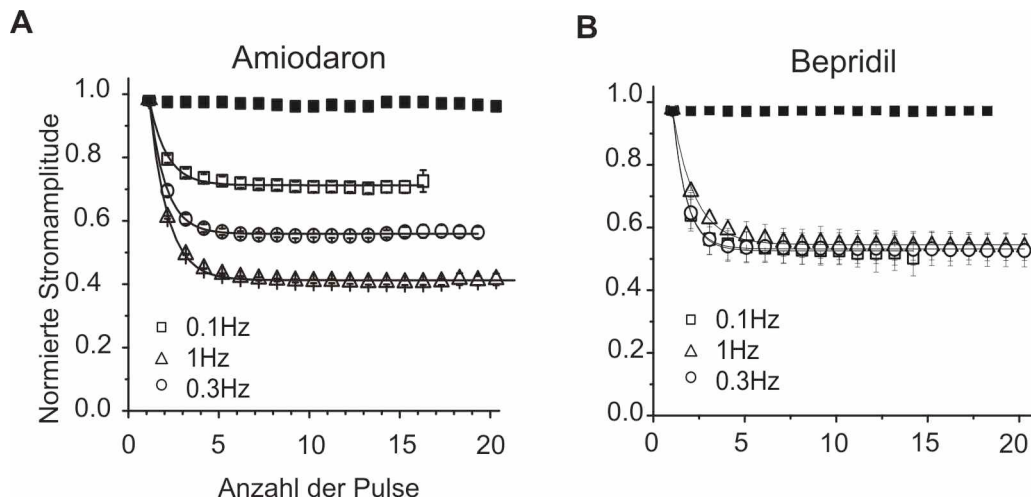
**Abb. 27:** Hemmung von hERG-G628C/S631C-Strömen in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von Amiodaron, Bepridil und E-4031.

**A)** Testpuls – Spannungsprotokoll, sowie Beispielstrom, aufgenommen vor und nach der Applikation von 10 µM Amiodaron. Normierte Maximalstromamplituden der hERG-Mutante, gemessen bei 0,3 Hz in Anwesenheit von 1, 10 und 100 µM Amiodaron, wurden als Funktion der Pulsnummer geplottet. Die Kurven wurden mit Hilfe der monoexponentiellen Funktion ( $I_{\text{peak}} = A \cdot \exp(-N/N_{\text{const}}) + I_{\text{ss}}$ ) gefittet. Die Maximalstromwerte der Experimente mit **B)** 1, 3 und 5 µM Bepridil und **C):** 10 und 30 µM E-4031 wurden ebenfalls als Funktion der Pulsnummer geplottet und die Kurven mit monoexponentieller Funktion gefittet.

**Tabelle 7:** Die  $\tau$  und „steady state“ des Blocks bei nichtinaktivierendem (G628C/S631C) hERG-Kanal mit verschiedenen Konzentrationen von Amiodaron, Bepridil und E-4031

|           | Konzentration<br>( $\mu\text{M}$ ) | Geschwindigkeit der<br>Inhibierung ( $\tau$ ) | Ausmaß am<br>Block $I_{ss}$ |
|-----------|------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------|
| Amiodaron | 1 $\mu\text{M}$ (n = 3)            | $2.15 \pm 0.31$                               | $0.82 \pm 0.03$             |
|           | 10 $\mu\text{M}$ (n = 3)           | $0.88 \pm 0.15$                               | $0.56 \pm 0.02$             |
|           | 100 $\mu\text{M}$ (n = 3)          | $0.52 \pm 0.09$                               | $0.43 \pm 0.01$             |
| Bepridil  | 1 $\mu\text{M}$ (n = 3)            | $3.76 \pm 0.13$                               | $0.78 \pm 0.01$             |
|           | 3 $\mu\text{M}$ (n = 3)            | $0.75 \pm 0.08$                               | $0.55 \pm 0.05$             |
|           | 10 $\mu\text{M}$ (n = 3)           | $0.59 \pm 0.09$                               | $0.38 \pm 0.02$             |
| E-4031    | 10 $\mu\text{M}$ (n = 3)           | $8.56 \pm 0.27$                               | $0.59 \pm 0.01$             |
|           | 30 $\mu\text{M}$ (n = 3)           | $2.63 \pm 0.04$                               | $0.43 \pm 0.03$             |

**Abb. 28:** Hemmung von hERG-G628C/S631C-Strömen mit 10  $\mu$ M Amiodaron bzw. 3  $\mu$ M Bepridil bei verschiedenen Frequenzen.



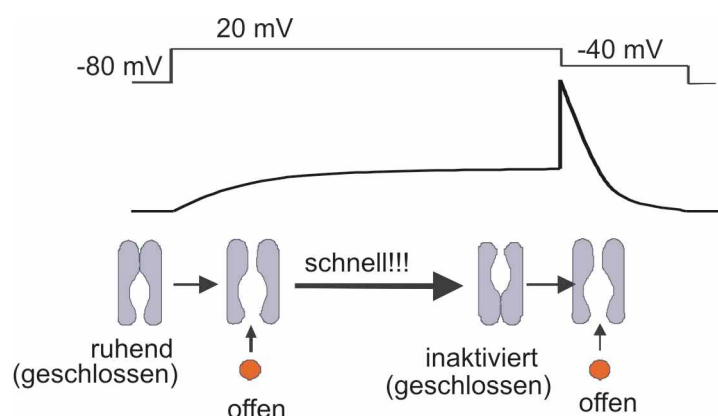
**Tabelle 8:** Die  $\tau$  und „steady state“ der hERG-G628C/S631C-Inhibierung mit Amiodaron und Bepridil bei verschiedenen Pulsfrequenzen:

|           | Frequenz (Hz)  | Geschwindigkeit der Inhibierung ( $\tau$ ) | Ausmaß am Block $I_{ss}$ |
|-----------|----------------|--------------------------------------------|--------------------------|
| Amiodaron | 0.1 Hz (n = 3) | $1.15 \pm 0.24$                            | $0.73 \pm 0.02$          |
|           | 0.3 Hz (n = 3) | $1.22 \pm 0.35$                            | $0.57 \pm 0.01$          |
|           | 1 Hz (n = 3)   | $1.01 \pm 0.06$                            | $0.43 \pm 0.01^*$        |
| Bepridil  | 0.1 Hz (n = 4) | $1.75 \pm 0.60$                            | $0.57 \pm 0.04$          |
|           | 0.3 Hz (n = 3) | $0.75 \pm 0.08$                            | $0.55 \pm 0.05$          |
|           | 1 Hz (n = 3)   | $1.18 \pm 0.17$                            | $0.56 \pm 0.05$          |

\*Statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0.05$ ) des Ausmaßes am Block - mit Amiodaron gemessen bei 1 Hz - im Vergleich zum Ausmaß am Block, gemessen bei niedrigeren Testpulsfrequenzen (0.1 oder 0.3 Hz).

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe elektrophysiologischer Untersuchungen an *Xenopus laevis* Oozyten 17 verschiedene Substanzen hinsichtlich ihrer hERG-Kanal-inhibierenden Wirkung getestet. Mit den Substanzen, die eine Inhibierung des hERG-Stroms zeigten, wurden weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der kanalzustandsabhängigen Wirkung durchgeführt.

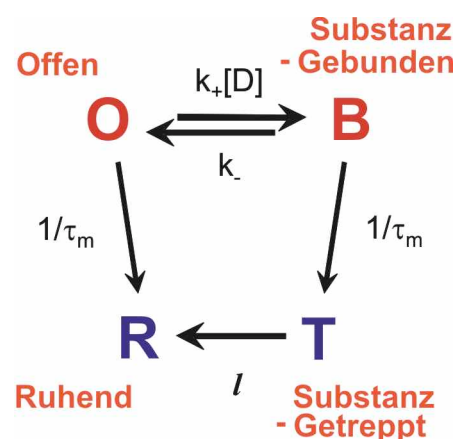


**Abb. 29:** Kanalzustandsänderung im Verlauf des Aktionspotentials

Bei der Messung der Inhibierung des hERG-Kanal Stromes, evoziert durch die Applikation einer Pulssalve (Spannungs- Protokoll des Testpulses siehe Abb. 29), wurde für Diphehydramin, Chinidin und Thioridazin ein pulsunabhängiger tonischer Block dokumentiert (Abb. 15). Daraus wäre zu schließen, dass diese hERG-Kanalblocker ihre Wirkung am ruhenden Kanal entfalten. Dieses Ergebnis schließt jedoch nicht aus, dass diese Blocker auch am offenen hERG-Kanal binden, aber wegen der schnellen Blockkinetik eine Use-Dependency mit dem oben beschriebenen Messprotokoll nicht detektierbar ist. Die in der Literatur beschriebene Evidenz für einen schnellen Use-Dependent hERG-Kanal Block mit Chinidin (Tsujimae *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004) und Thioridazin (Milnes *et al.*, 2006) bestätigt, dass das angewendete Messprotokoll nicht zur Charakterisierung der Kanalzustandsabhängigkeit nach der Einwirkung von sehr schnellen hERG-Kanalblockern geeignet ist.

Weitere potente HERG Blocker (Amiodaron, Bepridil, Droperidol, E-4031, Terfenadin, Haloperidol, Domperidol und Cisaprid) inhibieren den hERG-Strom pulsabhängig (Abb. 17). Die Notwendigkeit des Testpulses für die Inhibierung deutet darauf hin, dass die Zugänglichkeit der Bindungsdomäne für den jeweiligen use-dependent Blocker nur in der offenen bzw. inaktivierten Kanalkonformation gegeben ist. Es ist aus mehreren Studien bekannt, dass die überwiegende Zahl der hERG-Kanalblocker mit Aminosäureresten der Porenregion interagieren (Mitcheson *et al.*, 2000a; Zou *et al.*, 1997; Mitcheson *et al.*, 2000b).

Ein Vergleich der Kinetik der hERG-Kanal Hemmung durch verschiedene Blocker bei gleicher Frequenz ergab gravierende Unterschiede. Der Block durch Haloperidol und Domperidon erreichte sein steady state innerhalb von 4- 5 Pulsen; der Block durch Amiodaron innerhalb von 10-12 Pulsen und der Block durch E-4031 innerhalb von mehr als 120 Pulsen (Abb. 16). Die Unterschiede in der Kinetik der Strominhibierung deuten darauf hin, dass die unterschiedlichen Blocker eine unterschiedliche Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit aufweisen. Die Kinetik der Strominhibierung verschiedener hERG-Kanalblocker wurde mit Hilfe einer Reihe von elektrophysiologischen Untersuchungen detailliert charakterisiert.

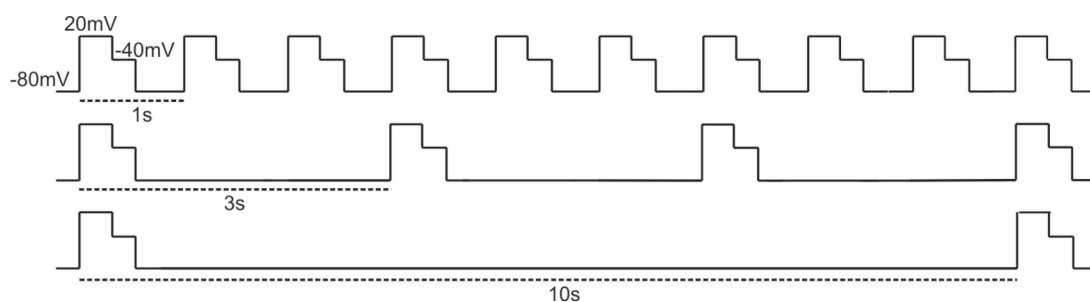


**Abb. 30:** Schematische Darstellung der Kanalzustandsänderung

Während der Depolarisation und der Repolarisation (Testpuls) befinden sich die Kanäle in offenem bzw. inaktiviertem Zustand. Ein „use-dependent“ Blocker bindet mit einer Geschwindigkeit  $K_+$  an seine Bindungsstelle, kann jedoch von der Bindungsstelle mit der Geschwindigkeit  $K_-$  abdissoziieren, bevor die Kanäle schließen. Mit zunehmender Repolarisation schließen sowohl substanzfreie als auch substanzgebundene Kanäle. Durch

das Schließen des Inaktivierungs- und Aktivierungstors bleibt das gebundene Molekül im Kanal gefangen (getrappt). Es kann jedoch mit der Geschwindigkeitskonstante  $I$  den geschlossenen Kanal verlassen, wodurch der Kanal in den Ruhezustand übergeht und beim nächsten Puls wiederöffnungsbereit ist. Rot: Kanalkonformationen während des Pulses, blau: Kanalkonformationen zwischen den Pulsen beim Haltepotential.

Bei Messungen der Strominhibition bei verschiedenen Testpulsfrequenzen wurde die Zeit, in der die mögliche Dissoziation vom geschlossenen Kanal stattfindet, variiert. (siehe Abb. 31)



**Abb.31:** Protokolle für die Messung der hERG-Strom Inhibition bei verschiedenen Frequenzen

Anhand der Ergebnisse konnten die „use-dependent“ Blocker in 2 Gruppen eingeteilt werden:

Gruppe1: **Frequenzabhängige** (Amiodaron, Cisaprid, Droperidol und Haloperidol; Abb. 18) und

Gruppe 2: **Frequenzunabhängige Blocker** (Bepridil, Terfenadin, E-4031 und Domperidon; Abb. 19).

Die Dissoziation vom geschlossenen Kanal der Substanzen aus Gruppe 1 wurde experimentell belegt. Eine Erholung des ruhenden hERG-Kanals (beim Ruhemembranpotential) vom Block (Abb. 20), die durch die Hyperpolarisierung der Zellmembran beschleunigt wurde (Abb. 21, Tabelle 5), war zu beobachten.

Zwei Hypothesen wie ein Molekül den geschlossenen hERG-Kanal verlassen kann sind aufgelistet:

1. Ein Blocker verlässt den Kanal nur während des Übergangs (schnelles „Flickern“ der Kanäle zwischen offenem und geschlossenem Zustand) von der geschlossenen zu offenen Kanalkonformation.
2. Durch die unvollständige Schließung des Aktivierungstores ist der Blocker nicht vollständig in der Pore geschlossen („foot in the door“ Mechanismus, Yeh und Armstrong, 1978). Das unvollständig geschlossene Aktivierungstor stellt aber ein „leicht überwindbares“ Hindernis für die Arzneimitteldissoziation dar.

Die Häufigkeit des „Flickerns“ des Kanals zwischen geschlossenem und offenem Zustand wird mit stärkerer Hyperpolarisierung der Zellmembran vermindert und die Erholung des Kanals vom Block bei stärkerer Membranhyperpolarisation beschleunigt, womit die erste Hypothese wenig wahrscheinlich ist.

Meine Daten stützen hingegen die Hypothese, dass die Schließungsgates des Kanals die eigentliche Barriere für die spannungsabhängige Dissoziation der Blocker darstellt. Ein größerer Spannungsabfall innerhalb der Schließungsgates des geschlossenen hERG-Kanals erleichtert den geladenen Arzneimitteln aus Gruppe 1 das Verlassen des Kanals. Untersuchungen am nicht inaktivierendem hERG-Kanal zeigten weder Beeinträchtigung noch Beschleunigung der Substanzdissotiation vom geschlossenen Kanal (gleiche Frequenzabhängigkeit bei hERG-WT und hERG-G628C/S631C-Mutante; Abb. 28), was darauf schließen lässt, dass die Inaktivierung keine Rolle beim „Trapping“ spielt.

Eine Reihe von Beweisen unterstützt die Hypothese, dass die Substanzen der Gruppe 2 genau wie Miconazol (Kikuchi *et al.*, 2005) nicht vom geschlossenen, sehr wohl aber vom offenen hERG-Kanal abdissoziieren können.

Die Unabhängigkeit der Stromhemmung von der Testpulsfrequenz zeigt, dass keine zeitabhängige Dissoziation zwischen den Einzelpulsen, d.h. keine

Dissoziation vom geschlossenen Kanal, stattfindet. Dieses Phänomen kann als absolutes Trapping bezeichnet werden.

Der „steady state“ (ss) der hERG-Strom Inhibierung durch Substanzen der Gruppe 2 spiegelt das Gleichgewicht zwischen Kanalblock und dessen Deblockierung ( $ss > 0$ ) wieder. Da der „steady state“ Wert nicht durch Substanzdissoziation vom geschlossenen Kanal (I) beeinflusst wird (Abb. 20 zeigt keine Erholung des ruhenden Kanals vom Block innerhalb 330 s), ist zu erwarten, dass die Substanzen vom offenen Kanal dissoziieren (K-). Einen zusätzlichen Beweis für die Dissoziation vom offenen Kanal liefert die Beschleunigung des Auswaschens dieser Substanzen bei Erhöhung der Pulsfrequenz. Bepridil, Terfenadin, E-4031 und Domperidon dissoziieren nicht vom ruhenden hERG-Kanal (Abb. 20). Eine Dissoziation dieser Blocker vom hERG Kanal findet bei hochfrequenter Öffnung des Kanals statt (Abb. 22).

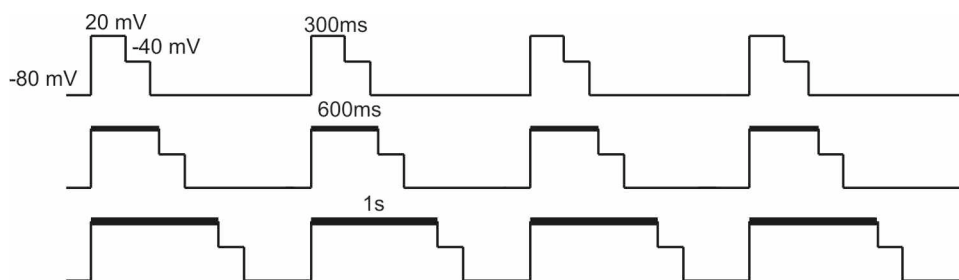
Kamiya *et al.* zeigten, dass E-4031 und Bepridil durch Schließung des Aktivierungstors im Poreninnenraum gefangen bleiben und bei Kanalwiederöffnung durch starke Membranhyperpolarisation (-160 mV) vom Kanal abdissoziieren. In meiner Arbeit habe ich ähnliche Ergebnisse für Domperidon und Terfenadin beobachtet (Abb. 23) und konnte damit die Ergebnisse von Kamiya *et al.* Bestätigen (Daten nicht gezeigt).

Die Ursachen für das unterschiedliche Dissoziationsverhalten verschiedener hERG-Kanalblocker ist noch weitgehend unbekannt. Die unterschiedlichen Bindungsstellen wurden als mögliche Ursache durch Ergebnisse der Studie von Mitcheson und Sanguinetti ausgeschlossen (Mitcheson, 2000a). In dieser Studie wurde berichtet, dass für die Bindung von Cisaprid und Terfenadin am hERG-Kanal ähnliche AS Reste notwendig sind (Tyr652 und Phe656). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Cisaprid vom geschlossenen hERG-Kanal abdissoziieren kann, wogegen Terfenadin nach dem Block vom hERG-Kanal in der Kanalpore gefangen bleibt. Aus diesen Erkenntnissen kann der Schluss gezogen werden, dass eine gleiche Bindungsdomäne der verschiedenen Blocker keine Voraussetzung für gleiches Dissoziationsverhalten ist. Meine Versuche, eine Korrelation zwischen Dissoziationsverhalten und einem chemischen bzw. physikalischen

Substanzmerkmal (Molekülgröße, Lipophilie) zu finden, waren bisher erfolglos (Daten nicht gezeigt). Allerdings war die Zahl der untersuchten Substanzen für eine aussagekräftige Korrelation nicht ausreichend. Um einen Rückschluss auf die chemische Struktur, die eine Voraussetzung für einen Trapping Mechanismus wäre, zu gewährleisten, waren die untersuchten Substanzen zu heterogen.

Vier der getesteten Substanzen (Amiodaron, Cisaprid, Haloperidol und Droperidol) üben einen frequenzabhängigen Block am hERG-Kanal aus, wobei die restlichen vier Blocker den hERG Strom in gleichem Ausmaß und mit gleicher Kinetik bei verschiedenen Frequenzen inhibieren. In Abbildung 29 wurde am Beispiel von Amiodaron (frequenzabhängiger Blocker) und Domperidon (frequenzunabhängiger Blocker) der Einfluss der Block-Frequenzabhängigkeit auf die Quantifizierung der Substanz-Kanal-Interaktion gezeigt. Für beide Substanzen wurden  $IC_{50}$ -Werte bei zwei Frequenzen bestimmt (0.3 und 0.03 Hz). Die gemessenen  $IC_{50}$ -Werte für die hERG Strom Inhibierung mit Amiodaron waren  $7.2 \pm 2.05 \mu\text{M}$  bei 0.03 Hz und  $1.1 \pm 0.65 \mu\text{M}$  bei 0.3 Hz. Die  $IC_{50}$ -Werte für Domperidon, gemessen bei beiden Frequenzen, waren vergleichbar ( $\approx 5 \mu\text{M}$ ). Mit diesen Experimenten wurde deutlich gezeigt, dass bei der Quantifizierung der Substanz-Kanal-Interaktion neben Temperatur und Spannungsprotokoll des Testpulses (Kirsch *et al.* 2004, Yao *et al.*, 2005) auch die Frequenz der Testpulsapplikation eine Auswirkung auf den  $IC_{50}$ -Wert haben kann. Dieses Ergebnis stellt eine mögliche Erklärung für die großen Unterschiede, der in verschiedenen Labors ermittelten  $IC_{50}$ -Werte (10- bis 30-fache) (Pearlstein *et al.*, 2003), dar.

Die 20 mV – Protokollstufe simuliert die Stufe der kardialen Depolarisation während der ein Großteil der hERG-Kanäle inaktiviert ist. Durch die Verlängerung dieser Zeit wurde die eigentliche Verweildauer des Kanals im inaktivierten Zustand verlängert.



**Abb.32:** Protokolle für die Messung der hERG-Strom Inhibierung bei verschiedenen Prepulslängen

Ein Einfluss der Vorpulsverlängerung auf das Ausmaß und die Kinetik der hERG Strom Inhibierung wurde für E-4031 untersucht. Die Verlängerung dieser Zeit resultiert in einer Verstärkung des Blocks, was die Schlussfolgerung zulässt, dass eine Interaktion von E-4031 mit dem inaktivierten hERG-Kanal stattfindet. In dieser Arbeit wurde mit der Änderung der Vorpulslänge gezeigt, dass E-4031 neben der Bindung am offenen Kanal (ohne den es keinen „use-dependent“ Block gäbe) auch eine Wirkung auf den inaktivierten hERG-Kanal ausübt.

Eine Vorpulsabhängigkeit des Blocks, induziert durch Amiodaron, Bepridil, Cisaprid, Domperidol, Droperidol, Haloperidol und Terfenadin war experimentell nicht nachweisbar. Dies schließt jedoch nicht aus, dass vor allem die Substanzen, die sehr schnelle hERG-Strom Inhibierung aufweisen, trotz fehlender Vorpulsabhängigkeit mit dem inaktivierten Kanal interagieren. Bei Erreichen eines fast vollständigen Blocks innerhalb von 2-3 Pulsen (Bsp. Haloperidol) ist der Einfluss der Vorpulsverlängerung auf den Block während der Pulssalve schwer zu erkennen.

Durch Vergleichen der  $IC_{50}$ -Werte der Substanzen für den hERG-G628C/S631C (nicht inaktivierender hERG Mutant) und den hERG-WT wurde die Interaktion von E-4031 mit dem inaktivierten hERG-Kanal bestätigt. In dieser Arbeit wurde genau wie bei Wang *et al.*, 1997 im hERG-Kanal mit fehlender Inaktivierung eine 10-fache  $IC_{50}$  Erhöhung durch E-4031 gemessen. Die Experimente mit Bepridil am hERG-Mutanten zeigten, dass Bepridil ein reiner „open hERG channel bloker“ ist, da idente  $IC_{50}$ -Werte am hERG-WT und am nicht inaktivierenden Mutanten gemessen wurden.

Die Klasse III Antiarrhythmika entfalten ihre antiarrhythmische Wirkung über den Block von kardialen  $K^+$ -Kanälen. Eines der Hauptcharakteristika fast aller Vertreter der Klasse III Antiarrhythmika (ausgenommen Amiodaron) ist die „reverse Use-Dependency“. Darunter versteht man eine stärkere Verlängerung des Aktionspotentials bei Bradykardie als bei Tachykardie. Eine rasche Dissoziation vom Kanal während der Diastole stellt die Voraussetzung für einen schwachen Kanalblock bei niedrigerer Frequenz sowie stärkeren Blocks bei höheren Frequenzen dar (positive Use-Dependency) (Ishii *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Amiodaron im Unterschied zu E-4031 und Dofetilide (Ishii *et al.*, 2002) vom geschlossenen Kanal abdissozieren kann, wodurch eine positive Use-Dependency ermöglicht wird.

## 5 Anhang

### 5.1 Zusammenfassung

Die Untersuchungen zur Hemmung von hERG-Kanälen durch 11 bekannte Inhibitoren erbrachten folgende Ergebnisse:

1. hERG Kanal Blocker dissoziieren jeweils verschieden vom offenen und geschlossenen Kanalzustand. Dies wurde besonders durch die beobachtete „use-dependent“ Dissoziation und „drug trapping“ deutlich.  
„Getrappte“ Blocker dissoziieren vom offenen hERG-Kanal, wohingegen die frequenzabhängigen Blocker sowohl vom offenen als auch vom geschlossenen Kanal dissoziieren.
2. Die Depolarisationsfrequenz beeinflusst die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte von frequenzabhäng wirkenden Kanalblockern. Dies könnte zur Erklärung der Variabilität von  $IC_{50}$ -Werte aus verschiedenen Laboratorien beitragen.
3. Bepridil hemmt hERG Kanäle ausschließlich im offenen Zustand und kann deshalb als reiner „offener-Kanal-Blocker“ bezeichnet werden.  
Für E-4031 wurde eine Abhängigkeit der Kanalhemmung von der Länge des konditionären Testpulses festgestellt, was auf eine Interaktion dieses Blockers mit inaktivierten Kanälen schließen lässt.
4. Es ist möglich, dass die Arrhythmogenität von Arzneistoffen in einem engen Zusammenhang mit dem „drug trapping“ Mechanismus steht. Substanzen, die während der Diastole (im geschlossenen Kanalzustand) nicht von ihren Bindungsstellen im Kanal dissoziieren können, könnten theoretisch eine größere Neigung haben, in der Kanalpore zu verweilen und die Kanäle nachhaltiger zu inhibieren.  
Durch die Identifizierung von Teilstrukturen von Kanalblockern, die für den „trapping“ Mechanismus verantwortlich sind bzw. diesen Verhindern, wäre die Erkennung bzw, das Vermeiden einer eventuellen Arrhythmogenität neuer Wirkstoffkandidaten während der Entwicklung möglich.

## 5.2 Abstract

In this study, the kinetics of inhibition of currents through hERG channels by 11 known channel blockers were investigated. The following conclusions can be drawn:

1. The dissociation of hERG blockers is channel state dependent and different for open and closed channels (use-dependent dissociation). “Trapped” blockers dissociate mainly from the open channel state. Frequency-dependent blockers dissociate from open and closed channels.
2. The pulse frequency was found to affect the observed  $IC_{50}$  of the frequency-dependent channel blockers. This could help to explain differences in  $IC_{50}$  values reported from different laboratories.
3. Bepridil inhibits exclusively hERG channels in the open state and can therefore be designated as “pure open channel blocker”. Channel inhibition by E-4031 was found to be dependent on the conditioning pre-pulse length suggesting an interaction with inactivated channels.
4. The tendency of the blockers to cause arrhythmias may be related to drug trapping. Compounds unable to dissociate from their binding sites during diastole (where most channels are in a closed state) might be expected to block hERG channels more efficiently and more persistently. Identification of the structural features of channel blockers responsible for drug trapping would allow to recognize (or prevent) arrhythmogenic features at early stages of drug development.

### 5.3 Abkürzungen

|                     |                                                       |
|---------------------|-------------------------------------------------------|
| ACE-Hemmer          | Angiotensin Converting Enzyme Hemmer                  |
| ANKB                | Ankyrin B Protein                                     |
| AP                  | Aktionspotential                                      |
| ARVD                | Arrhythmogenic right ventricular Displasia            |
| AS                  | Aminosäure                                            |
| AT1                 | mous atrial tumor cells                               |
| DMSO                | Dimethylsulfoxid                                      |
| EAG                 | Ether-a-go-go                                         |
| EC <sub>50</sub>    | mittlere effektive Konzentration                      |
| ERG                 | Ether-a-go-go Related Gene                            |
| MSS                 | Ethyl-3-aminobenzoatmethansulfonat                    |
| GERD                | gastro-oesophagealen Refluxkrankheit                  |
| GPV                 | guinea pig ventricular myocytes                       |
| HEK Zellen          | Human Embrionic Kidney – Zellen                       |
| HEPES               | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| hERG                | Human Ether-a-go-go Related Gene                      |
| IC <sub>50</sub>    | mittlere inhibitorische Konzentration                 |
| I <sub>K</sub>      | delayed rectifier Kaliumauswärtsstrome                |
| I <sub>Kr</sub>     | langsam aktivierende I <sub>K</sub>                   |
| I <sub>Ks</sub>     | schnell aktivierende I <sub>K</sub>                   |
| I <sub>Kur</sub>    | ultra schnell aktivierende I <sub>K</sub>             |
| InsP <sub>3</sub> R | Inositol-1,4,5-triphosphat Receptor                   |
| I <sub>to</sub>     | Transiente Kaliumauswärtsstrom                        |
| JLN1                | Jervell-Lange-Nielsen Syndrom                         |
| K <sub>2P</sub>     | Zwie-Poren Kaliumkanäle                               |
| K <sub>Ach</sub>    | Acetylcholin-gesteuerte Kaliumknäle                   |
| K <sub>ATP</sub>    | Adenosintriphosphat-gesteuerte Kaliumkanäle           |
| KChIP               | K <sub>V</sub> -Channel-interacting Protein           |

---

|                     |                                                                         |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| KcsA                | Kaliumkanal von <i>Streptomyces lividans</i>                            |
| K <sub>ir</sub>     | inward-rectifier Kaliumkanäle                                           |
| KMes                | 4-Morpholinoethansulfonsäure-K <sup>+</sup> -Salz                       |
| K <sub>v</sub>      | Spannungsabhängige Kaliumkanäle                                         |
| K <sub>v</sub> LQT1 | Long-QT-Syndrom-1-assoziierte Kaliumkanal                               |
| LQTS                | Long-QT-Syndrom                                                         |
| minK                | minimal K <sup>+</sup> -channel                                         |
| MiRP1               | minimal K <sup>+</sup> -channel related Peptide-1                       |
| MthK                | kalziumgesteuerte Kaliumkanal vom <i>Methanobacterium autotrophicum</i> |
| NaMes               | 4-Morpholinoethansulfonsäure-Na <sup>+</sup> -Salz                      |
| nH                  | Hill koeffizient                                                        |
| PAS                 | Per-Arnt-Sim                                                            |
| QA                  | Quartären Aminen                                                        |
| RYR2                | Ryanodin-Rezeptor                                                       |
| SCN5A               | Natriumkanal Gen                                                        |
| TdP                 | Torsade de Point                                                        |
| TEA                 | Triethylamin                                                            |
| TBA                 | Tributylamin                                                            |
| TRP-Kanäle          | Transient-Receptor-Potential Kanäle                                     |
| WT                  | wild Typ                                                                |

## 5.4 Literaturverzeichnis

- Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT and Goldstein SA (1999) MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **97**(2):175-187.
- Abriel H, Schlapfer J, Keller DI, Gavillet B, Buclin T, Biollaz J, Stoller R and Kappenberger L (2004) Molecular and clinical determinants of drug-induced long QT syndrome: an iatrogenic channelopathy. *Swiss Med Wkly* **134**(47-48):685-694.
- Anantharam A and Abbott GW (2005) Does hERG coassemble with a beta subunit? Evidence for roles of MinK and MiRP1. *Novartis Found Symp* **266**:100-112; discussion 112-107, 155-108.
- Arcangeli A, Rosati B, Cherubini A, Crociani O, Fontana L, Ziller C, Wanke E and Olivotto M (1997) HERG- and IRK-like inward rectifier currents are sequentially expressed during neuronal development of neural crest cells and their derivatives. *Eur J Neurosci* **9**(12):2596-2604.
- Armstrong CM (1968) Induced inactivation of the potassium permeability of squid axon membranes. *Nature* **219**(5160):1262-1263.
- Armstrong CM (1969) Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion injection in squid axons. *J Gen Physiol* **54**(5):553-575.
- Armstrong CM (1971) Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen Physiol* **58**(4):413-437.
- Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft *Proarrhythmische Wirkungen der Antihistaminika Terfenadin und Astemizol*, Dtsch Arztebl 1997; 94(18): A-1224 / B-1044 / C-976
- Baburin I, Beyl S and Hering S (2006) Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening. *Pflugers Arch* **453**(1):117-123.
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M and Romey G (1996) K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* **384**(6604):78-80.

- Bauman JL (1997) Class III antiarrhythmic agents: the next wave. *Pharmacotherapy* **17**(2 Pt 2):76S-83S; discussion 89S-91S.
- Bezanilla F (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* **80**(2):555-592.
- Bezanilla F (2005) The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel. *Trends Biochem Sci* **30**(4):166-168.
- Bianchi L, Wible B, Arcangeli A, Taglialatela M, Morra F, Castaldo P, Crociani O, Rosati B, Faravelli L, Olivotto M and Wanke E (1998) hERG encodes a K<sup>+</sup> current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells? *Cancer Res* **58**(4):815-822.
- Buckley NA, Whyte IM and Dawson AH (1995) Cardiotoxicity more common in thioridazine overdose than with other neuroleptics. *J Toxicol Clin Toxicol* **33**(3):199-204.
- Camm AJ, Janse MJ, Roden DM, Rosen MR, Cinca J and Cobbe SM (2000) Congenital and acquired long QT syndrome. *Eur Heart J* **21**(15):1232-1237.
- Cavalli A, Poluzzi E, De Ponti F and Recanatini M (2002) Toward a pharmacophore for drugs inducing the long QT syndrome: insights from a CoMFA study of HERG K<sup>+</sup> channel blockers. *J Med Chem* **45**(18):3844-3853.
- Chen H, Kim LA, Rajan S, Xu S and Goldstein SA (2003) Charybdotoxin binding in the I(Ks) pore demonstrates two MinK subunits in each channel complex. *Neuron* **40**(1):15-23.
- Chen J, Seeböhm G and Sanguinetti MC (2002) Position of aromatic residues in the S6 domain, not inactivation, dictates cisapride sensitivity of HERG and eag potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19):12461-12466.
- Chen J, Zou A, Splawski I, Keating MT and Sanguinetti MC (1999) Long QT syndrome-associated mutations in the Per-Arnt-Sim (PAS) domain of HERG potassium channels accelerate channel deactivation. *J Biol Chem* **274**(15):10113-10118.
- Cherubini A, Taddei GL, Crociani O, Paglierani M, Buccoliero AM, Fontana L, Noci I, Borri P, Borrani E, Giachi M, Becchetti A, Rosati B, Wanke E, Olivotto M and Arcangeli A (2000) HERG potassium channels are more

- frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. *Br J Cancer* **83**(12):1722-1729.
- Chiang CE and Roden DM (2000) The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* **36**(1):1-12.
- Chouabe C, Drici MD, Romey G, Barhanin J and Lazdunski M (1998) HERG and KvLQT1/IsK, the cardiac K<sup>+</sup> channels involved in long QT syndromes, are targets for calcium channel blockers. *Mol Pharmacol* **54**(4):695-703.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E and Rudy B (1999) Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci* **868**:233-285.
- Crociani O, Cherubini A, Piccini E, Polvani S, Costa L, Fontana L, Hofmann G, Rosati B, Wanke E, Olivotto M and Arcangeli A (2000) erg gene(s) expression during development of the nervous and muscular system of quail embryos. *Mech Dev* **95**(1-2):239-243.
- Crumb WJ, Jr. (1999) Rate-dependent blockade of a potassium current in human atrium by the antihistamine loratadine. *Br J Pharmacol* **126**(3):575-580.
- Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED and Keating MT (1995) A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* **80**(5):795-803.
- Dascal N. (1987) The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem.* **22**(4):317-87. Review.
- Davies AJ, Harindra V, McEwan A and Ghose RR (1989) Cardiotoxic effect with convulsions in terfenadine overdose. *BMJ* **298**(6669):325.
- De Ponti F, Poluzzi E, Cavalli A, Recanatini M and Montanaro N (2002a) Safety of non-antiarrhythmic drugs that prolong the QT interval or induce torsade de pointes: an overview. *Drug Saf* **25**(4):263-286.
- De Ponti F, Poluzzi E, Vaccheri A, Bergman U, Bjerrum L, Ferguson J, Frenz KJ, McManus P, Schubert I, Selke G, Terzis-Vaslamatzis G and Montanaro N (2002b) Non-antiarrhythmic drugs prolonging the QT interval: considerable use in seven countries. *Br J Clin Pharmacol* **54**(2):171-177.

- Delisle BP, Anson BD, Rajamani S and January CT (2004) Biology of cardiac arrhythmias: ion channel protein trafficking. *Circ Res* **94**(11):1418-1428.
- Delpon E, Valenzuela C and Tamargo J (1999) Blockade of cardiac potassium and other channels by antihistamines. *Drug Saf* **21 Suppl 1**:11-18; discussion 81-17.
- Desautels S, Filteau C and St-Jean A (1964) Ventricular Tachycardia Associated with Administration of Thioridazine Hydrochloride (Mellaril): Report of a Case with a Favourable Outcome. *Can Med Assoc J* **90**:1030-1031.
- Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS and McKinnon D (1996) Role of the Kv4.3 K<sup>+</sup> channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* **79**(4):659-668.
- Drolet B, Rousseau G, Daleau P, Cardinal R, Turgeon J (2000) Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Circulation* **17**:1883–1885
- Eckhardt LL, Rajamani S and January CT (2005) Protein trafficking abnormalities: a new mechanism in drug-induced long QT syndrome. *Br J Pharmacol* **145**(1):3-4.
- Ekins S, Crumb WJ, Sarazan RD, Wikel JH and Wrighton SA (2002) Three-dimensional quantitative structure-activity relationship for inhibition of human ether-a-go-go-related gene potassium channel. *J Pharmacol Exp Ther* **301**(2):427-434.
- Eulitz Dirk (2000) Dopaminerge Neurone im motorischen und limbischen Mesencephalon der Ratte unterscheiden sich in ihrer Ausstattung mit Kir3-Kanälen. *Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin*
- European Medicin Agency; ICH Topic E 14 The Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs, November 2005; CHMP/ICH/2/04

- Fan JS, Jiang M, Dun W, McDonald TV and Tseng GN (1999) Effects of outer mouth mutations on hERG channel function: a comparison with similar mutations in the Shaker channel. *Biophys J* **76**(6):3128-3140.
- Fermini B and Fossa AA (2003) The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* **2**(6):439-447.
- Ferrer T, Rupp J, Piper DR and Tristani-Firouzi M (2006) The S4-S5 linker directly couples voltage sensor movement to the activation gate in the human ether-a'-go-go-related gene (hERG) K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* **281**(18):12858-12864.
- Ficker E, Jarolimek W, Kiehn J, Baumann A and Brown AM (1998) Molecular determinants of dofetilide block of HERG K<sup>+</sup> channels. *Circ Res* **82**(3):386-395.
- Fowler NO, McCall D, Chou TC, Holmes JC and Hanenson IB (1976) Electrocardiographic changes and cardiac arrhythmias in patients receiving psychotropic drugs. *Am J Cardiol* **37**(2):223-230.
- Goldin AL (1991) Expression of ion channels by injection of mRNA into *Xenopus* oocytes. *Methods Cell Biol* **36**:487-509.
- Grabner M, Wang Z, Hering S, Striessnig J and Glossmann H (1996) Transfer of 1,4-dihydropyridine sensitivity from L-type to class A (BI) calcium channels. *Neuron* **16**(1):207-218.
- Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G. (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*.**233**(5316):177-82. No abstract available.
- Guy JM, Andre-Fouet X, Porte J, Bertrand M, Lamaud M and Verneyre H (1991) [Torsades de pointes and prolongation of the duration of QT interval after injection of droperidol]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* **40**(9):541-545.
- Gwilt M, Arrowsmith JE, Blackburn KJ, Burges RA, Cross PE, Dalrymple HW and Higgins AJ (1991) UK-68,798: a novel, potent and highly selective class III antiarrhythmic agent which blocks potassium channels in cardiac cells. *J Pharmacol Exp Ther* **256**(1):318-324.

- Habib AS and Gan TJ (2003) Food and drug administration black box warning on the perioperative use of droperidol: a review of the cases. *Anesth Analg* **96**(5):1377-1379.
- Henderson RA, Lane S, Henry JA. (1991) Life-threatening ventricular arrhythmia (torsades de pointes) after haloperidol overdose. *Hum Exp Toxicol* **10**(1):59-62.
- Hanner M, Green B, Gao YD, Schmalhofer WA, Matyskiela M, Durand DJ, Felix JP, Linde AR, Bordallo C, Kaczorowski GJ, Kohler M and Garcia ML (2001) Binding of correolide to the K(v)1.3 potassium channel: characterization of the binding domain by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **40**(39):11687-11697.
- Hassaballa HA, Balk RA. (2003) Torsade de pointes associated with the administration of intravenous haloperidol: a review of the literature and practical guidelines for use. *Expert Opin Drug Saf.* **2**(6):543-7. Review.
- Hatta K, Takahashi T, Nakamura H, Yamashiro H, Asukai N, Matsuzaki I, Yonezawa Y. (2001) The association between intravenous haloperidol and prolonged QT interval. *J Clin Psychopharmacol.* **21**(3):257-61.
- Haverkamp W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antzelevitch C, Escande D, Franz M, Malik M, Moss A and Shah R (2000) The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* **47**(2):219-233.
- Haverkamp W, Monnig G, Schulze-Bahr E, Haverkamp F and Breithardt G (2002) Physician-induced torsade de pointes--therapeutic implications. *Cardiovasc Drugs Ther* **16**(2):101-109.
- Herzberg IM, Trudeau MC and Robertson GA (1998) Transfer of rapid inactivation and sensitivity to the class III antiarrhythmic drug E-4031 from HERG to M-eag channels. *J Physiol* **511** ( Pt 1):3-14.
- Hodgkin AL and Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* **117**(4):500-544.

- Holmgren M, Smith PL and Yellen G (1997) Trapping of organic blockers by closing of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels: evidence for a trap door mechanism of activation gating. *J Gen Physiol* **109**(5):527-535.
- Hulisz DT, Dasa SL, Black LD and Heiselman DE (1994) Complete heart block and torsade de pointes associated with thioridazine poisoning. *Pharmacotherapy* **14**(2):239-245.
- Huston JR and Bell GE (1966) The effect of thioridazine hydrochloride and chlorpromazine on the electrocardiogram. *JAMA* **198**(1):134-138.
- Isbrandt D, Friederich P, Solth A, Haverkamp W, Ebner A, Borggrete M, Funke H, Sauter K, Breithardt G, Pongs O and Schulze-Bahr E (2002) Identification and functional characterization of a novel KCNE2 (MiRP1) mutation that alters HERG channel kinetics. *J Mol Med* **80**(8):524-532.
- Ishii K, Kondo K, Takahashi M, Kimura M and Endoh M (2001) An amino acid residue whose change by mutation affects drug binding to the HERG channel. *FEBS Lett* **506**(3):191-195.
- Ishii K, Nagai M, Takahashi M and Endoh M (2003) Dissociation of E-4031 from the HERG channel caused by mutations of an amino acid results in greater block at high stimulation frequency. *Cardiovasc Res* **57**(3):651-659.
- January CT, Gong Q and Zhou Z (2000) Long QT syndrome: cellular basis and arrhythmia mechanism in LQT2. *J Cardiovasc Electrophysiol* **11**(12):1413-1418.
- Jiang D, Xiao B, Yang D, Wang R, Choi P, Zhang L, Cheng H and Chen SR (2004) RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca<sup>2+</sup> release (SOICR). *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(35):13062-13067.
- Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A and MacKinnon R (2003) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* **423**(6935):42-48.
- Kamiya K, Mitcheson JS, Yasui K, Kodama I and Sanguinetti MC (2001) Open channel block of HERG K<sup>+</sup> channels by vesnarinone. *Mol Pharmacol* **60**(2):244-253.

- Kamiya K, Lu Z, Yasui K, Kodama I, Sanguinetti MC (2002) Bepridile preferentially inhibits hERG channels rather than KvLQT1/MinK channels. *Biophys. J. (Annual Meeting Abstracts)* **82** (1): 607.
- Kamiya K, Niwa R, Mitcheson JS and Sanguinetti MC (2006) Molecular determinants of HERG channel block. *Mol Pharmacol* **69**(5):1709-1716.
- Katchman AN, Koerner J, Tosaka T, Woosley RL and Ebert SN (2006) Comparative evaluation of HERG currents and QT intervals following challenge with suspected torsadogenic and nontorsadogenic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **316**(3):1098-1106.
- Kawakami K, Nagatomo T, Abe H, Kikuchi K, Takemasa H, Anson BD, Delisle BP, January CT and Nakashima Y (2006) Comparison of HERG channel blocking effects of various beta-blockers-- implication for clinical strategy. *Br J Pharmacol* **147**(6):642-652.
- Kelly HG, Fay JE and Lavery SG (1963) Thioridazine Hydrochloride (Mellaril): Its Effect on the Electrocardiogram and a Report of Two Fatalities with Electrocardiographic Abnormalities. *Can Med Assoc J* **89**:546-554.
- Kemper AJ, Dunlap R and Pietro DA (1983) Thioridazine-induced torsade de pointes. Successful therapy with isoproterenol. *JAMA* **249**(21):2931-2934.
- Kiehn J, Thomas D, Karle CA, Schols W and Kubler W (1999) Inhibitory effects of the class III antiarrhythmic drug amiodarone on cloned HERG potassium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **359**(3):212-219.
- Kikuchi K, Nagatomo T, Abe H, Kawakami K, Duff HJ, Makielski JC, January CT, Nakashima Y. (2005) Blockade of HERG cardiac K<sup>+</sup> current by antifungal drug miconazole. *Br J Pharmacol*. **144**(6):840-8.
- Kirsch GE, Trepakova ES, Brimecombe JC, Sidach SS, Erickson HD, Kochan MC, Shyjka LM, Lacerda AE, Brown AM. (2004) Variability in the measurement of hERG potassium channel inhibition: effects of temperature and stimulus pattern. *J Pharmacol Toxicol Methods*. **50**(2):93-101.
- Kodama I, Kamiya K, Toyama J. (1997) Cellular electropharmacology of amiodarone. *Cardiovasc Res*. **35**(1):13-29. Review.

- Kongsamut S, Kang J, Chen XL, Roehr J and Rampe D (2002) A comparison of the receptor binding and HERG channel affinities for a series of antipsychotic drugs. *Eur J Pharmacol* **450**(1):37-41.
- Kuryshv YA, Ficker E, Wang L, Hawryluk P, Dennis AT, Wible BA, Brown AM, Kang J, Chen XL, Sawamura K, Reynolds W and Rampe D (2005) Pentamidine-induced long QT syndrome and block of hERG trafficking. *J Pharmacol Exp Ther* **312**(1):316-323.
- Kutteh R, Vandenberg JI and Kuyucak S (2007) Molecular dynamics and continuum electrostatics studies of inactivation in the HERG potassium channel. *J Phys Chem B* **111**(5):1090-1098.
- Larsson HP and Elinder F (2000) A conserved glutamate is important for slow inactivation in  $K^+$  channels. *Neuron* **27**(3):573-583.
- Lees-Miller JP, Duan Y, Teng GQ and Duff HJ (2000) Molecular determinant of high-affinity dofetilide binding to HERG1 expressed in *Xenopus* oocytes: involvement of S6 sites. *Mol Pharmacol* **57**(2):367-374.
- Liu J, Zhang M, Jiang M and Tseng GN (2002) Structural and functional role of the extracellular s5-p linker in the HERG potassium channel. *J Gen Physiol* **120**(5):723-737.
- Liu S, Rasmusson RL, Campbell DL, Wang S, Strauss HC. Activation and inactivation kinetics of an E-4031-sensitive current from single ferret atrial myocytes. *Biophys J* 1996; 70:2704-15.
- Long SB, Campbell EB and Mackinnon R (2005) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* **309**(5736):903-908.
- MacKinnon R (2003) Potassium channels. *FEBS Lett* **555**(1):62-65.
- Mark E. Curran CFuCRB (2002) Molecular Mechanism of a serious adverse Drug reaction drug induced cardiac arrhythmias, in *Pharmaceutical Discovery and Development*.
- Mazhari R, Greenstein JL, Winslow RL, Marban E and Nuss HB (2001) Molecular interactions between two long-QT syndrome gene products, HERG and KCNE2, rationalized by in vitro and in silico analysis. *Circ Res* **89**(1):33-38.
- Mehtonen OP, Aranko K, Malkonen L and Vapaatalo H (1991) A survey of sudden death associated with the use of antipsychotic or

- antidepressant drugs: 49 cases in Finland. *Acta Psychiatr Scand* **84**(1):58-64.
- Meyer R and Heinemann SH (1998) Characterization of an eag-like potassium channel in human neuroblastoma cells. *J Physiol* **508** ( Pt 1):49-56.
- Milnes JT, Witchel HJ, Leaney JL, Leishman DJ and Hancox JC (2006) hERG K<sup>+</sup> channel blockade by the antipsychotic drug thioridazine: An obligatory role for the S6 helix residue F656. *Biochem Biophys Res Commun* **351**(1):273-280.
- Mitcheson J, Perry M, Stansfeld P, Sanguinetti MC, Witchel H and Hancox J (2005) Structural determinants for high-affinity block of hERG potassium channels. *Novartis Found Symp* **266**:136-150; discussion 150-138.
- Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C and Sanguinetti MC (2000a) A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22):12329-12333.
- Mitcheson JS, Chen J and Sanguinetti MC (2000b) Trapping of a methanesulfonanilide by closure of the HERG potassium channel activation gate. *J Gen Physiol* **115**(3):229-240.
- Mohammad S, Zhou Z, Gong Q and January CT (1997) Blockage of the HERG human cardiac K<sup>+</sup> channel by the gastrointestinal prokinetic agent cisapride. *Am J Physiol* **273**(5 Pt 2):H2534-2538.
- Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogne K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H and Bennett V (2003) Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* **421**(6923):634-639.
- Morais Cabral JH, Lee A, Cohen SL, Chait BT, Li M and Mackinnon R (1998) Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell* **95**(5):649-655.
- Moss AJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Tzivoni D, Locati EH, MacCluer J, Hall WJ, Weitkamp L, Vincent GM and Garson A, Jr. (1991) The long QT syndrome. Prospective longitudinal study of 328 families. *Circulation* **84**(3):1136-1144.

- Nerbonne JM (2000) Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* **525 Pt 2**:285-298.
- Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J, Faure S, Gary F, Coumel P, Petit C, Schwartz K and Guicheney P (1997) A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet* **15**(2):186-189.
- Noda T, Shimizu W, Satomi K, Suyama K, Kurita T, Aihara N and Kamakura S (2004) Classification and mechanism of Torsade de Pointes initiation in patients with congenital long QT syndrome. *Eur Heart J* **25**(23):2149-2154.
- Paul AA, Witchel HJ and Hancox JC (2002) Inhibition of the current of heterologously expressed HERG potassium channels by flecainide and comparison with quinidine, propafenone and lignocaine. *Br J Pharmacol* **136**(5):717-729.
- Pearlstein R, Vaz R and Rampe D (2003) Understanding the structure-activity relationship of the human ether-a-go-go-related gene cardiac K<sup>+</sup> channel. A model for bad behavior. *J Med Chem* **46**(11):2017-2022.
- Perrault LP, Denault AY, Carrier M, Cartier R, Bélisle S. (2000) Torsades de pointes secondary to intravenous haloperidol after coronary bypass grafting surgery. *Can J Anaesth.* **47**(3):251-4.
- Perry M, de Groot MJ, Helliwell R, Leishman D, Tristani-Firouzi M, Sanguinetti MC and Mitcheson J (2004) Structural determinants of HERG channel block by clofilium and ibutilide. *Mol Pharmacol* **66**(2):240-249.
- Piper DR, Hinz WA, Tallurri CK, Sanguinetti MC and Tristani-Firouzi M (2005) Regional specificity of human ether-a'-go-go-related gene channel activation and inactivation gating. *J Biol Chem* **280**(8):7206-7217.
- Piper DR, Varghese A, Sanguinetti MC and Tristani-Firouzi M (2003) Gating currents associated with intramembrane charge displacement in HERG potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(18):10534-10539.
- Plugge B, Gazzarrini S, Nelson M., A potassium channel protein encoded by chlorella virus PBCV-1. *Science* **287**, 1641-1644

- Po SS, Wang DW, Yang IC, Johnson JP, Jr., Nie L and Bennett PB (1999) Modulation of HERG potassium channels by extracellular magnesium and quinidine. *J Cardiovasc Pharmacol* **33**(2):181-185.
- Quieffin J, Brochet E, Gamerman G, Assayag P, Antony I and Valere PE (1991) [Ventricular arrhythmia following thioridazine poisoning]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* **40**(4):199-201.
- Recanatini M, Poluzzi E, Masetti M, Cavalli A and De Ponti F (2005) QT prolongation through hERG K<sup>+</sup> channel blockade: current knowledge and strategies for the early prediction during drug development. *Med Res Rev* **25**(2):133-166.
- Reilly JG, Ayis SA, Ferrier IN, Jones SJ and Thomas SH (2000) QTc-interval abnormalities and psychotropic drug therapy in psychiatric patients. *Lancet* **355**(9209):1048-1052.
- Ridley JM, Milnes JT, Witchel HJ and Hancox JC (2004) High affinity HERG K<sup>+</sup> channel blockade by the antiarrhythmic agent dronedarone: resistance to mutations of the S6 residues Y652 and F656. *Biochem Biophys Res Commun* **325**(3):883-891.
- Robertson GA, Jones EM and Wang J (2005) Gating and assembly of heteromeric hERG1a/1b channels underlying I(Kr) in the heart. *Novartis Found Symp* **266**:4-15; discussion 15-18, 44-15.
- Rocha CM and Barbosa MM (2005) QT interval prolongation associated with the oral use of domperidone in an infant. *Pediatr Cardiol* **26**(5):720-723.
- Roden DM (1993) Current status of class III antiarrhythmic drug therapy. *Am J Cardiol* **72**(6):44B-49B.
- Roden DM, Thompson KA, Hoffman BF and Woosley RL (1986) Clinical features and basic mechanisms of quinidine-induced arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* **8**(1 Suppl A):73A-78A.
- Roden DM and Viswanathan PC (2005) Genetics of acquired long QT syndrome. *J Clin Invest* **115**(8):2025-2032.
- Salata JJ, Jurkiewicz NK, Wallace AA, Stupienski RF, 3rd, Guinasso PJ, Jr. and Lynch JJ, Jr. (1995) Cardiac electrophysiological actions of the histamine H1-receptor antagonists astemizole and terfenadine compared with chlorpheniramine and pyrilamine. *Circ Res* **76**(1):110-119.

- Sanchez-Chapula JA, Ferrer T, Navarro-Polanco RA and Sanguinetti MC (2003) Voltage-dependent profile of human ether-a-go-go-related gene channel block is influenced by a single residue in the S6 transmembrane domain. *Mol Pharmacol* **63**(5):1051-1058.
- Sanguinetti MC, Chen J, Fernandez D, Kamiya K, Mitcheson J and Sanchez-Chapula JA (2005) Physicochemical basis for binding and voltage-dependent block of hERG channels by structurally diverse drugs. *Novartis Found Symp* **266**:159-166; discussion 166-170.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL and Keating MT (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* **384**(6604):80-83.
- Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME and Keating MT (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I<sub>Kr</sub> potassium channel. *Cell* **81**(2):299-307.
- Sanguinetti MC and Tristani-Firouzi M (2006) hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* **440**(7083):463-469.
- Sanguinetti MC and Xu QP (1999) Mutations of the S4-S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **514** ( Pt 3):667-675.
- Schoonmaker FW, Osteen RT and Greenfield JC, Jr. (1966) Thioridazine (mellaril)-induced ventricular tachycardia controlled with an artificial pacemaker. *Ann Intern Med* **65**(5):1076-1078.
- Schott JJ, Charpentier F, Peltier S, Foley P, Drouin E, Bouhour JB, Donnelly P, Vergnaud G, Bachner L, Moisan JP, le Marec H. and pascal O.. (1995) Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am J Hum Genet* **57**(5):1114-1122.
- Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y, Rubie C, Hordt M, Towbin JA, Borggrefe M, Assmann G, Qu X, Somberg JC, Breithardt G, Oberti C and Funke H (1997) KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet* **17**(3):267-268.
- Schwoerer AP, Blutner C, Brandt S, Binder S, Siebrands CC, Ehmke H and Friederich P (2007) Molecular interaction of droperidol with human ether-a-go-go-related gene channels: prolongation of action potential

- duration without inducing early afterdepolarization. *Anesthesiology* **106**(5):967-976.
- Scuderi PE (2003) Droperidol: many questions, few answers. *Anesthesiology* **98**(2):289-290.
- Silverman WR, Tang CY, Mock AF, Huh KB and Papazian DM (2000) Mg(2+) modulates voltage-dependent activation in ether-a-go-go potassium channels by binding between transmembrane segments S2 and S3. *J Gen Physiol* **116**(5):663-678.
- Smith PL, Baukrowitz T and Yellen G (1996) The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* **379**(6568):833-836.
- Smith PL and Yellen G (2002) Fast and slow voltage sensor movements in HERG potassium channels. *J Gen Physiol* **119**(3):275-293.
- Spector PS, Curran ME, Keating MT and Sanguinetti MC (1996) Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ Res* **78**(3):499-503.
- Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC and Keating MT (1997) Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress I<sub>Ks</sub> function. *Nat Genet* **17**(3):338-340.
- Solth Anna (2005) Die Effekte langwirksamer Amidlokalanästhetika auf repolarisierende Kaliumkanäle des menschlichen Herzens. *Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg*
- Suessbrich H, Schonherr R, Heinemann SH, Attali B, Lang F and Busch AE (1997) The inhibitory effect of the antipsychotic drug haloperidol on HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol* **120**(5):968-974.
- Suessbrich H, Waldegger S, Lang F and Busch AE (1996) Blockade of HERG channels expressed in *Xenopus* oocytes by the histamine receptor antagonists terfenadine and astemizole. *FEBS Lett* **385**(1-2):77-80.
- Taglialatela M, Castaldo P, Pannaccione A, Giorgio G and Annunziato L (1998) Human ether-a-gogo related gene (HERG) K<sup>+</sup> channels as

- pharmacological targets: present and future implications. *Biochem Pharmacol* **55**(11):1741-1746.
- Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Valenzuela C and Delpon E (2004) Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 62(1):9-33.
- Tie Hii Hui (2002) Cellular mechanisms of QT prolongation and proarrhythmia induced by non-Antiarrhythmic Drugs. *Thesid submittet for the degree of Doctor of Medicine University of New South Wales*
- Tisdale JE, Rasty S, Padhi ID, Sharma ND, Rosman H. (2001) The effect of intravenous haloperidol on QT interval dispersion in critically ill patients: comparison with QT interval prolongation for assessment of risk of Torsades de Pointes. *J Clin Pharmacol.* **41**(12):1310-8.
- Tristani-Firouzi M, Chen J and Sanguinetti MC (2002a) Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* **277**(21):18994-19000.
- Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A, Bendahhou S, Kwiecinski H, Fidzianska A, Plaster N, Fu YH, Ptacek LJ and Tawil R (2002b) Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin Invest* **110**(3):381-388.
- Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B and Robertson GA (1995) HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* **269**(5220):92-95.
- Tseng GN and Guy HR (2005) Structure-function studies of the outer mouth and voltage sensor domain of hERG. *Novartis Found Symp* **266**:19-35; discussion 35-45.
- Tsujimae K, Suzuki S, Yamada M and Kurachi Y (2004) Comparison of kinetic properties of quinidine and dofetilide block of HERG channels. *Eur J Pharmacol* **493**(1-3):29-40.
- Turgeon J, Daleau P, Bennett PB, Wiggins SS, Selby L and Roden DM (1994) Block of I<sub>Ks</sub>, the slow component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current, by the diuretic agent indapamide in guinea pig myocytes. *Circ Res* **75**(5):879-886.

- Walker BD, Singleton CB, Bursill JA, Wyse KR, Valenzuela SM, Qiu MR, Breit SN and Campbell TJ, (1999) Inhibition of the human ether-a-go-go-related gene (HERG) potassium channel by cisapride: affinity for open and inactivated states. *Br J Pharmacol* **128**(2):444-450
- Wang J, Myers CD and Robertson GA (2000) Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol* **115**(6):749-758.
- Wang L, Wible BA, Wan X and Ficker E (2007) Cardiac glycosides as novel inhibitors of human ether-a-go-go-related gene channel trafficking. *J Pharmacol Exp Ther* **320**(2):525-534.
- Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD and Keating MT (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* **12**(1):17-23.
- Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA and Keating MT (1995) SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* **80**(5):805-811.
- Wang S, Morales MJ, Liu S, Strauss HC and Rasmusson RL (1997) Modulation of HERG affinity for E-4031 by [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> and C-type inactivation. *FEBS Lett* **417**(1):43-47.
- Warmke JW and Ganetzky B (1994) A family of potassium channel genes related to eag in Drosophila and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(8):3438-3442.
- Weerapura M, Hebert TE and Nattel S (2002) Dofetilide block involves interactions with open and inactivated states of HERG channels. *Pflugers Arch* **443**(4):520-531.
- White PF, Song D, Abrao J, Klein KW and Navarette B (2005) Effect of low-dose droperidol on the QT interval during and after general anesthesia: a placebo-controlled study. *Anesthesiology* **102**(6):1101-1105.
- Wilt JL, Minnema AM, Johnson RF, Rosenblum AM. (1993) Torsade de pointes associated with the use of intravenous haloperidol. *Ann Intern Med.* **119**(5):391-4

- Witchel HJ, Dempsey CE, Sessions RB, Perry M, Milnes JT, Hancox JC and Mitcheson JS (2004) The low-potency, voltage-dependent HERG blocker propafenone--molecular determinants and drug trapping. *Mol Pharmacol* **66**(5):1201-1212.
- Witchel HJ and Hancox JC (2000) Familial and acquired long qt syndrome and the cardiac rapid delayed rectifier potassium current. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27**(10):753-766.
- Woosley RL, Chen Y, Freiman JP and Gillis RA (1993) Mechanism of the cardiotoxic actions of terfenadine. *JAMA* **269**(12):1532-1536.
- Wysowski DK and Bacsanyi J (1996) Cisapride and fatal arrhythmia. *N Engl J Med* **335**(4):290-291.
- Yang BF, Xu DH, Xu CQ, Li Z, Du ZM, Wang HZ and Dong DL (2004) Inactivation gating determines drug potency: a common mechanism for drug blockade of HERG channels. *Acta Pharmacol Sin* **25**(5):554-560.
- Yang T and Roden DM (1996) Extracellular potassium modulation of drug block of IKr. Implications for torsade de pointes and reverse use-dependence. *Circulation* **93**(3):407-411.
- Yao JA, Du X, Lu D, Baker RL, Daharsh E and Atterson P (2005) Estimation of potency of hERG channel blockers: Imoact of voltage protokol and temperature. *J Pharmacol Toxicol Methods* **52**(1):146-153.
- Yap YG and Camm AJ (1999a) Arrhythmogenic mechanisms of non-sedating antihistamines. *Clin Exp Allergy* **29 Suppl 3**:174-181.
- Yap YG and Camm AJ (1999b) The current cardiac safety situation with antihistamines. *Clin Exp Allergy* **29 Suppl 1**:15-24.
- Yap YG and Camm AJ (2002) Potential cardiac toxicity of H1-antihistamines. *Clin Allergy Immunol* **17**:389-419.
- Yeh JZ, Armstrong CM. (1978) Immobilisation of gating charge by a substance that simulates inactivation. *Nature*. **273**(5661):387-9.
- Yellen G (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* **419**(6902):35-42.
- Yong S, Tian X and Wang Q (2003) LQT4 gene: the "missing" ankyrin. *Mol Interv* **3**(3):131-136.

- Young JB, Vandermolen LA and Pratt CM (1986) Torsade de pointes: an unusual manifestation of chloral hydrate poisoning. *Am Heart J* **112**(1):181-184.
- Zagotta WN, Hoshi T, Dittman J and Aldrich RW (1994) Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway. *J Gen Physiol* **103**(2):279-319.
- Zeltser D, Justo D, Halkin A, Prokhorov V, Heller K and Viskin S (2003) Torsade de Pointes due to noncardiac drugs: most patients have easily identifiable risk factors. *Medicine (Baltimore)* **82**(4):282-90
- Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC and January CT (1999) Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ Res* **84**(9):989-998.
- Zhou Z, Gong Q, Ye B, Fan Z, Makielski JC, Robertson GA and January CT (1998) Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *Biophys J* **74**(1):230-241.
- Zhu XR, Wulf A, Schwarz M, Isbrandt D and Pongs O (1999) Characterization of human Kv<sub>4.2</sub> mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K<sup>+</sup> current. *Receptors Channels* **6**(5):387-400.
- Zou A, Curran ME, Keating MT and Sanguinetti MC (1997) Single HERG delayed rectifier K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* **272**(3 Pt 2):H1309-1314.

**Bücher:**

- Hille Bertil, *Ion Channels of Excitable Membranes*, University of Washington, 3. Auflage. (2001)
- Forth H, Rummel *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, München. (2001)
- Mutchler E., Geisslinger G., Kroemer H.K. und Schäfer-Korting M. *Arzneimittelwirkungen; Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Stuttgart, 8. Auflage (2001)
- Novartis Foundation Symposium 266  
*The hERG Cardiac Potassium Channel: structure, function and long QT syndrome*, Chichester. (2005)

**Andere Quellen:**

„Metalle in Membranen“ - Seminarvortrag im Rahmen des Anorganisch-Chemischen-Fortgeschrittenen Praktikum für SS 2007, Johannes Troendlin und L.H. Gade, Anorganisch-Chemische Institut der Universität Heidelberg

<http://www.arizona.com>

<http://www.medizin.unikoeln.de/humangenetik>

## 5.5 Lebenslauf

Daniela Stork-Riedler

Heiligenstädterstrasse 78/18

Geburtstag,-ort: 10.Juni 1975, Tuzla, Bosnien und Herzegowina

Familienstand: verheiratet

Kinder: einen Sohn

### Schul Ausbildung:

1990 – 1992 Realgymnasium „Mesa Selimovic“ und Musikgymnasium  
in Tuzla , Bosnien und Herzegowina

1992 -1994 Realgymnasium „Gornji Grad“ Zagreb, Kroatien

Mai 1994 Matura am Realgymnasium „Gornji Grad“ Zagreb,  
Kroatien

### Hochschulbildung:

1995 – 1996 Vorstudiumslehrgang für ausländische Studenten an der  
Universität Wien

1996 – 2003 Studium der Pharmazie an der Universität Wien mit den  
Schwerpunkten Pharmazeutische Chemie und  
Pharmazeutische Technologie

Ab November 2004 Doktoratstudium am Institut für Pharmakologie und  
Toxikologie der Universität Wien bei Univ. Prof. Steffen  
Hering

Seit September 2008 Apothekerausbildung in der Anstaltsapotheke des  
Wilhelminenspitals der Stadt Wien

**5.6 Publikation**

Stork D, Timin EN, Berjukow S, Huber C, Hohaus A, Auer M and Hering S  
(2007) State dependent dissociation of HERG channel inhibitors. Br J  
Pharmacol 151(8):1368-1376.

### **5.7 Danksagung**

Diese Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt

Meiner Familie und meinen Eltern, ohne deren Unterstützung und Verständnis diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

Herrn Univ. Prof. Dr Steffen Hering, für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie durchführen zu können sowie für die wertvollen Kommentare zum Manuskript dieser Arbeit.

Herrn Prof. Eugen Timin sowie Herrn Univ. Prof. Dr Steffen Hering für die intensive wissenschaftliche Betreuung und Hilfestellung während meiner gesamten Arbeit und dafür, dass sie mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herrn Dr. Stanislav Berjukow für die stets erbrachte Hilfe bei der Erlernung der Messmethoden sowie für die intensive wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Dr. Stanislav Beyl für die wertvollen Tipps und Hilfestellungen beim Erlernen der Computerprogramme.

Frau Dr. Sophia Khom und Herrn Dr. Igor Baburin für die Hilfe bei der Oocytenpreparation und zusätzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Igor Baburin für die stets erbrachte Hilfe beim Lösen zahlreicher technischer Probleme beim set-up bedanken.

Frau Dr. Annette Hohaus für die RNA Transkription und für die wunderbare Freundschaft.

Frau Mag. Michaela Kudrnac für die netten und lustigen Gespräche.

Außerdem möchte ich beiden sowie Frau Doris Stenitzer und meinem lieben Ehemann für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit danken.

Frau Doris Steniza für die stets erbrachte Hilfe beim administrativen Teil der Arbeit und für die Feste, die dank Ihr immer so feierlich waren.

Allen MitarbeiterInnen des Institutes für die kollegiale Zusammenarbeit und  
Hilfestellung während der Dissertation