

Struktur-Funktionsanalyse
von angeborenen und erworbenen
schweren ventrikulären Herzrhythmusstörungen
am Beispiel der humanen Kaliumkanäle
HERG und KCNQ1

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
im Departement Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Cornelia Siebrands

Hamburg 2006

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. O. PONGS
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. A. RODEWALD
Tag der Disputation: 04. August 2006

Hamburg, den 11. Juli 2006



A handwritten signature in black ink, appearing to read "R. Lieberei".

Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Aufbau von Kaliumkanälen	3
2.2	Das Herzaktionspotential	5
2.2.1	I_{Ks} : KCNQ1 und KCNE1.....	6
2.2.2	I_{Kr} : HERG	8
2.3	Das Long QT-Syndrom	10
2.3.1	Angeborenes LQT-Syndrom	10
2.3.2	Erworbenes LQT-Syndrom	11
2.4	Lokalanästhetika	13
2.4.1	Geschichte der Lokalanästhetika	13
2.4.2	Inhibition von Ionenkanälen durch Lokalanästhetika	15
2.5	Ziel der Arbeit	16
3	MATERIAL UND METHODEN	17
3.1	Molekularbiologische Methoden	17
3.1.1	Herstellung kompetenter Zellen	17
3.1.2	Transformation von Bakterien.....	17
3.1.3	Präparation von DNA aus Bakterienkulturen.....	18
3.1.4	DNA-Sequenzierung	18
3.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	19
3.1.6	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	19
3.1.7	Konzentrationsbestimmung von RNA durch Fluoreszenzmessungen	19
3.1.8	Modifikationen von DNA.....	19
3.1.9	In vitro Mutagenese	21
3.1.10	cRNA-Synthese	22
3.2	Zellkultur	22
3.2.1	Routinehaltung der Zellen	22

3.2.2	Transfektion.....	23
3.2.3	Präparation und Injektion von <i>Xenopus laevis</i> Oocyten	23
3.3	Elektrophysiologische Methoden	23
3.3.1	Ganz-Zell-Patch-Clamp-Technik	23
3.3.2	Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	27
3.3.3	Verwendete Stimulationsprotokolle und Datenauswertung	28
3.4	Computergestützte Sekundäranalysen.....	35
3.4.1	Simulation kardialer Aktionspotentiale	35
3.4.2	Modellierung der Kristallstruktur	35
3.5	Lösungen	36
3.5.1	Lösungen für molekularbiologische Methoden.....	36
3.5.2	Nährmedien	37
3.5.3	Lösungen für elektrophysiologische Arbeiten.....	37
4	ERGEBNISSE.....	40
4.1	HERG	40
4.1.1	Charakterisierung der Mutanten HERG _{Y652A} und HERG _{F656A} in CHO-Zellen	40
4.1.2	Lokalanästhetika-Empfindlichkeit von HERG _{wt} , HERG _{Y652A} und HERG _{F656A} in CHO-Zellen	45
4.1.3	Charakterisierung weiterer Mutanten in der S6-Region in <i>Xenopus laevis</i> Oocyten	52
4.1.4	Untersuchung der Bupivacain-Empfindlichkeit von weiteren HERG-Mutanten in <i>Xenopus laevis</i> Oocyten	57
4.1.5	Untersuchung der Bupivacain-Empfindlichkeit von EAG-Kanälen	62
4.2	Untersuchung der LQT1-Mutation KCNQ1_{A344V}	65
4.2.1	Elektrophysiologische Charakterisierung der LQT1 Mutante KCNQ1 _{A344V} ...	65
4.2.2	Lokalanästhetika-Empfindlichkeit von KCNQ1 _{wt} und KCNQ1 _{A344V}	71
4.2.3	Simulation der Ergebnisse in einem Modell für kardiale Aktionspotentiale....	77
4.3	KCNQ1 Alanin-Scan.....	79
4.3.1	Mutanten ohne funktionelle Expression.....	80
4.3.2	Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung	81

4.3.3	Mutationen mit spannungsabhängiger Inaktivierung	86
4.3.4	Untersuchung der relativen Rb ⁺ /K ⁺ -Leitfähigkeit	88
5	DISKUSSION.....	92
5.1	HERG	92
5.2	Untersuchung der LQT1-Mutation KCNQ1_{A344V}	99
5.3	KCNQ1 Alanin-Scan.....	107
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	111
7	ANHANG.....	129
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	129
7.2	Wissenschaftlicher Werdegang	132
7.3	Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	132
7.4	Danksagung.....	135

1 Zusammenfassung

Das long QT-Syndrom (LQTS) ist eine häufige Herzrhythmusstörung. Symptome sind Synkopen (kurzdauernde Bewusstlosigkeiten), ventrikuläre Tachykardien vom Torsades de Pointes-Typ und plötzlicher Herztod. Man unterscheidet zwischen angeborenem LQTS, das zumeist durch Mutationen in verschiedenen kardialen Ionenkanälen, die für die Repolarisation des Aktionspotentials verantwortlich sind (z.B. KCNQ1 und HERG), oder akzessorischen Untereinheiten verursacht wird, und dem erworbenen LQTS, bei dem eine pharmakologische Blockierung der repolarisierenden Kaliumkanäle zu einer verlangsamten Repolarisation und damit zu Arrhythmien führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum einen untersucht, wie Lokalanästhetika vom Bupivacain-Typ mit kardialen Kaliumkanälen interagieren können, und des Weiteren versucht, mit Hilfe eines Alanin-Scans Aussagen über die Struktur des KCNQ1-Kanals zu treffen. Dazu wurden Patch-Clamp- und Two-Electrode-Voltage-Clamp-Experimente in CHO-Zellen bzw. *Xenopus laevis* Oocyten durchgeführt.

Die Ergebnisse des Alanin-Scans deuten darauf hin, dass sich das Schaltverhalten von KCNQ1-Kanälen grundsätzlich von dem des *Shaker*-Kanals unterscheidet. Es konnten Regionen identifiziert werden, die das Öffnungsverhalten von KCNQ1-Kanälen stark beeinflussen. Diese finden sich besonders am cytoplasmatischen Ende der S5- und S6-Helix. Dabei war eine Verschiebung der Aktivierung zu positiveren Potentialen häufiger festzustellen als eine Verschiebung zu negativeren Potentialen.

Es konnte gezeigt werden, dass die aromatischen Aminosäuren F656 und Y652 im unteren Bereich der S6-Helix sowie T623, S624 und V625 in der Nähe der Pore für die Interaktion von HERG-Kanälen mit Lokalanästhetika wichtig sind. Durch Mutation dieser Reste zu Alanin wurde die Sensitivität für Bupivacain drastisch reduziert. Obwohl Lokalanästhetika HERG-Kanäle mit relativ niedriger Potenz blockieren, wird die Interaktion durch die gleichen Aminosäurereste vermittelt wie die Blockade durch hochaffine Inhibitoren.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die LQTS-Mutation A344V in KCNQ1 die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften des KCNQ1-Kanals verändert. Die Position A344 in KCNQ1 entspricht F656 in HERG, der wichtigsten Interaktionsstelle für Lokalanästhetika. Die Mutation KCNQ1_{A344V} führt zu einer spannungsabhängigen Inaktivierung und bei Co-Expression mit KCNE1 zu einer

Verschiebung des Aktivierungsmittelpunktes um 30 mV zu positiveren Potentialen. Außerdem wird die Empfindlichkeit für Bupivacain etwa 20-fach erhöht. Eine Computersimulation eines kardialen Aktionspotentials deutet darauf hin, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten schwerer Herzrhythmusstörungen durch diese Mutation erhöht wird und dass die betroffenen Patienten besonders anfällig für Arrhythmien bei einer Lokalanästhetika-Intoxikation sind. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass das long QT-Syndrom nicht nur einen allgemeinen, sondern auch einen spezifischen pharmakogenetischen Risikofaktor für perioperative ventrikuläre Arrhythmien darstellen kann.

2 Einleitung

Ionenkanäle sind in der Zellmembran aller Zellen vorhanden, um den Austausch von Ionen zwischen den intrazellulären und extrazellulären Kompartimenten zu regulieren. Die meisten Ionenkanäle sind selektiv für eine bestimmte Sorte Ionen, wie beispielsweise Kalium, Natrium, Calcium oder Chlorid, durchlässig. Weiterhin wird zwischen spannungsabhängigen und ligandengesteuerten Kanälen unterschieden (Hille 2001). Kaliumkanäle sind für das Ruhemembranpotential der Zelle verantwortlich sowie für die Ausschüttung von Transmittern und Hormonen.

2.1 Aufbau von Kaliumkanälen

Alle Kaliumkanäle sind aus mehreren α -Untereinheiten mit membrandurchspannenden Helices aufgebaut. Man unterscheidet dabei vier große Strukturklassen nach ihrer Membrantopologie (Abbildung 2.1). Grundsätzlich werden Untereinheiten mit einer und mit zwei porenbildenden Strukturen unterschieden.

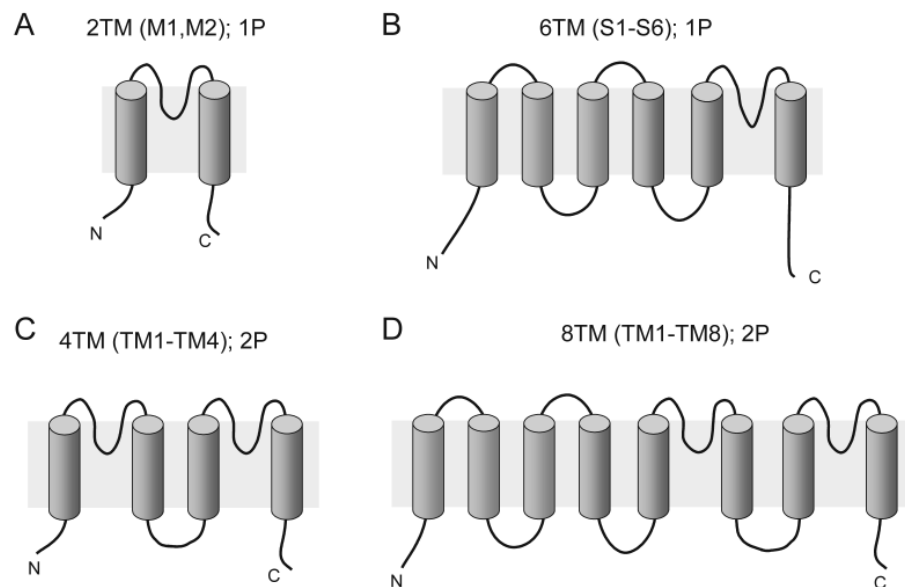


Abbildung 2.1: Einteilung der verschiedenen Kaliumkanalfamilien nach ihrer Membrantopologie.

(A) K_{ir} -Kanäle oder prokaryotische Kaliumkanäle besitzen nur zwei Transmembransegmente (TM) und eine Pore. (B) Alle spannungsgesteuerten Kaliumkanäle, wie HERG, KCNQ und Kv-Kanäle bestehen aus sechs TM mit einer Pore. Kaliumkanäle mit zwei Poren (C und D) können vier (z.B. TWIK, TREK) oder acht (z.B. TOK) TM besitzen.

Die einfachsten Kaliumkanaluntereinheiten bestehen nur aus zwei Transmembransegmenten und einer Porenschleife; sie finden sich beispielsweise bei K_{ir} -Kanälen (Nichols & Lopatin 1997) oder den prokaryotischen Kaliumkanälen KcsA (Doyle *et al.*, 1998) und MthK (Jiang *et al.*, 2002). Wie die meisten Kaliumkanäle

besitzen die spannungsgesteuerten eine Pore und sechs Transmembransegmente (Pongs 1999). Außerdem gibt es Kaliumkanäle mit zwei porenbildenden Segmenten und vier bzw. acht Transmembransegmenten. Zu diesen gehören die sog. Leckkanäle, wie z.B. TWIK und TREK (Lesage & Lazdunski 2000). Allen Kaliumkanälen gemein ist eine Signatursequenz in der Porenschleife, welche die Selektivität für Kaliumionen bestimmt (z.B. TXGYGD).

Alle spannungsabhängigen Ionenkanäle haben einen ähnlichen Aufbau. Sie bestehen aus vier Homo- oder Heterotetrameren (bei Kaliumkanälen) bzw. vier Subdomänen (bei Natrium- und Calciumkanälen). Diese α -Untereinheiten oder Subdomänen werden aus sechs Transmembranhelices gebildet (Abbildung 2.2). Dabei bilden die Helices S5 und S6 die Kanalpore. Zwischen S5 und S6 befinden sich die Porenhelix und der Selektivitätsfilter. Das Segment S4 enthält zahlreiche geladene Aminosäurereste und bildet den Spannungssensor. An vielen Kanalkomplexen sind zusätzlich zu diesen α -Untereinheiten noch akzessorische β -Untereinheiten beteiligt. Diese β -Untereinheiten können entweder membranständig oder im Cytoplasma lokalisiert sein.

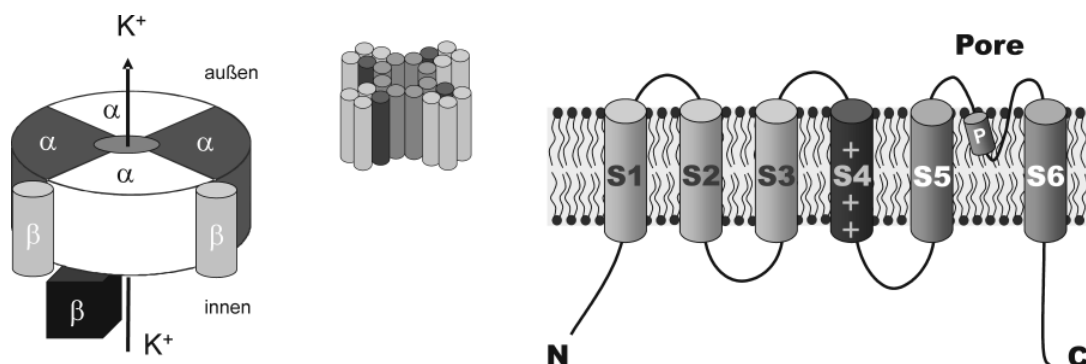


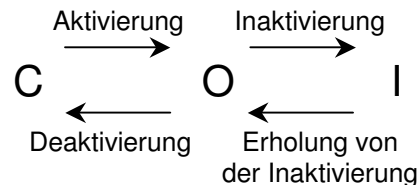
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung zum Aufbau eines Ionenkanals.

Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle bestehen aus vier homologen oder heterologen α -Untereinheiten und eventuell akzessorischen β -Untereinheiten. Jede dieser α -Untereinheiten besteht aus sechs Transmembranhelices und enthält einen Spannungssensor in S4 und eine Porenschleife zwischen S5 und S6.

Einige Kaliumkanäle konnten bereits kristallisiert werden, so dass eine gute Vorstellung über die dreidimensionale Struktur vorhanden ist. Der erste Kaliumkanal, der kristallisiert wurde, war der bakterielle Kanal KcsA aus *Streptomyces lividans* (Doyle *et al.*, 1998). Dieser Kanal besteht aus vier Untereinheiten mit jeweils nur zwei Transmembranhelices, einer inneren und einer äußeren, die der S5- und S6-Helix entsprechen. Die Struktur eines ligandengesteuerten Kaliumkanals mit sechs TM wurde

erstmalig 2003 bestimmt (Jiang *et al.*, 2003) und 2005 die des eukaryotischen spannungsabhängigen Kanals Kv1.2 (Long *et al.*, 2005a).

Ionenkanäle können grundsätzlich in drei unterschiedlichen Konformationen vorliegen, die sich vereinfacht in dem folgenden Schema darstellen lassen:



Im geschlossenen Zustand (C, closed) fließen keine Ionen durch den Kanal, durch Änderung des Membranpotentials oder Bindung eines Liganden können die Kanäle aber aktiviert werden und in einen geöffneten Zustand (O) übergehen. Aus diesem ist ein Übergang in einen inaktivierten Zustand (I) möglich, in dem wiederum keine Ionen fließen können, der sich aber in seiner Konformation vom geschlossenen Zustand unterscheidet (Hille 2001). Dieses Schaltschema kann durch eine unterschiedliche Anzahl an geschlossenen und offenen Zuständen und verschiedene Übergangsmöglichkeiten zwischen den Zuständen variiert werden.

2.2 Das Herzaktionspotential

Das Herz kontrahiert sich rhythmisch, um den Körper mit Blut zu versorgen. Damit die Kontraktion konzertiert im gesamten Herzmuskel stattfindet, wird ein elektrisches Signal generiert und über den gesamten Muskel weitergeleitet. In jeder Herzmuskelzelle führt dieses Signal über die elektromechanische Kopplung zur Kontraktion der Myofilamente. Das elektrische Signal wird durch verschiedene Ionenflüsse durch die Zellmembran generiert und als Herzaktionspotential bezeichnet (Antoni 2000).

Das Aktionspotential des Herzens wird durch verschiedene Ionenströme verursacht (Abbildung 2.3). Die schnelle Depolarisation zu Beginn des Aktionspotentials wird durch einen Einwärtsstrom von Na^+ -Ionen vermittelt (Phase 0). Die Repolarisation während Phase 1 ist auf transiente K^+ -Auswärtsströme (I_{to}) zurückzuführen. Die lange Plateau-Phase (2) wird durch einen Ca^{2+} -Einwärtsstrom durch L-Typ-Calcium-Kanäle verursacht. An der Repolarisation während der Phasen 2 und 3 sind mehrere K^+ -

Auswärtsströme beteiligt, die als „delayed rectifier“ K^+ current“ (I_K) (verzögerter Gleichrichter-Strom) bezeichnet werden.

Zur Zeit werden beim humanen Aktionspotential drei verschiedene Komponenten von I_K anhand von pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften unterscheiden: I_{Kur} , I_{Kr} und I_{Ks} (ultrapid, rapid und slow).

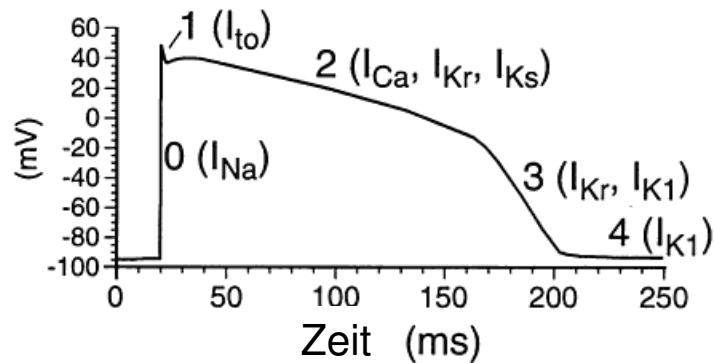


Abbildung 2.3: Aktionspotential des Herzens (nach Keating & Sanguinetti, 2001).

Die Gene, die für die entsprechenden Kanäle kodieren, konnten in den vergangenen Jahren identifiziert werden. I_{Kur} , der sehr schnell aktiviert, wird in den meisten Spezies durch *Kv1.5* kodiert, I_{Kr} durch *HERG*, I_{Ks} durch *KCNQ1* und *KCNE1*.

2.2.1 I_{Ks} : *KCNQ1* und *KCNE1*

Die molekulare Grundlage von I_{Ks} war lange Zeit unklar. Die erste Untereinheit wurde Ende der 1980er entdeckt. Die Expression von mRNA aus dem Uterus und der Niere der Ratte in *Xenopus laevis* Oocyten induziert einen langsam aktivierenden spannungsabhängigen K^+ -Strom, der Ähnlichkeit mit I_{Ks} hat (Boyle *et al.*, 1987; Takumi *et al.*, 1988). Das Gen wurde als *IsK* oder *minK* (*minimal K⁺-channel*) bezeichnet (nach neuer Nomenklatur *KCNE1*). Es kodiert ein kleines Protein (129 AS) mit nur einer membrandurchspannenden Domäne, so dass unklar war, wie diese Monomere einen funktionellen Kanal bilden könnten. Daher wurde angenommen, dass *KCNE1* nur eine Untereinheit eines Kalium-Kanals darstellt. Ein weiterer Grund für diese Annahme war die Tatsache, dass mit relativ wenig RNA bereits ein maximaler Strom in *Xenopus* Oocyten induziert wurde (Cui *et al.*, 1994). Außerdem konnte bei Transfektion von Säugtierzellen mit *KCNE1*-DNA kein Strom gemessen werden.

Schließlich wurde 1996 durch *positional cloning* ein neuer Kalium-Kanal gefunden, der als *KvLQT1* bezeichnet wurde, da Mutationen in diesem Gen zum long QT Syndrom (siehe Abschnitt 2.3) führen (Wang *et al.*, 1996a). Bei heterologer Expression zeigte der

induzierte Strom keinerlei Ähnlichkeit mit bekannten physiologischen Strömen. Daher nahm man an, dass KvLQT1 oder KCNQ1 – nach der aktuellen Nomenklatur Kv7.1 – zusammen mit einer Untereinheit exprimiert wird. Die Co-Expression mit KCNE1 führt zu sehr langsam aktivierenden, nicht inaktivierenden Strömen, die große Ähnlichkeit mit I_{Ks} haben, so dass man heute davon ausgeht, dass der *slow delayed rectifier current* I_{Ks} durch KCNQ1 und KCNE1 vermittelt wird (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996). Ein Beweis dafür wurde auch durch Li *et al.* erbracht (2001). Die Autoren konnten zeigen, dass die Expression einer dominant negativen Mutation von KCNQ1 in Kardiomyocyten von Mäusen und Meerschweinchen zu einer deutlichen Reduktion von I_{Ks} führt (Li *et al.*, 2001). KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexe werden auf vielfältige Weise reguliert und moduliert. So wird der Komplex durch cAMP-abhängige Phosphorylierungen im N-Terminus aktiviert (Kurokawa *et al.*, 2003). Dazu ist ein weiteres Protein, Yotiao, notwendig, welches die Proteinkinase A und Proteinphosphatasen an den Kanalkomplex koppelt (Kurokawa *et al.*, 2003; Kurokawa *et al.*, 2004). Außerdem wird der Kanal durch PIP2 modifiziert (Loussouarn *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005). Des Weiteren ist die Aktivierung von KCNQ1/KCNE1-Kanälen von der Temperatur und der intrazellulären Calciumkonzentration abhängig (Busch & Lang 1993; Seebom *et al.*, 2001a; Shamgar *et al.*, 2006).

Außer im Herzen werden KCNQ1 und KCNE1 vor allem im Innenohr exprimiert. Dort ist dieser Kanalkomplex für die Kalium-Konzentration der Endolymphe verantwortlich (Nicolas *et al.*, 2001). Ein kompletter Verlust dieser Kanäle führt zu Taubheit wie beim Jervell-Lange-Nielson-Syndrom.

KCNQ1-Kanäle zeichnen sich durch einen schnell aktivierenden Strom aus; die Aktivierung wird durch Co-Expression mit KCNE1 stark verlangsamt. Eine Besonderheit von KCNQ1-Kanälen ist die verzögerte Inaktivierung, die nur wenig spannungsabhängig ist und unabhängig von der extrazellulären Kaliumkonzentration erfolgt. Diese Inaktivierung unterscheidet sich dadurch von der N- oder C-Typ-Inaktivierung und ist in elektrophysiologischen Untersuchungen am sog. „hook“ während der deaktivierenden Tail-Ströme zu erkennen. Sie wird durch Co-Expression mit KCNE1 unterdrückt (Pusch *et al.*, 1998; Tristani-Firouzi & Sanguinetti 1998). Es wird vermutet, dass die Inaktivierung von KCNQ1-Kanälen auf einen „Flicker“-Zustand des offenen Kanals, der sehr schnell zwischen einem leitenden und einem nicht leitenden Zustand wechselt, zurückzuführen ist (Pusch *et al.*, 2000; Seebom *et al.*, 2003b).

2.2.2 I_{Kr} : HERG

HERG-Kanäle (*human ether-à-gogo-related gene*) gehören zur Superfamilie der EAG-Kanäle (*ether-à-go-go*). Diese Kanäle wurden zuerst bei *Drosophila melanogaster*-Mutanten entdeckt, die unter Ethernarkose ein Schütteln der Beine zeigten (Warmke *et al.*, 1991). 1994 wurde durch Homologie-Untersuchungen ein verwandtes Gen (*human ether-à-gogo-related gene*) im menschlichen Genom entdeckt (Warmke & Ganetzky 1994). Es zeigte sich, dass Mutationen in diesem Gen auch dem angeborenen Long QT-Syndrom zugrunde liegen (Curran *et al.*, 1995; Sanguinetti *et al.*, 1995) und dass HERG-Kanäle die molekulare Entsprechung von I_{Kr} bilden (Trudeau *et al.*, 1995). HERG-Kanäle können mit der akzessorischen Untereinheit MiRP1 (*minK related peptide*) bzw. KCNE2 interagieren (Abbott *et al.*, 1999), die auch die pharmakologische Sensitivität beeinflussen soll (Sesti *et al.*, 2000). Es herrscht jedoch Unklarheit darüber, welche physiologische Rolle diese Untereinheit spielt (Weerapura *et al.*, 2002; Friederich *et al.*, 2004).

In der Strom-Spannungs-Beziehung zeigen HERG-Kanäle das Verhalten eines einwärts gerichteten Stroms, d.h. Einwärtsströme werden viel besser geleitet als Auswärtsströme. Dieses lässt sich durch das besondere Inaktivierungsverhalten der HERG-Kanäle erklären. Bei positiven Membranpotentialen ist die Inaktivierung von HERG-Kanälen schneller als die Aktivierung, die Erholung von der Inaktivierung aber schneller als die Deaktivierung. Mit einem mehrstufigen Protokoll ist es jedoch möglich, die instantan offenen Kanäle und somit große Auswärtsströme zu messen (Smith *et al.*, 1996). Die Inaktivierung von HERG-Kanälen weist Ähnlichkeiten mit der klassischen C-Typ-Inaktivierung auf, wie eine Verlangsamung durch TEA, und kann durch Mutationen in der Porenschleife auf der extrazellulären Seite des Selektivitätsfilters vermindert werden (Smith *et al.*, 1996).

HERG-Kanäle wurden als molekulare Zielstruktur für die kardiotoxischen Nebenwirkungen von diversen pharmakologischen Substanzen identifiziert (Mitcheson *et al.*, 2000a). Dazu zählen neben Antiarrhythmika (Spector *et al.*, 1996; Mitcheson *et al.*, 2000a), Antihistaminika (Roy *et al.*, 1996; Suessbrich *et al.*, 1996), Psychopharmaka (Rampe *et al.*, 1997) und Gastroprokinetika (Mohammad *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1999) auch Lokalanästhetika (Lipka *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 2002a; Friederich *et al.*, 2004) und Kokain (Zhang *et al.*, 2001). Für die Interaktion dieser Substanzen mit HERG-Kanälen scheinen insbesondere zwei aromatische Seitenketten in der S6-Region verantwortlich zu sein: F656 und Y652 (Lees-Miller *et al.*, 2000;

Mitcheson *et al.*, 2000a; Kamiya *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2004). Wenn diese Aminosäurereste zu Alanin mutiert werden, wird die Sensitivität für MK-499 etwa um den Faktor 100 reduziert (Mitcheson *et al.*, 2000a). Als Ursache für die hohe Empfindlichkeit von HERG-Kanälen für diverse Substanzen wird angenommen, dass die innere Pore von HERG-Kanälen größer ist als bei anderen Kv-Kanälen, weil diesen das sog. PXP-Motiv in der S6-Helix fehlt (Abbildung 2.4).

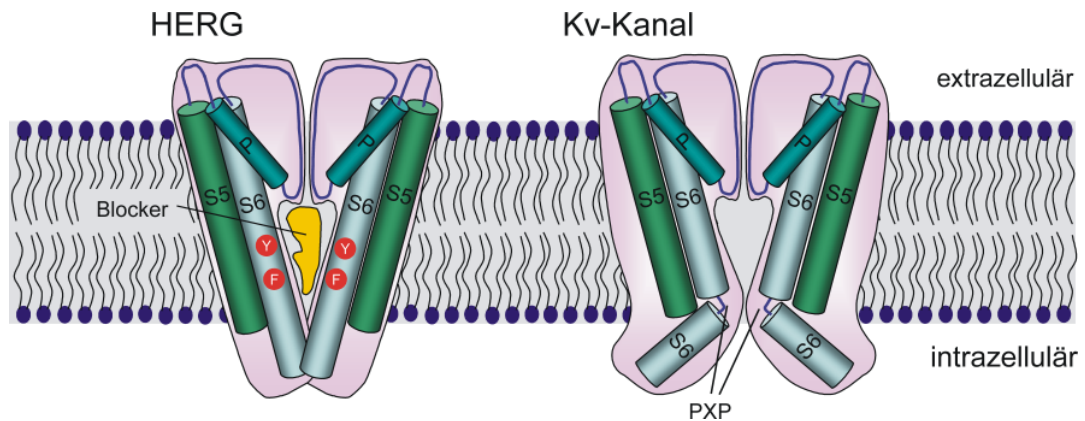


Abbildung 2.4: Vergleich der Struktur von HERG- und Kv-Kanälen.

HERG-Kanälen fehlt das PXP-Motiv in der S6-Helix, vom dem vermutet wird, dass es zu einem Knick in der S6-Helix führt. Daher besitzen HERG-Kanäle einen größeren Hohlraum unterhalb der Pore, in dem Substanzen gebunden werden können (nach Ion Channel Questionnaire Participants 2004).

Es wird vermutet, dass diese Aminosäure-Sequenz zu einem Knick in der S6-Helix führt (del Camino *et al.*, 2000), was einen kleineren Hohlraum unterhalb des Selektivitätsfilters zur Folge hat. Im Gegensatz dazu ermöglicht die größere Pore der HERG-Kanäle die Interaktion mit verschiedenen Substanzen. Nach dem Schließen des Kanals können gebundene Substanzen den Hohlraum nicht wieder verlassen (Mitcheson *et al.*, 2000b). Durch einen Alanin-Scan wurden zusätzlich zu den beiden aromatischen Aminosäuren Y652 und F656 weitere Aminosäurereste in der Nähe der Pore identifiziert, die an der Interaktion mit verschiedenen Substanzen beteiligt sind (Mitcheson *et al.*, 2000a; Kamiya *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2004).

2.3 Das Long QT-Syndrom

Das Long QT-Syndrom (LQTS) ist eine häufige Herzrhythmusstörung, die sich vor allem durch eine Verlängerung des QT-Intervalls im Elektrokardiogramm (EKG) auszeichnet (Keating & Sanguinetti 2001).

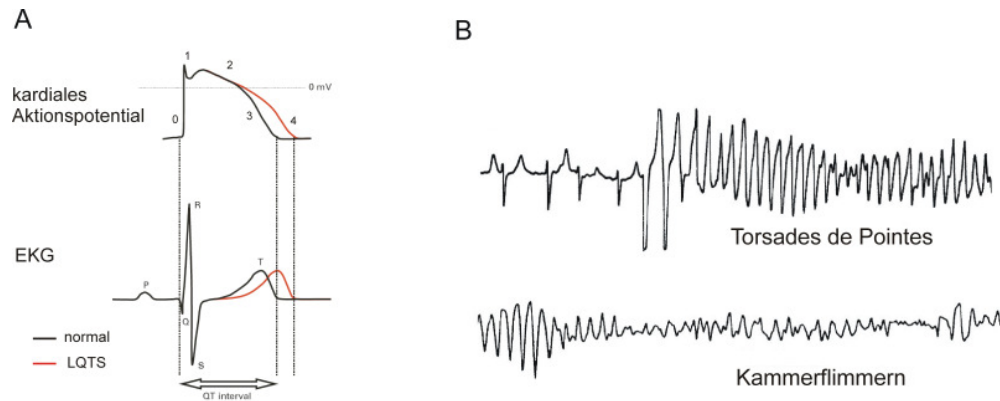


Abbildung 2.5: Arrhythmien.

(A) Eine verminderte der Repolarisation, z.B. durch angeborene oder pharmakologische Reduktion von I_{Kr} , führt zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer und ist im EKG als eine Verlängerung des QT-Intervalls zu erkennen. (B) Arrhythmien vom Torsades de Pointes-Typ können in ein Kammerflimmern degenerieren.

Außerdem treten häufig Arrhythmien wie *Torsades de Pointes* und Kammerflimmern auf, die zu Synkopen und plötzlichem Herztod führen können. Ursache für die Verlängerung der QT-Zeit ist eine Störung der Repolarisation des kardialen Aktionspotentials. Dadurch kann es zu sogenannten frühen Nachdepolarisationen („early afterdepolarisation“ EAD) kommen (Abbildung 2.5). Man unterscheidet zwischen dem angeborenen und dem erworbenen LQT-Syndrom.

2.3.1 Angeborenes LQT-Syndrom

Es gibt zwei Formen des familiären LQTS. Die autosomal rezessiv vererbte Form wird auch als Jervell und Lange-Nielson-Syndrom (JLNS) bezeichnet (Jervell & Lange-Nielsen 1957). Ihr Vorkommen in der Bevölkerung wird auf 1/250 000 geschätzt (Aerssens & Paulussen 2005). Neben den kardialen Symptomen leiden betroffene Patienten zusätzlich unter Taubheit, da die Produktion der Endolymphe im Innenohr gestört ist. Sowohl Mutationen in *KCNQ1* als auch in *KCNE1* können zum Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom führen (Tabelle 2.1).

LQTS	Genlocus	Gen	Protein	Ionenkanal	Anteil am LQTS	Referenz
Autosomal dominant (Romano-Ward)						
LQT1	11p15.5	KCNQ1	KCNQ1 (Kv7.1)	α -Untereinheit von I_{Ks}	50%	(Wang <i>et al.</i> , 1996a)
LQT2	7q35-36	KCNH2	HERG (Kv11.1)	α -Untereinheit von I_{Kr}	45%	(Curran <i>et al.</i> , 1995)
LQT3	3p21-24	SCN5A	Nav1.5	α -Untereinheit von I_{Na}	3-4%	(Wang <i>et al.</i> , 1995)
LQT4	4q25-27	ANK2	Ankyrin-B	—	<1%	(Mohler <i>et al.</i> , 2003)
LQT5	21q22	KCNE1	minK	β -Untereinheit von I_{Ks}	<1%	(Splawski <i>et al.</i> , 1997)
LQT6	21q22	KCNE2	MiRP1	β -Untereinheit von I_{Kr} (?)	<1%	(Abbott <i>et al.</i> , 1999)
LQT7	17q23	KCNJ2	Kir2.1	I_{K1}	<1%	(Tristani-Firouzi <i>et al.</i> , 2002b)
Autosomal rezessiv (Jervell und Lange-Nielsen)						
JLN1	11p15.5	KCNQ1	KCNQ1 (Kv7.1)	α -Untereinheit von I_{Ks}	<1%	(Neyroud <i>et al.</i> , 1997)
JLN2	21q22	KCNE1	minK	β -Untereinheit von I_{Ks}	<1%	(Schulze-Bahr <i>et al.</i> , 1997)

Tabelle 2.1: Übersicht über LQT-Syndrome und deren genetische Grundlagen.

Wesentlich häufiger (Inzidenz etwa 1/10 000 (Aerssens & Paulussen 2005)) ist die autosomal dominant vererbte Form des Long QT-Syndroms, die auch als Romano-Ward-Syndrom (RWS) bezeichnet wird und keine weiteren Symptome hat (Romano *et al.*, 1963; Ward 1964). Bislang wurden Mutationen in acht verschiedenen Genen gefunden, die zum LQT-Syndrom führen (Tabelle 2.1). Sie kodieren für kardiale Ionenkanäle oder akzessorische Untereinheiten. Dabei handelt es sich um Funktionsgewinn-Mutationen („gain of function“) bei SCN5A und um Funktionsverlust-Mutationen („loss of function“) bei Genen die für Kaliumkanäle oder deren Untereinheiten kodieren.

2.3.2 *Erworbenes LQT-Syndrom*

Im Gegensatz zum angeborenen LQT-Syndrom wird das erworbene LQT-Syndrom durch die pharmakologische Inhibition kardialer Ionenkanäle verursacht. Die Häufigkeit in der Gesamtbevölkerung ist schwer abzuschätzen, da die meisten Dokumentationen medikamenteninduzierter Arrhythmien aus Fallberichten oder klinischen Studien

stammen. Ursache ist in den meisten Fällen eine Inhibition von HERG-Kanälen durch diverse pharmakologische Substanzen (Mitcheson *et al.*, 2000a).

In den 1960er Jahren wurde über eine Serie von Patienten mit Synkopen und polymorpher ventrikulärer Tachykardie nach Einnahme von Chinidin berichtet (Selzer & Wray 1964). Die Bezeichnung „Torsades de Pointes“ (TdP) wurde 1966 erstmalig verwendet (Dessertenne 1966). Das Auftreten der Torsaden wurde jedoch erst Ende der 1970er Jahren auf das verlängerte QT-Intervall zurückgeführt (Jenzer & Hagemeyer 1976; Roden 2006). Später wurden Fälle von QT-Zeit-Verlängerung und Arrhythmien im Zusammenhang mit nicht-kardiologischen Medikamenten berichtet. Einige Medikamente wie Terfenadin wurden wegen dieser Vorfälle vom Markt genommen. Aufgrund der Tatsache, dass kardiotoxische Nebenwirkungen meist auf die Blockade von HERG-Kanälen zurückzuführen sind, müssen heute alle neuen Wirkstoffe auf ihre Fähigkeit zur Blockade von HERG und I_{Kr} *in vitro* getestet werden, bevor klinische Studien durchgeführt werden dürfen (Finlayson *et al.*, 2004).

Um das Auftreten des erworbenen LQTS zu erklären, wurde das Konzept der Repolarisationsreserve entwickelt (Roden 1998). Dabei wird davon ausgegangen, dass im gesunden Herzen verschiedene oftmals redundante Mechanismen zur Verfügung stehen, um eine normale Repolarisation zu gewährleisten. Eine kleine Störung in einem dieser Mechanismen, beispielweise durch eine Mutation in einem kardialen Ionenkanal, hat noch keinen Einfluss auf die Repolarisation und ist klinisch oft unauffällig. Erst wenn weitere Faktoren dazukommen, z.B. I_{Kr} -Block durch ein Medikament, führt dies zu einer massiven Verlängerung des Aktionspotentials. Diese Hypothese wird sowohl durch Simulationen von kardialen Aktionspotentialen als auch durch experimentelle Arbeiten an Kardiomyocyten unterstützt (Biliczki *et al.*, 2002; Jost *et al.*, 2005; Silva & Rudy 2005). Dabei stellt I_{Ks} offenbar eine wichtigere Repolarisationsreserve dar als I_{Kr} . Zu den Risikofaktoren für das Auftreten von erworbenem LQTS zählen unter anderem weibliches Geschlecht, Hypokaliämie, Bradykardie und das angeborene LQT-Syndrom (Roden 1998). Bei einer Screening-Untersuchung von Patienten mit erworbenem LQTS wurden bei 10% Mutationen in LQT-Genen gefunden (Yang *et al.*, 2002).

Es gibt sogar Vermutungen, dass auch der Tod Napoleons auf das erworbene LQT-Syndrom zurückzuführen ist (Mari *et al.*, 2004). Anlass zu dieser Vermutung geben relativ hohe Arsenkonzentrationen in seinen Haaren und die Tatsache, dass er aufgrund

von chronischer Arsenexposition und Gabe von Kaliumantimonoxidtartrat (Brechweinstein) an einer Hypokaliämie gelitten hat. Außerdem wurde Napoleon mit Chinarinde behandelt, die Chinin enthält. Chinin und Arsentrioxid können nachweislich HERG-Kanäle inhibieren (Sanchez-Chapula *et al.*, 2003; Drolet *et al.*, 2004). Damit liegen in diesem Fall mehrere Risikofaktoren für medikamenteninduzierte Arrhythmien vor.

2.4 Lokalanästhetika

2.4.1 *Geschichte der Lokalanästhetika*

Bereits im 19. Jahrhundert wurde Kokain als erstes Lokalanästhetikum von dem Wiener Augenarzt Carl Koller eingesetzt (Koller 1884). Die Idee dazu ging auf Sigmund Freud zurück. Die Substanz war von Albert Niemann aus den Blättern der südamerikanischen Kokapflanze isoliert worden. Wegen der schweren Nebenwirkungen, die oft zu Todesfällen führten, und des großen Suchtpotentials konnte sich die Lokalanästhesie mit Kokain in der klinischen Praxis nicht durchsetzen. Nachdem jedoch die chemische Struktur aufgeklärt worden war, konnte man durch deren Veränderung neue Lokalanästhetika mit geringerer Toxizität entwickeln. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde das erste Esterlokalanästhetikum Procain synthetisiert (Einhorn 1905). Nachteile dieser Substanz waren die kurze Wirkdauer und das hohe allergische Potential. 1943 wurde das erste Aminoamid-Lokalanästhetikum Lidocain von Löfgren entwickelt (Löfgren 1948). Löfgren erkannte auch den allgemeinen Aufbau der Lokalanästhetika, die aus einer hydrophilen Amino-Gruppe und einer lipophilen aromatischen Gruppe bestehen, verbunden durch eine Zwischenkette mit einer Ester- oder einer Amidbindung (Löfgren & Lundquist 1948). Lidocain zeichnet sich durch eine hohe Potenz, einen schnellen Wirkungseintritt und ein geringes allergisches Potential aus und wird noch heute klinisch verwendet. 1957 wurden dann Bupivacain und Mepivacain als Vertreter der Pipecoloxylidid-Lokalanästhetika synthetisiert (Abbildung 2.6). Mepivacain wurde sehr bald auch klinisch verwendet; es hat ähnliche Eigenschaften wie Lidocain. Das sehr lang wirksame Bupivacain hingegen wurde erst 1963 für den klinischen Gebrauch zugelassen, weil sich in Tierversuchen eine sehr hohe Toxizität zeigte. Ende der 1970er Jahre begannen nach einem Bericht über mehrere Todesfälle nach Anwendung von Bupivacain und Etidocain (Albright 1979) Diskussionen um die Toxizität der lang wirkenden Lokalanästhetika. Die Toxizität äußert sich in zentralnervösen Symptomen,

wie periorale Taubheit, Geschmacksirritationen, Muskelzittern und Krampfanfällen, sowie in kardiovaskulären Effekten, wie ventrikuläre Arrhythmien und Herzstillstand (Groban *et al.*, 2000). In einigen Studien wurde die Stereoselektivität der Inhibition von kardialen Natrium-Kanälen für die kardiotoxischen Nebenwirkungen der Lokalanästhetika verantwortlich gemacht (Valenzuela *et al.*, 1995b; Nau *et al.*, 2000; Graf *et al.*, 2002). Daher wurde das strukturverwandte Ropivacain 1996 als reines S-Enantiomer eingeführt. Seit dem Jahr 2000 wird auch das reine S-Enantiomer von Bupivacain, Levobupivacain, klinisch verwendet.

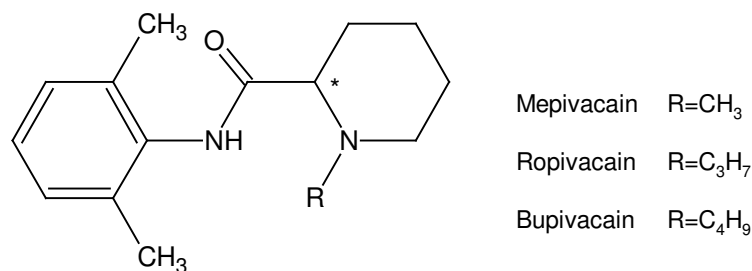


Abbildung 2.6: Struktur der Lokalanästhetika vom Typ Bupivacain. * kennzeichnet das Chiralitätszentrum.

Articain (Abbildung 2.7) gehört ebenfalls zu den Amid-Lokalanästhetika, besitzt aber im Gegensatz zu Bupivacain einen Thiophen-Ring als aromatischen Ring und eine zusätzliche Estergruppe. Dadurch kann Articain sehr schnell durch unspezifische Plasmaesterasen hydrolysiert werden (van Oss *et al.*, 1989). Die entstehende Articansäure ist unwirksam als Lokalanästhetikum. Articain zeichnet sich weiterhin durch einen raschen Wirkungseintritt aus und ist in Deutschland das am häufigsten verwendete Lokalanästhetikum in der Zahnheilkunde (Oertel *et al.*, 1997).

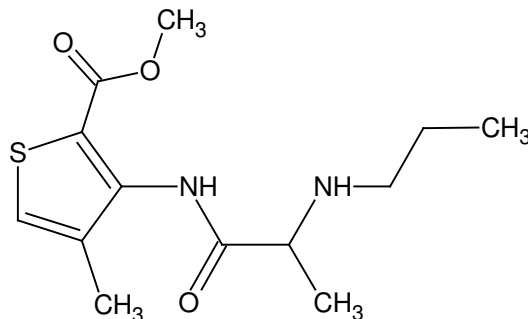


Abbildung 2.7: Strukturformel von Articain.

2.4.2 Inhibition von Ionenkanälen durch Lokalanästhetika

Durch die versehentliche intravasale Injektion von Lokalanästhetika kann es zu schweren Arrhythmien und zum plötzlichen Herztod kommen (Albright 1979; Polley & Santos 2003). Die systemische Toxizität der Lokalanästhetika ist, wie die eigentliche Wirkung, auf eine Blockade von Ionenkanälen zurückzuführen. Lokalanästhetika hemmen die Reizweiterleitung in den peripheren Nerven durch Blockade von neuronalen Natriumkanälen. Auch der kardiale Natriumkanal hH1 (bzw. SCN5A) wird durch Lokalanästhetika inhibiert (Nau *et al.*, 2000). Es ist jedoch unklar, welche Rolle die Inhibition der Natriumkanäle bei QT-Verlängerung und Arrhythmien durch Lokalanästhetika spielt, da HERG-Kanäle ebenfalls bei klinisch relevanten Konzentrationen inhibiert werden (Lipka *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 2001b; Zhang *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2002a; Friederich *et al.*, 2004). KCNQ1-Kanäle sind hingegen relativ unempfindlich für die Inhibition durch Lokalanästhetika und Kokain (Lipka *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001). Die Inhibition von Kaliumkanälen durch Lokalanästhetika wird durch akzessorische β -Untereinheiten beeinflusst (Gonzalez *et al.*, 2002b; Friederich & Solth 2004; Solth *et al.*, 2005) und kann sich daher in den verschiedenen Schichten des Herzens unterschiedlich auswirken.

2.5 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Interaktion von Lokalanästhetika mit kardialen Kalium-Kanälen. Durch das Einführen von Alanin-Mutationen in der S6-Region und in der Porenregion von HERG, sollte überprüft werden, ob an der Interaktion mit Lokalanästhetika die gleichen Aminosäuren beteiligt sind wie an der Interaktion mit verschiedenen hochaffinen HERG-Blockern.

Des Weiteren wurde eine LQT1-Mutation in KCNQ1 elektrophysiologisch und pharmakologisch untersucht. Die Mutation A344V befindet sich an der analogen Position zu F656 in HERG-Kanälen. Dieser aromatische Rest ist wichtig für die Bindung von allen bislang untersuchten Substanzen an HERG-Kanäle. Die Mutation zu Alanin an dieser Stelle vermindert die Sensitivität für diese Substanzen. Daher wurde vermutet, dass die Mutation von Alanin zum hydrophoberen Valin eine neue Interaktionsstelle für Lokalanästhetika generieren könnte.

Ein Alanin-Scan der S5- und der S6-Region von KCNQ1 wurde durchgeführt, um Hinweise auf die dreidimensionale Struktur im Vergleich zu anderen Kalium-Kanälen zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Aus einer bei -80°C gelagerten Dauerkultur von *E. coli* XL1-Blue-Zellen wurde ein Aliquot entnommen, auf einer LB-Platte mit passendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 5-6 Kolonien dieser Platte wurden in je 125 ml SOB-Medium (20 g/l Casein-Extrakt, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, pH 7.0 (NaOH)) überführt und 1.25 ml einer 2 M MgCl_2 -Lösung zugegeben. Die Bakterien wurden bei 22°C und 180 UpM solange inkubiert, bis sie ihre logarithmische Wachstumsphase erreicht hatten ($\text{OD}_{600} = 0.3-0.5$). Anschließend wurden die Bakterien 10 min auf Eis abgekühlt und dann zentrifugiert (10 min, 2500 x g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in eiskaltem TB-Puffer (10 mM Pipes, 15 mM CaCl_2 , 250 mM KCl, 55 mM MgCl_2 , steril filtriert) resuspendiert und weitere 10 min auf Eis gekühlt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 2500 x g, 4°C) wurde das Pellet in 8 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen, mit 600 μl DMSO (7% (v/v)) versetzt und nochmals 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde danach sofort in 200 μl -Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

Zur Ermittlung der Transformationsrate (Kompetenz) wurden 100-200 μl der Bakterien (kompetente Zellen) mit 10-50 pg Kontroll-DNA (z.B. pcDNA3) transformiert (siehe 3.1.2) und die Anzahl der Kolonien ermittelt. Die Anzahl der Kolonien bei einer DNA-Menge von 10 pg ist ein Maß für die Transformationsrate (100 Kolonien = Transformationsrate von 10^7).

3.1.2 Transformation von Bakterien

Für die Transformation des *E. coli* XL1-Blue Stammes wurden 100 μl der kompetenten Zellen mit 20-50 ng Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz (siehe 3.1.8.3) 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock (90 s, 42°C) und anschließende Kühlung auf Eis (10 min).

Die transformierten Zellen wurden auf Nährplatten (Abschnitt 3.5.2) mit einem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.1.3 Präparation von DNA aus Bakterienkulturen

3.1.3.1 Präparation aus 2 ml Bakterienkulturen (Miniprep)

Für die Minipräparation wurden 2 ml Nährmedium (Abschnitt 3.5.2) unter Zusatz eines entsprechenden Antibiotikums mit einer Einzelkolonie des plasmidtragenden *E. coli*-Stammes angeimpft und über Nacht im Wärmeschüttler wachsen gelassen (37°C, 225 UpM). 1.5 ml dieser Kultur wurden zentrifugiert (16100 x g, 1 min, RT) und die Plasmid-DNA aus dem Pellet mit Hilfe des Mini-Prep-Kits (Amersham-Bioscience, Freiburg) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.1.3.2 Präparation aus 50 ml Bakterienkulturen (Midiprep)

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen, wurden 50 ml Nährmedium mit Antibiotikum mit einer *E. coli*-Einzelkolonie, die das gewünschte Plasmid trägt, angeimpft und über Nacht im Wärmeschüttler wachsen gelassen (37°C, 180 UpM). Die DNA-Präparation aus den 50 ml-Übernachtulturen wurde mit dem Nucleobond AX-100-System (Macherey und Nagel, Düren) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Ausbeute an DNA wurde photometrisch (Abschnitt 3.1.6) bestimmt und die Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt. Die Qualität der DNA wurde durch einen Restriktionsverdau mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.1.5) bestimmt.

3.1.3.3 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Isolierung der DNA erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Abschnitt 3.1.5)

und Ausschneiden des DNA-haltigen Gelstückes. Nach Auflösen des Gelstückes in „Capture Buffer“ (1 µl pro mg Gelstück) (Amersham-Bioscience, Freiburg) (10 min bei 60°C, 100 UpM) wurde die DNA über GFX-Säulen (Amersham-Bioscience, Freiburg) aufgereinigt. Die Ausbeute wurde mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese unter Zuhilfenahme eines Mengenstandards bestimmt.

3.1.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde mit dem „ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing

ready Kit“ und dem ABI 377 DNA-Sequenziergerät (Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim) durchgeführt. Die Aufarbeitung der Sequenzierproben und die Bedienung des Sequenziergerätes erfolgten durch die Mitarbeiter des Sequenzier-Servicelabors des ZMNH.

3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA- bzw. RNA-Fragmenten wurden diese nach ihrer Größe in horizontalen Agarose-Gelen (1-2% (w/v) Agarose) in TAE-Puffer für DNA und in MOPS-Puffer für RNA aufgetrennt. Zum Nachweis der Nukleinsäuren wurde den Gelen 0.5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Als Laufpuffer wurde TAE- bzw. MOPS-Puffer verwendet. Die Detektion der DNA bzw. RNA erfolgte unter UV-Licht (356 nm) mit Hilfe eines Gel-Dokumentationssystems (BioDoc II, Biometra, Göttingen).

3.1.6 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Ausbeute der präparierten DNA (Abschnitt 3.1.3) wurde mit dem Gene-Quant-RNA/DNA Calculator (Amersham-Bioscience, Freiburg) bestimmt. Die DNA-Lösung wurde mit einer ausreichenden Menge Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm gegen Wasser als Blindwert gemessen. Das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm gilt als Maß für die Reinheit der DNA-Präparation.

3.1.7 Konzentrationsbestimmung von RNA durch Fluoreszenzmessungen

Die Konzentration von *in vitro* transkribierter RNA (Abschnitt 3.1.10) wurde mit dem RiboGreen RNA Quantification Kit (Molecular Probes, Invitrogen Corporation, Karlsruhe) bestimmt. Die Fluoreszenzmessung ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$, Perkin Elmer LS 50B) der mit RiboGreen versetzten und in TE-Puffer ausreichend verdünnten RNA-Lösung erfolgte gegen den mitgelieferten RNA-Standard (16S und 23S rRNA, *E. coli*).

3.1.8 Modifikationen von DNA

3.1.8.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für einen Restriktionsverdau wurde die gewünschte Menge an Plasmid-DNA mit der erforderlichen Menge an Enzym (MBI Fermentas, St.Leon-Rot oder New England

Biolabs, Frankfurt a. M.) in dem entsprechenden Puffer 1-2 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 5-fach konzentriertem DNA-Probenpuffer (20% (w/v) Ficoll 400, 0.025% (w/v) Bromphenolblau, 0.025% (w/v) Xylencyanol, 100 mM EDTA) wurde die enzymatische Reaktion gestoppt; dann wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 3.1.5).

Bei gleichzeitigem Verdau mit unterschiedlichen Enzymen wurden die Pufferbedingungen den Herstellerangaben entsprechend angepasst.

3.1.8.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Nach dem Restriktionsverdau wurde die zu dephosphorylierende DNA mit alkalischer Phosphatase (Ciab; MBI Fermentas, St.Leon-Rot) (1 U/50 pM 5'-Enden,) 30 min bei 37°C inkubiert.

3.1.8.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden 100-200 ng dephosphorylierte Vektor-DNA mit einem dreifachen molaren Überschuss an Fragment-DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 1 U T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) und 10-fach konzentriertem Ligasepuffer (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) 2 h bei Raumtemperatur ligiert.

3.1.8.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die DNA-Amplifikation durch die Polymerasekettenreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl in einer PCR-Maschine (DNA Engine PTC-200, MJ Research, Bio-Rad, München) durchgeführt. Ein Standard PCR-Ansatz setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: 20-50 ng Plasmid-DNA (Matrize), 50 pM der beiden Oligonukleotide, 200 µM dNTPs (Amersham-Bioscience, Freiburg), 5 µl 10-fach PCR-Puffer, 2 U *TurboPfu*-Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) und Wasser ad 50 µl. Das Programmieren des PCR-Blocks war abhängig von der Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Oligonukleotide und von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Die Schmelztemperatur T_m ist die Temperatur, bei der 50% der Oligonukleotide unhybridisiert vorliegen. Es existieren unterschiedliche Gleichungen, mit denen die Schmelztemperatur berechnet werden kann. In der einfachsten Variante ergibt sich T_m näherungsweise aus den GC-Gehalt des Primers:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 4 \cdot (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 \cdot (\text{Anzahl A bzw. T})$$

Ist T_m der verwendeten Primer unterschiedlich, erfolgt die Hybridisierung bei der niedrigeren Temperatur.

Als Standardprogramm für die PCR diente folgendes Schema:

Prädenaturierung	95°C	2 min	} 25 Zyklen
Denaturierung	95°C	0.5 min	
Anlagerung	$T_m - 4^\circ\text{C}$	1 min	
Elongation	72°C	1 min/kb	
Abschluss-Synthese	72°C	10 min	

Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel analysiert und aus dem Gel isoliert (Abschnitt 3.1.3.3). Anschließend wurden sie nach entsprechendem Verdau mit Restriktionsendonukleasen (Abschnitt 3.1.8.1) in geeignete Vektoren kloniert und sequenziert (Abschnitt 3.1.4).

3.1.9 *In vitro* Mutagenese

Punktmutationen wurden mit Hilfe der Technik der Overlap-PCR erzeugt. Dazu wurden zuerst separat zwei PCR-Fragmente als Zwischenprodukte hergestellt (Abschnitt 3.1.8.4). Die Reaktionen erfolgten mit zwei komplementären Oligonukleotiden, die die Punktmutation enthielten und zwei spezifischen Oligonukleotiden, die an flankierende Regionen in den beiden DNA-Abschnitten binden. Die beiden Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgereinigt (Abschnitt 3.1.5) und als Matrize in äquimolaren Mengen in eine dritte PCR-Reaktion („Overlap-PCR“) eingesetzt. In dieser Reaktion erfolgte eine Hybridisierung der Fragmente in ihrem überlappenden Bereich und eine Synthese des mutierten DNA-Moleküls mit den beiden spezifischen Oligonukleotiden aus den Start-Reaktionen.

Zur Hybridisierung der Fragmente erfolgten vor der Synthese des *Overlap*-Produktes zwei der folgenden Zyklen ohne Oligonukleotide:

3 min 72°C, 5 min 37°C, 3 min 72°C

Das Produkt der Overlap-PCR, welches die gewünschte Mutation enthält, wurde gelelektrophoretisch aufgereinigt (Abschnitt 3.1.5) und in die Klonierung eingesetzt.

3.1.10 cRNA-Synthese

Die cRNA für die Injektion in Oocyten wurde mit dem mRNA mMachine-Kit (Ambion; Austin, TX, USA) synthetisiert. Dazu wurde das pGEM-Plasmid mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert (KCNQ1: BcuI; KCNE1: NotI; HERG: NotI). Der Restriktionsansatz wurde mit Hilfe von GFX-Säulen aufgereinigt und die Ausbeute und Vollständigkeit der Linearisierung auf einem Agarosegel überprüft. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt; für die Synthese wurden 7 µg DNA eingesetzt. Nach 2 h Synthese bei 37°C wurde 1 µl DNase zugegeben, um das Plasmid zu verdauen. Die Aufreinigung der cRNA erfolgte über Phenol/Chloroform-Extraktion. Die cRNA wurde mit 3 M Na-Acetat präzipitiert und in 20 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Die Konzentration der synthetisierten RNA wurde mit der RiboGreen-Methode (RiboGreen RNA Quantification Reagent, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (Abschnitt 3.1.7) bestimmt und die Qualität der RNA auf einen Agarosegel analysiert (Abschnitt 3.1.5).

3.2 Zellkultur

3.2.1 Routinehaltung der Zellen

Die CHO-Zellen wurden in 20 ml Nährmedium (MEM-alpha Medium; Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe), dem 10% (v/v) fetales Kälberserum (Biochrom, Berlin) und 1% (v/v) PSG-Lösung (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe) zugesetzt wurde) in 80 cm² großen Zellkulturflaschen (NUNC, Roskilde, Dänemark) kultiviert.

Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus, Kendro, Langenselbold) bei Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂ und 95% relative Luftfeuchtigkeit). Bei einer Konfluenz von 80-100% wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums mit 5 ml Trypsin/EDTA (Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe) vom Boden der Kulturflaschen gelöst. Nach 2-5 min wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 5 ml frischem Medium abgestoppt. Die Zellkonzentration wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die fortlaufende Kultur wurden die Zellen mit einer Dichte von $4 \cdot 10^4$ /ml ausgesät und waren nach 2-3 Tagen im Brutschrank ausreichend konfluent gewachsen, so dass sie erneut passagiert werden konnten. Für elektrophysiologische Untersuchungen wurden die Zellen in 35 mm Ø Kulturschälchen (NUNC, Roskilde, Dänemark) in einer Dichte von $1 \cdot 10^4$ /ml ausplattiert.

3.2.2 *Transfektion*

Die Transfektion der CHO-Zellen erfolgte einen Tag nach dem Ausplattieren in 35 mm Schälchen nach der Liposomeneinschluss-Methode mit dem Reagens LipofectAMINE (Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe) bzw. dem Nachfolgepräparat LipofectAMINE 2000 (Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe). Zusätzlich zu den verwendeten Plasmiden, die für die Kaliumkanäle kodieren, wurden die Zellen mit einem pcDNA3-EGFP-Konstrukt transfiziert, um den Erfolg der Transfektion optisch bestimmen zu können.

3.2.3 *Präparation und Injektion von Xenopus laevis Oocyten*

Nach chirurgischer Entnahme der Oocyten aus weiblichen *Xenopus laevis* Fröschen wurden die Oocyten in Ca^{2+} -freier-Oocyten-Ringer-Lösung (OR2 siehe 3.5.3.2) mit Kollagenase A (1.3 mg/ml, Boehringer, Mannheim) inkubiert (2-4 h, 100 UpM, Horizontalschüttler, RT), um die Follikelzellschicht zu entfernen. Anschließend wurden die Oocyten (Stadium V und VI) selektiert, in Gentamycin-Lösung überführt und über Nacht bei 17°C aufbewahrt. Am folgenden Tag wurden die Oocyten in OR2-Lösung mit je 50 nl cRNA-Lösung injiziert (Nanoliter 2000, World Precision Instruments, Saratoga, FL, USA). Die injizierten Oocyten wurden in Gentamycin-Lösung überführt und bei 17°C inkubiert. Oocyten schlechter Qualität wurden täglich ausgesondert und das Medium wurde bei Bedarf gewechselt. Die elektrophysiologische Messung der heterolog exprimierten Kanalproteine erfolgte nach 2-7 Tagen.

3.3 Elektrophysiologische Methoden

Alle elektrophysiologischen Experimente wurden bei Raumtemperatur (22-22°C) durchgeführt.

3.3.1 *Ganz-Zell-Patch-Clamp-Technik*

Die Patch-Clamp-Technik wurde in den 1970er Jahren von Neher und Sakmann entwickelt und später verfeinert (Neher *et al.*, 1978; Hamill *et al.*, 1981). Ziel der Methode war ursprünglich die Messung einzelner Ionenkanäle in biologischen Membranen. Da die zu messenden Ströme sehr klein sind (im nA-Bereich), müssen sie verstärkt und das Hintergrundrauschen minimiert werden. Um das Hintergrundrauschen

zu vermindern, wird der Messplatz gegen äußere elektrische Felder abgeschirmt und ein sehr enger Kontakt (Gigaseal) zwischen Zellmembran und Messpipette etabliert (Numberger & Dragun 1996).

Wenn der Kontakt der Pipette zur Zellmembran hergestellt ist („*cell attached*“-Konfiguration) können Messungen an Einzelkanälen durchgeführt werden. Durch Anlegen von Unterdruck im Inneren der Pipette kann das Membranstück unter der Pipettenöffnung („*patch*“) durchbrochen werden, so dass die „*whole-cell*“-Konfiguration erreicht wird. Im Gegensatz zur „*cell-attached*“-Konfiguration wird bei der Ganz-Zell-Ableitung der Strom durch die gesamte Zellmembran gemessen. Die Lösung im Pipetteninneren ist in der „*whole-cell*“-Konfiguration direkt mit dem Cytoplasma verbunden, so dass nach kurzer Zeit im Zellinneren eine Ionen-Zusammensetzung erreicht ist, die der verwendeten intrazellulären Pipettenlösung entspricht. Der Zugangswiderstand (Serienwiderstand R_s) zum Inneren der Zelle sollte möglichst gering sein, um ein möglichst schnelles Klemmen der Membranspannung zu erreichen und die Differenz zwischen dem eingestellten und dem tatsächlich angelegten Membranpotential möglichst gering zu halten. Im Idealfall ist R_s nur wenig größer als der durch die Pipettenöffnung vorgegebene Pipettenwiderstand (R_p).

Bei der Patch-Clamp-Technik wird eine Kommando-Spannung (V_{soll}) vorgegeben. Um die gemessene Membranspannung V_m immer auf V_{soll} einzustellen (zu „klemmen“), ist die Injektion eines Kompensationsstroms durch die Pipette nötig. Dieser Kompensationsstrom wird registriert und ausgewertet. Er entspricht in seinem Zeitverlauf dem Ionenstrom, der primär zur Differenz von V_m und V_{soll} führte. Um diese Messung mit nur einer Pipettenelektrode bewerkstelligen zu können, wird ein sogenannter Strom-Spannungswandler eingesetzt. Er besteht aus einem Operationsverstärker (OPA), der seine beiden Eingangssignale V_{soll} (+) und V_m (-) miteinander vergleicht. Bei einer Differenz zwischen V_m und V_{soll} generiert der OPA an seinem Ausgang eine hoch verstärkte Spannung, die proportional zur Differenz zwischen V_m und V_{soll} ist. Dadurch entseht ein Spannungsabfall über den Rückkopplungswiderstand R_f und es fließt ein entsprechender Strom in die Zelle. Gemessen wird die Spannungsdifferenz aus V_{soll} und Ausgangsspannung am OPA, die wiederum dem Kontrollstrom proportional ist. Eine entsprechende Kalibrierung des Messstroms erlaubt die Berechnung des Kontrollstroms (Abbildung 3.1).

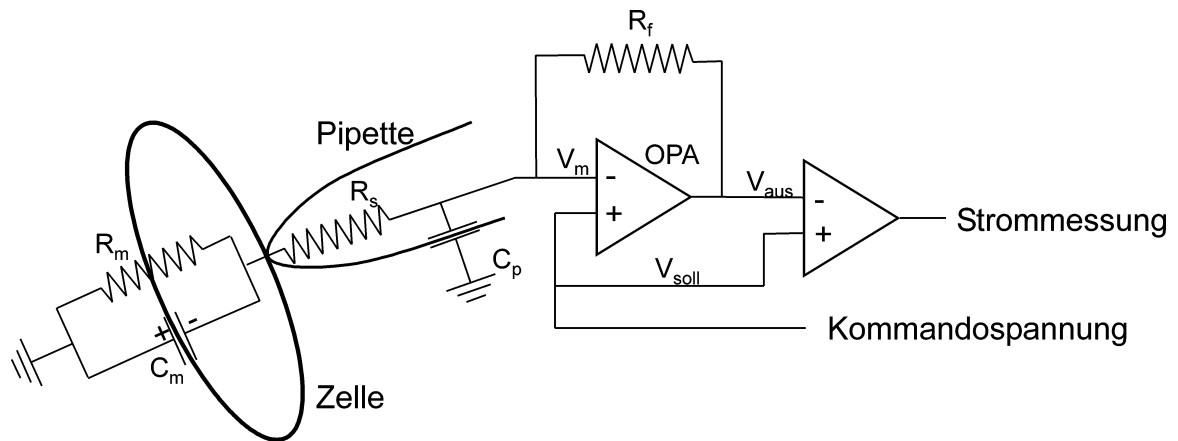


Abbildung 3.1: Schematisches Schaltbild einer Patch-Clamp-Ableitung in der Ganz-Zell-Konfiguration. R_f : Rückkopplungswiderstand, R_s : Serienwiderstand, R_g : Seal-Widerstand, C_p : Pipettenkapazität, R_m : Membranwiderstand, C_m : Membrankapazität, V_m : Membranspannung, V_{soll} : Kommandospannung, V_{aus} : Ausgangsspannung, OPA: Operationsverstärker.

3.3.1.1 Ausstattung des Messstandes

Die Messapparatur war auf einem schwingungsgedämpften Tisch (T250, Physik Instrumente, Waldborn) gelagert, um Erschütterungen der empfindlichen Patch-Clamp-Messungen zu vermeiden. Um das elektrische Hintergrundrauschen zu reduzieren, war Messstand mit einem Faraday-Käfig umgeben.

Zu visuellen Kontrolle der Patchpipette während der Annäherung an die Zellmembran, wurde ein inverses Mikroskop (Axiovert-200, Zeiss, Oberkochen) mit bis zu 400-facher Vergrößerung und Kontrastverstärkungsoptik eingesetzt. Eine HBO-UV-Lichtquelle wurde zum Nachweis von EGFP, das als Indikatorprotein für erfolgreich transfizierte Zellen eingesetzt wurde, verwendet. Die 35 mm-Kulturschalen wurden direkt in eine passende Halterung auf dem Mikroskoptisch eingesetzt.

Als Patchpipetten dienten aus Borosilikatglas (Wandstärke ca. 0.15 mm, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) mit einem horizontalen Pipettenziehgerät (P-97, Sutter Instruments, Novato, CA, USA) ausgezogene Glaskapillaren. Der Durchmesser der Spitzenöffnung betrug etwa $1 \mu\text{m}$, so dass sich mit den angegebenen Lösungen ein Pipettenwiderstand von 2-3 M Ω ergab. Nach dem Befüllen mit sterilfiltrierter Intrazellulärlösung (Abschnitt 3.5.3.1) wurde die Pipette in den Pipettenhalter am Vorverstärker eingesetzt. Die elektrische Verbindung zum Verstärker wurde über einen AgCl-beschichteten Silberdraht im Pipettenhalter hergestellt, der in die Pipettenlösung eintaucht. Die Beschichtung des Silberdrahts wurde durch Lagerung hypochlorithaltiger Bleichlauge erzeugt. Eine Verbindung der Badlösung zum Erdleiter

wurde mit einem Ag/AgCl-Pellet hergestellt (World Precision Instruments). Die Benutzung von Ag/AgCl-Elektroden soll Polarisierungen der Silber-Elektrode in umgebenden Elektrolytlösung vermeiden.

Das Anlegen eines Über- bzw. Unterdruckes erfolgt über den Pipettenhalter.

Gesteuert wurde die Pipette mit Hilfe eines motorisierten Mikromanipulators (Patchman, Eppendorf, Hamburg).

Für die Applikation von pharmakologischen Substanzen wurde eine schwerkraftbetriebenes Perfusionssystem mit steuerbaren Ventilen (Eigenbau Werkstatt ZMNH) verwendet und eine Mehrkanal-Perfusionspipette (E.S.F. electronic, Göttingen).

3.3.1.2 Datenerfassung

Die gemessenen Signale wurden vom Vorverstärker an einen Hauptverstärker (EPC-9, HEKA Elektronik, Lambrecht) weitergegeben. Für dessen Steuerung und die Digitalisierung der gemessenen Signale wurde eine ITC16-AD/DA-Schnittstelle an einem Computer (Apple MacIntosh G3) eingesetzt. Das analoge Messsignal wurde mit einer Auflösung von 16 bit und einer Aufnahmefrequenz zwischen 0.2 und 20 kHz digitalisiert. Als Software zur Datenerfassung und zur Kontrolle des Verstärkers diente das Programm PULSE (Version 8.5, HEKA Elektronik, Lambrecht). Pipettenkapazität (C_p) und Membrankapazität (C_m) konnten durch eine entsprechende Funktion des Programms kompensiert werden.

Als Leckstrom wird ein unspezifischer Strom bezeichnet, der durch Abweichungen von Idealzustand des Giga-Seal zustande kommt und eine lineare Abhängigkeit von der angelegten Spannung zeigt. Um diesen von den tatsächlich zu messenden spannungsaktivierten Strömen subtrahieren zu können, wurde er nach jedem Spannungs-Testpuls durch entsprechende Leckprotokolle mit der P/n - Methode bestimmt. Dabei wurden die Stromantworten auf kleine Spannungspulse ($Amplitude = 1/n \cdot Testpuls \text{ in } mV$), bei denen die zu untersuchenden Kanäle noch nicht aktivieren, gemessen. Die registrierten Stromantworten wurden mit n multipliziert und von der Stromantwort auf den eigentlichen Testpuls subtrahiert.

Serienwiderstände (R_s) wurden zu mindestens 85% durch den Verstärker kompensiert.

3.3.2 *Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik in Xenopus-Oocyten*

Zur elektrophysiologischen Analyse der in Oocyten exprimierten Kanalproteine wurde die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik verwendet. Hier wird das Membranpotential durch zwei intrazelluläre Mikroelektroden bestimmt. Eine Elektrode misst das aktuelle Membranpotential (Spannungselektrode), während die andere einen Strom injiziert, um das gewünschte Potential aufrecht zu erhalten. Im Gegensatz zur Patch-Clamp-Technik ist es hier mit der zweiten Elektrode möglich, das Membranpotential direkt zu messen.

3.3.2.1 *Messplatz*

Die Messapparatur für das Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp war auf einer Metallplatte auf einem Tisch aufgebaut. Die beiden Messelektroden waren an dem Tisch mit Magnetfußhaltern fixiert und konnten mit mechanischen Micromanipulatoren bewegt werden. Zur visuellen Kontrolle war die Messkammer unter einem Binokular (Wild M3C, Heerbrugg) platziert. Die Mikroelektroden wurden aus Borosilikatglas (Wandstärke ca. 0.15 mm, World Precision Instruments) mit Hilfe eines vertikalen Elektrodenziehgerätes (Narishige, Tokyo, Japan) ausgezogen und anschließend mit einer Microforge (Narishige) abgebrochen. Ein Spitzendurchmesser von 15 μm entsprach in den verwendeten Lösungen einem Elektrodenwiderstand von 0.2- 0.3 M Ω . Zum Füllen der Mikroelektroden diente 3 M KCl-Lösung. Die Spitzen der Elektroden wurden mit Agar gefüllt. Die elektrische Verbindung zur Pipettenlösung wurde durch einen in hypochlorithaltiger Bleichlauge behandelten Silberdraht hergestellt; die Verbindung der Badlösung zum Erdleiter mit einem AgCl-Pellet (World Precision Instruments). Zum Austausch der Badlösung in der Messkammer dienten ein schwerkraftbetriebenes Perfusionssystem und eine Absaugvorrichtung.

3.3.2.2 *Datenerfassung*

Die Signale wurden über den Vorverstärker an den Hauptverstärker (Oocyte-Clamp OC-725, Warner Instrument Corp., Hamden, CT, USA) geleitet. Zur Digitalisierung der Signale und zur Steuerung des Versuchsablaufes war der Hauptverstärker über eine ITC-16-AD/DA-Schnittstelle (HEKA Elektronik) mit einem Computer (Apple MacIntosh, G3) verbunden. Das analoge Messsignal wurde bei 16 bit Auflösung mit Aufnahmefrequenzen von 1.7-5 kHz digitalisiert und auf der Festplatte des Computers gespeichert.

3.3.3 *Verwendete Stimulationsprotokolle und Datenauswertung*

Für die Programmierung der Protokolle zur Aktivierung der Kanäle wurde das Programm PULSE (HEKA Elektronik, Lambrecht) verwendet. Zur Auswertung der Stromaufnahmen wurden die Programme PULSEFIT (HEKA Elektronik), KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA, USA) und Excel (Office 2000, Microsoft Cooperation, Redmond, WA, USA) verwendet. Die Daten wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der Experimente wurde mit n bezeichnet. T-Tests nach Student wurden mit Excel durchgeführt. Bei einem p-Wert von 0.05 oder kleiner wurde ein Unterschied als signifikant angesehen. Ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Messkurven wurde mit Hilfe einer ANOVA oder eines F-Tests (Motulsky & Christopoulos 2003) in Excel bestimmt.

Das Haltepotential betrug -80 mV für alle Messungen in CHO-Zellen, in *Xenopus laevis* Oocyten ebenfalls -80 mV für Messungen von HERG-Kanälen und -100 mV für die Messung von KCNQ1-Kanälen. Für einige KCNQ1 Alanin-Mutanten, die in 140 mM KCl, was einer symmetrischen Kaliumkonzentration entspricht, analysiert wurden, betrug das Haltepotential 0 mV, da bei diesem Potential kein Nettostrom fließt.

3.3.3.1 *Analyse der Aktivierung*

Um die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung eines Kanals zu bestimmen, wurden – ausgehend vom Haltepotential – nacheinander Depolarisationen auf verschiedenen Potentiale mit einem Abstand von jeweils 10 mV durchgeführt. Danach wurde das sog. Tail-Potential appliziert bevor wieder das Haltepotential angelegt wurde (Abbildung 3.2).

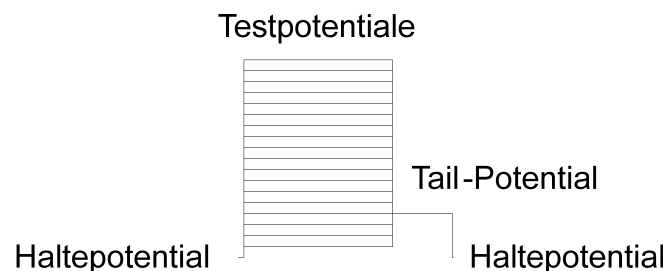


Abbildung 3.2: Beispiel für ein Aktivierungsprotokoll.

Die Dauer der Depolarisationen betrug 1 s für HERG- und EAG-Kanäle, 3 s für KCNQ1-Kanäle und 5 s für KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexe. Das Tail-Potential betrug

-40 mV bei HERG-Kanälen und -60 mV bei KCNQ1-Kanälen. Wenn größere Einwärtsströme gemessen werden sollten, wurden die Tail-Ströme bei -120 mV aufgenommen.

Die maximale Stromamplitude während der Depolarisation ist abhängig vom Anteil der geöffneten Kanäle in der Membran und vom angelegten Membranpotential selbst, welches die Triebkraft für die Kaliumionen bestimmt. Um den Anteil der geöffneten Kanäle zu bestimmen, muss mit Hilfe des Umkehrpotentials aus dem maximalen Strom die maximale Leitfähigkeit berechnet werden (Gleichung 1).

$$G_{\max} = \frac{I_{\max}}{E_m - E_K} \quad (1)$$

(G_{\max} : maximale Leitfähigkeit; I_{\max} : maximaler Strom; E_m : Membranpotential; E_K : Umkehrpotential für Kalium)

Das Umkehrpotential für Kaliumionen kann mit Hilfe der Nernst-Gleichung berechnet werden (Gleichung 2):

$$E_K = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{[K]_i}{[K]_o} \quad (2)$$

(E_K : Gleichgewichtspotential für Kalium; R: Gaskonstante; T: Temperatur in Kelvin [295 K]; z: Wertigkeit des Ions; F: Faraday-Konstante; $[K]_i$: intrazelluläre Kaliumkonzentration; $[K]_o$: extrazelluläre Kaliumkonzentration).

Für die standardmäßig verwendeten intra- und extrazellulären Lösungen bei den Patch-Clamp-Experimenten (IC6 und EC6) betrug das Umkehrpotential -89.04 mV, bei der extrazellulären Lösung, die in den Experimenten mit EAG-Kanälen verwendet wurden, -82.70 mV.

Da das Tail-Potential für alle Depolarisationen gleich ist, hat es keinen Einfluss auf die Triebkraft und die maximale Stromamplitude des Tail-Stroms ist proportional zur maximalen Leitfähigkeit während der vorangegangenen Depolarisation.

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurde mit einer Boltzmann-Funktion beschrieben (Gleichung 3).

$$G = \frac{G_{\max}}{1 + \exp\left(\frac{V_{0.5} - V_m}{k}\right)} \quad \text{bzw.} \quad I = \frac{I_{\max}}{1 + \exp\left(\frac{V_{0.5} - V_m}{k}\right)} \quad (3)$$

(G: Leitfähigkeit; G_{\max} : maximale Leitfähigkeit; I: Strom; I_{\max} : maximale Stromamplitude; $V_{0.5}$: Spannung der halbmaximalen Aktivierung; V_m : Membranspannung; k: Steigungsfaktor)

Bei der Analyse der Mutanten aus dem Alanin-Scan von KCNQ1 wurden noch weitere Berechnungen zur Thermodynamik der Aktivierung durchgeführt. Der Steigungsfaktor k wurde in die effektive Ladung z umgerechnet:

$$z = \frac{RT}{F \cdot k} \quad (4)$$

Dann wurde aus den Parametern $V_{0.5}$ und dem Faktor z die Gibbs freie Energie ΔG_0 berechnet (Gleichung 5).

$$\Delta G_0 = -zFV_{0.5} = -RT \ln \frac{[o]}{[c]} \quad (5)$$

(F: Faraday-Konstante; R: allgemeine Gaskonstante; T: Temperatur in K; [o]: Anteil der geöffneten Kanäle; [c]: Anteil der geschlossene Kanäle)

ΔG_0 wurde in kcal/mol berechnet, um die erhaltenen Werte besser mit publizierten Daten aus dem Alanin-Scan von *Shaker* (Yifrach & MacKinnon 2002) vergleichen zu können. Der Faktor für die Umrechnung von SI-Einheiten in kcal/mol beträgt 0.2389.

Um Veränderungen der freien Energie zwischen KCNQ1 Wildtyp ($\Delta G_{0 \text{ wt}}$) und Mutation ($\Delta G_{0 \text{ mut}}$) darzustellen, wurde der $\Delta \Delta G_0$ -Wert berechnet (Gleichung 6).

$$\Delta \Delta G_0 = \Delta G_{0 \text{ mut}} - \Delta G_{0 \text{ wt}} \quad (6)$$

Entsprechend wurde die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung $\Delta V_{0.5}$ berechnet.

Der Fehler der Differenz $s_{\Delta X}$, die sich aus $X_{\text{wt}} \pm s_{X,\text{wt}}$ und $X_{\text{mut}} \pm s_{X,\text{mut}}$ ergab, wurde unter Annahme einer linearen Fehlerfortpflanzung nach der folgenden Formel berechnet:

$$s_{\Delta X} = \sqrt{s_{X,\text{wt}}^2 + s_{X,\text{mut}}^2} \quad (7)$$

3.3.3.2 Analyse der Deaktivierung

Die Deaktivierung wurde gemessen, indem das Membranpotential zunächst ausgehend vom Haltepotential für 2 s auf +60 mV depolarisiert wurde und anschließend ein Membranpotential von -120 mV bis +40 mV in 10 mV-Schritten für jeweils 1 s angelegt wurde.

Die Zeitabhängigkeit der Deaktivierung wurde mit einer exponentiellen Funktion mit ein (bei KCNQ1) oder zwei (bei HERG) Zeitkonstanten beschrieben (Gleichung 8).

$$y = A_f \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_f}\right) + A_s \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) + A_0 \quad (8)$$

(A_f bzw. A_s : Amplitude der schnellen bzw. langsamen Zeitkonstante; t : Zeit; τ_f bzw. τ_s : schnelle bzw. langsame Zeitkonstante; A_0 : steady-state Amplitude)

3.3.3.3 Analyse der instantanen Strom-Spannungsbeziehung bei HERG-Kanälen

Die instantane Strom-Spannungsbeziehung von HERG-Kanälen wurde durch ein Dreistufen-Protokoll ermittelt (Smith *et al.*, 1996). Zuerst wurde die Zellmembran für 2 s auf +20 mV depolarisiert. Während der folgenden Repolarisation auf -80 mV für 30 ms erholten sich die Kanäle aus der Inaktivierung. In der dritten Stufe wurde das Membranpotential in 10 mV-Schritten auf Potentiale zwischen -120 mV und +60 mV verändert. Während des letzten Schrittes kann der instantane Strom gemessen werden. Außerdem konnte die Zeitabhängigkeit der Inaktivierung in diesem Schritt mit einer exponentiellen Funktion beschrieben werden (Gleichung 8).

3.3.3.4 Analyse der Inaktivierung von HERG-Kanälen

Die Inaktivierung von HERG-Kanälen wurde mit Hilfe eines Dreistufen-Protokolls analysiert. Dafür wurden die Kanäle durch eine Depolarisation für 2 s auf +40 mV zunächst aktiviert und dann inaktiviert. Anschließend wurden für 30 ms Membranpotentiale von -120 mV bis +60 mV in 10 mV-Schritten angelegt. In dieser Phase erholten sich die Kanäle von der Inaktivierung. Während der letzten Stufe wurde erneut ein Membranpotential von +40 mV angelegt und es wurde der maximale Strom gemessen. Diese maximale Amplitude wurde bei sehr negativen Membranpotentialen um den Anteil der Kanäle korrigiert, die sich während der zweiten Stufe geschlossen hatten (Smith *et al.*, 1996). Dazu wurden die deaktivierenden Ströme während dieses

Schritt auf ihren Anfangswert zu Beginn der Repolarisation extrapoliert und die relative Differenz zwischen Anfangswert und Maximalwert während des zweiten Schritts zu der maximalen Amplitude während der dritten Stufe addiert. Die Spannungsabhängigkeit dieser korrigierten Inaktivierung wurde mit einer Boltzmann-Funktion beschrieben (Gleichung 3).

3.3.3.5 Analyse der Erholung von der Inaktivierung („Recovery from inactivation“)

Die Erholung von der Inaktivierung wurde für KCNQ1_{A344V}-Kanäle mit Hilfe eines Dreistufen-Protokolls bestimmt. Zuerst wurden die Kanäle durch eine 3 s Depolarisation auf +60 mV aktiviert und auch inaktiviert. Dann wurde die Membran für verschiedene Intervalle zwischen 10 ms und 10 s auf -100 mV repolarisiert, damit sich die Kanäle von der Inaktivierung erholen konnten. Der Anteil der Kanäle, die sich bereits von der Inaktivierung erholt hatten, wurde durch erneute Depolarisation auf +60 mV für 100 ms bestimmt. Die maximale Stromamplitude während dieses zweiten Pulses wurde auf die Amplitude während des ersten Pulses normiert. Der relative Strom wurde gegen die Interpulsdauer aufgetragen und mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben (Gleichung 9).

$$y = A_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + A_0 \quad (9)$$

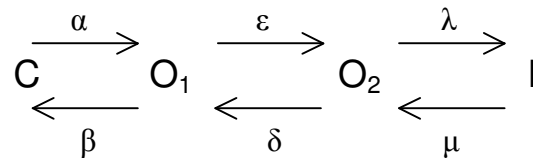
(A₁: Amplitude der Inaktivierungszeitkonstanten; t: Zeit; τ₁: Inaktivierungszeitkonstante; A₀: steady-state Amplitude)

3.3.3.6 Analyse der Inaktivierung bei KCNQ1

Der Anteil der inaktivierten Kanäle wurde aus den Tail-Strömen, die in 100 mM K⁺-Lösung bei -120 mV gemessen wurden, bestimmt. Dazu wurden die Tail-Ströme, die den für KCNQ1 charakteristischen „hook“ aufweisen mit einer biexponentiellen Funktion beschrieben (siehe Gleichung 8).

Dabei beschreibt die schnelle Komponente die Erholung der Kanäle aus der Inaktivierung, die langsame Komponente die Deaktivierung.

Um das Schaltverhalten von KCNQ1-Kanälen zu erklären wurde, vereinfacht das folgende Modell postuliert (Pusch *et al.*, 1998):



Unter der Annahme, dass bei dem angelegten Membranpotential von -120 mV die Zeitkonstanten δ und β für die Rückreaktion sehr groß sind gegenüber den Zeitkonstanten α und ε für die Hinreaktion, lassen sich λ und μ , und damit der Anteil der inaktivierten Kanäle f_{inakt} , aus den Parametern des exponentiellen Fits (Gleichung 8) wie folgt berechnen:

$$f_{\text{inakt}} = \frac{p_I}{p_I + p_{O_2}} = \frac{\lambda}{\lambda + \mu} = \frac{a_f / a_s - \tau_f / \tau_s}{1 - \tau_f / \tau_s} \quad (10)$$

3.3.3.7 Analyse der relativen Rb^+/K^+ -Leitfähigkeit von KCNQ1

Die relative Rb^+/K^+ -Leitfähigkeit $G_{\text{Rb}}/G_{\text{K}}$ wurde aus dem Verhältnis der Extrema der Tail-Ströme in 100 mM Rb^+ -Lösung und in 100 mM K^+ -Lösung berechnet. Dazu wurden die Kanäle durch Depolarisation für 2 s auf +40 mV aktiviert und die deaktivierenden Tail-Ströme bei -120 mV gemessen.

3.3.3.8 Das Rampenprotokoll

Das Rampenprotokoll simuliert in vereinfachter Form ein kardiales Aktionspotential (Hancox *et al.*, 1998) und ist geeignet, um die Wirkung von Medikamenten auf das Verhalten von HERG-Kanälen während eines Aktionspotentials abzuschätzen. Für dieses Protokoll wurde die Zellmembran vom Haltepotential auf +60 mV depolarisiert. Anschließend wurde die Membran im Verlauf von 1 s kontinuierlich auf -80 mV repolarisiert.

3.3.3.9 Analyse der Inhibition

Die Inhibition wurde als Reduktion der maximalen Stromamplitude oder – beim Rampenprotokoll – als Reduktion des Ladungsflusses analysiert (Gleichung 11).

$$f = 1 - \frac{2 \cdot I_{\max, drug}}{I_{\max, control} + I_{\max, wash out}} \quad (11)$$

(f: fraktionaler Block; $I_{\max, drug}$: maximale Stromamplitude unter Einfluss des Medikaments; $I_{\max, control}$: maximale Stromamplitude unter Kontrollbedingungen; $I_{\max, wash out}$: maximale Stromamplitude nach dem Auswasch des Medikaments)

Bei Experimenten in *Xenopus laevis* Oocyten wurde der Auswasch nicht berücksichtigt, der relative Block berechnet sich dann wie folgt:

$$f = 1 - \frac{I_{\max, drug}}{I_{\max, control}} \quad (12)$$

Die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition wurde mit einer Hill-Funktion beschrieben (Gleichung 12).

$$f = \frac{1}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{c_{drug}} \right)^h} \quad (13)$$

(f: fraktionaler Block; IC_{50} : Konzentration der halbmaximalen Inhibition; c_{drug} : Konzentration des Medikaments; h: Hill-Koeffizient)

3.3.3.10 Analyse des „onset of block“

Um die Entwicklung des Blocks eines Kanals zu analysieren, wurde für jeden Zeitpunkt des zu betrachtenden Pulses der Strom unter Medikamenteneinfluss durch den Strom unter Kontrollbedingungen dividiert. Der erhaltene Wert I_{Bupi}/I_{Kon} wurde gegen die Zeit aufgetragen und der zeitliche Verlauf – wenn möglich – mit einer Exponentialfunktion (Gleichung 7) beschrieben.

3.4 Computergestützte Sekundäranalysen

3.4.1 *Simulation kardialer Aktionspotentiale*

Die möglichen Auswirkungen der untersuchten Mutation KCNQ1_{A344V} auf ein kardiales Aktionspotential wurden mit einer modifizierten Version des Luo-Rudy-Modells („Luo-Rudy dynamic model“, (Luo & Rudy 1991; Faber & Rudy 2000)) für Kardiomyocyten des Meerschweinchens simuliert. Dieses Modell wurde von Stephan Binder im Rahmen seiner Diplomarbeit am ZMNH in eine leicht zu bedienende Programmoberfläche implementiert (Binder 2006). Für die Simulation wurde ein Intervall von 1000 ms zwischen dem Beginn zweier Aktionspotentiale verwendet. Es wurden 500 Zyklen durchlaufen, um Veränderungen in der Aktionspotentialdauer (APD), die zu Beginn der Simulation auftreten können, auszuschließen. Die Simulation wurde für epikardiale, endokardiale und midmyokardiale Zellen durchgeführt (Viswanathan *et al.*, 1999). Zusätzlich wurde die Wirkung von Bupivacain in zwei verschiedenen Konzentrationen (3 μM als klinisch relevante Plasmakonzentration und 30 μM als toxikologisch relevante Konzentration) auf das Aktionspotential simuliert. Dazu wurde eine Reduktion des Stromes durch Natriumkanäle (Nau *et al.*, 2000), L-Typ-Calciumkanäle (Rossner & Freese 1997) und die repolarisierenden Kaliumkanäle HERG und KCNQ1 simuliert; I_{to} ist im Luo-Rudy-Modell nicht vorhanden, da Meerschweinchen kein I_{to} besitzen. Dabei wurden folgende Werte für die Inhibition durch 3 μM bzw. 30 μM Bupivacain verwendet: 3 μM : I_{Na} 55%, I_{Kr} 15%, $I_{\text{L-Ca}}$ 5%; 30 μM : I_{Na} 90%, I_{Kr} 60%, $I_{\text{L-Ca}}$ 20%.

Das Simulationsprogramm berechnet automatisch die Dauer des Aktionspotentials (APD) als Zeitdifferenz zwischen dem Beginn der Depolarisation und 90% Repolarisation und gibt alle Daten im ASCII-Format aus.

3.4.2 *Modellierung der Kristallstruktur*

Die Ergebnisse des Alanin-Scans von KCNQ1 wurden mit Hilfe des Programms PyMOL (DeLano Scientific LLC, San Francisco, USA) in der Kristallstruktur von Kv1.2 (Long *et al.*, 2005a) modelliert. Dazu wurden die untersuchten Mutanten nach den elektrophysiologischen Ergebnissen in Gruppen eingeteilt und diese Gruppen jeweils farblich dargestellt. Der Übersichtlichkeit halber wurden nur die Porenhelices S5 und S6 dargestellt.

3.5 Lösungen

Soweit nicht anders angegeben wurden sämtliche Chemikalien in reinst Qualität von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

Levobupivacain, Dextrobupivacain, S-Ropivacain und R-Ropivacain wurden freundlicherweise von der Firma AstraZeneca (Södertalje, Schweden) zur Verfügung gestellt. Artcain wurde von Aventis (Frankfurt) erhalten. Für die elektrophysiologischen Experimente wurden diese Substanzen in der verwendeten extrazellulären Lösung gelöst.

3.5.1 Lösungen für molekularbiologische Methoden

TE-Puffer:	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	pH 7.5	
TAE-Puffer:	Tris-Acetat	0.05 mM
	EDTA	2 mM
	pH 8.0	
MOPS-Puffer:	MOPS	20 mM
	Natriumacetat	20 mM
	EDTA	1 mM
	pH 7.5	
DNA-Probenpuffer:	Formaldehyd	1.7%
	Ficoll 400	20% (w/v)
	Bromphenolblau	0.025% (w/v)
	Xylencyanol	0.025% (w/v)
	EDTA	100 mM

3.5.2 Nährmedien

LB-Medium	NaCl	10 g/l
	Casein-Extrakt	10 g/l
	Hefe-Extrakt	5 g/l
	pH 7.4	
	Ampicillin	100 mg/l

Das Nährmedium wurde nach dem Einstellen des pH-Wertes autoklaviert und vor Verwendung mit dem Antibiotikum versetzt.

LB-Platten:	15 g/l Agar in LB-Medium
	100 g/l Ampicillin

3.5.3 Lösungen für elektrophysiologische Arbeiten

3.5.3.1 Lösungen für Patch-Clamp-Messungen

intrazelluläre Standard-Lösung (ic 6):	KCl	160 mM
	MgCl ₂	0.5 mM
	HEPES	10 mM
	Na ₂ -ATP	2 mM
	pH 7.2 mit KOH	

intrazelluläre Lösung für EAG-Messungen:	KCl	125 mM
	CaCl ₂	1 mM
	MgCl ₂	1 mM
	EGTA	11 mM
	HEPES	10 mM
	Sucrose	10 mM
	Na ₂ -ATP	2 mM
	pH 7.2 mit KOH	

extrazelluläre Standard-Lösung (ec 6):	NaCl	135 mM
	KCl	5 mM
	CaCl ₂	2 mM

MgCl ₂	2 mM
HEPES	5 mM
Sucrose	10 mM
	pH 7.2 mit NaOH

extrazelluläre Lösung mit hoher Kalium-Konzentration:

NaCl	40 mM
KCl	100 mM
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	2 mM
HEPES	5 mM
Sucrose	10 mM
	pH 7.2 mit NaOH

3.5.3.2 Lösungen für Two-Electrode-Voltage-Clamp-Messungen

Tricain-Lösung für Anästhesie der Frösche: 0.6 g Tricain auf 500 ml Leitungswasser

Agar: 1 g Agar auf 30 ml 3 M KCl.

OR2 (Oocyten-Ringer-Lösung):	NaCl	82.5 mM
	KCl	2 mM
	MgCl ₂	1 mM
	HEPES	5 mM
		pH 7.5 mit NaOH

Gentamicin-Lösung:	NaCl	75 mM
	KCl	2 mM
	CaCl ₂	2 mM
	MgCl ₂	1 mM
	Na-Pyruvat	5 mM
	HEPES	5 mM
		pH 7.5 mit NaOH
	Gentamicin	59 µg/ml

Messlösungen

Standard-Messlösung (ND80):	NaCl	79.5 mM
	KCl	2 mM
	CaCl ₂	2 mM
	MgCl ₂	1 mM
	HEPES	5 mM
	pH 7.5 mit NaOH	
20 mM K ⁺ :	NaCl	97 mM
	KCl	20 mM
	CaCl ₂	1.8 mM
	HEPES	10 mM
	pH 7.5 mit NaOH	
140 mM K ⁺ :	KCl	135 mM
	CaCl ₂	1.8 mM
	MgCl ₂	1 mM
	HEPES	5 mM
	KOH	5 mM
	pH 7.5 mit KOH	
100 mM K ⁺ :	KCl	100 mM
	MgCl ₂	1.8 mM
	CaCl ₂	0.1 mM
	HEPES	5 mM
	pH 7.5 mit KOH	
100 mM Rb ⁺ :	RbCl	96 mM
	KCl	4 mM
	MgCl ₂	1.8 mM
	CaCl ₂	0.1 mM
	HEPES	5 mM
	pH 7.5 mit RbOH	

4 Ergebnisse

4.1 HERG

Die biophysikalischen und pharmakologischen Untersuchungen der HERG-Kanäle wurden sowohl in CHO-Zellen als auch in *Xenopus laevis* Oocyten durchgeführt. Dazu wurde zunächst in CHO-Zellen der Einfluss der Mutationen Y652A und F656A in der S6-Helix von HERG auf das Schaltverhalten der Kanäle sowie auf die Lokalanästhetika-Empfindlichkeit untersucht. Weitere Mutationen in der S6-Helix und in der Porenregion von HERG wurden dann in *Xenopus laevis* Oocyten analysiert.

4.1.1 Charakterisierung der Mutanten $HERG_{Y652A}$ und $HERG_{F656A}$ in CHO-Zellen

Um die pharmakologischen Effekte der Mutationen $HERG_{Y652A}$ und $HERG_{F656A}$ besser beurteilen zu können, war eine vorhergehende Charakterisierung dieser Mutanten nötig. Dazu wurden das Aktivierungs-, Deaktivierungs- und Inaktivierungsverhalten von $HERG_{wt}$ -Kanälen und mutierten HERG-Kanälen in CHO-Zellen untersucht. Die Expression der Mutante $HERG_{F656A}$ führte unter Standardbedingungen zu kaum messbaren Strömen. Die Charakterisierung dieser Mutante wurde daher mit hohem extrazellulären Kalium (100 mM, siehe 3.5.3.1) durchgeführt. Die Mutante $HERG_{Y652A}$ hingegen ließ sich auch unter Standardbedingungen gut messen.

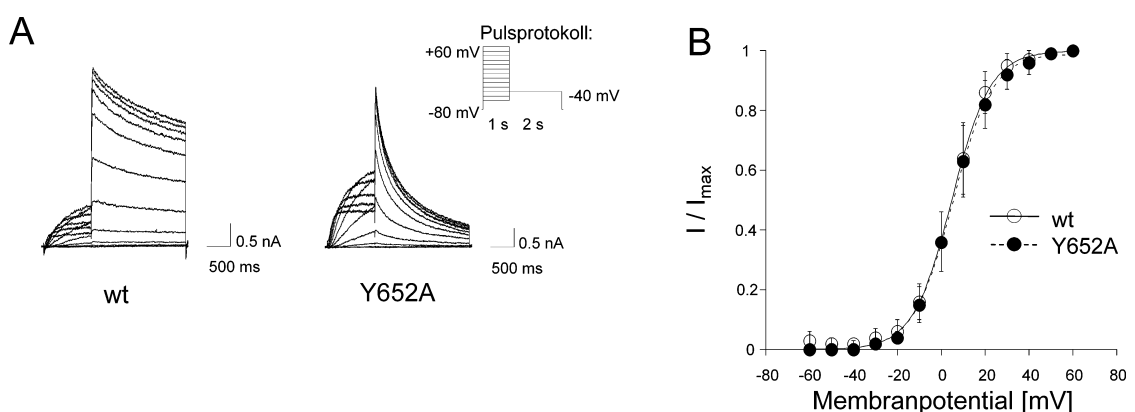


Abbildung 4.1: Aktivierung von $HERG_{wt}$ und $HERG_{Y652A}$ in CHO-Zellen.

(A) Beispielhafte Stromspuren der Aktivierung von $HERG_{wt}$ und $HERG_{Y652A}$. (B) Boltzmann-Fit der normierten maximalen Stromamplituden des Tail-Stromes. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung unterscheidet sich nicht.

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung unterschied sich nicht zwischen HERG_{wt} und $\text{HERG}_{\text{Y652A}}$ (wt: Spannung für die halbmaximale Aktivierung $V_{0.5} = 4.85 \pm 4.23$ mV, $k = 8.51 \pm 0.83$ mV, $n = 6$; Y652A: $V_{0.5} = 5.35 \pm 4.31$ mV, $k = 8.79 \pm 1.27$ mV, $n = 12$) (Abbildung 4.1). Ebenso war die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung nicht unterschiedlich (Abbildung 4.2). Beide Kanäle zeigten die typische Spannungsabhängigkeit eines Gleichrichter-Stroms.

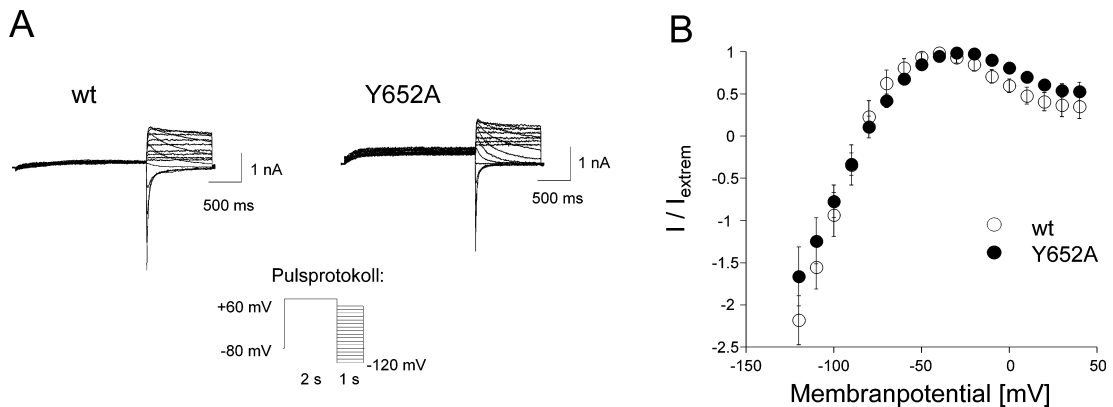


Abbildung 4.2: Deaktivierung von HERG_{wt} und $\text{HERG}_{\text{Y652A}}$ in CHO-Zellen.

(A) Exemplarische Stromspuren von HERG_{wt} und $\text{HERG}_{\text{Y652A}}$, die durch das Deaktivierungsprotokoll hervorgerufen wurden. (B) Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung. Die Extremwerte der Stromamplituden des Tail-Stromes wurden auf das Maximum normiert.

Ein deutlicher Unterschied zeigte sich jedoch bei der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung (Abbildung 4.3 A und B). Der Inaktivierungsmittelpunkt war bei der Mutante $\text{HERG}_{\text{Y652A}}$ deutlich zu positiveren Potentialen hin verschoben ($V_{0.5} = -36.2 \pm 10.6$ mV, $n = 6$ für $\text{HERG}_{\text{Y652A}}$ gegenüber $V_{0.5} = -69.6 \pm 7.8$ mV, $n = 7$ für HERG_{wt} ; $p < 0.05$). Auch die Inaktivierungszeitkonstanten, die mit dem Protokoll für die instantane Aktivierung bestimmt wurden, unterschieden sich signifikant. Die Inaktivierung wurde durch die Mutation Y652A beschleunigt (Abbildung 4.3 C und D).

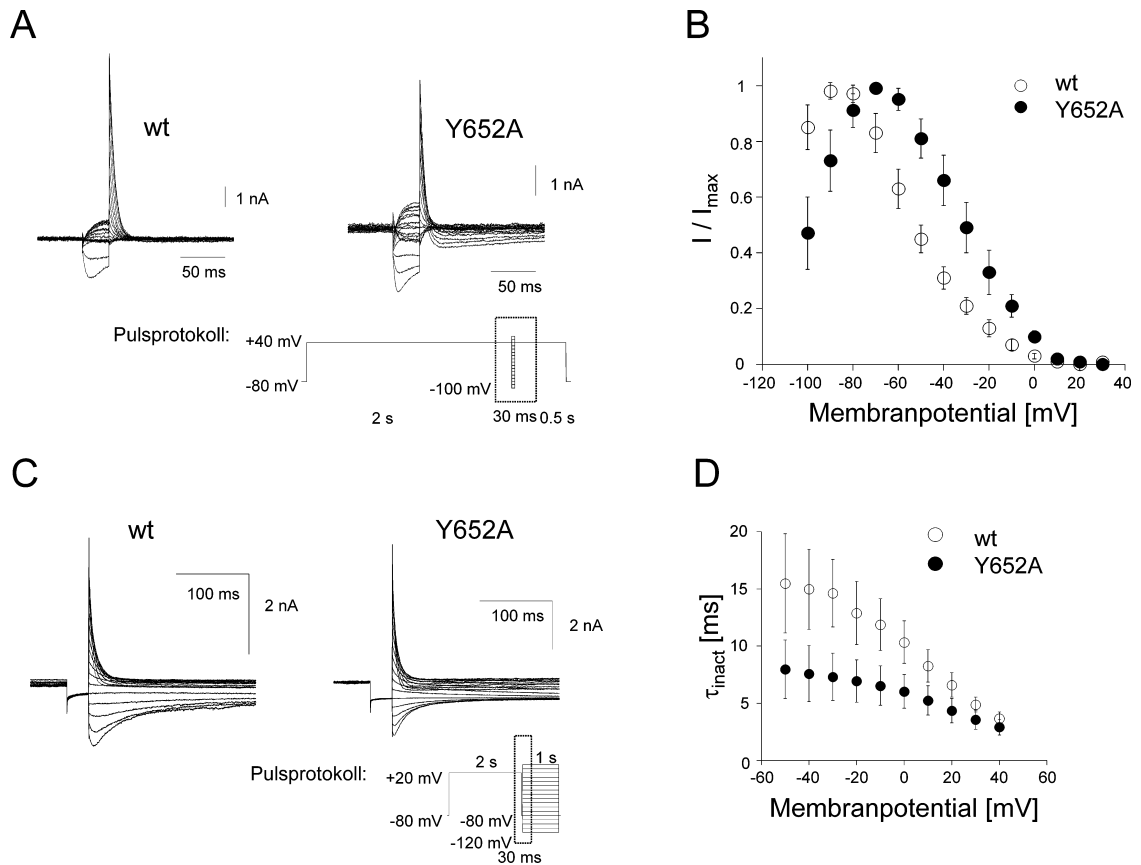


Abbildung 4.3: Inaktivierungsverhalten von $HERG_{wt}$ und $HERG_{Y652A}$ in CHO-Zellen.

(A) Ausschnitt aus der Stromantwort von $HERG_{wt}$ und $HERG_{Y652A}$ auf das Inaktivierungsprotokoll. (B) Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung. Der Inaktivierungsmittelpunkt wird durch die Mutation $HERG_{Y652A}$ zu positiveren Werten hin verschoben. Der Strom der instantanen Aktivierung wurde gemessen (C) und die Inaktivierungszeitkonstanten bei verschiedenen Spannungen analysiert (D).

Für die pharmakologischen Untersuchungen der HERG-Kanäle wurde ein Rampenprotokoll verwendet, das ein kardiales Aktionspotential simuliert (Hancox *et al.*, 1998). Sowohl bei $HERG_{wt}$ als auch bei $HERG_{Y652A}$ führte dieses Protokoll zu einer glockenförmigen Stromantwort (Abbildung 4.4). Der Verlauf dieser Stromantwort unterschied sich zwischen den beiden Kanälen insofern, dass der maximale Strom während der Depolarisation bei $HERG_{Y652A}$ früher erreicht wurde als bei $HERG_{wt}$. Die durchschnittliche Zeit bis zum Erreichen der maximalen Amplitude betrug 723 ± 10 ms für $HERG_{wt}$ ($n = 116$) und 615 ± 12 ms für $HERG_{Y652A}$ ($n = 91$). Diese Werte entsprachen während des Rampenprotokolls angelegten Spannungen von -40 ± 1 mV ($HERG_{wt}$) bzw. von -26 ± 2 mV ($HERG_{Y652A}$). Da sich die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung nicht unterschied, könnte man vermuten, dass die Ursache für diesen Unterschied im Inaktivierungsverhalten der beiden Kanäle liegt.

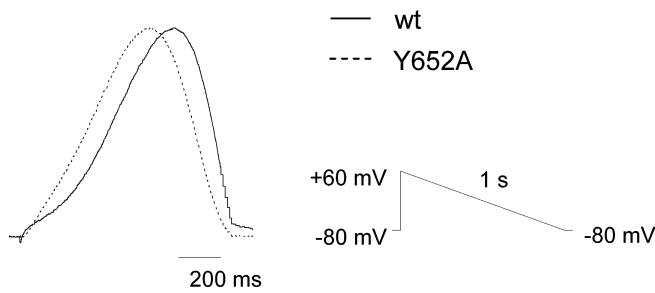


Abbildung 4.4: Rampen-Protokoll. Stromantwort von $HERG_{wt}$ - und $HERG_{Y652A}$ -Kanälen (normierte Darstellung) auf das Rampen-Protokoll. Dieses Protokoll simuliert ein kardiales Aktionspotential und führt bei $HERG_{wt}$ - und $HERG_{Y652A}$ -Kanälen zu einer glockenförmigen Stromantwort.

Die Mutante $HERG_{F656A}$ konnte nur mit hoher extrazellulärer Kaliumkonzentration untersucht werden. Um die unter diesen Bedingungen erhaltenen Daten besser einschätzen zu können, wurden $HERG_{wt}$ - und $HERG_{Y652A}$ -Kanäle ebenfalls mit hoher extrazellulärer Kaliumkonzentration untersucht (Abbildung 4.5).

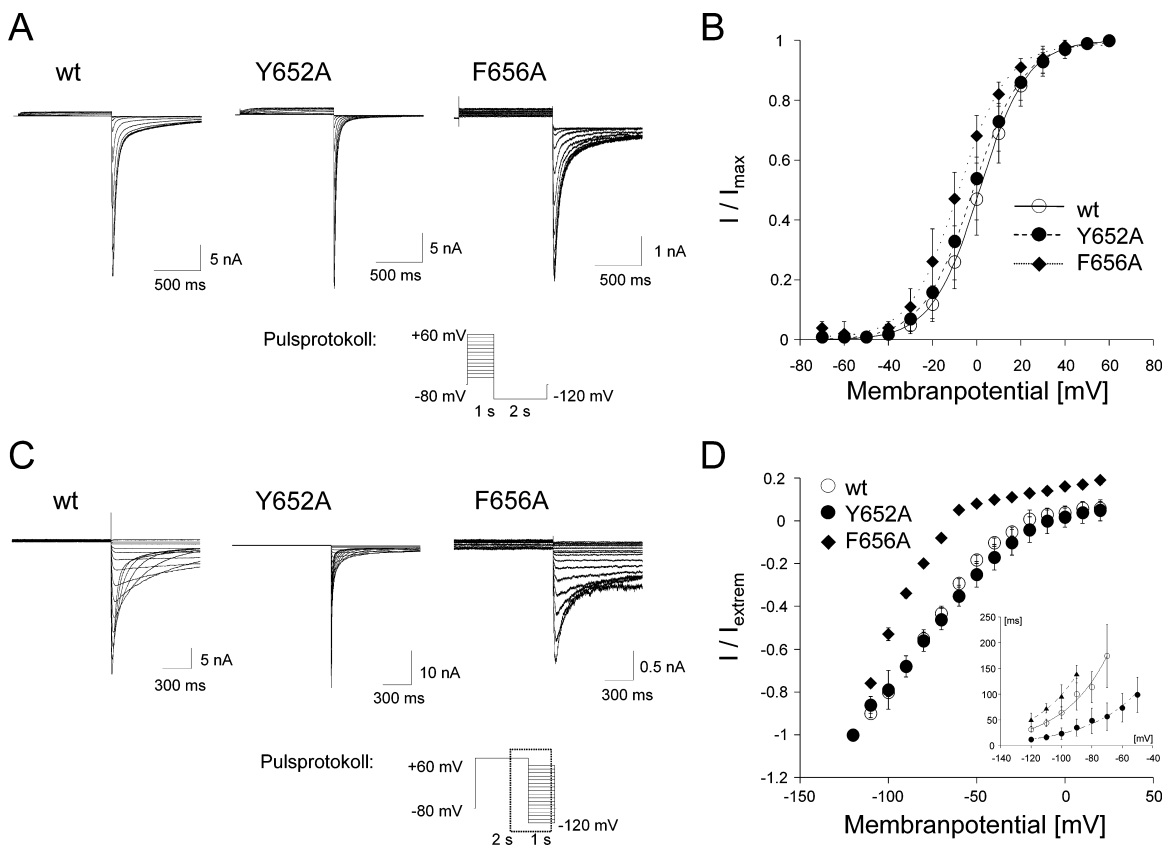


Abbildung 4.5: Aktivierungs- und Deaktivierungsverhalten bei 100 mM extrazellulärem K^+ .

(A) Ströme durch $HERG_{wt}$ - $HERG_{Y652A}$ - und $HERG_{F656A}$ -Kanäle, gemessen in CHO-Zellen bei 100 mM extrazellulärem K^+ mit dem Aktivierungsprotokoll (kleines Bild). (B) Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. (C) Ausschnitt aus Stromspuren, die mit dem Deaktivierungsprotokoll erhalten wurden. (D) Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung (großes Bild) und der schnellen Deaktivierungszeitkonstanten (kleines Bild).

Die Stromdichte von $HERG_{F656A}$ war deutlich geringer als die von $HERG_{wt}$ oder $HERG_{Y652A}$ (968 ± 475 pA/pF für $HERG_{wt}$; 571 ± 272 pA/pF für $HERG_{Y652A}$;

129 ± 49 pA/pF für HERG_{F656A}; n = 5). Dabei unterschieden sich die Werte für HERG_{wt} und HERG_{Y652A} nicht signifikant.

Die Aktivierung von HERG_{wt} und HERG_{Y652A}-Kanälen unterschied sich auch unter diesen Bedingungen nicht (Abbildung 4.5 A und B; HERG_{wt}: $V_{0.5} = 1.4 \pm 4.7$ mV, n = 6; HERG_{Y652A}: $V_{0.5} = -1.7 \pm 6.8$ mV, n = 6, $p > 0.05$). Der Aktivierungsmittelpunkt der Mutante HERG_{F656A} war jedoch signifikant zu negativeren Potentialen hin verschoben (Abbildung 4.5 B; HERG_{F656A}: $V_{0.5} = -8.9 \pm 4.5$ mV, n = 7, $p < 0.05$). Das Deaktivierungsverhalten der Kanäle wurde auch bei hohem extrazellulärem Kalium untersucht (Abbildung 4.5 C). Die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung von HERG_{F656A}-Kanälen unterschied sich deutlich von HERG_{wt} und HERG_{Y652A} und war ebenfalls zu negativeren Potentialen hin verschoben (Abbildung 4.5 D). Die Deaktivierungszeitkonstanten wurden durch beide Mutationen verändert. Die Mutation Y652A beschleunigte die Deaktivierung gegenüber dem Wildtyp, während die Mutation F656A die Deaktivierung verlangsamt (Abbildung 4.5 D, kleines Bild).

4.1.2 Lokalanästhetika-Empfindlichkeit von $HERG_{wt}$, $HERG_{Y652A}$ und $HERG_{F656A}$ in CHO-Zellen

In CHO-Zellen wurde mit dem Rampenprotokoll die Wirkung verschiedener Lokalanästhetika auf $HERG_{wt}$ und $HERG_{Y652A}$ untersucht. Dabei wurden Bupivacain (als Racemat), Levobupivacain, S(-)- und R(+)-Ropivacain, Mepivacain (als Racemat) und Articain verwendet. Die Ströme durch beide Kanäle wurden konzentrationsabhängig und reversibel inhibiert (Abbildung 4.6). Bei allen untersuchten Substanzen war die Inhibition von $HERG_{wt}$ -Kanälen stärker ausgeprägt als die Inhibition von $HERG_{Y652A}$ -Kanälen.

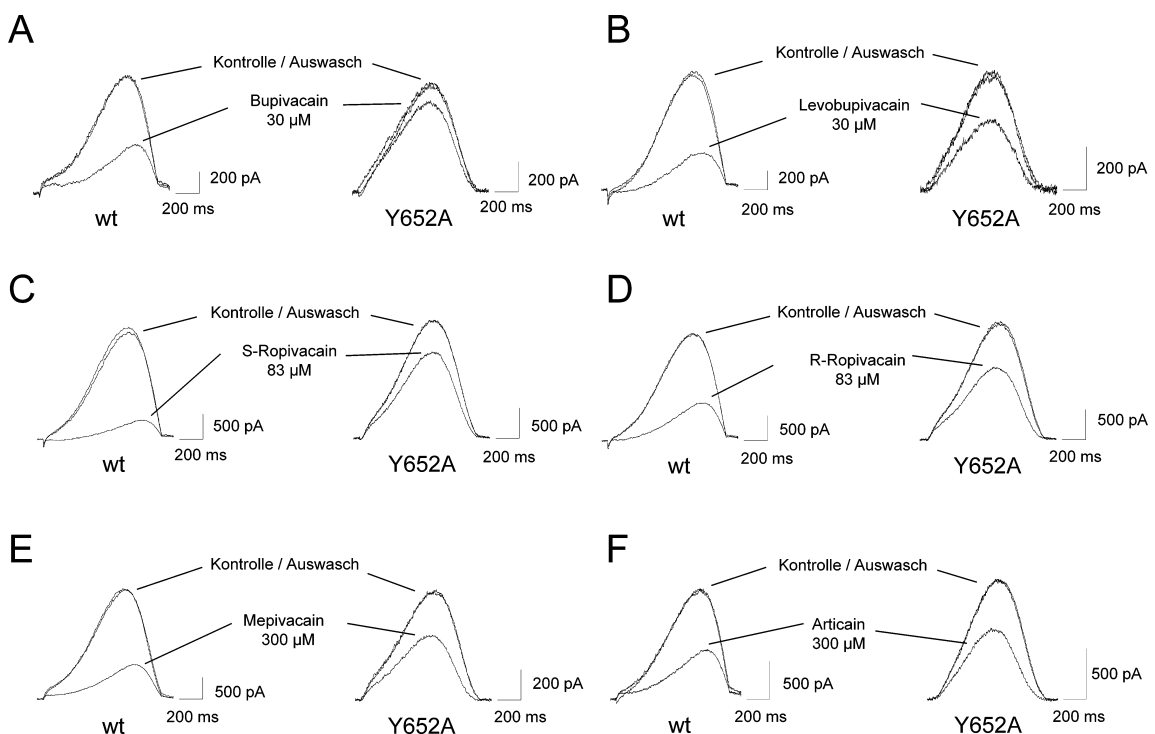


Abbildung 4.6: Inhibition von $HERG_{wt}$ und $HERG_{Y652A}$ durch verschiedene Amid-Lokalanästhetika. Inhibition der durch das Rampen-Protokoll evozierten Ströme in $HERG_{wt}$ und $HERG_{Y652A}$ -Kanälen durch Bupivacain (A), Levobupivacain (B), S-Ropivacain (C), R-Ropivacain (D), Mepivacain (E) und Articain (F). Bei allen Substanzen war die Inhibition von $HERG_{wt}$ stärker ausgeprägt als die Inhibition von $HERG_{Y652A}$.

Die Inhibition wurde sowohl als Reduktion des maximalen Stroms wie auch als Reduktion des Ladungsflusses während der gesamten Depolarisation berechnet. Die Art der Auswertung beeinflusste die Konzentrations-Wirkungs-Kurven kaum (Abbildung 4.7) und auch die Parameter der entsprechenden Hill-Fits waren sehr ähnlich (Tabelle 4.1). Die Mutation $HERG_{Y652A}$ führte zu einer reduzierten Empfindlichkeit für Lokalanästhetika aus der homologen Reihe Bupivacain, Ropivacain und Mepivacain; die IC_{50} -Werte waren 3- bis 10-mal größer. Deutlich geringer ist der Effekt der

Mutation auf die Inhibition durch Articain, der IC_{50} -Wert war hier nur um den Faktor 1.6 erhöht. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven unterschieden sich jedoch in allen Fällen signifikant.

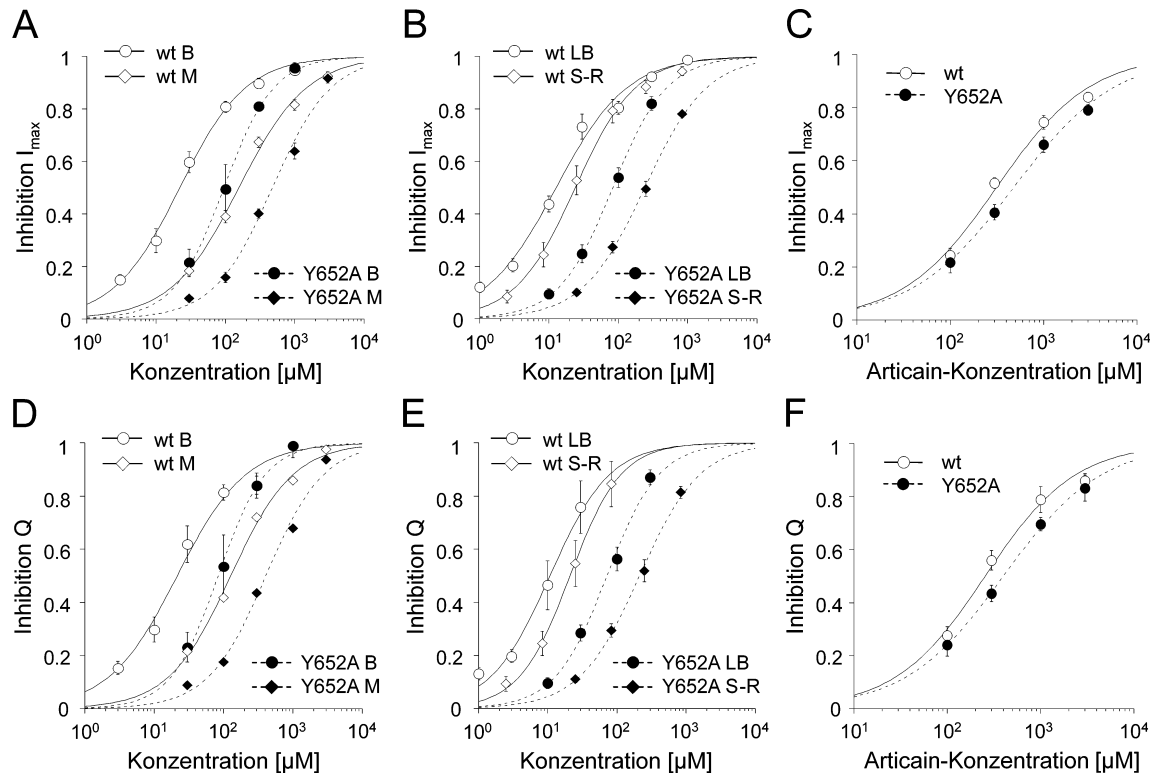


Abbildung 4.7: Konzentrations-Wirkungskurven.

Konzentrations-Wirkungskurven für die Inhibition des maximalen Stromes I_{max} (A-C) und des Ladungsflusses Q (D-F) durch HERG_{wt}- und HERG_{Y652A}-Kanäle durch Bupivacain (A, D; ○●), Mepivacain (A, D; ◇◆), Levobupivacain (B, E; ○●), S-Ropivacain (B, E; ◇◆) und Articain (C, F). Die Kurven wurden für HERG_{wt} (offene Symbole) und HERG_{Y652A} (geschlossene Symbole) mit einer Hill-Funktion gefittet. Die Parameter der Hill-Fits sind in Tabelle 4.1 zu finden.

Besonders ausgeprägt war die Reduktion der Sensitivität durch die Mutation Y652A bei S-Ropivacain. Eine Ursache hierfür könnte in der Stereoselektivität des Blocks von HERG-Kanälen liegen. Wie auch aus Abbildung 4.6 ersichtlich, war die Inhibition von HERG_{wt}-Kanälen durch Levobupivacain (Abbildung 4.6 B) stärker ausgeprägt als bei racemischem Bupivacain (Abbildung 4.6 A und Tabelle 4.1). Ebenso waren HERG_{wt}-Kanäle empfindlicher für S-Ropivacain als für R-Ropivacain (vgl. Abbildung 4.6 C und D). Diese Stereoselektivität veränderte sich durch die Mutation Y652A. Die Inhibition durch R-Ropivacain war hier stärker als durch S-Ropivacain (vgl. Abbildung 4.6 C und D). Diese Unterschiede in der Inhibition wurden in gepaarten Experimenten mit den reinen Enantiomeren näher untersucht. Dazu wurden Konzentrationen nahe des IC_{50} für HERG_{wt} und HERG_{Y652A} gewählt. Wie bereits in anderen Untersuchungen (Gonzalez *et al.*, 2002a) gezeigt wurde, wurden HERG_{wt}-Kanäle sowohl bei Bupivacain als auch bei

Ropivacain stärker durch das S-Enantiomer als durch das R-Enantiomer inhibiert (Abbildung 4.8 A). Die Mutante HERG_{Y652A} wies für die Inhibition durch Bupivacain dieselbe Stereoselektivität auf, bei Ropivacain zeigte sich jedoch eine stärkere Inhibition durch das R-Enantiomer als durch das S-Enantiomer (Abbildung 4.8 B).

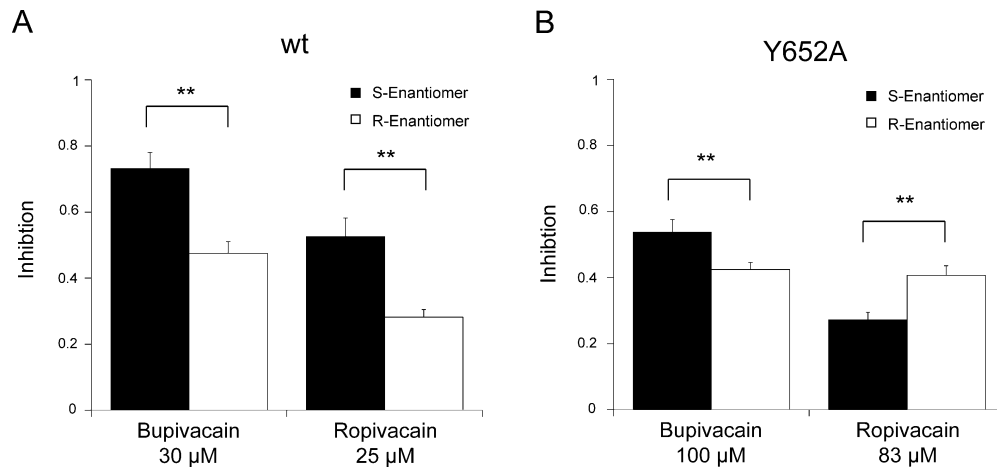


Abbildung 4.8: Stereoselektive Effekte des Blocks durch Bupivacain und Ropivacain.

Die Stereoselektivität des Blocks von HERG_{wt}- (A) und HERG_{Y652A}-Kanälen (B) durch Bupivacain und Ropivacain wurde in gepaarten Experimenten bei Konzentrationen nahe des IC₅₀-Wertes untersucht. (n = 5-8 pro Konzentration; ** p < 0.001)

(A) Inhibition des maximalen Stroms während des Rampen-Protokolls.

Substanz	wt			Y652A		
	IC ₅₀ [µM]	Hill	n	IC ₅₀ [µM]	Hill	n
Bupivacain	21.9 ± 1.6	0.91 ± 0.06	31	95.2 ± 5.0	1.21 ± 0.07	38
Levobupivacain	12.7 ± 1.4	0.85 ± 0.07	41	82.9 ± 3.2	1.11 ± 0.05	25
S-Ropivacain	23.9 ± 1.6	1.00 ± 0.06	50	240 ± 9.5	0.97 ± 0.04	27
Mepivacain	156 ± 11	0.89 ± 0.06	28	476 ± 50	1.03 ± 0.10	27
Articain	224 ± 5.7	1.17 ± 0.03	23	360 ± 48	0.93 ± 0.08	26

(B) Inhibition des Ladungsflusses während des Rampen-Protokolls.

Substanz	wt			Y652A		
	IC ₅₀ [µM]	Hill	n	IC ₅₀ [µM]	Hill	n
Bupivacain	21.5 ± 3.4	0.88 ± 0.12	31	83.9 ± 5.9	1.27 ± 0.11	38
Levobupivacain	10.8 ± 1.2	1.01 ± 0.12	41	71.8 ± 5.9	1.16 ± 0.11	26
S-Ropivacain	21.0 ± 0.8	1.18 ± 0.05	48	212 ± 13	1.00 ± 0.06	27
Mepivacain	127 ± 10	0.96 ± 0.07	28	408 ± 43	1.04 ± 0.11	27
Articain	194 ± 3.8	1.22 ± 0.03	22	353 ± 52	0.89 ± 0.08	26

Tabelle 4.1: Parameter der Hill-Fits für die Inhibition von HERG-Kanälen in CHO-Zellen.

Aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden mit Hilfe eines Hill-Fits die Konzentration der halbmaximalen Inhibition (IC₅₀) und der Hill-Koeffizient (Hill) bestimmt. N bezeichnet die Anzahl der Experimente. Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben.

Zusätzlich zur Reduktion der maximalen Stromamplitude führte die Applikation der Lokalanästhetika zu einer Veränderung des Zeitpunktes, an dem der maximale Strom erreicht wird („time to peak“). Dabei war bei $HERG_{wt}$ -Strömen eine Rechtsverschiebung des Maximum zu erkennen, entsprechend einer längeren Dauer bis zum Erreichen des maximalen Stroms, während bei $HERG_{Y652A}$ -Strömen eine Linksverschiebung vorlag. Diese Verschiebung des Maximum war konzentrationsabhängig. Abbildung 4.9 zeigt die Verschiebung des Maximums im Vergleich zur Kontrolle (Δ time to peak) für verschiedene Bupivacain-Konzentrationen.

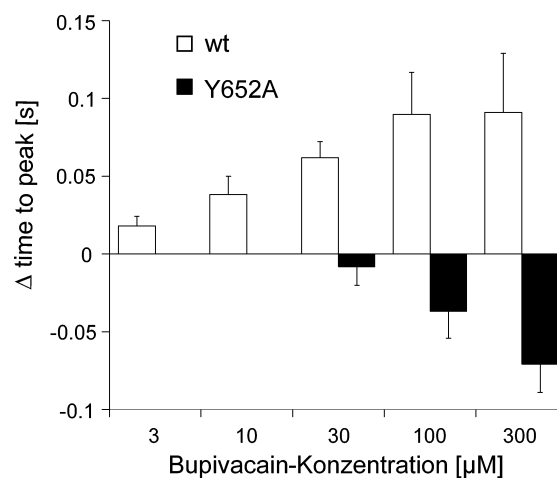


Abbildung 4.9: Konzentrationsabhängigkeit der Verschiebung des Zeitpunktes der maximalen Stromamplitude (Δ time to peak).

Die Spannungsabhängigkeit der Inhibition von $HERG_{wt}$ - und $HERG_{Y652A}$ -Kanälen durch Bupivacain wurde mit Hilfe des instantanen Aktivierungsprotokolls analysiert. Dazu wurden Konzentrationen nahe der zuvor ermittelten IC_{50} -Werte verwendet (20 μ M für $HERG_{wt}$; 90 μ M für $HERG_{Y652A}$). Ausschnitte aus exemplarischen Stromspuren sind in Abbildung 4.10 dargestellt.

Die Inhibition von $HERG_{wt}$ - und $HERG_{Y652A}$ -Kanälen war nicht spannungsabhängig (Abbildung 4.11 A). Der Einfluss von Bupivacain auf die Inaktivierungs- und Deaktivierungszeitkonstanten wurde ebenfalls anhand dieser Messungen analysiert. Die Inaktivierung von $HERG_{wt}$ wurde durch die Applikation von Bupivacain beschleunigt; bei $HERG_{Y652A}$ war kein signifikanter Unterschied festzustellen (Abbildung 4.11 B). Die Deaktivierung bei -120 mV wurde mit einer biexponentiellen Funktion gefittet. Beide Zeitkonstanten wurden durch Bupivacain signifikant vergrößert (Abbildung 4.11 C und D). Dieser Effekt war bei $HERG_{wt}$ stärker ausgeprägt als bei $HERG_{Y652A}$.

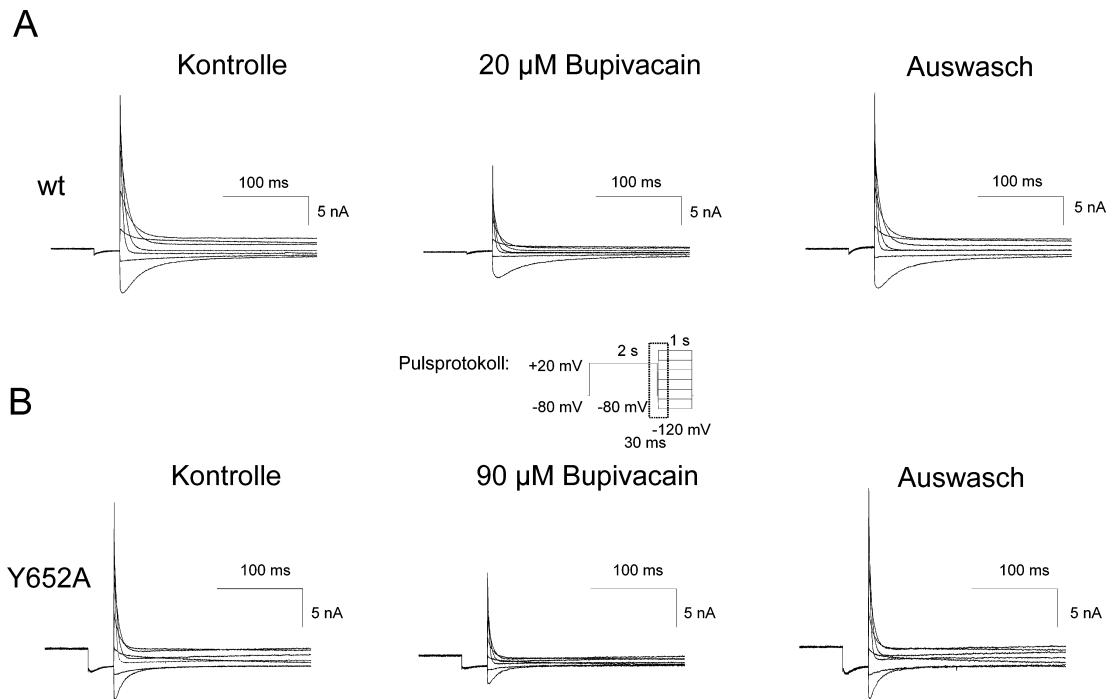


Abbildung 4.10: Bupivacain-Wirkung auf die instantane Aktivierung von HERG-Kanälen.

Ausschnitte aus beispielhaften Stromspuren, hervorgerufen durch das instantane Aktivierungsprotokoll (kleines Bild) in HERG_{wt} (A) und $\text{HERG}_{\text{Y652A}}$ -Kanälen (B) unter Kontrollbedingungen, nach Applikation von 20 μM bzw. 90 μM Bupivacain und nach Auswasch der Substanz.

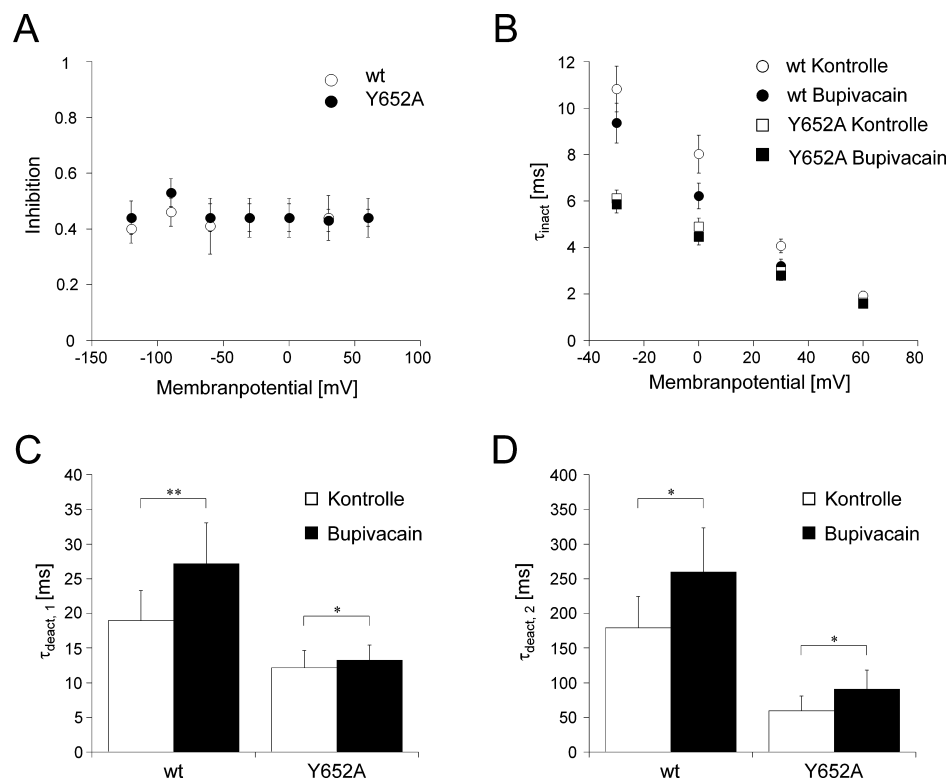


Abbildung 4.11: Analyse des Einflusses von Bupivacain auf die instantane Aktivierung.

(A) Spannungsabhängigkeit der Inhibition von HERG_{wt} - und $\text{HERG}_{\text{Y652A}}$ -Kanälen. (B) Spannungsabhängigkeit der Inaktivierungszeitkonstanten unter Kontrollbedingungen und unter Bupivacain-Einfluss. Sowohl die schnelle (C) als auch die langsame (D) Deaktivierungszeitkonstante bei -120 mV wurde durch Bupivacain vergrößert.

Die Lokalanästhetika-Empfindlichkeit der Mutante $HERG_{F656A}$ wurde bei hoher extrazellulärer Kalium-Konzentration untersucht. Zum Vergleich erfolgte ebenfalls eine Untersuchung von $HERG_{wt}$ - und $HERG_{Y652A}$ -Kanälen unter diesen Bedingungen. Dazu wurde die Reduktion der einwärtsgerichteten Tail-Ströme bei -120 mV nach Aktivierung der Kanäle durch eine Depolarisation auf $+20$ mV für 2 s analysiert (Abbildung 4.12).

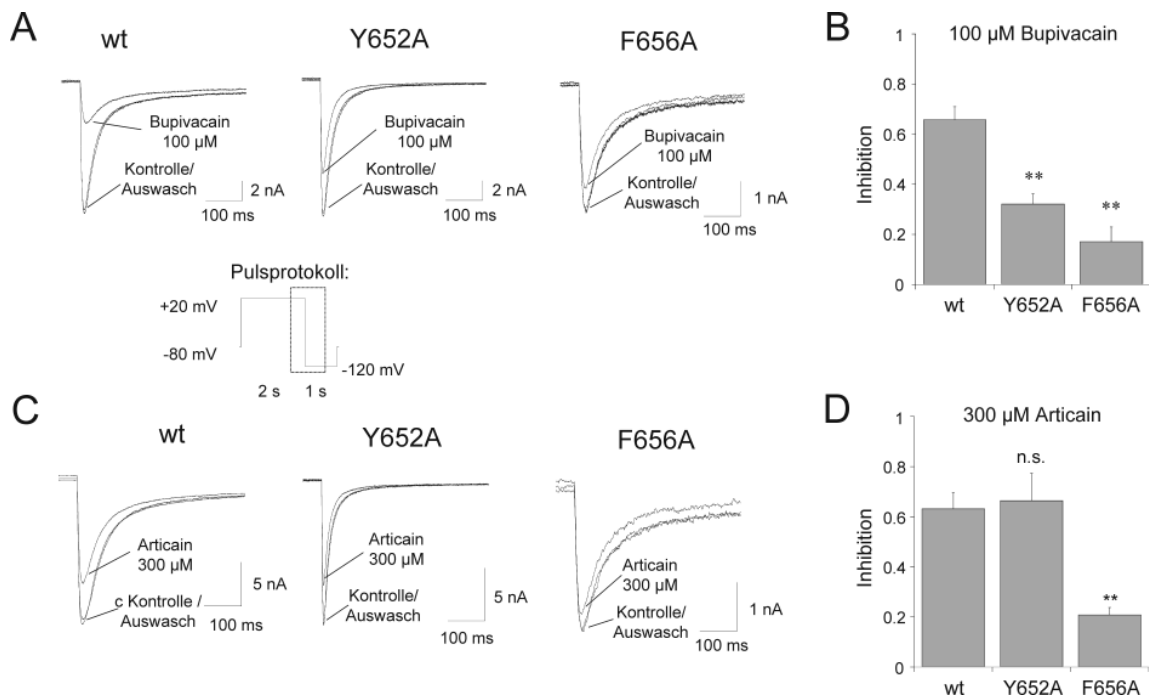


Abbildung 4.12: Inhibition von HERG-Kanälen durch Bupivacain und Articain in 100 mM K^+ .

(A, B) Ausschnitte der einwärts gerichteten Tail-Ströme durch $HERG_{wt}$ -, $HERG_{Y652A}$ - und $HERG_{F656A}$ -Kanäle unter Kontrollbedingungen, nach Applikation von 100 µM Bupivacain (A) bzw. 300 µM Articain (B) und nach Auswasch der Substanzen. (C, D) Zusammenfassende Analyse der Inhibition durch 100 µM Bupivacain (C) (n = 5) und 300 µM Articain (D) (n = 6-7). (** p < 0.001; n.s. nicht signifikant p > 0.05)

Die Applikation von 100 µM Bupivacain führte bei allen drei Kanälen zu einer reversiblen Inhibition, die bei den beiden Mutanten geringer ausgeprägt war als beim Wildtyp, wobei $HERG_{Y652A}$ -Kanäle stärker inhibiert wurden als $HERG_{F656A}$ -Kanäle (Abbildung 4.12). Bei der Applikation von 300 µM Articain hingegen war kein Unterschied in der Inhibition von $HERG_{wt}$ und $HERG_{Y652A}$ -Kanälen festzustellen. Durch die Mutation F656A wurde die Inhibition durch Articain jedoch signifikant reduziert.

Aufgrund der geringen Empfindlichkeit von $HERG_{F656A}$ -Kanälen wurden keine kompletten Konzentrations-Wirkungskurven analysiert. Stattdessen wurde die Inhibition der Mutante $HERG_{F656A}$ im Vergleich zu $HERG_{wt}$ durch die verschiedenen

Lokalanästhetika bei einer Konzentration von jeweils 1 mM untersucht (Abbildung 4.13). Bei allen Substanzen wurde die Inhibition durch die Mutation F656A reduziert. Die Rangfolge der inhibitorischen Potenz Bupivacain>Ropivacain>Mepivacain blieb jedoch erhalten. Allerdings wurde durch die Mutation F656A, wie auch schon durch Y652A, die Stereoselektivität der Inhibition durch Ropivacain umgekehrt.

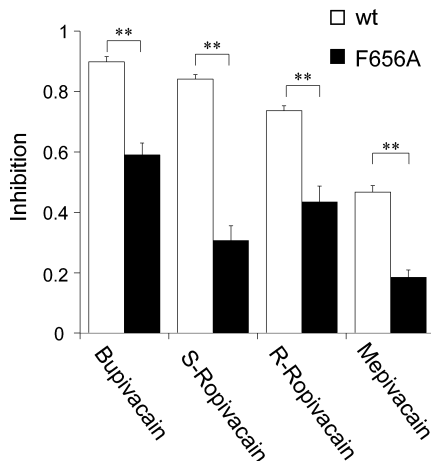


Abbildung 4.13: Inhibition von $HERG_{wt}$ und $HERG_{F656A}$. Vergleich der Inhibition von $HERG_{wt}$ und $HERG_{F656A}$ -Tail-Strömen durch 1 mM Bupivacain, S Ropivacain, R- Ropivacain und Mepivacain.

(n = 3-7 pro Datenpunkt; ** p < 0.01)

Der Einfluss der Inhibition durch Bupivacain auf die Deaktivierungskinetik der verschiedenen Kanäle bei hoher extrazellulärer K^+ -Konzentration wurde detailliert untersucht (Abbildung 4.14). Bei $HERG_{wt}$ -Kanälen führte die Inhibition durch 100 μ M Bupivacain zu einer Verlangsamung der Deaktivierung. Sowohl die schnelle als auch die langsame Zeitkonstante waren nach Bupivacain-Applikation größer als unter Kontrollbedingungen. Bei den beiden Mutanten hingegen führte die Inhibition durch Bupivacain (100 μ M bei $HERG_{Y652A}$; 1 mM bei $HERG_{F656A}$) zu einer schnelleren Deaktivierung.

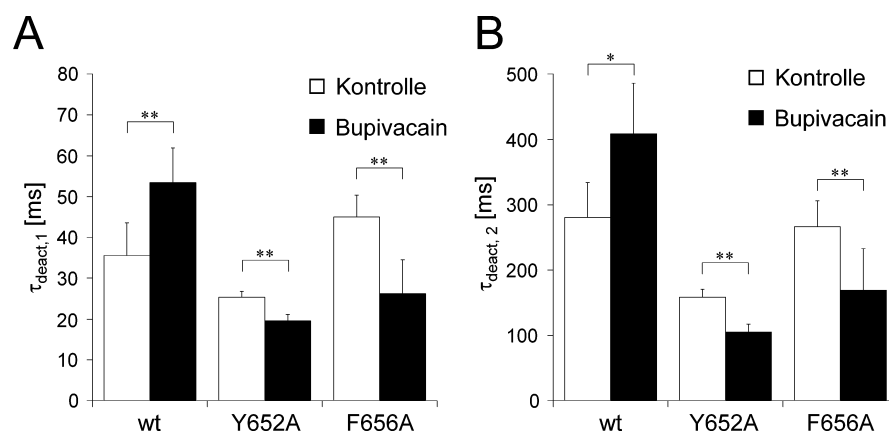


Abbildung 4.14: Einfluss von Bupivacain auf die Kinetik der Deaktivierung.

Einfluss von 100 μ M Bupivacain (bei wt und Y652A) bzw. 1 mM Bupivacain (bei F656A) auf die schnelle (A) und langsame (B) Zeitkonstante der Deaktivierung von $HERG_{wt}$ -, $HERG_{Y652A}$ - und $HERG_{F656A}$ -Kanälen. (n = 5 für jedes Konstrukt; * p < 0.05; ** p < 0.01).

4.1.3 Charakterisierung weiterer Mutanten in der S6-Region in *Xenopus laevis* Oocyten

Um die Bindung von Lokalanästhetika an HERG-Kanäle genauer zu charakterisieren, wurden weitere Mutationen in der Porenregion und in der S6-Domäne eingeführt. Dabei wurden die Aminosäurereste T623, S624 und V625 nahe der Porenregion und G648 in der S6-Region zu Alanin mutiert. Von diesen Aminosäureresten wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass sie an der Bindung sogenannter „high affinity“-Blocker beteiligt sind (Mitcheson *et al.*, 2000a; Kamiya *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2004; Kamiya *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass diese Reste in den Hohlraum unterhalb des Selektivitätsfilters („Cavity“) hineinragen. Es ist jedoch unklar, welche Rolle diese Seitenketten bei der Interaktion von HERG-Kanälen mit weniger potenten Blockern wie Lokalanästhetika spielen. Des Weiteren wurden die aromatischen Aminosäuren Y652 und F656 zu Threonin mutiert, um zu überprüfen, wie wichtig die Aromatizität an diesen Positionen für die Interaktion mit Bupivacain ist. Alle Untersuchungen mit diesen Mutanten wurden in *Xenopus laevis* Oocyten durchgeführt, da in diesem Messsystem auch Mutanten mit geringer Expression gut analysiert werden können und längere Messprotokolle als in CHO-Zellen möglich sind.

Um die Effekte der Mutationen auf die pharmakologische Empfindlichkeit besser einschätzen zu können, wurden diese Mutanten zuvor in ihrem Schaltverhalten charakterisiert. Beispielhafte Stromantworten, die mit dem Aktivierungsprotokoll hervorgerufen wurden, sind in Abbildung 4.15 zu sehen. Die Tail-Ströme wurden bei –120 mV analysiert, da einige Mutanten (T623A, V625A und F656A) nur sehr geringe Auswärtsströme zeigten.

Zwei der Mutanten, G648A und Y652T, zeigten eine sehr schlechte Expression mit geringen Stromdichten unter Standardbedingung, so dass diese Mutanten bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 20 mM untersucht wurden (Abbildung 4.15 B). Diese Konzentration wurde gewählt, um größere Einwärtsströme bei negativen Potentialen messen zu können. Andererseits sollte die Inhibition der HERG-Kanäle, die, wie in CHO-Zellen gezeigt, von der Kaliumkonzentration abhängig ist, nicht zu stark beeinflusst werden. HERG_{wt}-Kanäle wurden unter diesen Bedingungen ebenfalls analysiert, um die Effekte der Mutationen beurteilen zu können.

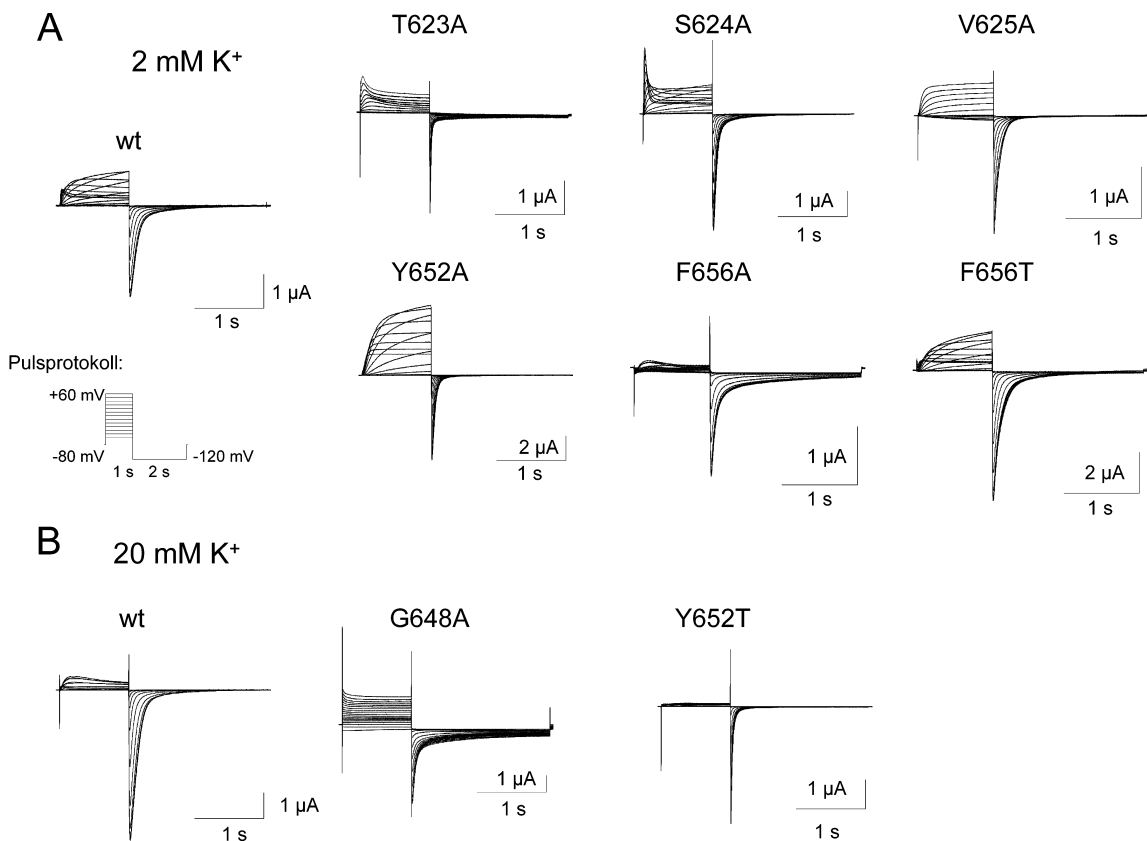


Abbildung 4.15: Aktivierungsverhalten der verschiedenen HERG-Mutanten.

Beispielhafte Stromspuren, die mit dem Aktivierungsprotokoll bei 2 mM extrazellulärem K⁺ (A) und bei 20 mM extrazellulärem K⁺ (B) hervorgerufen wurden. Die Tail-Ströme wurden bei -120 mV gemessen.

Die Mutanten S624A, Y652A und F656T waren in ihrem Schaltverhalten HERG_{wt}-Kanälen sehr ähnlich. Die Größe des maximalen Stroms am Ende der Depolarisation in Abhängigkeit vom Membranpotential zeigte den für HERG-Kanäle typischen glockenförmigen Verlauf (Abbildung 4.16 A und B). Bei den Mutanten T623A und V625A zeigte sich jedoch eine lineare Zunahme der Stromamplitude mit der Membranspannung (Abbildung 4.16 A), die Einwärtsrektifizierung wurde durch diese Mutationen aufgehoben. Bei der Mutante F656A waren die Auswärtsströme so gering, dass eine Analyse nicht möglich war. Bei 20 mM extrazellulärem K⁺ war die Analyse der Auswärtsströme wegen der geringeren Amplitude schwieriger als bei 2 mM extrazellulärem K⁺. Für HERG_{wt} war trotzdem ein glockenförmiger Verlauf der maximalen Amplitude zu erkennen (Abbildung 4.16 C). Dieses Verhalten war bei der Mutante Y652T nicht so deutlich ausgeprägt. Einen vollkommen anderen Verlauf zeigt die Mutante G648A. Diese Kanäle waren auch bei negativen Membranpotentialen kontinuierlich geöffnet (Abbildung 4.16 C) und ähnelten in ihrem Verhalten Leckkanälen.

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, die über die Amplituden der Tail-Ströme bei -120 mV bestimmt wurde, unterschied sich bei fast allen Mutanten signifikant vom Wildtyp (Abbildung 4.16 D-F und Tabelle 4.2). Nur der $V_{0.5}$ -Wert der Mutante Y652A war nicht signifikant unterschiedlich. Bei den Mutanten T623A und S624A in der Porenregion verschob sich der Aktivierungsmittelpunkt um etwa 8 mV bzw. 6 mV zu positiveren Potentialen. Für alle anderen Mutanten wurde der Aktivierungsmittelpunkt zu negativeren Potentialen verschoben. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung beim Wildtyp wurde durch die extrazelluläre K^+ -Konzentration nicht signifikant verändert und betrug -9.4 ± 3.3 mV bei 2 mM K^+ und -13.0 ± 4.4 mV bei 20 mM K^+ .

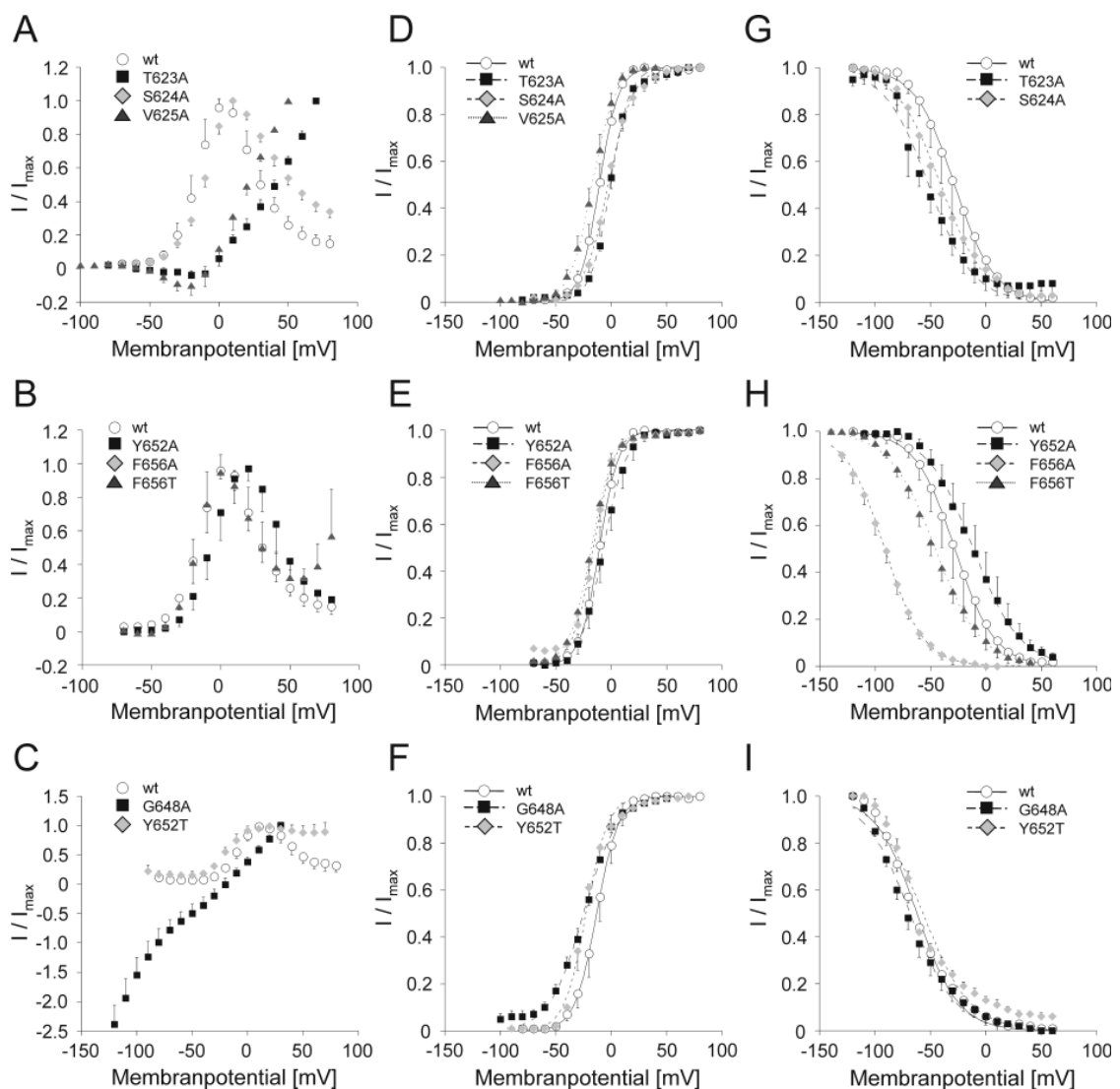


Abbildung 4.16: Vergleichende Übersicht über das Schaltverhalten der HERG-Mutanten.

Dargestellt sind die Spannungsabhängigkeit der maximalen Stromamplitude am Ende der Depolarisationsphase des Aktivierungsprotokolls (A-C), die Spannungsabhängigkeit der normierten Tail-Ströme während der Aktivierung (D-F) und der Inaktivierung (G-I) für Mutanten in der Poren-Region (A,D,G), Mutanten der aromatischen Aminosäuren in S6 (B,E,H) und bei 20 mM extrazellulärem K^+ (C,F,I). Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Inaktivierung wurden mit Boltzmann-Funktionen gefittet; die Werte sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Deutlichere Unterschiede waren beim Inaktivierungsverhalten zu finden (Abbildung 4.16 G-I, Tabelle 4.2). Beispielhafte Stromspuren, die mit dem Inaktivierungsprotokoll hervorgerufen wurden, sind in Abbildung 4.17 dargestellt. Die Mutante V625A zeigte überhaupt keine Inaktivierung (Abbildung 4.15 A). Die Mutante T623A, die wie V625A keine Einwärtsrektifizierung zeigte, inaktivierte hingegen spannungsabhängig (Abbildung 4.17 A). Der Inaktivierungsmittelpunkt war im Vergleich zum Wildtyp um ca. 28 mV zu negativeren Potentialen hin verschoben. Am stärksten ausgeprägt war die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung bei der Mutante F656A, die schon in CHO-Zellen untersucht wurde. Die Mutante Y652A führte als einzige zu einer Verschiebung des Inaktivierungsmittelpunktes zu positiveren Potentialen. Diese Ergebnisse bestätigten die Messungen in CHO-Zellen.

Nur bei der Mutante Y652T kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung; alle anderen Mutationen verschoben die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu negativeren Potentialen.

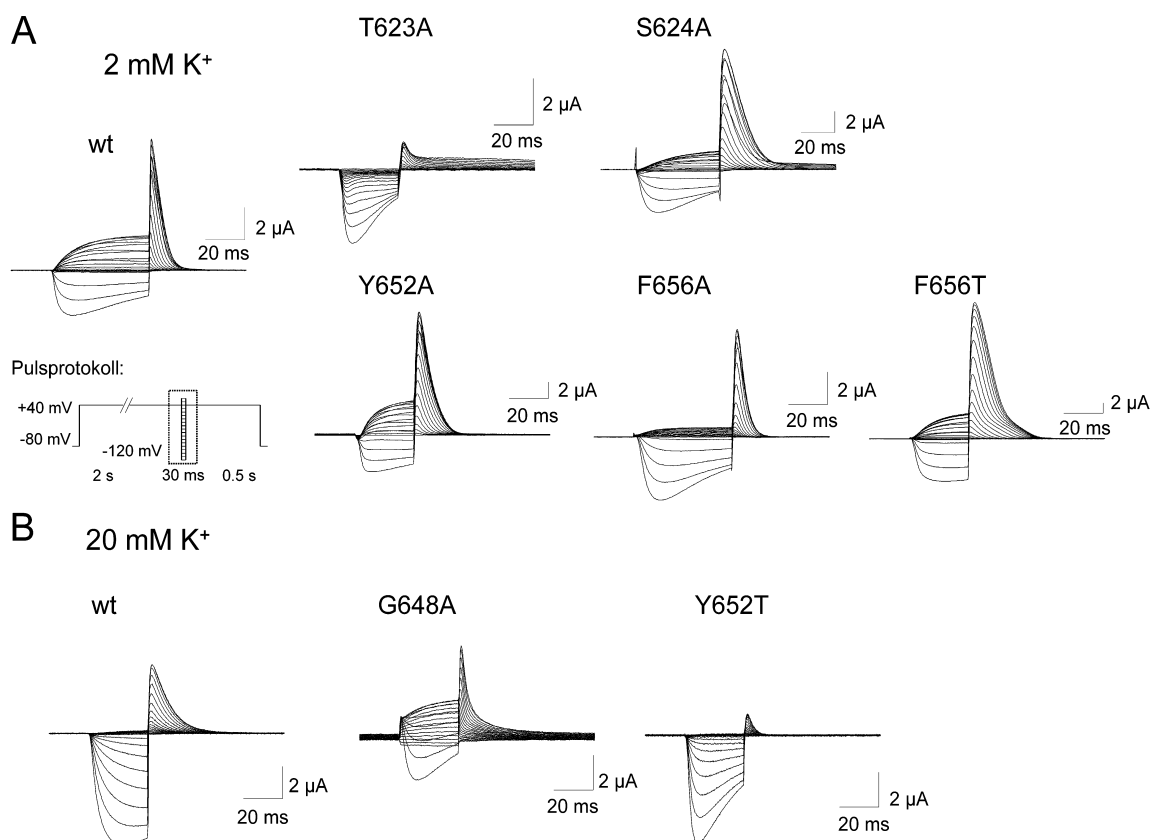


Abbildung 4.17: Inaktivierungsverhalten der verschiedenen HERG-Mutanten.

Ausschnitte aus Stromspuren, die mit dem Inaktivierungsprotokoll bei 2 mM extrazellulärem K⁺ (A) und bei 20 mM extrazellulärem K⁺ (B) hervorgerufen wurden

In 20 mM extrazellulärem K^+ (Abbildung 4.16 I; Abbildung 4.17 B) war die Inaktivierung von $HERG_{wt}$ im Vergleich zu den Messungen mit der Standard-Lösung deutlich zu negativeren Potentialen verschoben ($V_{0.5} = -29.2 \pm 11.0$ mV bei 2 mM K^+ und $V_{0.5} = -69.8 \pm 2.2$ mV bei 20 mM K^+).

	Aktivierung (Tail -120mV)			Inaktivierung		
	$V_{0.5}$ [mV]	k [mV]	n	$V_{0.5}$ [mV]	k [mV]	n
Wildtyp	-9.4 ± 3.3	8.8 ± 0.9	7	-29.2 ± 11.0	-17.5 ± 1.5	5
Wildtyp (20 mM K^+)	-13.0 ± 4.4	9.5 ± 0.7	8	$-69.8 \pm 2.2^{**}$	$-24.7 \pm 1.0^{**}$	6
T623A	$-1.2 \pm 1.5^{**}$	8.3 ± 0.9	8	$-57.4 \pm 4.9^{**}$	-17.7 ± 2.4	7
S624A	$-3.3 \pm 2.5^*$	$10.7 \pm 0.6^{**}$	6	$-46.0 \pm 6.6^*$	$-22.8 \pm 2.3^{**}$	9
V625A	$-16.9 \pm 2.8^{**}$	$10.2 \pm 0.2^{**}$	10	keine Inaktivierung		
G648A (20 mM K^+)	$-22.6 \pm 3.1^{**}$	$13.7 \pm 1.3^{**}$	11	$-82.1 \pm 3.7^{**}$	-26.9 ± 4.8	6
Y652A	-7.2 ± 4.0	$10.1 \pm 1.3^*$	9	$-14.0 \pm 10.9^*$	$-21.8 \pm 1.5^{**}$	6
Y652T (20 mM K^+)	$-23.4 \pm 3.0^{**}$	$8.8 \pm 0.4^*$	8	-67.5 ± 1.8	$-19.2 \pm 1.7^{**}$	7
F656A	$-16.2 \pm 1.2^*$	9.2 ± 0.4	5	$-95.2 \pm 5.5^{**}$	-19.4 ± 2.4	8
F656T	$-18.3 \pm 3.4^{**}$	$9.7 \pm 0.4^*$	6	$-47.8 \pm 5.0^*$	$-22.1 \pm 2.9^{**}$	7

Tabelle 4.2: Parameter der Boltzmann-Fits der Aktivierung und der Inaktivierung der verschiedenen HERG-Mutanten.

$V_{0.5}$: Spannung der halbmaximalen Aktivierung/Inaktivierung; k : Steigungsfaktor; n : Anzahl der Experimente; t-Test vs. Wildtyp (bei G648A und Y652T vs. Wildtyp bei 20 mM K^+): * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$

4.1.4 Untersuchung der Bupivacain-Empfindlichkeit von weiteren HERG-Mutanten in *Xenopus laevis* Oocyten

Um die Inhibition der HERG-Mutanten durch Bupivacain beurteilen zu können, wurde zunächst die Sensitivität von HERG_{wt}-Kanälen analysiert. Dazu wurden drei verschiedene Pulsprotokolle verwendet: das Rampenprotokoll, welches ein kardiales Aktionspotential simuliert, und außerdem zwei Rechteckpulse auf 0 mV mit Tail-Potentialen bei -40 mV und bei -120 mV. In Abbildung 4.18 A sind exemplarische Stromspuren, die mit diesen Protokollen hervorgerufen wurden, unter Kontrollbedingungen und nach Einwasch von 300 μ M Bupivacain dargestellt.

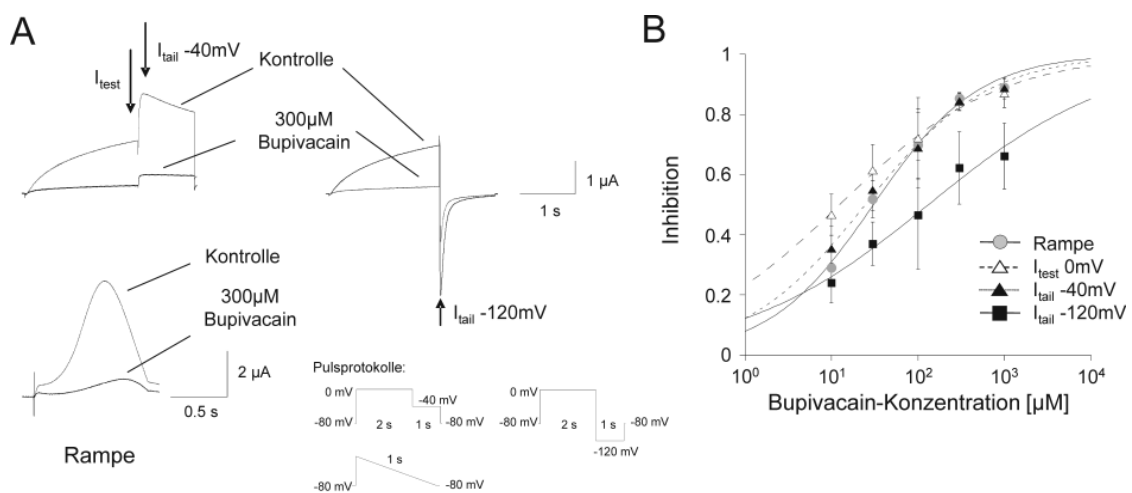


Abbildung 4.18: Inhibition von HERG_{wt}-Kanälen durch Bupivacain in *Xenopus laevis* Oocyten.

(A) Exemplarische Stromantworten von HERG_{wt}-Kanälen auf einen Rechteck-Puls auf 0 mV (I_{test}) mit Tail-Potentialen bei -40 mV ($I_{tail-40mV}$) und bei -120 mV ($I_{tail-120mV}$) sowie auf das Rampen-Protokoll unter Kontrollbedingungen und nach Einwasch von 300 μ M Bupivacain. (B) Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die Bupivacain-Inhibition der verschiedenen Protokolle (n = 6-7 pro Datenpunkt).

Die mit diesen drei Protokollen ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden mit Hill-Funktionen beschrieben (Abbildung 4.18 B und Tabelle 4.3). Die Kurven und die IC_{50} -Werte für die Inhibition während des Rampen-Protokolls und während des Tail-Stroms bei -40 mV unterschieden sich kaum. Am geringsten war die Inhibition der einwärtsgerichteten Tail-Ströme bei -120 mV.

	Rampe	$I_{test} 0mV$	$I_{tail} -40mV$	$I_{tail} -120mV$
$IC_{50} [\mu M]$	30.5 ± 2.9	12.4 ± 1.5	24.6 ± 2.3	132 ± 21.5
Hill	0.72 ± 0.06	0.48 ± 0.03	0.61 ± 0.04	0.40 ± 0.04
n	33	33	33	33

Tabelle 4.3: Parameter der Hill-Fits der Inhibition von HERG_{wt}-Kanälen für die verschiedenen Protokolle.

Um die Bupivacain-Empfindlichkeit der HERG-Mutanten zu analysieren, wurde eine Konzentration von 300 μM Bupivacain gewählt, die etwa dem 10-fachen des IC_{50} -Wertes entspricht.

Bei den Mutanten S624A, Y652A und F656T, die ein relativ normales Schaltverhalten zeigten, wurde wie bei HERG_{wt} die Wirkung von Bupivacain auf die drei verschiedenen Protokolle untersucht (Abbildung 4.19 A). $\text{HERG}_{\text{F656T}}$ -Kanäle zeigten bei allen drei Protokollen nur eine sehr geringe Inhibition durch 300 μM Bupivacain (Rampe: $3.5\% \pm 3.3\%$; $I_{\text{tail}}-40 \text{ mV}$: $2.3\% \pm 3.2\%$; $I_{\text{tail}}-120 \text{ mV}$: $2.1\% \pm 1.6\%$; $n = 6$). Die Wirkung auf $\text{HERG}_{\text{S624A}}$ - und $\text{HERG}_{\text{Y652A}}$ -Kanäle war gegenüber der Wirkung auf HERG_{wt} -Kanäle signifikant reduziert. Wie bei HERG_{wt} -Kanälen war die Inhibition durch Bupivacain beim Rampen-Protokoll und bei der Depolarisation auf -40 mV sehr ähnlich; die Inhibition der Einwärtsströme bei -120 mV durch Bupivacain war geringer (Abbildung 4.19 A, Abbildung 4.20 A und B).

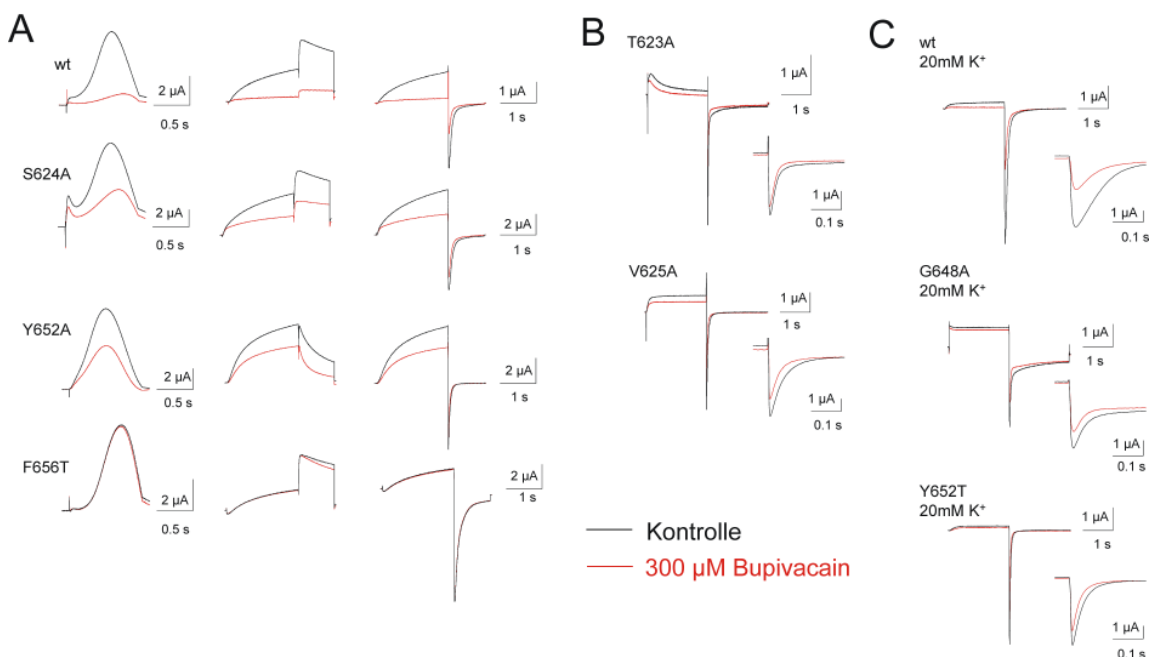


Abbildung 4.19: Inhibition von Wildtyp- und mutierten HERG-Kanälen durch 300 μM Bupivacain. (A) Beispiele für Stromantworten auf das Rampen-Protokoll (linke Spalte) und einen Rechteck-Puls auf 0 mV mit Tail-Potentialen bei -40 mV (mittlere Spalte) und bei -120 mV (rechte Spalte) unter Kontrollbedingungen und nach Einwasch von 300 μM Bupivacain. (B) Stromantworten auf einen Rechteck-Puls mit einem Tail-Potential von -120 mV unter Kontrollbedingungen und nach Einwasch von 300 μM Bupivacain. (C) Ströme bei einem Rechteck-Puls mit einem Tail-Potential von -120 mV gemessen bei 20 mM extrazellulärem K^+ unter Kontrollbedingungen und nach Einwasch von 300 μM Bupivacain.

Bei den Mutanten T623A und V625A waren die Auswärtsströme während des Rampen-Protokolls und bei Depolarisation auf 0 mV sehr gering, so dass nur die Inhibition während einer Depolarisation auf $+40 \text{ mV}$ und während des Tails bei -120 mV

analysiert wurde (Abbildung 4.19 B, Abbildung 4.20 C und D). Die beiden Mutanten waren deutlich weniger empfindlich für Bupivacain als der Wildtyp.

Die Inhibition der Mutanten G648A und Y652T durch Bupivacain wurde, wie auch das Schaltverhalten, bei einer K^+ -Konzentration von 20 mM analysiert. Dabei wurde nur ein Rechteckpuls mit einer Depolarisation auf 0 mV verwendet, die Tail-Ströme wurden bei -120 mV gemessen. Zum Vergleich wurde die Inhibition von $HERG_{wt}$ -Kanälen ebenfalls unter diesen Bedingungen gemessen (Abbildung 4.19 C, Abbildung 4.20 C und D). Die Inhibition von $HERG_{wt}$ -Kanälen durch 300 μ M Bupivacain wurde bei -120 mV nicht signifikant durch die Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration beeinflusst (2 mM K^+ : 62.1% \pm 12.0%, 20 mM K^+ : 57.7% \pm 7.2%) die Inhibition während der Depolarisation auf 0 mV hingegen schon (2 mM K^+ : 84.2% \pm 3.1%, 20 mM K^+ : 76.2% \pm 4.8%). Beide Mutanten waren weniger empfindlich für die inhibierende Wirkung von Bupivacain als der Wildtyp.

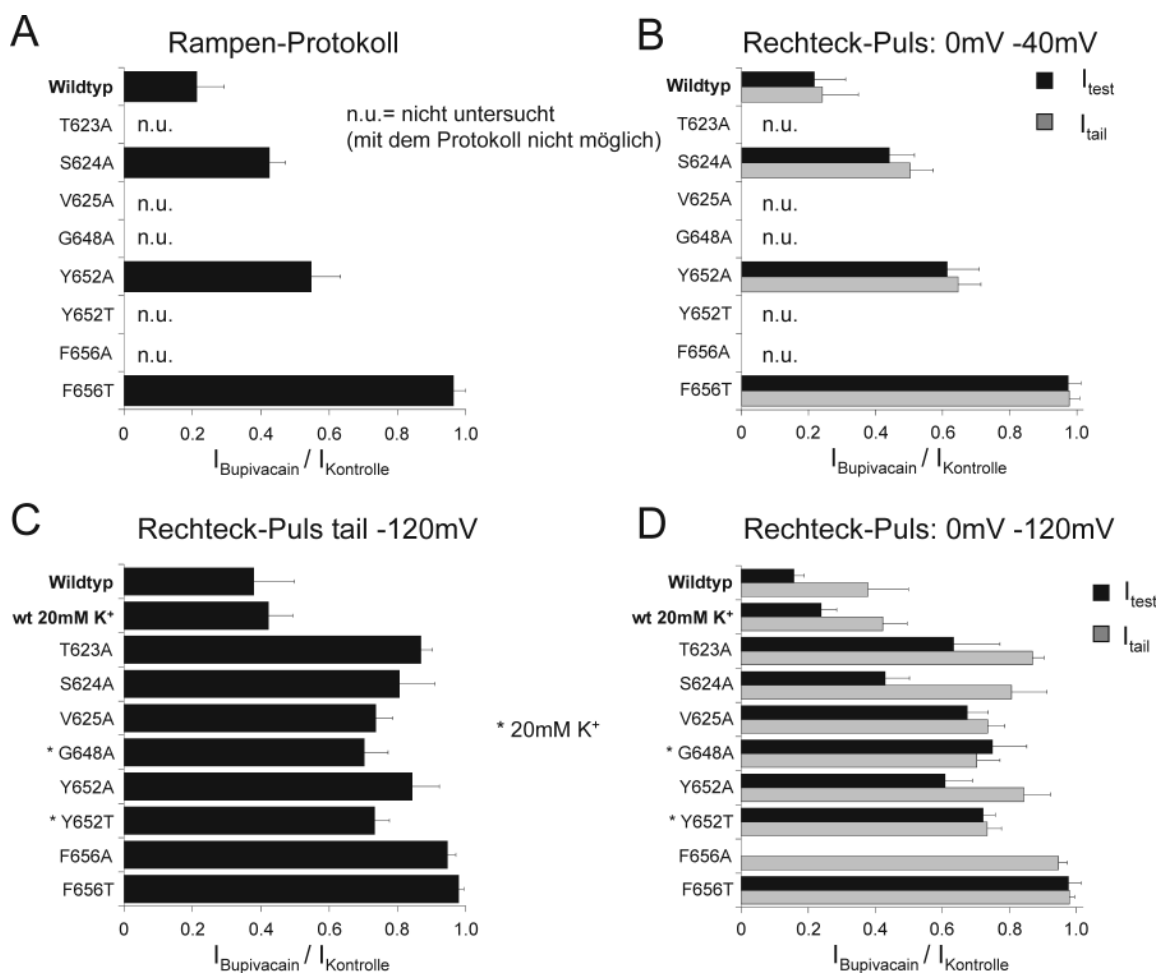


Abbildung 4.20: Auswertung der Inhibition der verschiedenen Mutanten durch 300 μ M Bupivacain. Reststrom unter Einfluss von 300 μ M Bupivacain ($I_{Bupivacain} / I_{Kontrolle}$) für das Rampenprotokoll (A), für einen Rechteckpuls mit Tail-Potential von -40 mV (B) und für einen Rechteckpuls mit Tail-Potential von -120 mV (C und D). Analysiert wurde der maximale Strom während des Rampenprotokolls (A), am Ende der Depolarisation auf 0 mV (I_{test}) (B und D) und der Extremwert während des Tails (I_{tail}) (C und D).

Den stärksten Einfluss auf die Inhibition durch Bupivacain hatten Mutationen der aromatischen Aminosäurereste F656 und Y652. Dabei spielt das Öffnungsverhalten des Kanals offenbar eine untergeordnete Rolle, da sich die beiden Mutanten F656A und F656T im Schaltverhalten stark unterschieden, die Inhibition durch Bupivacain aber ähnlich gering war.

Anhand der Messdaten wurde außerdem die Entwicklung des Blocks („onset of block“) analysiert. Dazu wurde für jeden Zeitpunkt der Depolarisation der Strom nach Applikation von Bupivacain durch den Strom unter Kontrollbedingungen dividiert ($I_{\text{Bup}}/I_{\text{Kon}}$) und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 4.21).

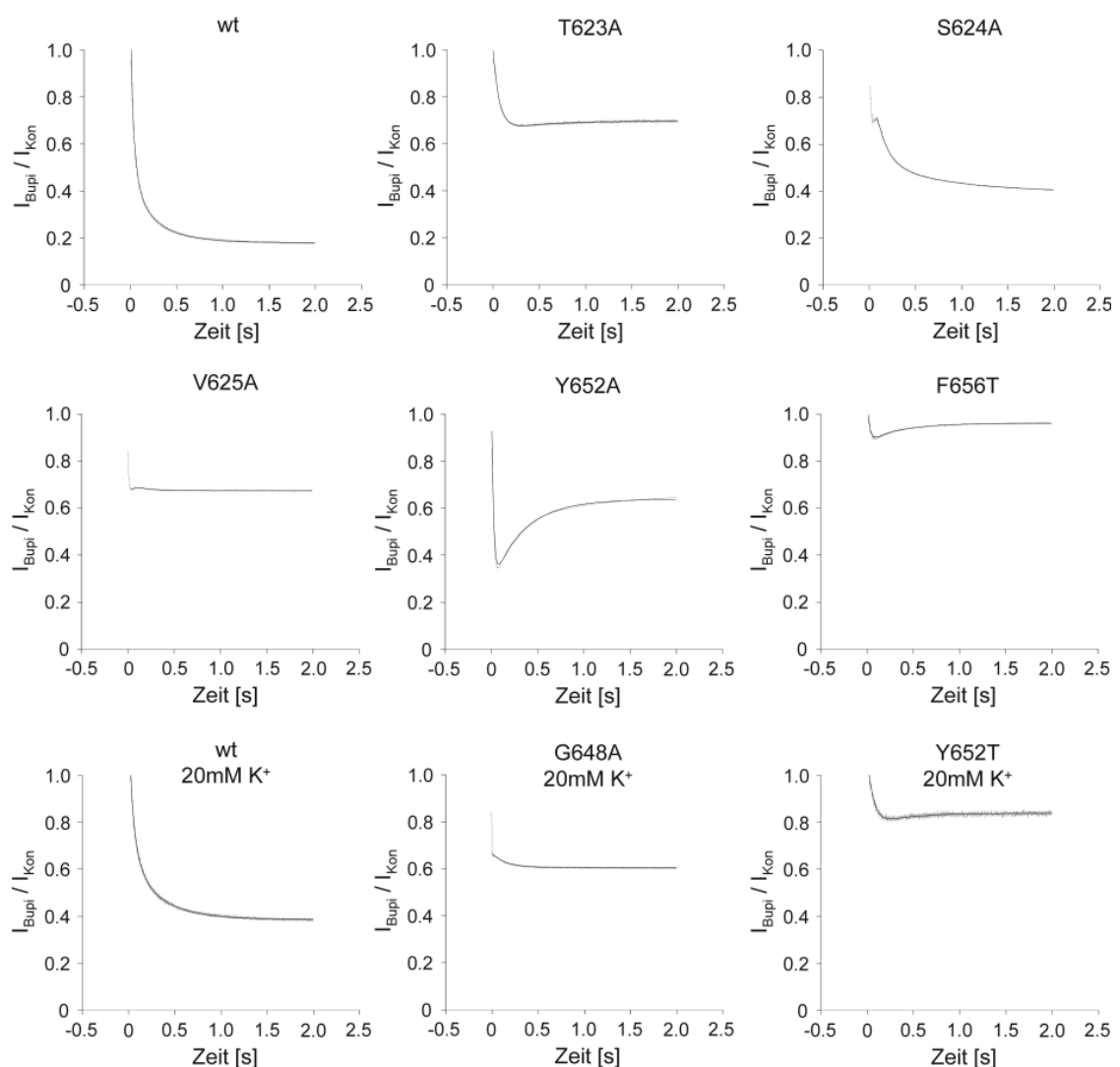


Abbildung 4.21: Zeitabhängigkeit des Blocks („onset of block“) für HERG_{wt} und Mutanten.

Beispielhafter Verlauf des „onset of block“. Der Strom unter Bupivacain-Einfluss wurde für jeden Zeitpunkt durch den Strom unter Kontrollbedingungen geteilt ($I_{\text{Bup}}/I_{\text{Kon}}$).

Für HERG_{wt} war eine exponentielle Zunahme des Blocks mit der Zeit zu erkennen. Zur Beschreibung des Verlaufs wurden zwei Zeitkonstanten verwendet (Abbildung 4.22).

Nur die langsame Zeitkonstante wurde durch die extrazelluläre Kaliumkonzentration beeinflusst, die schnelle Zeitkonstante veränderte sich nicht signifikant zwischen den Messungen mit 2 mM K⁺ (ND80) und 20 mM K⁺.

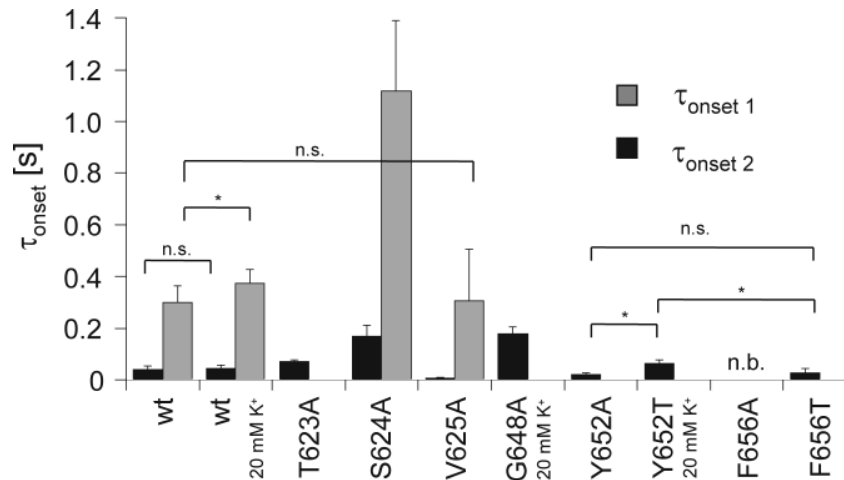


Abbildung 4.22: Zeitkonstanten des „onset of block“ für die untersuchten HERG-Kanäle.

Der zeitliche Verlauf der Zunahme des Blocks wurde mit einer exponentiellen Funktion mit ein oder zwei Zeitkonstanten beschrieben (τ_{onset}). Für alle Mutanten unterschieden sich die schnellen Zeitkonstanten ($\tau_{\text{onset 1}}$) signifikant von HERG_{wt} unter den gleich Bedingungen ($n = 3-7$).

(n.b.: nicht bestimmt; n.s.: nicht signifikant unterschiedlich im t-Test ($p \geq 0.05$); * $p < 0.05$)

Der „onset of block“ wurde durch die Mutation S624A signifikant verlangsamt. Bei den Mutationen der aromatischen Aminosäuren Y652A, Y652T und F656T und bei T623A zeigte sich nach einer anfänglichen Zunahme des Blocks eine Erholung vom Block, die bei $\text{HERG}_{\text{Y652A}}$ am stärksten ausgeprägt war. Die Auswärtsströme der Mutante F656A waren zu gering, als dass eine Analyse des „onsets“ möglich gewesen wäre. Die Zeitkonstanten für die Erholung vom Block für die Mutanten T623A, Y652A, Y652T und F656T waren nicht signifikant unterschiedlich und betragen zwischen 319 ± 147 ms für Y652A und 522 ± 187 ms für T623A.

4.1.5 Untersuchung der Bupivacain-Empfindlichkeit von EAG-Kanälen

EAG-Kanäle sind strukturell sehr nahe verwandt mit HERG-Kanälen, zeichnen sich aber durch eine fehlende C-Typ-Inaktivierung aus (Bauer & Schwarz 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von Bupivacain auf EAG1-Kanäle der Ratte untersucht, um sie mit der Bupivacain-Wirkung auf HERG-Kanäle zu vergleichen.

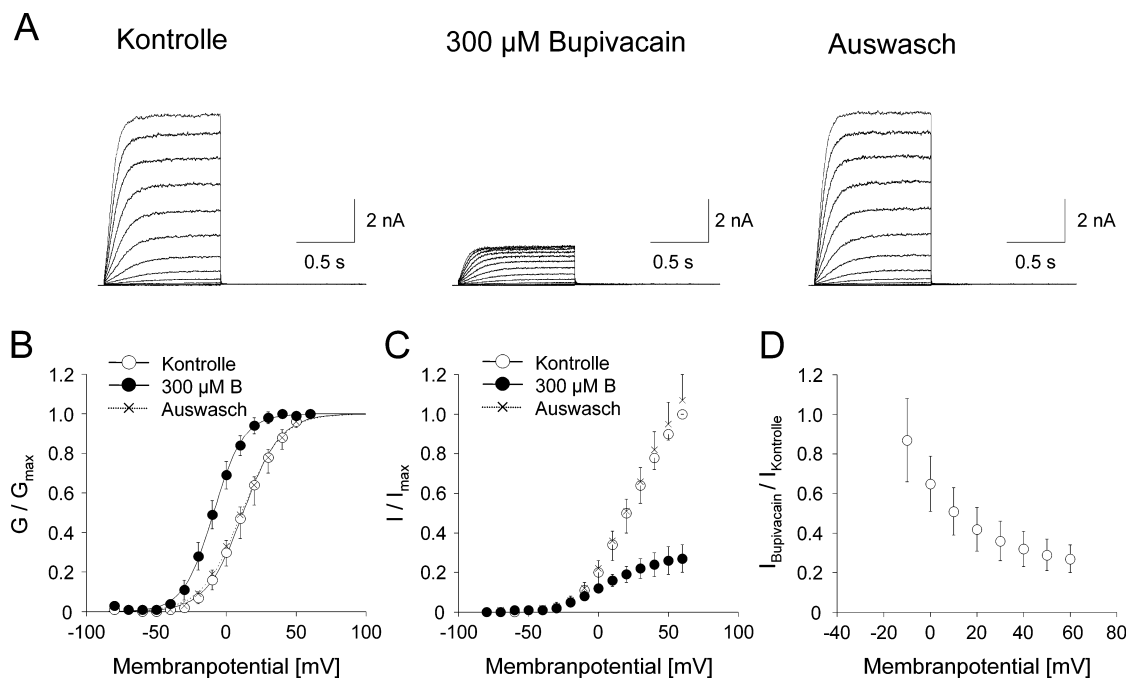


Abbildung 4.23: Inhibition von rEAG1-Kanälen durch 300 μM Bupivacain.

(A) Beispielhafte Ströme durch rEAG1-Kanäle, hervorgerufen mit einem Aktivierungsprotokoll, wurden reversibel durch 300 μM Bupivacain inhibiert. (B) Abhängigkeit des maximalen Stroms vom Membranpotential und Inhibition durch Bupivacain (300 μM). Alle Werte wurden auf Kontrollbedingungen normiert. (C) Die maximale Leitfähigkeit wurde aus dem maximalen Strom berechnet und gegen die Membranspannung aufgetragen. Die Kurven wurden mit einer Boltzmann-Funktion beschrieben. (D) Spannungsabhängigkeit der Inhibition.

Das Aktivierungsprotokoll rief bei EAG-Kanälen einen schnell aktivierenden, nicht inaktivierenden Strom hervor. Die Applikation von 300 μM Bupivacain führte zu einer deutlichen Reduktion der Stromamplitude, ohne die Form der Stromantwort zu verändern (Abbildung 4.23 A). Die Inhibition war vollständig reversibel. Zur weiteren Analyse wurde der maximale Strom während der Depolarisation auf die entsprechende Kontrolle normiert und gegen die Spannung aufgetragen (Abbildung 4.23 B; $n = 6$). Aus den Maximalamplituden wurden die entsprechenden Leitfähigkeiten berechnet. Die Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit ließ sich sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Bupivacain-Einfluss sehr gut mit einer Boltzmann-Funktion beschreiben. Die Applikation von Bupivacain (300 μM) führte zu einer Verschiebung des Aktivierungsmittelpunktes zu negativeren Potentialen (Abbildung 4.23 C; $n = 6$;

Kontrolle: $V_{0.5} = 15.2 \pm 4.4$ mV, $k = 16.1 \pm 3.0$ mV; 300 μ M Bupivacain: $V_{0.5} = -8.3 \pm 3.1$ mV, $k = 10.8 \pm 0.3$ mV; Auswasch: $V_{0.5} = 12.8 \pm 3.0$ mV, $k = 18.4 \pm 3.7$ mV; t-Test Kontrolle vs. Bupivacain: $p = 4 \cdot 10^{-6}$; Kontrolle vs. Auswasch: $p = 0.04$).

Um die Spannungsabhängigkeit der Inhibition zu analysieren, wurde für jedes Potential der Quotient aus dem Strom unter Bupivacain-Einfluss und dem Strom unter Kontrollbedingungen gebildet (Abbildung 4.23 D). Die Inhibition von EAG-Kanälen durch Bupivacain war deutlich spannungsabhängig für Membranpotentiale zwischen -10 mV und +60 mV.

Wegen der Spannungsabhängigkeit der Inhibition wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition von EAG-Kanälen durch Bupivacain bei zwei verschiedenen Potentialen, 0 mV und +40 mV, untersucht: (Abbildung 4.24 A und B). Ein Potential von 0 mV wurde gewählt, weil die Inhibition von HERG-Kanälen bei diesem Potential analysiert wurde. Da die EAG-Kanäle bei 0 mV jedoch noch nicht vollständig aktiviert sind, wurde die Inhibition zusätzlich bei +40 mV, einem Potential im Plateaubereich der Aktivierungskurve, analysiert.

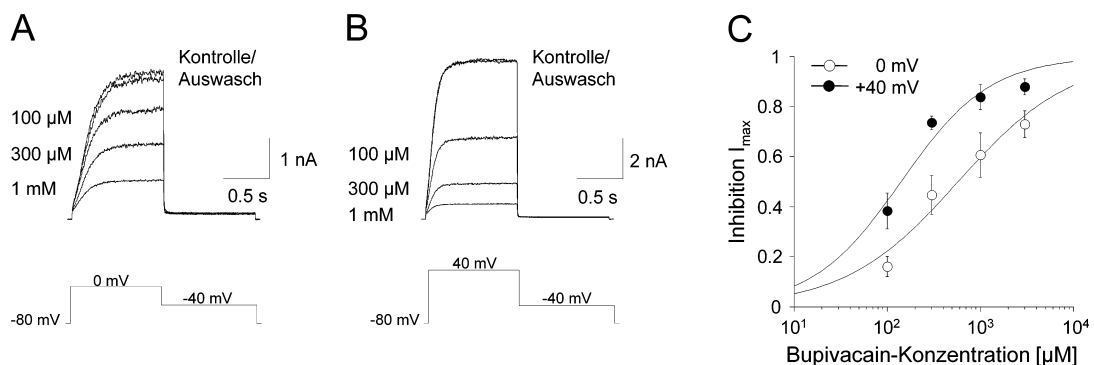


Abbildung 4.24: Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition von EAG-Kanälen durch Bupivacain. Repräsentative Stromantworten von EAG-Kanälen bei Depolarisation auf 0 mV (A) und auf +40 mV (B) unter Kontrollbedingungen, nach Applikation verschiedener Bupivacain-Konzentrationen und nach Auswasch der Substanz. (C) Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Inhibition von EAG-Kanälen durch Bupivacain bei 0 mV und +40 mV.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition für beide Potentiale wurde mit einer Hill-Funktion gefittet (Abbildung 4.24 C). Bei Depolarisation auf +40 mV waren EAG-Kanäle deutlich empfindlicher für die Wirkung von Bupivacain als bei Depolarisation auf 0 mV (0 mV: $IC_{50} = 576 \pm 127$ μ M, $h = 0.71 \pm 0.14$, $n = 56$; +40 mV: $IC_{50} = 140 \pm 36$ μ M, $h = 0.91 \pm 0.23$, $n = 43$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass EAG-Kanäle deutlich weniger empfindlich für die inhibierende Wirkung von Bupivacain waren als HERG-Kanäle, im Gegensatz zu diesen aber eine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit der Inhibition zeigten..

4.2 Untersuchung der LQT1-Mutation KCNQ1_{A344V}

Die Mutation KCNQ1_{A344V} wurde bei einer LQT1-Familie in Frankreich entdeckt (Donger *et al.*, 1997). Diese Position in KCNQ1 entspricht der Position F656 in HERG. Da die Mutation F656A in HERG-Kanälen zu einer deutlichen Reduktion der Lokalanästhetika-Empfindlichkeit führte, war eine Vermutung zu Beginn dieser Arbeit, dass die Mutation von Alanin zu der hydrophoberen Aminosäure Valin eine Zunahme der Sensitivität für Lokalanästhetika bewirken könnte. KCNQ1_{wt}-Kanäle sind im Gegensatz zu HERG-Kanälen relativ unempfindlich gegenüber der Inhibition durch Lokalanästhetika (Lipka *et al.*, 1998).

4.2.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der LQT1 Mutante KCNQ1_{A344V}

Da die Mutation KCNQ1_{A344V} bislang noch nicht elektrophysiologisch untersucht worden war, war eine Charakterisierung der biophysikalischen Eigenschaften notwendig, um die pharmakologischen Eigenschaften dieser Mutante besser einschätzen zu können. Die Charakterisierung wurde sowohl in *Xenopus laevis* Oocyten als auch in CHO-Zellen durchgeführt.

4.2.1.1 Expression in *Xenopus laevis* Oocyten

Die Mutante KCNQ1_{A344V} führte bei Expression in *Xenopus* Oocyten zu gut messbaren Strömen. Im Gegensatz zu KCNQ1_{wt} zeigte sich bei KCNQ1_{A344V} eine spannungsabhängige Inaktivierung (Abbildung 4.25 A und B, obere Reihe). Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung unterschied sich nicht zwischen KCNQ1_{wt} und KCNQ1_{A344V} (Abbildung 4.25 C; Tabelle 4.4). Durch die Co-Expression mit KCNE1 verlangsamte sich die Kinetik der Aktivierung sowohl bei KCNQ1_{wt} als auch bei KCNQ1_{A344V} (Abbildung 4.25 A und B, untere Reihe). Außerdem wurde die Inaktivierung von KCNQ1_{A344V} aufgehoben.

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung verschob sich durch die Co-Expression mit KCNE1 zu positiveren Membranpotentialen. Dieser Effekt war bei der Mutante KCNQ1_{A344V} deutlich stärker ausgeprägt, so dass sich eine Verschiebung des Aktivierungsmittelpunktes um 30 ± 17 mV zwischen KCNQ1_{wt}/KCNE1 und KCNQ1_{A344V}/KCNE1 ergab (Abbildung 4.25 C). Die Parameter der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung sind in Tabelle 4.4 (Seite 68) zusammengefasst.

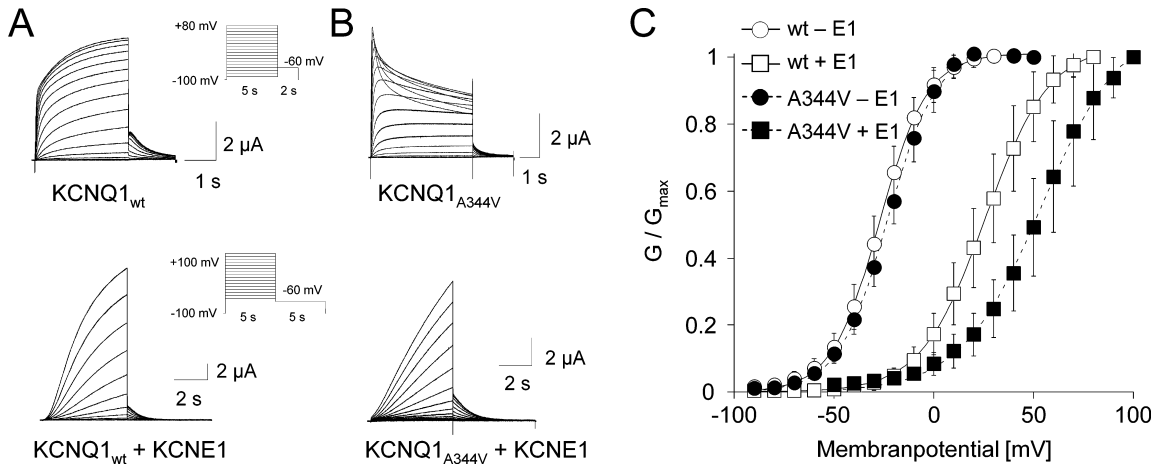


Abbildung 4.25: Expression von $KCNQ1_{wt}$ und $KCNQ1_{A344V}$ in *Xenopus laevis* Oocyten

Repräsentative Stromspuren der Aktivierung von $KCNQ1_{wt}$ (A) und $KCNQ1_{A344V}$ (B) bei alleiniger Expression (obere Reihe) und bei Co-Expression mit KCNE1 (untere Reihe). (C) die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurde mit einer Boltzmann-Funktion gefittet.

Die Kinetik der Aktivierung von $KCNQ1/KCNE1$ -Kanalkomplexen wurde detailliert untersucht. Der Zeitverlauf der Aktivierung wurde mit einer monoexponentiellen Funktion angenähert. Die Zeitkonstanten waren sowohl für $KCNQ1_{wt}/KCNE1$ als auch für $KCNQ1_{A344V}/KCNE1$ spannungsabhängig (Abbildung 4.26 A). Dabei wurde die Aktivierung durch die Mutation A344V signifikant verlangsamt. Diese Verlangsamung lässt sich nicht allein durch die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung erklären, da der Unterschied auch noch signifikant war, wenn diese Verschiebung einbezogen wurde.

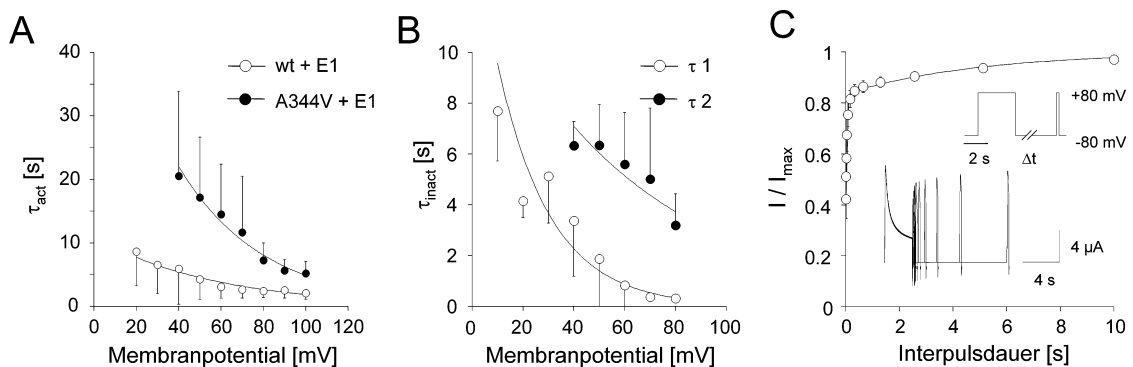


Abbildung 4.26: Analyse der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik von $KCNQ1$ -Kanälen in Oocyten. (A) Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten der Aktivierung von $KCNQ1/KCNE1$ -Kanalkomplexen. (B) Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von $KCNQ1_{A344V}$. (C) Zeitabhängigkeit der Erholung aus der Inaktivierung von $KCNQ1_{A344V}$ -Kanälen. Das kleine Bild zeigt das verwendete Recovery-Protokoll und eine exemplarische Stromantwort auf dieses Protokoll.

Die Zeitabhängigkeit der Inaktivierung von $KCNQ1_{A344V}$ ließ sich ebenfalls mit einer exponentiellen Funktion beschreiben. Dazu war bei Membranpotentialen von +10 bis +30 mV eine Zeitkonstante ausreichend, bei Membranpotentialen ab +40 mV waren

jedoch zwei Zeitkonstanten nötig, um den Inaktivierungsverlauf hinreichend genau zu beschreiben (Abbildung 4.26 B). Beide Zeitkonstanten waren spannungsabhängig. KCNQ1_{A344V}-Kanäle erholten sich zeitabhängig aus der Inaktivierung. Zur Analyse wurde ein Recovery-Protokoll mit unterschiedlich langen Interpulsdauern verwendet (Abbildung 4.26 C). Der zeitliche Verlauf der Erholung aus der Inaktivierung ließ sich mit einer biexponentiellen Funktion beschreiben ($\tau_{\text{rec } 1} = 45 \pm 8 \text{ ms}$; $\tau_{\text{rec } 2} = 4.7 \pm 0.5 \text{ s}$). Die Deaktivierung von KCNQ1-Kanälen und von KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexen wurde - nach Aktivierung der Kanäle durch Depolarisation auf +60 mV - bei Tail-Potentialen von -120 mV bis -100 mV analysiert (Abbildung 4.27). Nur für KCNQ1_{wt}-Kanäle waren die Deaktivierungszeitkonstanten spannungsabhängig. Durch die Mutation A344V wurde die Deaktivierung von KCNQ1-Kanälen signifikant verlangsamt. Bei KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexen war jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und A344V festzustellen.

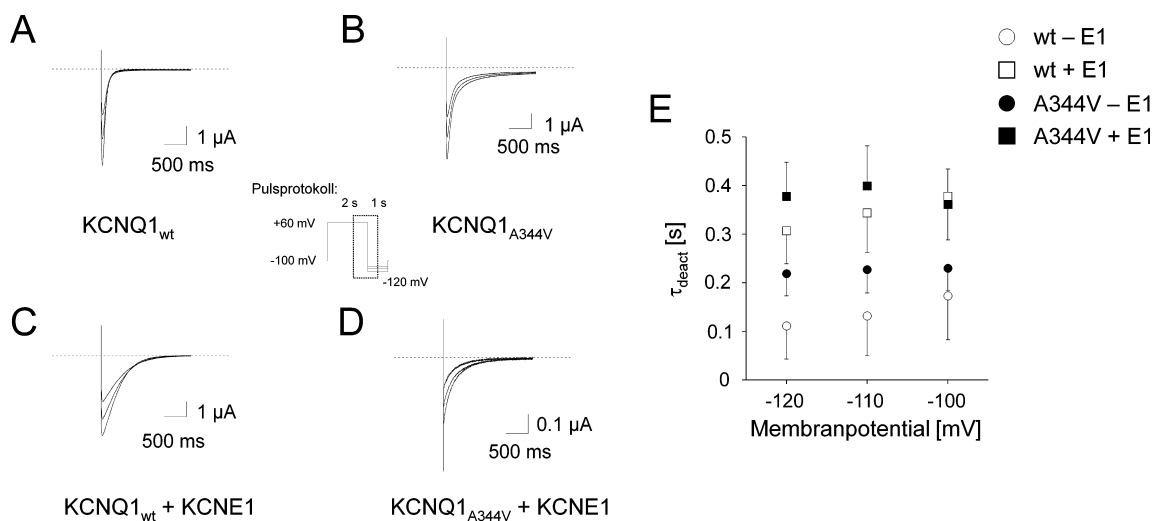


Abbildung 4.27: Deaktivierung von KCNQ1-Kanälen und KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexen.

Ausschnitte aus Stromspuren hervorgerufen mit dem Deaktivierungsprotokoll in KCNQ1_{wt}-Kanälen (A), KCNQ1_{A344V}-Kanälen (B), KCNQ1_{wt}/KCNE1-Kanalkomplexen (C) und KCNQ1_{A344V}/KCNE1-Kanalkomplexen (D). (E) Spannungabhängigkeit der Deaktivierungszeitkonstanten (n = 5-26 pro Datenpunkt).

Um die heterozygote Situation im LQTS-Patienten zu simulieren, wurden KCNQ1_{wt} und KCNQ1_{A344V} im Verhältnis 1:1 mit und ohne KCNE1 in *Xenopus laevis* Oocyten exprimiert.

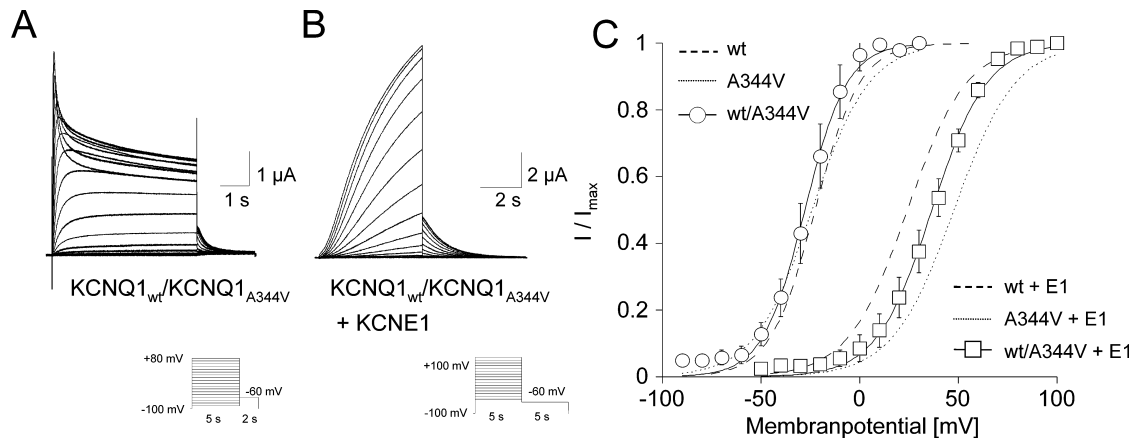


Abbildung 4.28: Co-Expression von $KCNQ1_{wt}$ und $KCNQ1_{A344V}$

Stromantworten auf das Aktivierungsprotokoll in $KCNQ1_{wt}/KCNQ1_{A344V}$ -Heteromultimeren ohne (A) und mit KCNE1 (B). Die Leitfähigkeits-Spannungsbeziehung wurde mit einer Boltzmann-Funktion gefittet (C). Die Fits für die Aktivierung der homomeren Kanäle ohne und mit KCNE1 (+E1) sind zum Vergleich ebenfalls dargestellt.

Die Co-Expression von $KCNQ1_{wt}$ und $KCNQ1_{A344V}$ ohne KCNE1 führte beim Aktivierungsprotokoll zu einer spannungsabhängigen Inaktivierung, die auch bei homomeren $KCNQ1_{A344V}$ -Kanälen beobachtet wurde (Abbildung 4.28 A). Durch die Co-Expression mit KCNE1 wurde die Aktivierung deutlich verlangsamt und eine Inaktivierung war nicht mehr festzustellen (Abbildung 4.28 B). Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von $KCNQ1_{wt}/KCNQ1_{A344V}$ -Heteromeren unterschied sich nicht von der der Aktivierung der homomeren $KCNQ1_{wt}$ -Kanäle (Abbildung 4.28 C; Tabelle 4.4). Bei Co-Expression von $KCNQ1_{wt}/KCNQ1_{A344V}$ mit KCNE1 war jedoch eine deutliche Verschiebung des Aktivierungsmittelpunktes zu positiveren Potentialen festzustellen. Der $V_{0.5}$ -Wert für die Aktivierung von $KCNQ1_{wt}/KCNQ1_{A344V}/KCNE1$ -Komplexen lag in der Mitte zwischen den Werten für $KCNQ1_{wt}/KCNE1$ und $KCNQ1_{A344V}/KCNE1$ (Abbildung 4.28 C; Tabelle 4.4).

	wt		A344V		wt/A344V	
	-KCNE1	+KCNE1	-KCNE1	+KCNE1	-KCNE1	+KCNE1
$V_{0.5}$ [mV]	-25.6 ± 3.6	27.1 ± 9.0	-23.2 ± 2.9	57.3 ± 14.8	-26.9 ± 4.0	38.6 ± 3.8
$p V_{0.5}$ (t-Test vs. wt)	-	-	<0.05	<0.001	>0.05	<0.05
k [mV]	11.2 ± 1.3	15.1 ± 2.1	13.2 ± 2.0	19.6 ± 3.6	10.9 ± 1.2	15.2 ± 1.7
G_{max} [μ A]	2.8 ± 1.7	3.3 ± 1.7	2.2 ± 1.3	2.4 ± 1.4	1.5 ± 0.91	1.6 ± 0.88
n	14	16	27	22	5	5

Tabelle 4.4: Parameter für den Boltzmann-Fit der Aktivierung von KCNQ1-Kanälen in *Xenopus* Oocyten.

4.2.1.2 Expression in CHO-Zellen

Um zu überprüfen, wie sich die Mutation $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}$ auswirkt, wenn sie in Säugerzellen exprimiert wird, wurde eine Charakterisierung dieser Mutante ebenfalls in CHO-Zellen durchgeführt. Auch in diesem System führt die Mutation A344V bei Expression der KCNQ1 -Homomere zu einer spannungsabhängigen Inaktivierung, die bei KCNQ1_{wt} nicht auftrat (Abbildung 4.29 A und B, obere Reihe). Die Co-Expression mit KCNE1 führt zu einer Verlangsamung der Aktivierung, zur Aufhebung der Inaktivierung von $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}$ und zu einer Zunahme der Stromdichte (Abbildung 4.29 A und B, untere Reihe). Da die Stromamplituden der KCNQ1 -Homomere in CHO-Zellen meist sehr gering waren, wurden die pharmakologischen Experimente ausschließlich mit $\text{KCNQ1}/\text{KCNE1}$ -Heteromeren durchgeführt.

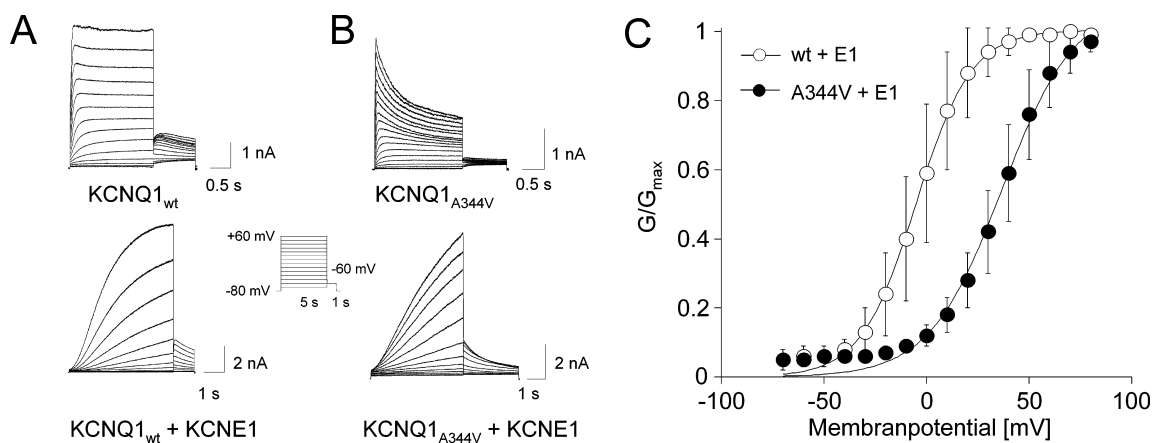


Abbildung 4.29: Expression von KCNQ1_{wt} und $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}$ in CHO-Zellen.

Repräsentative Stromspuren der Aktivierung von KCNQ1_{wt} (A) und $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}$ (B) bei alleiniger Expression (obere Reihe) und bei Co-Expression mit KCNE1 (untere Reihe). (C) Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von $\text{KCNQ1}/\text{KCNE1}$ -Kanalkomplexen wurde mit einer Boltzmann-Funktion gefittet.

Wie in *Xenopus laevis* Oocyten führte die Mutation A344V auch in CHO-Zellen zu einer deutlichen Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu positiveren Potentialen (Abbildung 4.29 C). Die Differenz zwischen den Werten für $\text{KCNQ1}_{\text{wt}}/\text{KCNE1}$ und $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}/\text{KCNE1}$ betrug 39 ± 13 mV. Die Parameter der Boltzmann-Kurven sind in Tabelle 4.5 zu finden.

	wt	A344V
$V_{0.5}$ [mV]	-2.2 ± 9.0	37.2 ± 8.8
p $V_{0.5}$ (wt-A344V)	-	<0.001
k [mV]	11.7 ± 3.2	16.3 ± 3.0
G_{max} [nA]	2.7 ± 0.81	2.6 ± 0.45
n	24	20

Tabelle 4.5: Parameter für den Boltzmann-Fit der Aktivierung von KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexen in CHO-Zellen.

Auch für die Experimente in CHO-Zellen wurde die Aktivierungskinetik von KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexen und die Inaktivierungskinetik von KCNQ1_{A344V} näher analysiert. Die Aktivierung der KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexe war spannungsabhängig und wurde durch die Mutation A344V signifikant verlangsamt (Abbildung 4.30 A). Die Aktivierung verlief jedoch für Wildtyp-Kanäle und für mutierte Kanäle in CHO-Zellen schneller als in *Xenopus* Oocyten.

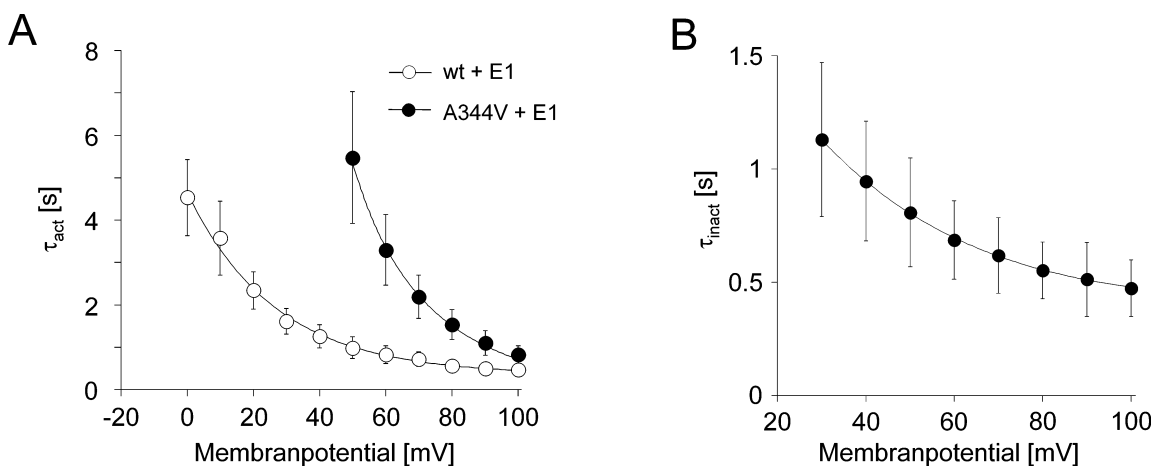


Abbildung 4.30: Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik von KCNQ1-Kanälen in CHO-Zellen.

(A) Spannungabhängigkeit der Zeitkonstanten der Aktivierung von KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexen ($n = 4-8$ pro Datenpunkt). (B) Spannungabhängigkeit der Inaktivierung von KCNQ1_{A344V} ($n = 7-10$ pro Datenpunkt).

Die Inaktivierung von KCNQ1_{A344V}-Homomeren wurde ebenfalls mit einer exponentiellen Funktion beschrieben und war spannungsabhängig (Abbildung 4.30 B). Im Gegensatz zur Inaktivierung von KCNQ1_{A344V} in *Xenopus* Oocyten ließ sich die Inaktivierung in CHO-Zellen für bei allen Potentialen gut mit nur einer Zeitkonstante beschreiben; diese lag in der Größenordnung der schnellen Inaktivierungszeitkonstanten der Messungen in *Xenopus laevis* Oocyten. Aufgrund der deutlich kleineren Ströme und des damit verbundenen schlechteren Signal/Rausch-Verhältnisses ließ sich die langsame Zeitkonstante in diesem System möglicherweise nicht auflösen.

4.2.2 Lokalanästhetika-Empfindlichkeit von $KCNQ1_{wt}$ und $KCNQ1_{A344V}$

In dieser Arbeit wurde außerdem der Einfluss der Mutation $KCNQ1_{A344V}$ auf die Inhibition von $KCNQ1$ -Kanälen durch Bupivacain und die strukturverwandten Substanzen Ropivacain und Mepivacain untersucht. Dazu wurden $KCNQ1_{wt}$ und $KCNQ1_{A344V}$ ohne und mit KCNE1 in *Xenopus laevis* Oocyten exprimiert. Um den Einfluss des Expressionssystems zu überprüfen, wurde auch die Wirkung von Bupivacain auf $KCNQ1/KCNE1$ -Kanalkomplexe in CHO-Zellen untersucht.

4.2.2.1 Expression in *Xenopus laevis* Oocyten

Wegen der Unterschiede im Aktivierungsverhalten der Kanäle wurden verschiedene Protokolle verwendet, um die Sensitivität von $KCNQ1$ -Kanälen für Lokalanästhetika in *Xenopus laevis* Oocyten zu untersuchen: $KCNQ1_{wt}$ - und $KCNQ1_{A344V}$ -Kanäle wurden durch einen 3 s-Puls auf +60 mV aktiviert, für $KCNQ1_{wt}/KCNE1$ wurde ein 5 s-Puls auf +60 mV und für $KCNQ1_{A344V}/KCNE1$ ein 5 s-Puls auf +80 mV angewendet. Sowohl $KCNQ1_{wt}$ - und $KCNQ1_{A344V}$ -Kanäle als auch $KCNQ1_{wt}/KCNE1$ - und $KCNQ1_{A344V}/KCNE1$ -Kanalkomplexe wurden durch Applikation von Bupivacain inhibiert (Abbildung 4.31 A und B).

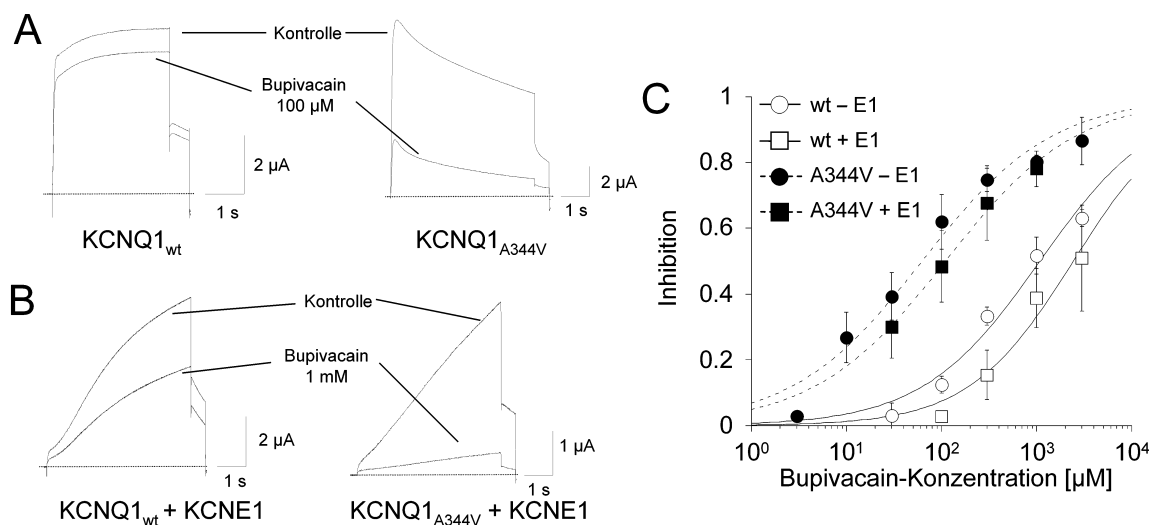


Abbildung 4.31: Inhibition von $KCNQ1$ -Kanälen und $KCNQ1/KCNE1$ -Kanalkomplexen durch Bupivacain in *Xenopus laevis* Oocyten.

(A) Inhibition von $KCNQ1_{wt}$ - und $KCNQ1_{A344V}$ -Kanälen durch 100 μM Bupivacain. (B) Inhibition von $KCNQ1_{wt}/KCNE1$ - und $KCNQ1_{A344V}/KCNE1$ -Kanalkomplexen durch 1 mM Bupivacain. (C) Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Inhibitionen der verschiedenen Kanäle ohne (-E1) und mit KCNE1 (+E1) durch Bupivacain.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition wurde mit einer Hill-Funktion beschrieben (Abbildung 4.31 C, Tabelle 4.6). Dabei waren $KCNQ1_{A344V}$ -Kanäle deutlich empfindlicher als $KCNQ1_{wt}$ -Kanäle. Der IC_{50} -Wert für die Inhibition von

KCNQ1_{wt}-Kanälen durch Bupivacain war 17-mal größer als der für die Inhibition von KCNQ1_{A344V}-Kanälen.

	wt		A344V	
	-KCNE1	+KCNE1	-KCNE1	+KCNE1
IC_{50} [μ M]	1078 \pm 194	2431 \pm 582	62.2 \pm 12.8	110 \pm 9.3
p IC_{50} (wt-A344V)	-	-	<0.001	<0.001
Hill	0.70 \pm 0.10	0.80 \pm 0.17	0.63 \pm 0.08	0.63 \pm 0.05
n	23	20	32	24

Tabelle 4.6: Parameter der Hill-Fits für die Inhibition von KCNQ1-Kanälen und KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexen durch Bupivacain in *Xenopus laevis* Oocyten.

Bei Co-Expression mit KCNE1 waren sowohl Wildtyp-Kanäle als auch mutierte KCNQ1-Kanäle weniger empfindlich für die Wirkung von Bupivacain (Abbildung 4.31 C, Tabelle 4.6). Bei KCNQ1_{wt} wurde die Empfindlichkeit um den Faktor 0.4 reduziert, bei KCNQ1_{A344V} um den Faktor 0.6. Das Verhältnis der IC_{50} -Werte von Wildtyp und Mutante bei Co-Expression mit KCNE1 betrug 22, und veränderte sich damit kaum gegenüber dem Wert bei Expression ohne KCNE1.

Die Spannungsabhängigkeit der Inhibition wurde bei einer Konzentration von 1 mM Bupivacain für KCNQ1_{wt}-Kanäle und bei einer Konzentration von 100 μ M bei KCNQ1_{A344V}-Kanälen und KCNQ1_{A344V}/KCNE1-Kanalkomplexen untersucht (Abbildung 4.32 A-C). Wegen der geringen Empfindlichkeit wurde die Spannungsabhängigkeit der Inhibition von KCNQ1_{wt}/KCNE1-Kanalkomplexen nicht analysiert. Bei den drei untersuchten Kanälen zeigte sich keine Spannungsabhängigkeit der Inhibition bei Membranpotentialen zwischen -30 mV und +100 mV (Abbildung 4.32 D). Auch die Aktivierungsmittelpunkte wurden durch die Wirkung von Bupivacain nicht signifikant verändert (Werte unter Bupivacain-Einfluss: KCNQ1_{wt} $V_{0.5}$ = -23.3 \pm 2.0 mV, n = 3, p > 0.05; KCNQ1_{A344V} $V_{0.5}$ = -26.4 \pm 3.2 mV, n = 7, p > 0.05; KCNQ1_{A344V}/KCNE1 $V_{0.5}$ = +54.8 \pm 5.0 mV, n = 5, p > 0.05).

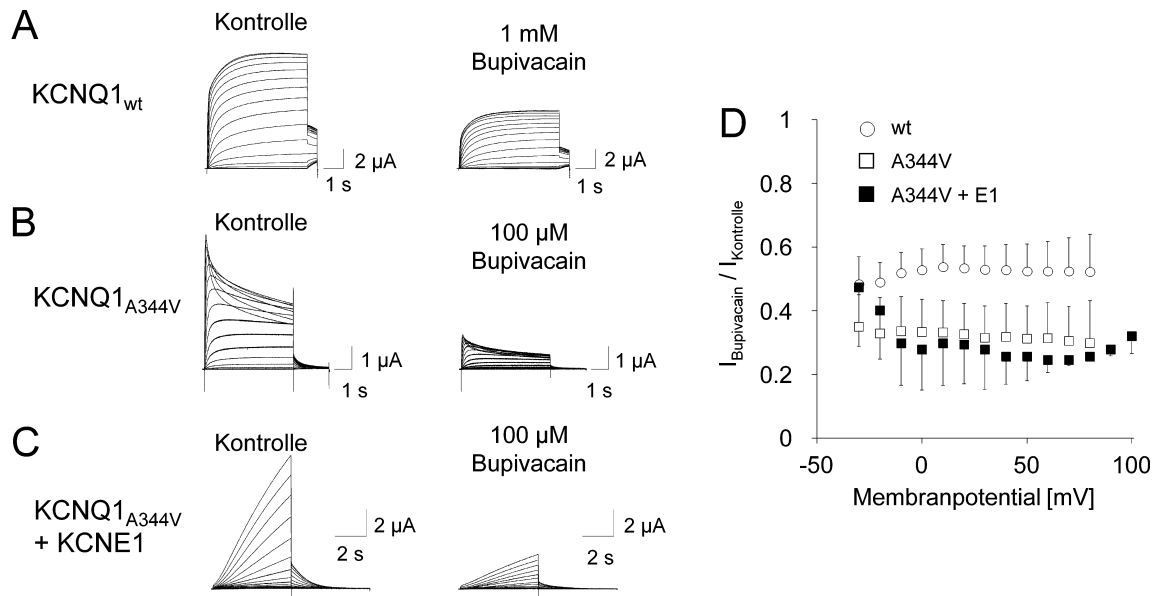


Abbildung 4.32: Spannungsabhängigkeit der Bupivacain-Inhibition von KCNQ1 und KCNQ1/KCNE1. Beispielhafte Stromspuren für die Aktivierung von $KCNQ1_{wt}$ (A), $KCNQ1_{A344V}$ (B) und $KCNQ1_{A344V}/KCNE1$ (C) unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Bupivacain (1 mM bei A, 100 μ M bei B und C). (D) Spannungsabhängigkeit der Inhibition.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Mutation $KCNQ1_{A344V}$ zu einer erhöhten Sensitivität der Kanäle für Bupivacain führte, wurde als nächstes überprüft, ob dies auch für die strukturverwandten Substanzen Ropivacain und Mepivacain zutrifft. Da Ropivacain klinisch nur als S-Enantiomer verwendet wird und auch nur dieses Enantiomer in ausreichenden Mengen zu Verfügung stand, wurde für die folgenden Versuche S-Ropivacain verwendet. Mepivacain hingegen wurde, wie auch Bupivacain als Racemat verwendet. Für die Inhibition von $KCNQ1_{A344V}$ -Kanälen und $KCNQ1_{A344V}/KCNE1$ -Kanalkomplexen durch Ropivacain und Mepivacain wurden vollständige Konzentrations-Wirkungs-Kurven analysiert, die mit Hill-Funktionen beschrieben wurden (Abbildung 4.33 A, Tabelle 4.7). Wegen ihrer geringen Empfindlichkeit wurden für $KCNQ1_{wt}$ -Kanäle und $KCNQ1_{wt}/KCNE1$ -Kanalkomplexe keine Konzentrations-Wirkungs-Kurven ermittelt. Stattdessen wurde die Wirkung von jeweils 1 mM der verschiedenen Lokalanästhetika auf diese Kanäle untersucht und mit der Wirkung auf $KCNQ1_{A344V}$ -Kanäle verglichen (Abbildung 4.33 B).

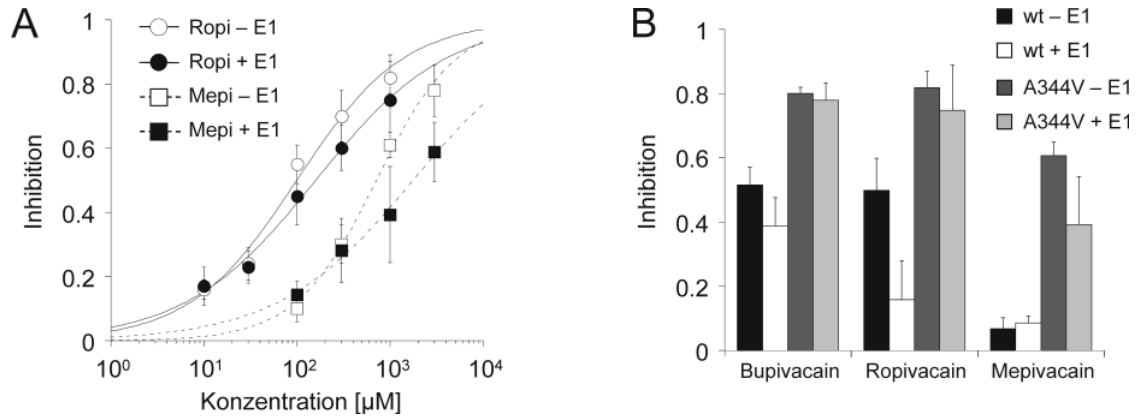


Abbildung 4.33: Inhibition von KCNQ1-Kanälen durch Ropivacain und Mepivacain.

(A) Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Inhibition von $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}$ -Kanälen (-E1) und $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}/\text{KCNE1}$ -Kanalkomplexen (+E1) durch S-Ropivacain (Ropi) und Mepivacain (Mepi). (B) Inhibition der verschiedenen Kanäle durch 1 mM des jeweiligen Lokalanästhetikums.

	<i>Bupivacain</i>		<i>S-Ropivacain</i>		<i>Mepivacain</i>	
	-KCNE1	+KCNE1	-KCNE1	+KCNE1	-KCNE1	+KCNE1
IC_{50} [μM]	62.2 ± 12.8	110 ± 9.3	99 ± 14	158 ± 14	711 ± 61	1764 ± 213
Hill	0.63 ± 0.08	0.63 ± 0.05	0.76 ± 0.08	0.62 ± 0.04	1.00 ± 0.09	0.60 ± 0.06
<i>n</i>	32	24	33	24	23	22

Tabelle 4.7: Parameter der Hill-Fits für die Inhibition von $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}$ - und $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}/\text{KCNE1}$ -Kanälen durch S-Ropivacain und Mepivacain. Werte für Bupivacain sind zum Vergleich aufgenommen.

Es war eine generelle Tendenz einer Abnahme der inhibitorischen Potenz mit abnehmender Lipophilie des Lokalanästhetikums zu erkennen, wobei die Unterschiede nicht immer signifikant waren. So war die Inhibition von $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}$ -Kanälen und $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}/\text{KCNE1}$ -Kanalkomplexen durch 1 mM Bupivacain oder 1 mM Ropivacain nicht signifikant unterschiedlich. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Bupivacain und Ropivacain unterschieden sich bei $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}$ -Kanälen signifikant, nicht jedoch bei $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}/\text{KCNE1}$ -Kanalkomplexen. Die Werte für Mepivacain waren bei diesen hingegen signifikant unterschiedlich von den Werten für Ropivacain. Bei KCNQ1_{wt} -Kanälen unterschied sich die Wirkung von 1 mM Bupivacain und 1 mM Ropivacain nicht signifikant, jedoch die Wirkung von 1 mM Ropivacain und 1 mM Mepivacain. Bei der Inhibition von $\text{KCNQ1}_{\text{wt}}/\text{KCNE1}$ -Kanalkomplexen war die Situation umgekehrt: Die Inhibition durch 1 mM Bupivacain und 1 mM Ropivacain war signifikant unterschiedlich, die durch 1 mM Ropivacain und 1 mM Mepivacain nicht. Dies kann weitgehend damit begründet werden, dass keine kompletten Konzentrations-

Wirkungs-Kurven verglichen wurden, sondern nur Werte bei einer Konzentration, die am oberen bzw. unteren Ende der Kurve lagen. Für alle untersuchten Lokalanästhetika wurde die Sensitivität der KCNQ1-Kanäle durch die Mutation KCNQ1_{A344V} erhöht.

Um zu testen, ob der Effekt der Mutation KCNQ1_{A344V} auf die pharmakologische Sensitivität dominant ist, wurden KCNQ1_{wt}- und KCNQ1_{A344V}-Kanäle im Verhältnis 1:1 ohne und mit KCNE1 exprimiert und die Wirkung von Bupivacain auf diese heteromeren Kanäle untersucht. Für diese Experimente wurde eine Konzentration von 100 μ M Bupivacain gewählt, die im Bereich der IC₅₀-Werte für die Inhibition von KCNQ1_{A344V}-Kanälen und KCNQ1_{A344V}/KCNE1-Kanalkomplexen lag. Beispielhafte Stromspuren unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von Bupivacain sind in Abbildung 4.34 A zu sehen. Einen Vergleich der Inhibition der verschiedenen homomeren und heteromeren Kanäle durch 100 μ M Bupivacain zeigt Abbildung 4.34 B.

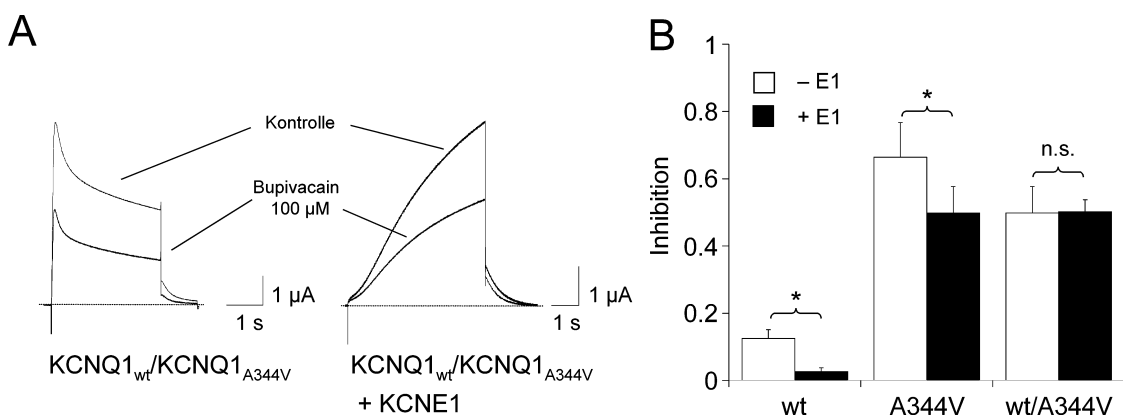


Abbildung 4.34: Inhibition der heteromeren KCNQ1_{wt}/KCNQ1_{A344V}-Kanäle durch 100 μ M Bupivacain. (A) Strom durch KCNQ1_{wt}/KCNQ1_{A344V}-Kanäle und KCNQ1_{wt}/KCNQ1_{A344V}/KCNE1-Kanalkomplexe unter Kontrollbedingungen und nach Einwasch von 100 μ M Bupivacain. (B) Inhibition der verschiedenen homomeren und heteromeren Kanäle durch 100 μ M Bupivacain.

KCNQ1_{wt}/KCNQ1_{A344V}-Heteromere waren deutlich empfindlicher für die inhibierende Wirkung von Bupivacain als KCNQ1_{wt}-Homomere, jedoch nicht so empfindlich wie KCNQ1_{A344V}-Homomere. Die Co-Expression mit KCNE1 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Inhibition von KCNQ1_{A344V}/KCNE1-Heteromeren durch Bupivacain. Bei der Inhibition der Kanalkomplexe mit KCNE1 gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen KCNQ1_{wt}/KCNQ1_{A344V}/KCNE1 und KCNQ1_{A344V}/KCNE1, die Inhibition war deutlich größer als die von KCNQ1_{wt}/KCNE1-Kanälen. Der Effekt der Mutation auf die pharmakologische Sensitivität war also dominant.

4.2.2.2 Expression in CHO-Zellen

In CHO-Zellen wurde die Wirkung von Bupivacain nur auf KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexe untersucht, weil die Ströme durch die homomeren KCNQ1-Kanäle zu gering waren.

Sowohl KCNQ1_{wt}/KCNE1- als auch KCNQ1_{A344V}/KCNE1-Kanalkomplexe wurden durch Bupivacain reversibel und konzentrationsabhängig inhibiert (Abbildung 4.35 A). Dabei wurde die Empfindlichkeit des Kanalkomplexes für Bupivacain durch die Mutation KCNQ1_{A344V} deutlich erhöht.

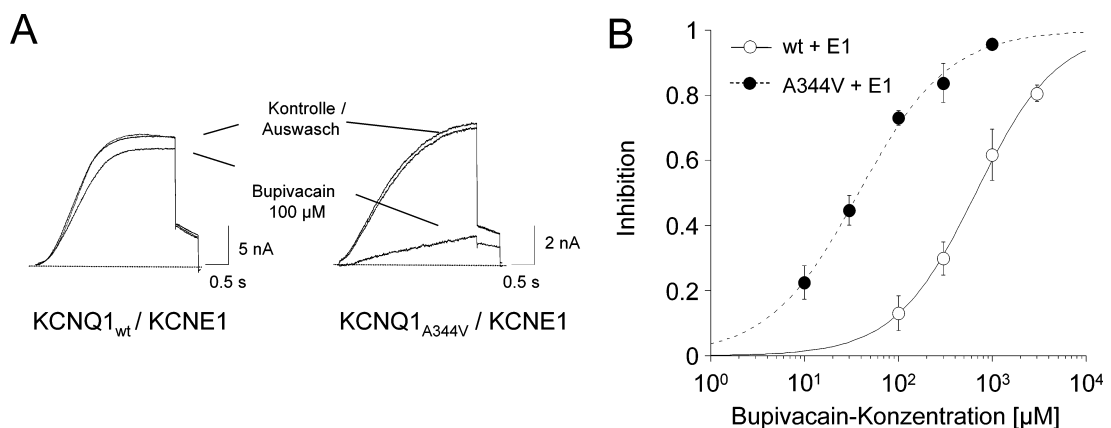


Abbildung 4.35: Inhibition von KCNQ1_{wt} und KCNQ1_{A344V} durch Bupivacain in CHO-Zellen.

(A) Beispielhafte Stromspuren von KCNQ1_{wt}/KCNE1- und KCNQ1_{A344V}/KCNE1-Kanalkomplexen unter Kontrollbedingungen, nach Applikation von 100 µM Bupivacain und nach Auswasch der Substanz. (B) Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden mit Hill-Funktionen beschrieben.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden mit Hill-Funktionen beschrieben (Abbildung 4.35 B und Tabelle 4.8). Der IC₅₀-Wert für die Inhibition durch Bupivacain wurde durch die Mutation A344V um den Faktor 18 reduziert. Das Verhältnis der Inhibition von Wildtyp- und mutierten Kanälen war also ähnlich wie bei den Untersuchungen in *Xenopus laevis* Oocyten. Sowohl KCNQ1_{wt}/KCNE1- als auch KCNQ1_{A344V}/KCNE1-Kanalkomplexe waren in CHO-Zellen deutlich empfindlicher für die Wirkung von Bupivacain als in *Xenopus laevis* Oocyten. KCNQ1_{wt}/KCNE1-Kanäle waren 3.6-mal empfindlicher, KCNQ1_{A344V}/KCNE1-Kanäle 2.9-mal.

	wt	A344V
IC_{50} [μM]	667 \pm 30	37.6 \pm 2.4
p IC_{50} (wt vs. A344V)	-	<0.001
Hill	1.01 \pm 0.05	0.91 \pm 0.05
n	17	26

Tabelle 4.8: Parameter der Hill-Fits für die Inhibition von KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexen durch Bupivacain in CHO-Zellen.

4.2.3 Simulation der Ergebnisse in einem Modell für kardiale Aktionspotentiale

Die Verschiebung des Aktivierungsmittelpunktes zu positiveren Potentialen hin könnte den pathophysiologischen Mechanismus der Mutation KCNQ1_{A344V} erklären. Um abzuschätzen, wie sich diese Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung auf das Herzaktionspotential auswirkt, wurde diese Verschiebung in einer modifizierten Form des Luo-Rudy-Modells für Kardiomyocyten des Meerschweinchens simuliert (siehe 3.4.1). Die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit von I_{Ks} um 15 mV, entsprechend der heterozygoten Situation bei betroffenen Patienten, führte zu einer Verlängerung des Aktionspotentials (Abbildung 4.36 A). Diese Verlängerung war in endokardialen Zellen (41 ms bzw. 19%) deutlich stärker ausgeprägt als in epikardialen (0.2 ms bzw. 0.1%). In midmyokardialen Zellen traten sog. frühe Nachdepolarisationen („early afterdepolarization“ EAD) auf. Außerdem erfolgte hier keine Repolarisation während der Dauer eines normalen Aktionspotentials. Die Dispersion, also der Unterschied in der Aktionspotentialdauer (APD) der verschiedenen Schichten, war bei der Simulation der heterozygoten Situation größer als unter Standardbedingungen. Die Differenz der ADP zwischen Endokard und Epikard nahm von 26 ms auf 66 ms zu.

Die Effekte von 3 μM und 30 μM Bupivacain auf das Aktionspotential sind in Abbildung 4.36 B und C dargestellt. Unter Standardbedingungen (wt, Abbildung 4.36 B) kam es durch 3 μM Bupivacain nur in midmyokardialen Schichten zu einer Verlängerung des Aktionspotentials um 46 ms bzw. 16%. 30 μM Bupivacain führten hingegen in epikardialen und endokardialen Schichten zu einer Verlängerung der APD um 16 ms bzw. um 24 ms (8% bzw. 12%). In der Simulation der midmyokardialen Zellen führte diese Bupivacain-Konzentration zu EADs.

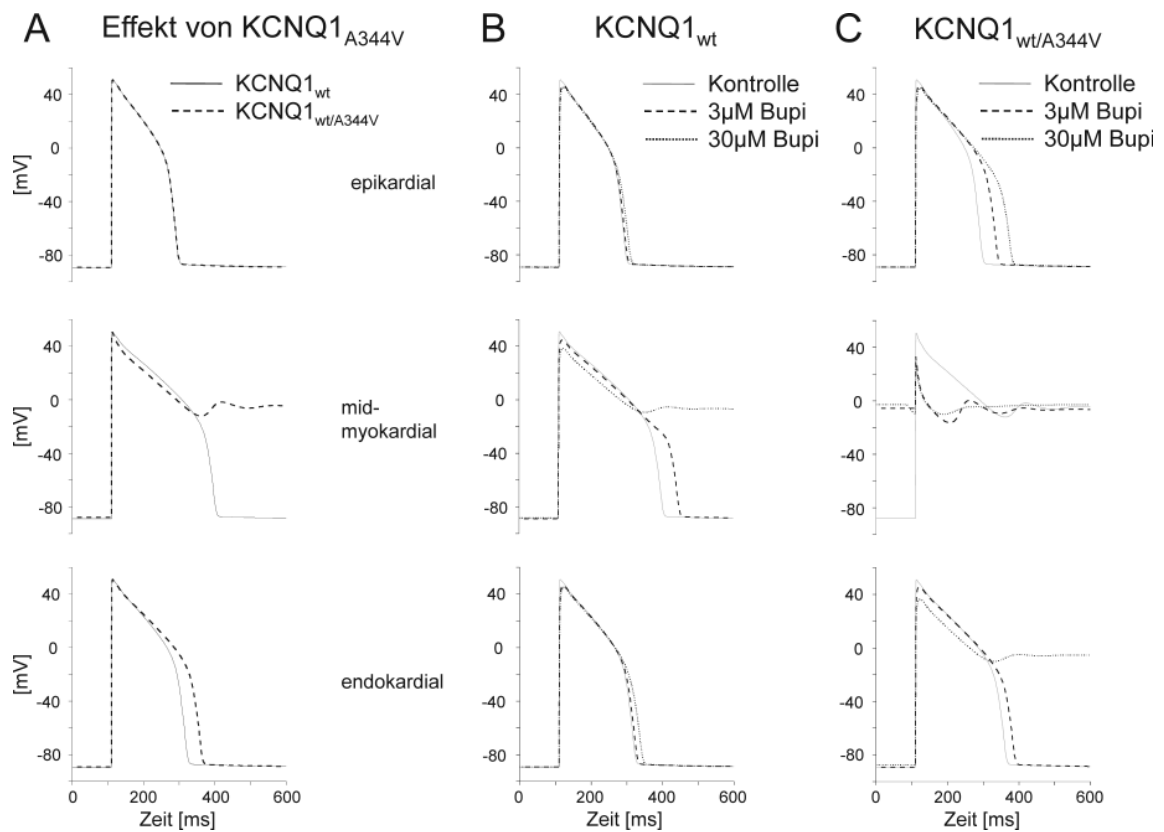


Abbildung 4.36: Simulation kardialer Aktionspotentiale mit dem Luo-Rudy-Modell.

Die Effekte der Mutation $KCNQ1_{A344V}$ auf ein kardiales Aktionspotential (A) und die Wirkung von $3\ \mu\text{M}$ bzw. $30\ \mu\text{M}$ Bupivacain auf ein Aktionspotential unter Standardbedingungen (B) und bei Annahme der heterozygoten Situation bei LQT Patienten (C) wurden für epikardiale (obere Reihe), midmyokardiale (mittlere Reihe) und endokardiale (untere Reihe) Schichten des Herzens simuliert.

Unter Annahme der heterozygoten Situation bei einem LQT1-Patienten mit der Mutation $KCNQ1_{A344V}$ ($\text{wt}/A344V$, Abbildung 4.36 C) hatten bereits $3\ \mu\text{M}$ Bupivacain starke Auswirkungen auf das Aktionspotential. In epikardialen und in endokardialen Schichten des Herzens kam es zu einer Verlängerung des Aktionspotentials um $43\ \text{ms}$ bzw. um $24\ \text{ms}$, dies entspricht einer Verlängerung um 23% bzw. um 10% . In midmyokardialen Schichten kam es zusätzlich zu EADs und zu einer unvollständigen Repolarisation. $30\ \mu\text{M}$ Bupivacain führten in epikardialen Schichten zu einer weiteren Verlängerung des Aktionspotentials um $103\ \text{ms}$ oder 56% . In midmyokardialen und endokardialen Schichten kam es bei dieser Konzentration zu EADs, wobei in midmyokardialen Zellen keine vollständige Repolarisation mehr stattfand.

4.3 KCNQ1 Alanin-Scan

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Alanin-Scan der Porenregion von KCNQ1 durchgeführt. Dazu wurden alle Aminosäuren im Bereich der S5- und der S6-Helix sowie der dazwischen liegenden Linker-Region zu Alanin mutiert. Eine Ausnahme bildeten dabei einige aromatische Aminosäurereste, die bereits im Rahmen eines Tryptophan-Scans zu Alanin mutiert worden waren und die ebenfalls im Institut für neurale Signalverarbeitung untersucht wurden. Aminosäuren, die in KCNQ1 bereits Alanin sind, wurden nicht mutiert.

Die Alanin-Mutanten wurden in *Xenopus laevis* Oocyten mit Hilfe der Two-Electrode-Voltage-Clamp-Methode untersucht. Zur Analyse der Effekte der Alanin-Mutationen wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Zuerst wurde überprüft, ob die Mutation zu Alanin die Funktionalität des Kanals beeinträchtigt, d.h. ob Ströme messbar waren. Im Folgenden wurde analysiert, ob die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und die relative Rubidium-Leitfähigkeit durch die Alanin-Mutationen beeinflusst werden. Dazu wurde ein Aktivierungsprotokoll verwendet. Die Dauer der Depolarisation und des „Tails“ wurde variiert, um bei allen Mutanten eine vollständige Aktivierung und Deaktivierung zu gewährleisten. Als extrazelluläre Lösungen wurden ND80, 20 mM KCl und 140 mM KCl verwendet. In ND80 betrug das Tail-Potential -60 mV, in 20 mM KCl -120 mV; das Haltepotential war -100 mV. Bei symmetrischem Kalium (140 mM KCl) wurden die Oocyten bei 0 mV gehalten, weil bei diesem Potential kein Strom fließt. Außerdem wurden die Leitfähigkeiten für Kalium und Rubidium verglichen. Dazu wurden nach Aktivierung der Kanäle durch Depolarisation auf +40 mV Tail-Ströme bei -120 mV in 100 mM K⁺ bzw. 100 mM Rb⁺ gemessen (Lösungen siehe 3.5.3.2).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 72 Alanin-Mutanten untersucht, 23 in der S5-Helix, 21 im Linker-Bereich zwischen S5 und S6, 22 in der S6-Helix und fünf in der Region C-terminal von S6. Der untersuchte Bereich umfasst 100 Aminosäuren von H258 bis Q357. Die nicht untersuchten Aminosäuren liegen in der Porenregion des Linkers zwischen S5 und S6, die den Selektivitätsfilter enthält (neun Aminosäurereste). Außerdem gibt es in dem untersuchten Bereich neun Alanin-Reste, die nicht verändert wurden. Zehn aromatische Aminosäurereste wurden bereits im Rahmen eines Tryptophan-Scans zu Alanin mutiert und daher im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert.

Von den 72 untersuchten Alanin-Mutationen führten 51 zu funktionellen Kanälen, deren Aktivierungsverhalten und Rb^+ -Leitfähigkeit detailliert untersucht wurden.

Zur Darstellung der Ergebnisse der Messungen wurden die Mutationen, die zu bestimmten Effekten führten, im Modell der Kristallstruktur des Kaliumkanals Kv1.2 modelliert.

4.3.1 Mutanten ohne funktionelle Expression

Von den untersuchten Mutationen führten 21 zu nicht funktionellen Kanälen, die auch bei Untersuchung mit 100 mM extrazellulärem K^+ keinen messbaren Strom zeigten. Die Mutationen, die zu nicht funktionellen Kanälen führen, wurden in der Kristallstruktur der S5- und S6-Helix von Kv1.2 modelliert (Abbildung 4.37). Viele dieser Aminosäurereste befinden sich im oberen Bereich des Kanals. Die linke Abbildung zeigt das Innere der Pore. Die Hälfte der Mutationen, die zu keinen funktionellen Kanälen führten, befinden sich im Linker-Bereich zwischen S5 und S6. Von den insgesamt 22 untersuchten Mutanten in diesem Bereich waren elf ohne messbaren Strom. Außerdem ist aus Abbildung 4.37 zu erkennen, dass einige der Mutationen im Bereich der Kontaktstellen zwischen den einzelnen Untereinheiten liegen. Diese Mutationen könnten daher die korrekte Zusammenlagerung der Untereinheiten stören. Da die Expression dieser Mutanten nicht überprüft wurde, lässt sich nicht sagen, ob der fehlende Strom auf eine veränderte Kanalfunktion oder auf eine fehlerhafte Faltung und damit auf eine Störung des Transports der Kanäle zur Membran zurückzuführen ist.

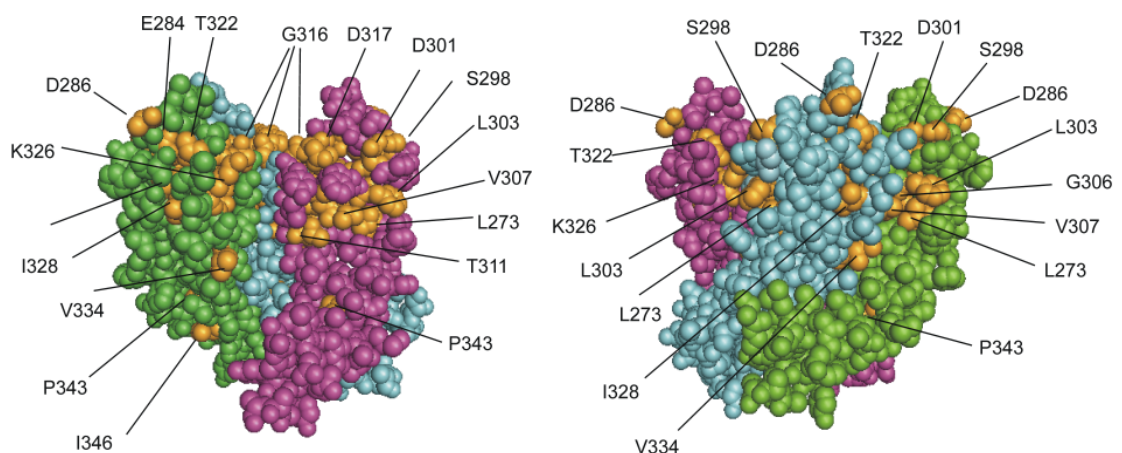


Abbildung 4.37: Mutanten, die keine funktionellen Kanäle bilden.

Modell der S5 und S6-Helix der Kv1.2-Kristallstruktur, in dem die Aminosäurereste, deren Mutation zu Alanin in KCNQ1 zu nicht funktionellen Kanälen führte, orange markiert sind. Es sind nur drei der vier Monomere dargestellt, in der linken Abbildung ist dadurch die innere Porenstruktur sichtbar. Die extrazelluläre Seite weist nach oben.

4.3.2 Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Beispielhafte Stromspuren für die Aktivierung von $KCNQ1_{wt}$ -Kanälen unter den verschiedenen Messbedingungen sind in Abbildung 4.38 A-C dargestellt.

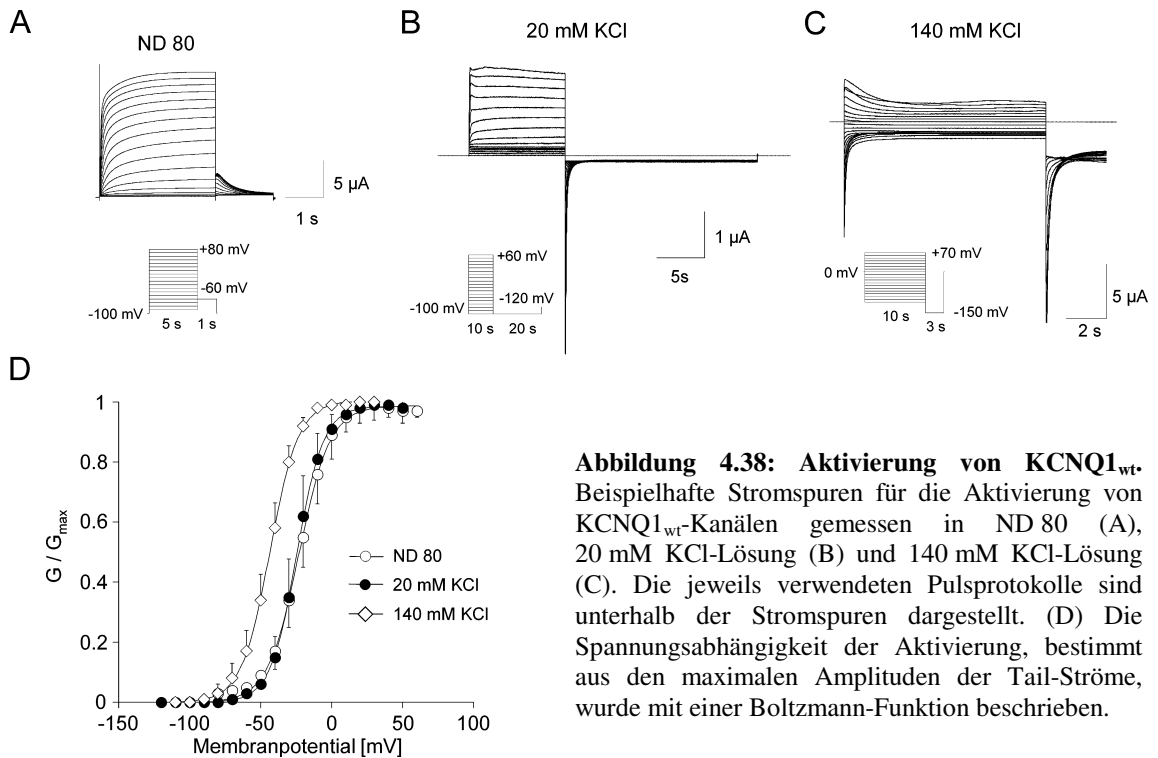


Abbildung 4.38: Aktivierung von $KCNQ1_{wt}$. Beispielhafte Stromspuren für die Aktivierung von $KCNQ1_{wt}$ -Kanälen gemessen in ND 80 (A), 20 mM KCl-Lösung (B) und 140 mM KCl-Lösung (C). Die jeweils verwendeten Pulsprotokolle sind unterhalb der Stromspuren dargestellt. (D) Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, bestimmt aus den maximalen Amplituden der Tail-Ströme, wurde mit einer Boltzmann-Funktion beschrieben.

Die normierten Tail-Ströme wurden mit Boltzmann-Funktionen beschrieben (Abbildung 4.38 D). Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung unterschied sich zwischen den Messungen mit ND80 als extrazellulärer Lösung oder der extrazellulären Lösung mit 20 mM KCl kaum; bei Verwendung von 140 mM KCl war die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung hingegen zu negativeren Potentialen verschoben.

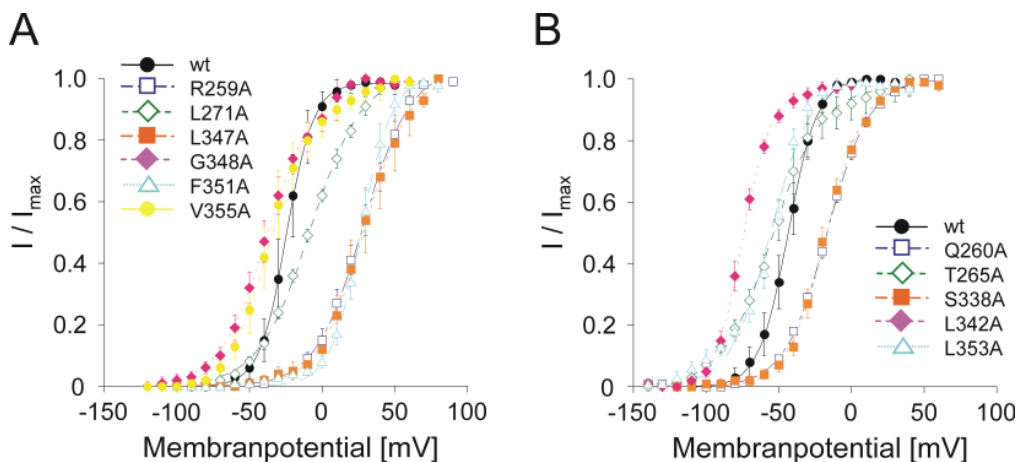


Abbildung 4.39: Aktivierung von $KCNQ1$ -Mutanten im Vergleich zu $KCNQ1_{wt}$. Strom-Spannungs-Beziehung der Aktivierung ausgewählter $KCNQ1$ -Mutanten sowie $KCNQ1_{wt}$ gemessen in 20 mM KCl (A) und 140 mM KCl (B).

Abbildung 4.39 zeigt die Strom-Spannungs-Beziehungen für einige ausgewählte KCNQ1-Mutanten, die einen besonders großen Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung hatten, im Vergleich zu KCNQ1_{wt}.

Die Ergebnisse der Messung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung für alle untersuchten Mutanten sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst.

	<i>n</i>	$V_{0.5}$ [mV]	$\Delta V_{0.5}$ [mV]	<i>z</i>	$-zFV_{0.5} = \Delta G_0$ [kcal/mol]	$\Delta\Delta G_0$ [kcal/mol]	Mess- lösung
wt	25	-22.7±1.0	-	2.30±0.05	-1.21±0.06	-	ND 80
wt	16	-24.3±1.3	-	2.95±0.09	-1.66±0.11	-	20 mM
wt	3	-40.2±1.7	-	2.54±0.18	-2.37±0.27	-	140 mM
S5-Helix							
H258A		kein Strom					
R259A	5	28.9±1.5	53.2±2.0	1.54±0.04	1.02±0.03	2.7±0.11	20 mM
Q260A	6	-19.1±1.6	21.1±2.3	1.72±0.05	-0.75±0.05	1.6±0.28	140 mM
E261A	9	-29.2±0.7	-4.9±1.5	2.85±0.06	-1.92±0.06	-0.3±0.13	20 mM
L262A	4	-18.4±2.0	5.9±2.4	1.77±0.04	-0.75±0.10	0.9±0.15	20 mM
I263A	10	-17.7±0.8	6.6±1.5	3.37±0.26	-1.40±0.14	0.3±0.18	20 mM
T264A	5	-55.7±1.1	-15.4±2.0	1.98±0.06	-2.53±0.06	-0.2±0.28	140 mM
T265A	4	-54.9±1.1	-14.7±2.1	1.53±0.08	-1.94±0.12	0.4±0.30	140 mM
L266A	7	-20.9±0.3	3.5±1.3	2.56±0.18	-1.23±0.10	0.4±0.15	20 mM
Y267A	5	-30.6±2.8	-7.9±3.0	1.58±0.11	-1.14±0.19	0.1±0.20	ND 80
I268A	4	-32.8±3.1	-8.5±3.4	1.52±0.07	-1.15±0.10	0.5±0.15	20 mM
G269A	6	-42.0±2.3	-1.7±2.9	2.02±0.09	-1.97±0.19	0.4±0.33	140 mM
F270A		nicht untersucht					
L271A	4	-7.9±0.9	16.4±1.6	1.42±0.06	-0.26±0.03	1.4±0.11	20 mM
G272A	4	-26.4±0.6	-2.0±1.4	3.03±0.14	-1.84±0.08	-0.2±0.13	20 mM
L273A		kein Strom					
I274A	4	-44.1±0.8	-3.9±1.9	2.87±0.08	-2.92±0.10	-0.6±0.29	140 mM
F275A	4	-25.3±1.1	-2.5±1.5	2.02±0.07	-1.18±0.09	0.0±0.11	ND 80
S276A	5	-18.8±2.1	5.5±2.5	3.23±0.23	-1.42±0.21	0.2±0.24	20 mM
S277A	5	-31.9±0.9	-7.6±1.6	2.55±0.12	-1.87±0.11	-0.2±0.15	20 mM
Y278A	6	10.7±1.4	33.5±1.8	1.19±0.09	0.29±0.04	1.5±0.07	ND 80
F279A	6	-26.3±0.7	-3.6±1.2	2.54±0.07	-1.55±0.08	-0.3±0.10	ND 80
V280A		kein Strom					
Y281A		nicht untersucht					
L282A	5	-34.2±0.9	6.1±2.0	2.72±0.24	-2.13±0.15	0.2±0.31	140 mM
A283		-					
Linker-Bereich							
E284A		kein Strom					
K285A	5	-34.1±1.7	-9.8±2.2	1.75±0.08	-1.39±0.14	0.3±0.18	20 mM
D286A		kein Strom					
A287		-					
V288A	4	-23.9±2.6	0.4±2.9	1.88±0.06	-1.03±0.10	0.6±0.15	20 mM
N289A	5	-24.3±0.6	0.0±1.4	1.94±0.03	-1.08±0.04	0.6±0.11	20 mM
E290A	5	-22.2±1.4	2.1±1.9	3.00±0.29	-1.52±0.12	0.1±0.17	20 mM
S291A	4	-24.3±1.4	0.0±1.9	4.13±0.31	-2.33±0.27	-0.7±0.29	20 mM
G292A		kein Strom					
R293A	5	-21.1±0.7	3.2±1.5	2.31±0.01	-1.13±0.04	0.5±0.12	20 mM
V294A	5	-25.8±0.8	-1.5±1.5	2.27±0.06	-1.35±0.04	0.3±0.12	20 mM
E295A	5	-21.4±0.9	2.9±1.6	3.06±0.17	-1.51±0.10	0.1±0.15	20 mM
F296A		nicht untersucht					
G297A	4	-20.3±3.4	4.0±3.6	2.73±0.23	-1.33±0.32	0.3±0.33	20 mM
S298A		kein Strom					
Y299A		nicht untersucht					
A300		-					
D301A		kein Strom					
A302		-					
L303A		kein Strom					
W304A		nicht untersucht					
W305A		nicht untersucht					
G306A		kein Strom					
V307A		kein Strom					
V308A		kein Strom					

	<i>n</i>	$V_{0.5}$ [mV]	$\Delta V_{0.5}$ [mV]	<i>z</i>	$-zFV_{0.5} = \Delta G_0$ [kcal/mol]	$\Delta\Delta G_0$ [kcal/mol]	Mess- lösung
wt	25	-22.7±1.0	-	2.30±0.05	-1.21±0.06	-	ND 80
wt	16	-24.3±1.3	-	2.95±0.09	-1.66±0.11	-	20 mM
wt	3	-40.2±1.7	-	2.54±0.18	-2.37±0.27	-	140 mM
T309A	kein Strom						
V310A	7	-26.1±1.9	-1.8±2.3	1.46±0.06	-0.87±0.07	0.8±0.13	20 mM
T311A	kein Strom						
T312A	3	-33.2±0.89	7.1±1.9	1.94±0.13	-1.48±0.07	0.9±0.28	140 mM
I313A	nicht untersucht						
G314A	nicht untersucht						
Y315A	nicht untersucht						
G316A	kein Strom						
D317A	kein Strom						
K318A	kein Strom						
V319A	kein Strom						
P320A	kein Strom						
S6-Helix							
Q321A	4	-22.3±0.8	2.0±1.5	3.27±0.13	-1.68±0.05	0.0±0.12	20 mM
T322A	kein Strom						
W323A	nicht untersucht						
V324A	7	-27.5±1.8	-3.1±2.3	2.78±0.13	-1.75±0.14	-0.1±0.18	20 mM
G325A	kein Strom						
K326A	kein Strom						
T327A	5	-27.8±0.5	-3.5±1.4	2.87±0.06	-1.85±0.06	-0.2±0.13	20 mM
I328A	kein Strom						
A329	-						
S330A	4	-29.0 0.6	-4.7±1.5	2.81±0.07	-1.88±0.08	-0.2±0.13	20 mM
C331A	4	-31.5 0.7	-7.2±1.5	2.88±0.09	-2.10±0.11	-0.4±0.15	20 mM
F332A	nicht untersucht						
S333A	4	-21.9±0.8	2.4±1.5	3.41±0.20	-1.73±0.16	-0.1±0.20	20 mM
V334A	kein Strom						
F335A	nicht untersucht						
A336	-						
I337A	4	-22.2±0.5	2.1±1.4	1.99±0.04	-1.02±0.01	0.6±0.11	20 mM
S338A	6	3.8±1.5	28.1±2.0	1.49±0.05	0.13±0.05	1.8±0.12	20 mM
F339A	nicht untersucht						
F340A	nicht untersucht						
A341	-						
L342A	3	-74.3±0.8	-34.0±1.9	2.56±0.10	-4.39±0.14	-2.0±0.31	140 mM
P343A	kein Strom						
A344	-						
G345A	4	-43.7±2.1	-3.5±2.5	1.71±0.04	-1.72±0.12	0.6±0.30	140 mM
I346A	kein Strom						
L347A	4	36.0±4.9	60.3±5.0	1.33±0.14	1.06±0.07	2.7±0.13	20 mM
G348A	5	-37.0±2.0	-12.7±2.4	1.58±0.08	-1.35±0.12	0.3±0.16	20 mM
S349A	4	-9.7±1.4	30.5±1.9	2.34±0.13	-0.53±0.10	1.8±0.29	140 mM
G350A	7	3.2±0.5	27.5±1.4	2.06±0.05	0.15±0.02	1.8±0.11	ND 80
F351A	6	27.0±1.2	51.3±1.8	2.40±0.06	1.49±0.06	3.1±0.12	20 mM
A352	-						
C-Terminus							
L353A	5	-55.3±1.1	-15.1±1.7	1.80±0.07	-2.29±0.07	0.1±0.28	140 mM
K354A	4	-8.9±0.7	15.5±1.5	1.93±0.08	-0.39±0.03	1.3±0.11	20 mM
V355A	4	-35.3±3.0	-11.0±3.3	1.83±0.04	-1.50±0.15	0.2±0.19	20 mM
Q356A	5	-24.5±1.0	-0.2±1.6	2.51±0.05	-1.42±0.08	0.2±0.13	20 mM
Q357A	6	-16.4±2.1	7.9±2.5	2.00±0.07	-0.77±0.12	0.9±0.16	20 mM

Tabelle 4.9: Zusammenfassung des Aktivierungsverhaltens der untersuchten Alanin-Mutanten.

Die Werte für die Spannung der halbmaximalen Aktivierung $V_{0.5}$ und für z wurden aus den Boltzmann-Fits der Aktivierungskurven ermittelt. Daraus wurde die Differenz der Gibbs-Energie zwischen offenem und geschlossenem Zustand ΔG_0 berechnet. Außerdem wurde der Effekt der Mutationen auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung ($\Delta V_{0.5}$) und auf die Gibbs-Energie ($\Delta\Delta G_0$) berechnet. In der letzten Spalte ist die jeweils verwendete Messlösung angegeben. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt; n bezeichnet die Anzahl der Experimente.

Der größte Teil der analysierten Alanin-Mutationen (34 bzw. 67%) hatte keinen oder nur geringen Einfluss auf das Aktivierungsverhalten der KCNQ1-Kanäle. Die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung durch die Alanin-Mutanten ($\Delta V_{0.5}$) ist in Abbildung 4.40 vergleichend dargestellt. Der Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurde als gering eingestuft, wenn die Differenz der $V_{0.5}$ -Werte zwischen KCNQ1_{wt} und der Mutante ($\Delta V_{0.5}$) vom Betrag kleiner als 10 mV war (Abbildung 4.40, dünne Linien).

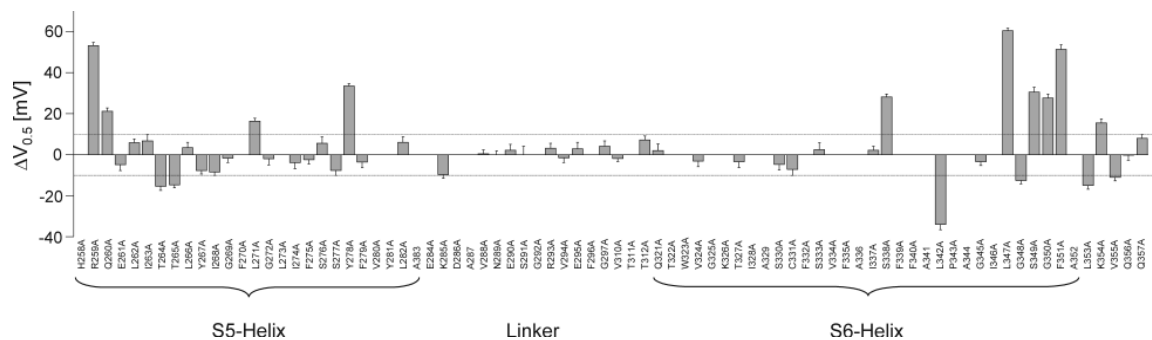


Abbildung 4.40: Einfluss der Alanin-Mutationen auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. Dargestellt ist die Differenz der $V_{0.5}$ -Werte von KCNQ1_{wt} und der jeweiligen Mutante ($\Delta V_{0.5}$) als Mittelwert \pm Standardfehler. Bei Werten von $\Delta V_{0.5}$ vom Betrag kleiner als 10 mV wurde der Einfluss der Mutation auf die Spannungsabhängigkeit als gering eingestuft. Die Alanin-Mutanten S298A bis T309A und I313A bis P320A, die keinen messbaren Strom zeigten bzw. nicht untersucht wurden (siehe Tabelle 4.9) sind in diesem Diagramm nicht enthalten.

Bei 17 der untersuchten Alanin-Mutanten fand eine deutliche Verschiebung der Spannungsabhängigkeit statt, wobei eine Verschiebung von $V_{0.5}$ zu positiveren Potentialen häufiger war als eine Verschiebung zu negativeren Potentialen. Besonders große Effekte auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurden am Anfang von S5 und am Ende von S6 gemessen. Diese Bereiche entsprechen dem cytoplasmatischen Ende der S5- bzw. S6-Helix. Auch bei der Modellierung dieser Ergebnisse im Modell von Kv1.2 (Abbildung 4.41 und Abbildung 4.42) wird deutlich, dass die meisten Aminosäurereste mit Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in der unteren Hälfte des Kanals liegen. Eine Ausnahme bildet dabei die Mutation K285A am Beginn der Linker-Region zwischen S5 und S6 im extrazellulären Bereich des Kanals, die zu einer Verschiebung von $V_{0.5}$ zu negativem Potentialen führte.

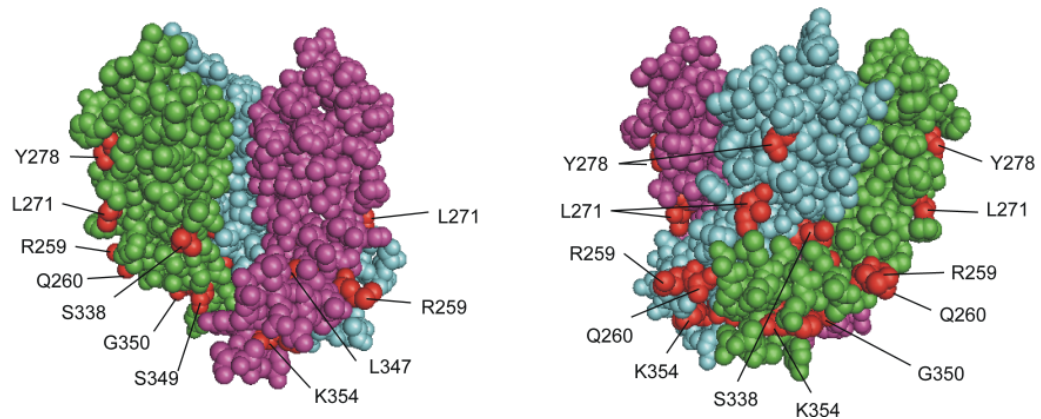


Abbildung 4.41: Mutanten mit Verschiebung von $V_{0,5}$ zu positiveren Potentialen.

Modell der S5 und S6-Helix der Kv1.2-Kristallstruktur, in der die Aminosäurereste, deren Mutation zu Alanin in KCNQ1 eine Verschiebung des Aktivierungsmittelpunktes zu positiveren Potentialen verursachte, rot markiert sind. Es sind nur drei der vier Monomere dargestellt, in der linken Abbildung ist dadurch die innere Porenstruktur sichtbar. Die extrazelluläre Seite weist nach oben.

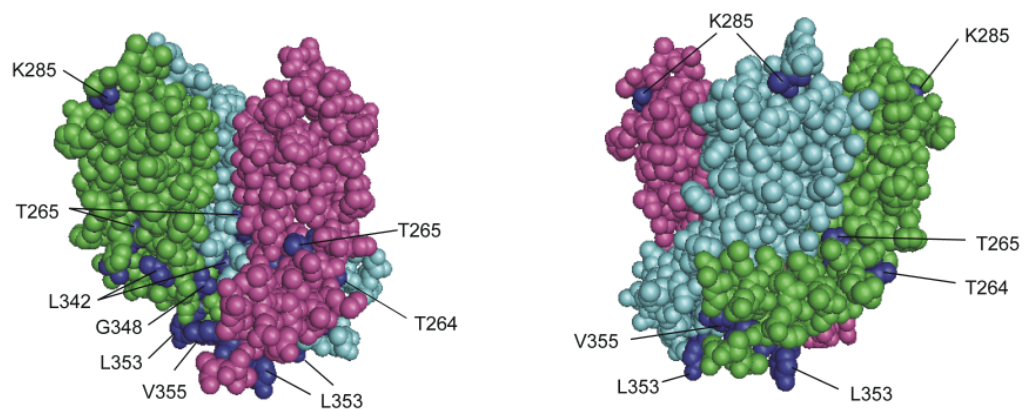


Abbildung 4.42: Mutanten mit Verschiebung von $V_{0,5}$ zu negativeren Potentialen.

Im Modell der S5 und S6-Helix der Kv1.2-Kristallstruktur wurden die Aminosäurereste, deren Mutation zu Alanin in KCNQ1 zu einer Verschiebung des Aktivierungsmittelpunktes zu negativeren Potentialen führte, blau markiert. Es sind nur drei der vier Monomere dargestellt, in der linken Abbildung ist dadurch die innere Porenstruktur sichtbar. Die extrazelluläre Seite weist nach oben.

Aus den Parametern $V_{0,5}$ und z des Boltzmann-Fits wurden Werte für die Gibbs-Energie des Öffnungsvorganges ΔG_0 berechnet (siehe Methoden). Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 4.9 zu finden. Die Veränderung der Gibbs-Energie durch die Mutationen ($\Delta\Delta G_0$) ist in Abbildung 4.43 dargestellt. Eine Veränderung von ΔG_0 wurde angenommen, wenn $\Delta\Delta G_0$ größer als 1.2 kcal/mol bzw. kleiner als -1.2 kcal/mol war. Es zeigte sich, dass alle Mutationen, die zu einer deutlichen Verschiebung von $V_{0,5}$ zu positiveren Potentialen führten, auch eine Verschiebung von ΔG_0 zu positiveren Werten verursachten. Sehr negative $\Delta\Delta G_0$ -Werte waren hingegen nicht bei allen Mutationen mit einem negativen $\Delta V_{0,5}$ zu finden, sondern nur bei L342A.

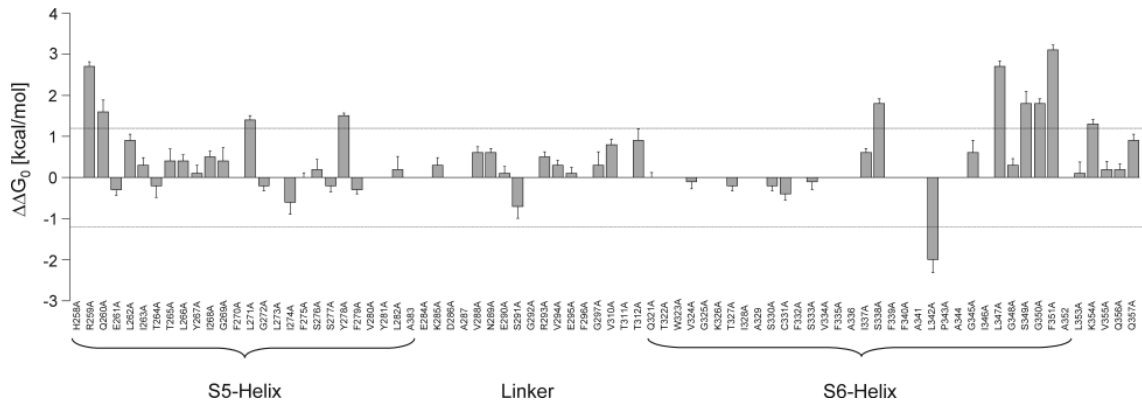


Abbildung 4.43: Einfluss der Alanin-Mutationen auf die freie Energie der Aktivierung.

Dargestellt ist die Differenz der ΔG_0 -Werte von $KCNQ1_{wt}$ und der jeweiligen Mutante ($\Delta\Delta G_0$) als Mittelwert \pm Standardfehler. Bei Werten größer als 1.2 kcal/mol bzw. kleiner als -1.2 kcal/mol (dünne Linien) wurde ein Effekt der Mutation auf die Gibbs-Energie der Aktivierung angenommen. Die Alanin-Mutanten S298A bis T309A und I313A bis P320A, die keinen messbaren Strom zeigten bzw. nicht untersucht wurden (siehe Tabelle 4.9) sind in diesem Diagramm nicht enthalten.

4.3.3 Mutationen mit spannungsabhängiger Inaktivierung

Bei acht Alanin-Mutanten zeigte sich beim Aktivierungsprotokoll im Gegensatz zu $KCNQ1_{wt}$ eine spannungsabhängige Inaktivierung mit unterschiedlich starker Ausprägung. Beispielhafte Stromspuren sind in Abbildung 4.44 dargestellt.

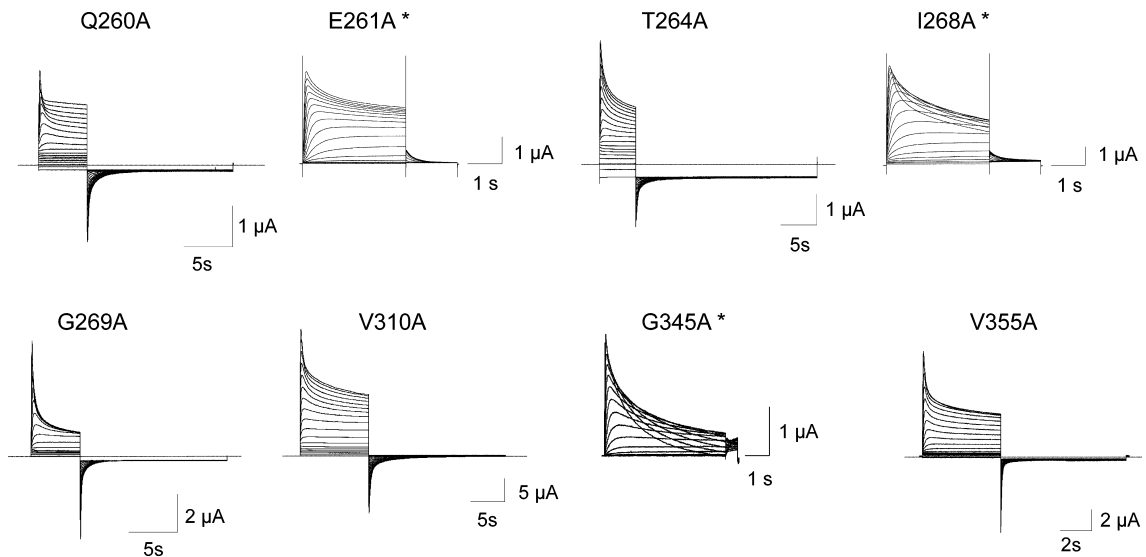


Abbildung 4.44: Stromspuren der Mutanten, die eine spannungsabhängige Inaktivierung zeigten. Beispielhafte Stromspuren der Aktivierung für die Alanin-Mutanten, die eine spannungsabhängige Inaktivierung zeigten. Die Ströme wurde mit 20 mM extrazellulärem K^+ bzw. ND80 (Mutanten mit *) aufgenommen, das Tail-Potential betrug -120 mV bzw. -60 mV (Mutanten mit *).

Die Positionen der acht Aminosäurereste, die bei Mutation zu Alanin zu einer spannungsabhängigen Inaktivierung führten, wurden im Modell des Kv1.2 Kanals dunkelrot dargestellt (Abbildung 4.45). Dabei fällt auf, dass diese Aminosäuren alle in

der unteren Hälfte des Kanals liegen. Dabei weisen einige Reste in die Öffnung der Pore hinein (V310, G345), während andere in Richtung der Membran zeigen (Q260, E261, T264, I268)

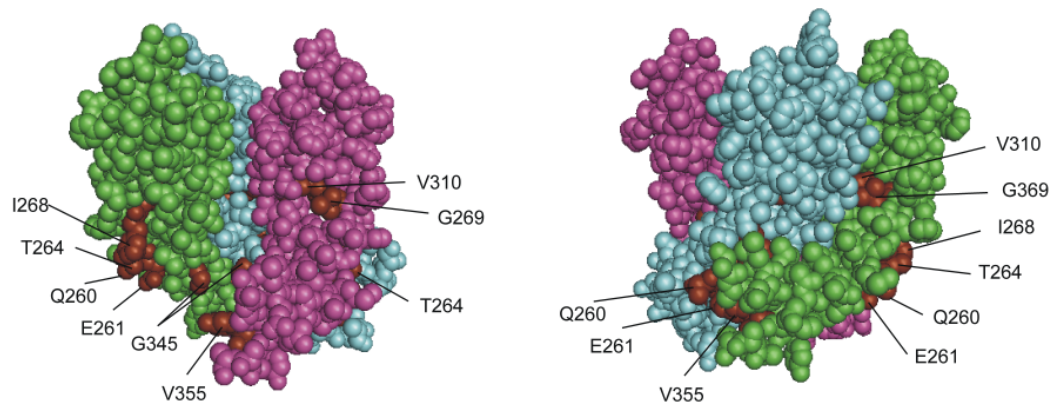


Abbildung 4.45: Mutanten mit makroskopischer spannungsabhängiger Inaktivierung.

Die Aminosäurereste, die bei Mutation zu Alanin zu einer spannungsabhängigen Inaktivierung führten, wurden in der Kv1.2-Kristallstruktur dunkelrot markiert. Es sind nur drei der vier Monomere dargestellt, in der linken Abbildung ist dadurch die innere Porenstruktur sichtbar. Die extrazelluläre Seite weist nach oben.

Zusätzlich zu den hier untersuchten Mutanten wurde eine ähnliche spannungsabhängige Inaktivierung für die Mutanten F339A und F340A, die im Rahmen des Tryptophan-Scans untersucht wurden, beschrieben. Von diesen Resten wird ebenfalls angenommen, dass sie in die Pore von KCNQ1 hineinragen.

4.3.4 Untersuchung der relativen Rb^+/K^+ -Leitfähigkeit

Für alle Alanin-Mutanten wurden die Tail-Ströme bei -120 mV nach Aktivierung auf +40 mV in 100 mM Rb^+ - und 100 mM K^+ -Lösung (siehe 3.5.3.2) gemessen. Beispielhafte Stromspuren für $KCNQ1_{wt}$ und fünf Mutanten sind in Abbildung 4.46 dargestellt.

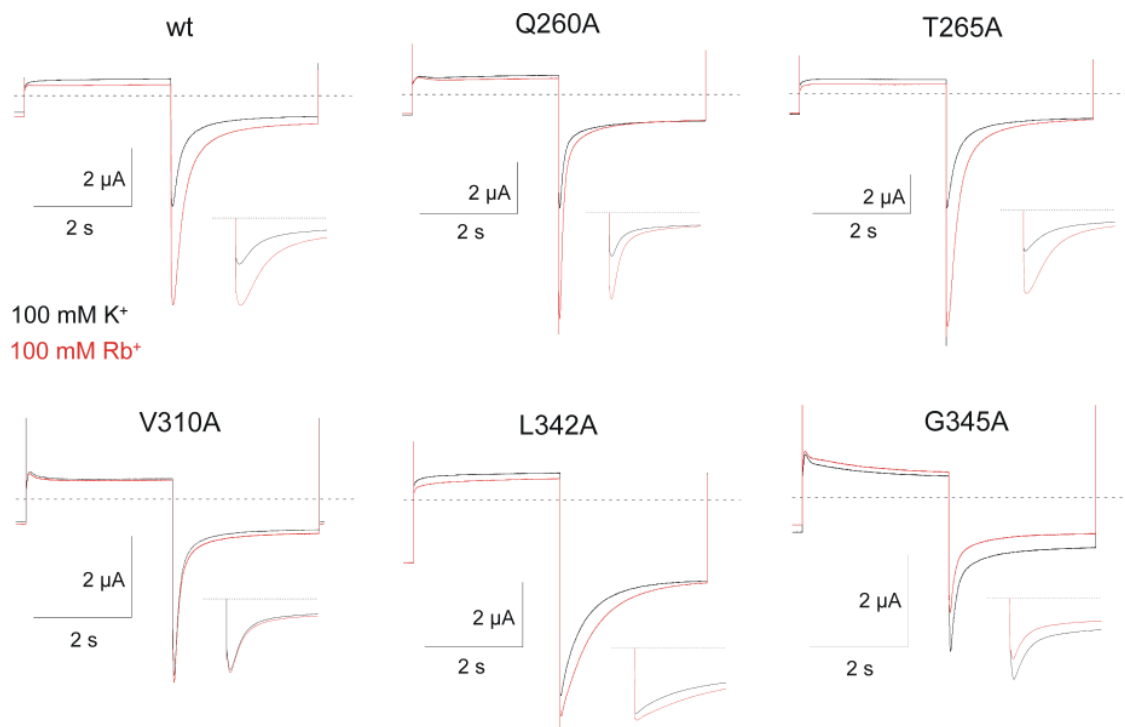


Abbildung 4.46: Beispielhafte Stromspuren für Messungen in 100 mM KCl bzw. 100 mM RbCl-Lösung. Die Stromantworten von $KCNQ1_{wt}$ -Kanälen und ausgewählten Alanin-Mutanten auf einen Rechteckpuls bei einer Messlösung mit 100 mM K^+ bzw. 100 mM Rb^+ zeigen die relative Rubidium-Leitfähigkeit. Das Ausmaß der Inaktivierung wurde durch Extrapolation des „hooks“ bestimmt. Die kleinen Bilder zeigen jeweils einen Ausschnitt von 1 s.

Aus dem Verhältnis der maximalen Amplituden gemessen in 100 mM Rb^+ - und 100 mM K^+ -Lösung wurde die relative Rb^+/K^+ -Leitfähigkeit G_{Rb}/G_K berechnet. $KCNQ1_{wt}$ -Kanäle zeigten eine deutlich größere Leitfähigkeit für Rb^+ als für K^+ , das Verhältnis G_{Rb}/G_K betrug 2.28 ± 0.08 . Einige Mutationen, wie z.B. Q260A und T265A (Abbildung 4.46, obere Reihe), hatten keinen oder nur geringen Einfluss auf die relative Rb^+/K^+ -Leitfähigkeit. Andere führten dazu, dass die Leitfähigkeiten für Rb^+ und K^+ fast gleich waren (Abbildung 4.46, untere Reihe). Die Ergebnisse aller untersuchten Mutanten sind in Tabelle 4.10 zusammengefasst.

	<i>n</i>	G_{Rb^+}/G_{K^+}	$f_{inakt.}$		<i>n</i>	G_{Rb^+}/G_{K^+}	$f_{inakt.}$
wt	16	2.28 ± 0.08	0.58 ± 0.02				
S5-Helix				S6-Helix			
H258A		kein Strom		Q321A	4	2.48 ± 0.11	0.77 ± 0.02
R259A	5	1.77 ± 0.05	0.58 ± 0.02	T322A		kein Strom	
Q260A	6	2.12 ± 0.11	0.70 ± 0.03	W323A		nicht untersucht	
E261A	6	0.60 ± 0.03	0	V324A	7	2.06 ± 0.05	0.74 ± 0.03
L262A	4	1.60 ± 0.04	0.41 ± 0.04	G325A		kein Strom	
I263A	10	2.37 ± 0.06	0.62 ± 0.02	K326A		kein Strom	
T264A	5	1.60 ± 0.08	0	T327A	5	2.00 ± 0.07	0.58 ± 0.07
T265A	4	2.24 ± 0.11	0.19 ± 0.03	I328A		kein Strom	
L266A	7	1.89 ± 0.06	0.49 ± 0.02	A329			
Y267A		nicht untersucht		S330A	4	2.29 ± 0.08	0.74 ± 0.03
I268A	3	1.72 ± 0.03	0.71 ± 0.05	C331A	4	2.21 ± 0.07	0.51 ± 0.03
G269A	6	1.54 ± 0.06	0.79 ± 0.04	F332A		nicht untersucht	
F270A		nicht untersucht		S333A	4	1.82 ± 0.05	0.39 ± 0.01
L271A	4	1.82 ± 0.05	0.43 ± 0.02	V334A		kein Strom	
G272A	4	2.11 ± 0.05	0.34 ± 0.03	F335A		nicht untersucht	
L273A		kein Strom		A336	-		
I274A	4	1.37 ± 0.03	0.67 ± 0.03	I337A	4	1.42 ± 0.04	0.32 ± 0.01
F275A		nicht untersucht		S338A	4	2.60 ± 0.07	0.71 ± 0.03
S276A	5	2.10 ± 0.04	0.34 ± 0.02	F339A		nicht untersucht	
S277A	5	2.02 ± 0.04	0.58 ± 0.01	F340A		nicht untersucht	
Y278A		nicht untersucht		A341		-	
F279A		nicht untersucht		L342A	3	1.20 ± 0.04	0.23 ± 0.03
V280A		kein Strom		P343A		kein Strom	
Y281A		nicht untersucht		A344		-	
L282A	5	1.99 ± 0.06	0.39 ± 0.01	G345A	4	0.72 ± 0.02	0.94 ± 0.12
A283		-		I346A		kein Strom	
Linker				C-Terminus			
E284A		kein Strom		L347A	4	1.73 ± 0.06	0.26 ± 0.02
K285A	5	2.36 ± 0.13	0.40 ± 0.01	G348A	4	1.58 ± 0.04	0.27 ± 0.02
D286A		kein Strom		S349A	4	1.89 ± 0.05	0.52 ± 0.04
A287		-		G350A	6	2.39 ± 0.15	0.38 ± 0.03
V288A	4	2.18 ± 0.43	0.62 ± 0.01	F351A	5	2.43 ± 0.27	0
N289A	5	2.13 ± 0.16	0.56 ± 0.01	A352		-	
E290A	5	2.38 ± 0.14	0.60 ± 0.04	C-Terminus			
S291A	4	2.50 ± 0.03	0.57 ± 0.03	L353A	5	1.71 ± 0.06	0.57 ± 0.02
G292A		kein Strom		K354A	4	1.65 ± 0.07	0.74 ± 0.02
R293A		2.15 ± 0.06	0.64 ± 0.02	V355A	4	0.77 ± 0.03	0
V294A	5	1.97 ± 0.08	0.64 ± 0.02	Q356A	5	2.19 ± 0.10	0.49 ± 0.03
E295A	5	2.18 ± 0.12	0.63 ± 0.04	Q357A	6	2.08 ± 0.16	0.60 ± 0.03
F296A		nicht untersucht					
G297A	4	2.15 ± 0.12	0.63 ± 0.04				
V310A	7	1.02 ± 0.05	0.58 ± 0.04				
T311A		kein Strom					
T312A		2.48 ± 0.10	0				

Tabelle 4.10: Zusammenfassung der Messungen der Alanin-Mutanten mit 100 mM K⁺ / 100 mM Rb⁺. Dargestellt sind die relative Rb⁺/K⁺-Leitfähigkeit (G_{Rb^+}/G_{K^+}) und der Anteil der inaktivierten Kanäle ($f_{inakt.}$) als Mittelwert ± Standardfehler. $f_{inakt.}$ wurde bei 100 mM K⁺ bestimmt (siehe 3.3.3.6). *n* bezeichnet die Anzahl der Experimente. Die Alanin-Mutanten S298A bis T309A und I313A bis P320A, die keinen messbaren Strom zeigten bzw. nicht untersucht wurden (siehe Tabelle 4.9), sind in dieser Tabelle nicht enthalten.

Bei 40 der insgesamt 47 untersuchten Alanin-Mutanten (entspricht 85%) wurde kein oder nur ein geringer Einfluss auf die relative Rb⁺/K⁺-Leitfähigkeit festgestellt. Bei sieben Mutationen war G_{Rb^+}/G_{K^+} reduziert gegenüber KCNQ1_{wt}. Als eine Reduktion der relativen Rb⁺/K⁺-Leitfähigkeit wurde ein G_{Rb^+}/G_{K^+} -Verhältnis ≤ 1.5 definiert.

Diese sieben Aminosäurereste wurden in der Kristallstruktur von Kv1.2 modelliert (Abbildung 4.47). Die meisten Aminosäuren, deren Mutation zu Alanin zu einer reduzierten relativen Rb^+/K^+ -Leitfähigkeit führte, sind in der unteren Hälfte des Kanals zu finden und ragen in die Pore hinein. Daher sind sie in der linken Abbildung besser zu sehen; lediglich der Rest I274 befindet sich in der oberen Hälfte des Kanals und weist nach außen.

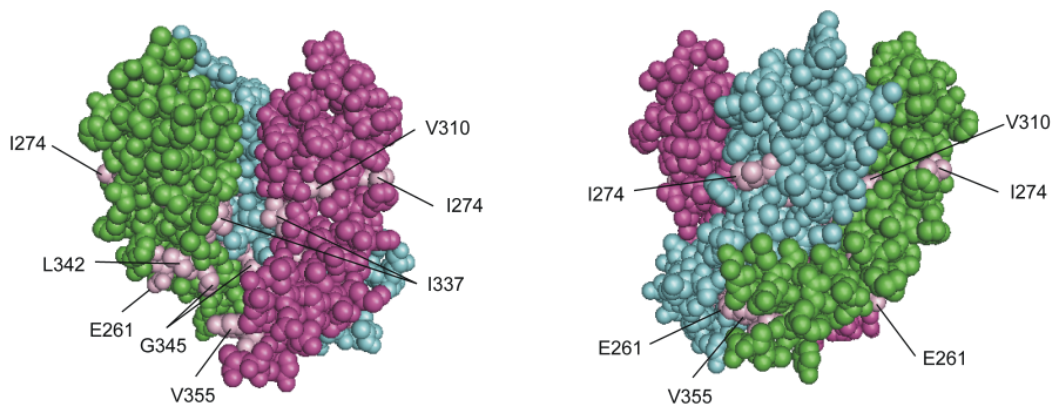


Abbildung 4.47: Mutanten mit einer reduzierten relativen Rb^+/K^+ -Leitfähigkeit.

Die Aminosäurereste, die bei Mutation zu Alanin zu einer reduzierten relativen Rb^+/K^+ -Leitfähigkeit führten, wurden in der Kv1.2-Kristallstruktur rosa markiert. Es sind nur drei der vier Monomere dargestellt, in der linken Abbildung ist dadurch die innere Porenstruktur sichtbar. Die extrazelluläre Seite weist nach oben.

Das Ausmaß der Inaktivierung der KCNQ1-Kanäle wurde durch Analyse der Tail-Ströme, die in der 100 mM K^+ -Lösung gemessen wurden, bestimmt. Dazu wurde der „hook“ (siehe Abbildung 4.46, kleine Abbildungen) mit einer biexponentiellen Funktion beschrieben, aus deren Parametern der Anteil der inaktivierten Kanäle f_{inakt} berechnet wurde (siehe 3.3.3.6).

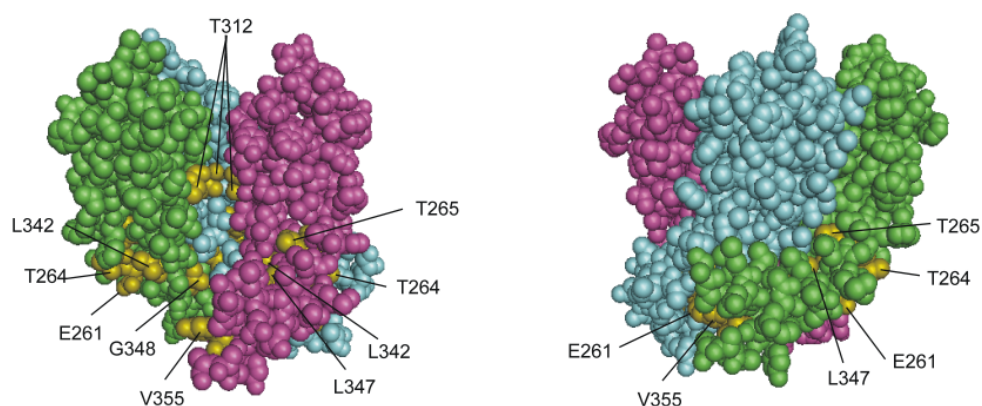


Abbildung 4.48: Mutanten, die eine reduzierte Inaktivierung in 100 mM K^+ zeigten.

Die Aminosäurereste, deren Mutation zu Alanin zu einer reduzierten Inaktivierung führten, wurden in der Kv1.2-Kristallstruktur gelb markiert. Es sind nur die S5- und S6-Segmente von dreien der vier Monomere dargestellt, in der linken Abbildung ist dadurch die innere Porenstruktur sichtbar. Die extrazelluläre Seite weist nach oben.

Bei $KCNQ1_{wt}$ betrug der Anteil der inaktivierten Kanäle $58\% \pm 2\%$. Bei den meisten der untersuchten Alanin-Mutanten lag er im Bereich des Wertes von $KCNQ1_{wt}$ (Tabelle 4.10). Wenn der Anteil der inaktivierten Kanäle geringer als 30% war, wurde dies als fehlende Inaktivierung definiert. Dies traf auf neun Alanin-Mutanten zu, die in Abbildung 4.48 dargestellt sind. Alle diese Aminosäurereste sind im Inneren der Kanalöffnung bzw. an den Interaktionsstellen zwischen den Untereinheiten zu finden. Die Seitenkette T312 befindet sich direkt unterhalb des Selektivitätsfilters.

Nur drei der untersuchten Mutationen führten sowohl zu einer Reduktion der Rb^+/K^+ -Leitfähigkeit als auch zu einer reduzierten Inaktivierung.

5 Diskussion

5.1 HERG

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Interaktionsstellen von Lokalanästhetika mit HERG-Kanälen. Dazu wurden zum einen die Mutationen der aromatischen Aminosäuren im unteren Bereich der S6-Helix, Y652A und F656A, detailliert in CHO-Zellen untersucht. Zum anderen wurden diese und weitere Alanin-Mutationen in der Porenregion sowie die Mutanten Y652T und F656T in *Xenopus laevis* Oocyten analysiert.

Die Mutation der aromatischen Aminosäuren Y652 und F656 zu Alanin führte zu einer reduzierten Empfindlichkeit der Kanäle für Lokalanästhetika. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Mitcheson *et al.*, 2000a; Fernandez *et al.*, 2004) beeinflusst die Mutation HERG_{Y652A} die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Deaktivierung nicht. Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung war jedoch zu positiveren Potentialen hin verschoben und die Deaktivierungszeitkonstanten waren signifikant schneller als bei HERG_{wt}. Dies könnte die kürzere Zeit, die bis zum Erreichen des maximalen Stroms während des Rampenprotokolls benötigt wurde, erklären. Die Mutation HERG_{F656A} führt zu einer stark reduzierten Stromdichte. Auch dies ist konsistent mit anderen Arbeiten (Mitcheson *et al.*, 2000a; Fernandez *et al.*, 2004). Außerdem wurde durch diese Mutation die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Deaktivierung zu negativeren Potentialen verschoben und die Kinetik der Deaktivierung verlangsamt. Die Wirkung von Bupivacain und Ropivacain auf HERG-Kanäle wurde bereits in anderen Arbeiten untersucht (Gonzalez *et al.*, 2002a; Friederich *et al.*, 2004), die Wirkung von Mepivacain jedoch noch nicht. Im Gegensatz zu der Arbeit von Gonzalez (2002a), wurde in der vorliegenden Arbeit ein Rampen-Protokoll verwendet, um die Sensitivität von HERG-Kanälen für Lokalanästhetika in CHO-Zellen zu untersuchen. Dieses Protokoll simuliert – stark vereinfacht – ein kardiales Aktionspotential (Hancox *et al.*, 1998). Die IC₅₀-Werte, die für Bupivacain und Ropivacain in dieser Arbeit mit Hilfe des Rampen-Protokolls erhalten wurden, sind nahezu identisch mit den Werten, die mit Rechteck-Pulsen erhalten wurden (Gonzalez *et al.*, 2002a). Auch bei der Untersuchung von HERG-Kanälen in *Xenopus laevis* Oocyten zeigte sich, dass die Inhibitionen der maximalen Ströme während des Rampen-Protokolls und während des Tail-Stroms bei -40 mV sehr ähnliche Werte liefern

(Abbildung 4.18). Die Inhibition der Mutanten $HERG_{S624A}$, $HERG_{Y652A}$ und $HERG_{F656T}$ durch $300 \mu\text{M}$ Bupivacain wurde in Oocyten ebenfalls mit dem Rampen-Protokoll sowie mit Rechteckpulsen untersucht. Auch bei diesen Mutanten sind die mit den beiden Protokollen erhaltenen Werte sehr ähnlich. Dies zeigt, dass das Rampen-Protokoll sehr gut geeignet ist, um pharmakologische Untersuchungen sowohl von $HERG_{wt}$ -Kanälen als auch von mutierten HERG-Kanälen durchzuführen.

In CHO-Zellen wurde weiterhin der Einfluss von Bupivacain auf die instantane Aktivierung untersucht. Mit Hilfe des instantanen Aktivierungsprotokolls wurde einerseits die Inhibition der offenen Kanäle durch Bupivacain und andererseits der Einfluss von Bupivacain auf die Kinetik der Deaktivierung und Inaktivierung untersucht. Sowohl bei $HERG_{wt}$ - als auch bei $HERG_{Y652A}$ -Kanälen führte die Applikation von Bupivacain zur Verlangsamung der Deaktivierung, was auf einen Block des offenen Kanals hindeutet. Die Inaktivierung hingegen wurde nur in $HERG_{wt}$ - nicht jedoch in $HERG_{Y652A}$ -Kanälen beschleunigt. Weil die Inaktivierung bereits durch die Mutation Y652A stark beschleunigt wurde, lässt sich möglicherweise ein zusätzlicher Effekt von Bupivacain auf die Inaktivierung zeitlich nicht mehr auflösen. Eine Verlangsamung der Deaktivierung und eine Beschleunigung der Inaktivierung sind typische Merkmale des Offenkanalblocks (Hille 2001). Die verwendeten Bupivacain-Konzentrationen wurden gewählt, weil sie in der Nähe der jeweiligen, mit dem Rampen-Protokoll bestimmten, IC_{50} -Werte lagen. Sie führten auch bei den instantanen Strömen zu Inhibitionen um 50%. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Zuverlässigkeit des Rampen-Protokolls und deutet außerdem darauf hin, dass mit diesem Protokoll in erster Line der Block der offenen Kanäle gemessen wird. Die Annahme, dass Bupivacain mit den offenen Kanälen interagiert, wird außerdem durch die Untersuchungen mit hohem extrazellulärem Kalium unterstützt. Die Inhibition von $HERG_{wt}$ - und $HERG_{Y652A}$ -Kanälen durch $100 \mu\text{M}$ Bupivacain ist bei 100 mM extrazellulärem K^+ geringer als bei Standard-Lösung ($5 \text{ mM } K^+$). Ein entsprechender Effekt wurde bereits für die Inhibition von HERG-Kanälen durch den Offen-Kanal-Blocker E-4031 beschrieben (Wang *et al.*, 1997).

Die Inhibition der maximalen Stromamplituden während des instantanen Aktivierungsprotokolls war nicht spannungsabhängig. Da mit diesem Protokoll vor allem die Inhibition der offenen Kanäle gemessen wurde, steht dieses Ergebnis nicht im Widerspruch zu früheren Experimenten von Gonzalez *et al.* (2002a). In jenen Experimenten wurde zwar eine Spannungsabhängigkeit der Inhibition durch Bupivacain

festgestellt, die jedoch bei Potentialen positiver als 0 mV nur sehr schwach ausgeprägt war (Gonzalez *et al.*, 2002a). Daher ist diese Spannungsabhängigkeit der Inhibition eventuell auf eine Abhängigkeit der Inhibition vom Zustand des Kanals zurückzuführen. Aufgrund des schnellen Gleichgewichtes zwischen offenem und inaktiviertem Zustand bei HERG-Kanälen ist es sehr schwierig, zu unterscheiden, mit welchem Zustand der Blocker bevorzugt interagiert. In vorangegangenen Experimenten von Lipka *et al.* (1998) konnte hingegen keine Spannungsabhängigkeit der Inhibition von HERG_{wt}-Kanälen durch Bupivacain festgestellt werden. Eine mögliche Ursache für die abweichenden Ergebnisse könnte die Tatsache sein, dass in der Studie von Lipka die Inhibition am Ende einer Depolarisation von 1 s Dauer bestimmt wurde, während in der Arbeit von Gonzalez *et al.* (2002a) die Inhibition während der Tail-Ströme nach einer Depolarisation über 5 s analysiert wurde. Durch die kürzere Depolarisationsdauer liegt möglicherweise ein geringerer Anteil der Kanäle im inaktivierten Zustand vor.

In jener Studie (Lipka *et al.*, 1998) wurde außerdem die Wirkung von Bupivacain auf die Mutante HERG_{G628C/S631C}, die keine C-Typ-Inaktivierung zeigt, untersucht. Die fehlende Inaktivierung führt zu einer verminderten Empfindlichkeit der Kanäle für die Wirkung von Bupivacain (100 μ M Bupivacain führen zu 44% Inhibition bei HERG_{G628C/S631C} und zu 58% bei HERG_{wt}) und zu einer deutlichen Spannungsabhängigkeit der Inhibition. Auch für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten EAG-Kanäle, konnte eine verminderte Sensitivität und eine deutliche Spannungsabhängigkeit der Inhibition durch Bupivacain gezeigt werden (Abschnitt 4.1.5). EAG-Kanäle sind strukturell eng verwandt mit HERG-Kanälen, zeigen aber im Gegensatz zu diesen keine C-Typ-Inaktivierung (Bauer & Schwarz 2001). Der Unterschied der Inhibition durch Bupivacain zwischen HERG- und EAG-Kanälen ist jedoch deutlich stärker ausgeprägt als derjenige zwischen HERG_{G628C/S631C} und HERG_{wt} in der Studie von Lipka (1998). Der IC₅₀-Wert für die Inhibition von EAG-Kanälen bei 40 mV, einem Potential, bei dem die Kanäle vollständig aktiviert sind, betrug 141 μ M und ist damit etwa siebenmal so groß wie der IC₅₀-Wert für HERG-Kanäle (22 μ M). Als mögliche Ursache für die geringere Sensitivität von EAG-Kanälen für viele HERG-Blocker wie Dofetilid (Ficker *et al.*, 1998) und Cisapride (Chen *et al.*, 2002), wird die fehlende C-Typ-Inaktivierung gesehen. Ebenso wird die geringere Sensitivität von HERG_{G628C/S631C}-Kanälen darauf zurückgeführt, dass inaktivierte HERG-Kanäle eine höhere Sensitivität für die meisten Blocker besitzen als offene. Die Rolle der Inaktivierung beim Block von HERG-Kanälen ist jedoch nicht unumstritten. Neben

Mutationen, die die Inaktivierung vermindern, zeigen auch Mutationen mit verstärkter Inaktivierung eine geringere Sensitivität für Blocker (Mitcheson *et al.*, 2000a). Dies wurde durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt. Die Mutationen T623A und V625A verminderten die Inhibition durch Bupivacain in einem ähnlichen Ausmaß, obwohl die Inaktivierung durch T623A verstärkt wurde und V625A gar keine Inaktivierung zeigte. Auch die Inhibition von HERG-Kanälen durch Kokain wird nur durch die Mutation S620T, welche die Inaktivierung vermindert, beeinflusst, nicht aber durch S631A und G628C/S631C, die ebenfalls die Inaktivierung aufheben (Guo *et al.*, 2006). Neben der fehlenden C-Typ-Inaktivierung spielen bei EAG-Kanälen möglicherweise auch die aromatischen Aminosäuren in der S6-Region eine Rolle. Obwohl EAG-Kanäle Thyrosin und Phenylalanin an den homologen Positionen zu Y652 und F656 in HERG besitzen, konnte in einer Mutagenese-Studie gezeigt werden, dass die Position dieser Reste eine wichtige Rolle spielt (Chen *et al.*, 2002). Wenn in HERG-Kanälen die aromatischen Reste im Tausch mit Alanin in der S6-Helix um eine Position nach oben oder unten verschoben wurden, führte dies zu einer deutlichen Reduktion der Inhibition durch Cisaprid. Im Gegensatz dazu wurde die Sensitivität für Cisaprid in EAG-Kanälen 43- bzw. 10-fach erhöht, wenn die entsprechenden Reste Y481 und F485 um eine Position nach unten versetzt wurden (Chen *et al.*, 2002).

Die in dieser Arbeit untersuchten Lokalanästhetika Bupivacain, Ropivacain und Mepivacain unterscheiden sich in der Länge ihrer N-Substituenten (vgl. Abbildung 2.6) und damit in ihrer Lipophilie. Zur Analyse des Einflusses der Lipophilie auf die inhibitorische Potenz der untersuchten Lokalanästhetika wurden die IC_{50} -Werte für die Blockade von HERG-Kanälen gegen die Lipophilie in einem doppeltlogarithmischen Plot aufgetragen (Abbildung 5.1 A). Als Maß für die Lipophilie wurde der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient P_{oct} gewählt (Strichartz *et al.*, 1990; Oertel *et al.*, 1997). Es zeigt sich eine sehr gute lineare Korrelation von Lipophilie und inhibitorischer Potenz für alle Substanzen bei HERG_{wt}-Kanälen ($r = 0.91$). Für HERG_{Y652A} wird jedoch nur eine gute Korrelation ($r = 0.92$) erhalten, wenn Articain nicht berücksichtigt wird. Dies deutet darauf hin, dass der aromatische Rest Y652 zwar an der Interaktion von Aminoamid-Lokalanästhetika vom Bupivacain-Typ beteiligt ist, nicht aber an der Interaktion mit Articain.

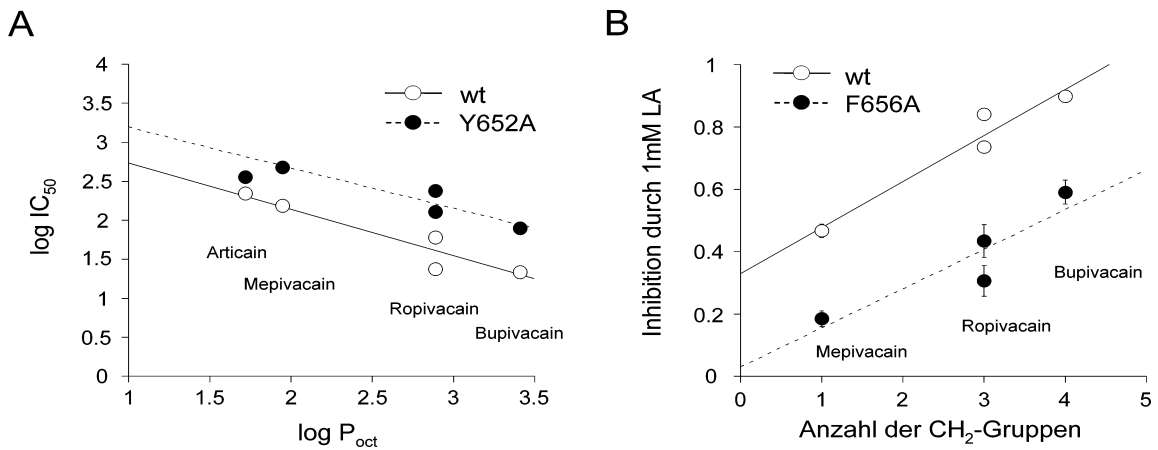


Abbildung 5.1: Einfluss der Lipophilie auf die inhibitorische Potenz der Aminoamid-Lokalanästhetika.

(A) Doppeltlogarithmische Auftragung der IC₅₀-Werte von Bupivacain, Ropivacain, Mepivacain und Articain für die Inhibition von HERG_{wt}- und HERG_{Y652A}-Kanälen in Abhängigkeit der Lipophilie. (B) Plot der Inhibition von HERG_{wt}- und HERG_{F656A}-Kanälen durch 1 mM des entsprechenden Lokalanästhetikums in Abhängigkeit der Lipophilie, dargestellt als Länge des N-Substituenten. Die zwei Punkte bei Ropivacain sind durch die Verwendung des S- und des R-Enantiomers zu erklären, Bupivacain und Mepivacain wurde das Racemat untersucht.

Wegen der geringen Empfindlichkeit von HERG_{F656A} für die Lokalanästhetika wurden keine vollständigen Konzentrations-Wirkungs-Kurven untersucht, sondern die Inhibition durch jeweils 1 mM Bupivacain, Ropivacain und Mepivacain verglichen (Abbildung 5.1 B). Als Maß für die Lipophilie wurde in dieser Darstellung die Kettenlänge des N-Substituenten gewählt. Sowohl für HERG_{wt}- als auch für HERG_{F656A}-Kanäle zeigt sich eine lineare Korrelation zwischen den beiden Parametern (HERG_{wt}: $r = 0.97$; HERG_{F656A}: $r = 0.91$). Die Tatsache, dass die Korrelationsgerade jeweils bei HERG_{wt} und bei den Mutanten fast parallel verläuft, deutet darauf hin, dass – neben den beiden aromatischen Aminosäuren – weitere Positionen im Kanal für lipophile Wechselwirkung verantwortlich sind. Dabei könnte es sich unter anderem um V625 nahe der Porenregion handeln, dessen Einfluss auf die Inhibition durch Bupivacain ebenfalls in dieser Arbeit gezeigt wurde. Eine andere Möglichkeit wäre, dass bereits eine der beiden aromatischen Aminosäuren Y652 oder F656 ausreicht, um lipophile Wechselwirkungen zwischen dem Kanal und dem Lokalanästhetikum zu etablieren. Um diese Hypothesen zu prüfen wäre eine Analyse von Ropivacain und Mepivacain mit HERG_{V625A}-Kanälen nötig. Außerdem könnte die Untersuchung einer Doppelmutante HERG_{Y652A/F656A} mit den verschiedenen Lokalanästhetika Hinweise auf die lipophilen Wechselwirkungen an diesen Positionen geben.

Nachdem von Milnes und Mitarbeitern gezeigt wurde, dass die Inhibition von HERG durch den niedrig potenten HERG-Blocker Fluvoxamin nur wenig durch die Mutationen Y652A und F656A beeinflusst wird (Milnes *et al.*, 2003), wurde die

Vermutung geäußert, dass sich der Mechanismus der Interaktion von hoch- und niedrigaffinen Blockern mit HERG-Kanälen grundsätzlich unterscheiden könnte (Mitcheson 2003). Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widerlegt. Stattdessen lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die meisten HERG-Blocker – unabhängig von ihrer inhibitorischen Potenz – in der S6- und der Porenregion binden. Die wichtigsten Interaktionsstellen für Bupivacain mit HERG-Kanälen stellen die aromatischen Aminosäuren Y652 und F656 am unteren Bereich der S6-Helix sowie T623 und V625 nahe der Pore dar. Diese Positionen wurden auch in anderen Studien als wichtige Interaktionsstellen für sog. „high affinity“-Blocker identifiziert (Mitcheson *et al.*, 2000a; Kamiya *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2004).

Einige der untersuchten Mutationen beeinflussten das Öffnungsverhalten der Kanäle sehr stark. Dadurch ist es schwierig, zwischen den direkten Effekten der Mutation auf die pharmakologische Sensitivität und den indirekten Effekten durch das veränderte Schaltverhalten zu unterscheiden. Dies trifft besonders auf die Mutation HERG_{G648A} zu. Diese Mutation führt zu sehr starken Veränderungen des Schaltverhaltens; auch bei negativen Potentialen waren die Kanäle geöffnet. Da Glycin keine Seitenkette besitzt, ist eine Interaktion mit Pharmaka an dieser Position höchst unwahrscheinlich. Die Reduktion der Inhibition von HERG_{G648A} durch Bupivacain ist daher wahrscheinlich auf indirekte Effekte zurückzuführen.

Hinweise auf die Art der Interaktion von Bupivacain mit HERG-Kanälen gibt die Analyse des „onset of block“ (Abbildung 4.21). Dabei ist nach einer initialen Zunahme des Blocks eine Erholung vom Block zu erkennen, wenn die aromatischen Aminosäuren Y652 oder F656 in der S6-Helix mutiert wurden. Ein ähnliches Verhalten von HERG_{Y652A}-Kanälen beim Block durch Chinidin und Chloroquin wurde bereits beschrieben (Sanchez-Chapula *et al.*, 2002; Sanchez-Chapula *et al.*, 2003). Eine mögliche Erklärung für den Verlauf des „onset of block“ wäre, dass das Bupivacain-Molekül zunächst Wechselwirkungen mit dem Kanal eingeht, sich dann aber wieder aus der Pore entfernt, weil keine stabile Interaktion mit dem Kanal möglich ist. Diese initiale Wechselwirkung könnte im Falle einer Mutationen an Position Y652 oder F656 über die jeweils andere aromatische Aminosäure oder über die porennahe Seitenketten von T623 oder V625 stattfinden. Es wäre daher auch unter diesem Aspekt interessant, eine Doppelmutation der beiden Aminosäuren zu untersuchen.

Die Hypothese einer direkten Interaktion von Lokalanästhetika mit den Resten Y652 und F656 wird durch die Beobachtung unterstützt, dass sich die Stereoselektivität des Ropivacain-Blocks durch diese Mutationen verändert. HERG_{wt}-Kanäle sind sowohl bei Bupivacain als auch bei Ropivacain empfindlicher für das S-Enantiomer als für das R-Enantiomer. Bei den Mutanten HERG_{Y652A} und HERG_{F656A} trifft dies nur für Bupivacain zu, während bei Ropivacain die Sensitivität für das R-Enantiomer größer ist. Das Ergebnis, dass eine veränderte Stereoselektivität durch die Mutationen der aromatischen Aminosäuren nur bei Ropivacain nicht jedoch bei Bupivacain auftrat, könnte darauf hindeuten, dass sowohl sterische Effekte als auch die Lipophilie bei der Interaktion von Lokalanästhetika mit HERG-Kanälen eine wichtige Rolle spielen. Bei Kv1.5-Kanälen, die eine umgekehrte Stereoselektivität als HERG_{wt}-Kanäle aufweisen, konnte gezeigt werden, dass der Rest V512 am unteren Ende der S6-Helix für die Stereoselektivität der Inhibition dieser Kanäle durch Bupivacain verantwortlich ist (Franqueza *et al.*, 1997). Dieser Rest befindet sich direkt unterhalb des PVP-Motivs, welches vermutlich einen Knick der S6-Helix verursacht. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Stereoselektivität der Inhibition von Kaliumkanälen durch Lokalanästhetika von Aminosäureresten in dieser Region bestimmt wird.

5.2 Untersuchung der LQT1-Mutation KCNQ1_{A344V}

Nachdem gezeigt werden konnte, dass – neben anderen Blockern – auch Lokalanästhetika mit der Porenregion von HERG-Kanälen interagieren, wurde die KCNQ1 Mutation A344V untersucht, die bei einer Familie von LQT1-Patienten nachgewiesen wurde (Donger *et al.*, 1997). Die Position A344 in KCNQ1 entspricht der Position F656 in HERG und damit einer der Interaktionsstellen für die Medikamentenbindung.

Da die Mutation A344V zuvor noch nicht charakterisiert worden war, war die elektrophysiologische und pharmakologische Untersuchung dieser Mutante ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Der Austausch der Aminosäure Alanin gegen Valin in der Porenregion der S6-Helix von KCNQ1 führt zu massiven Veränderungen des Schaltverhaltens sowohl von KCNQ1-Kanälen als auch von KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexen. Die elektrophysiologischen Merkmale dieser Mutation sind eine spannungsabhängige Inaktivierung und eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in depolarisierende Richtung. Diese Effekte treten ebenfalls auf, wenn mutierte Kanäle und Wildtyp-Kanäle co-exprimiert werden.

Ein Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung hin zu positiveren Potentialen wurde bereits für andere LQT1-Mutationen in der S4-Domäne und im C-terminalen Bereich gezeigt (Chouabe *et al.*, 1997; Chouabe *et al.*, 2000). Auch bei diesen Experimenten trat die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit nur auf, wenn KCNQ1 und KCNE1 co-exprimiert wurden. Da die S4-Helix den Spannungssensor darstellt, kann man sich leicht vorstellen, dass Mutationen, welche die positive Ladung in diesem Bereich verändern, zu einer veränderten Spannungsabhängigkeit der Aktivierung führen. Es sind allerdings verschiedene Möglichkeiten denkbar, die den Effekt einer Mutationen in der S6-Region auf die Spannungsabhängigkeit erklären können. Zum einen könnte die Kopplung zwischen Spannungssensor und Aktivierungstor gestört sein. Durch Mutagenese-Untersuchungen in anderen Kaliumkanälen konnte gezeigt werden, dass Kopplungen zwischen dem unteren Bereich der S6-Helix und dem S4-S5-Linker bestehen und dass die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung durch Mutationen in diesen Regionen verändert wurde (Lu *et al.*, 2002; Tristani-Firouzi *et al.*, 2002a). Außerdem deutet die Röntgenkristallstruktur von Kv1.2 darauf hin, dass sich der S4-S5-Linker in der Nähe der S6-Helix befindet (Long *et al.*, 2005b). Eine andere mögliche Erklärung wäre eine

Destabilisierung des Offenzustands des Kanals im Verhältnis zum geschlossenen Zustand, hervorgerufen durch strukturelle Veränderungen in der Porenregion. Durch diese Destabilisierung wäre eine höhere Aktivierungsenergie nötig, um ein Öffnen des Kanals zu bewirken (Yifrach & MacKinnon 2002).

Eine spannungsabhängige Inaktivierung, wie sie durch die Mutation A344V hervorgerufen wird, wurde bereits für andere Mutationen in der S6-Helix und in der S5-Helix beschrieben (Seebohm *et al.*, 2001b; Seebohm *et al.*, 2003a) und zeigte sich außerdem bei einigen der untersuchten Alanin-Mutanten (siehe Abschnitt 4.3.3). Als Erklärung wurde vermutet, dass die spannungsabhängige Inaktivierung auf ein Kollabieren der Pore, ähnlich der C/P-Typ-Inaktivierung, zurückzuführen ist und über eine Interaktion der Aminosäurereste F340 und L273 in der S6- bzw. S5-Helix mit V310 in der Porenhelix vermittelt wird (Seebohm *et al.*, 2005). Veränderungen in der Größe dieser Aminosäurereste führen zu einer verstärkten Inaktivierung aufgrund einer Destabilisierung des Offenzustands der Pore (Seebohm *et al.*, 2005). Der Aminosäurerest A344 befindet sich nur eine Helixwindung unterhalb von F340. Daher könnte auch in dieser Position ein größeres Seitenkettenvolumen durch die Mutation zu Valin zu einer Destabilisierung der offenen Pore führen.

KCNE1 verhindert die verzögerte Inaktivierung von KCNQ1_{wt}-Kanälen über einen indirekten Mechanismus (Pusch *et al.*, 1998; Pusch *et al.*, 2000). Daher ist es möglich, dass die Inaktivierung von KCNQ1_{A344V} durch einen ähnlichen Mechanismus verhindert wird, wenn KCNQ1_{A344V} und KCNE1 co-exprimiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Interaktion zwischen KCNQ1 und KCNE1 durch die Mutation A344V nicht gestört wird, da die Co-Expression mit KCNE1 auch bei den mutierten Kanälen zu den typischen Veränderungen im Gating führt: Verlangsamung der Aktivierung, Verschiebung des Aktivierungsmittelpunktes zu positiveren Potentialen und Aufhebung der Inaktivierung (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996; Pusch *et al.*, 1998; Pusch *et al.*, 2000). Zusammenfassend kann man sagen, dass sich beide Effekte der Mutation A344V auf das Gating mit einer Destabilisierung des Offenzustands erklären lassen.

Sowohl KCNQ1-Homomere als auch KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexe sind relativ unempfindlich gegenüber vielen pharmakologischen Substanzen, die HERG-Kanäle blockieren, wie z.B. Lokalanästhetika (Lipka *et al.*, 1998) und Kokain (Zhang *et al.*, 2001). Die Mutation A344V führt nicht nur zu einer Änderung des Schaltverhaltens von

KCNQ1-Kanälen und KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexen, sondern auch zu einer veränderten pharmakologischen Empfindlichkeit gegenüber Lokalanästhetika. Durch den Aminosäureaustausch von Alanin zum hydrophoberen Valin in der Position 344 wird die Empfindlichkeit für Bupivacain um den Faktor 17 für KCNQ1-Kanäle und um den Faktor 22 für KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexe erhöht. Damit sind die mutierten Kanäle ähnlich empfindlich für die Inhibition durch Bupivacain wie HERG-Kanäle (Gonzalez *et al.*, 2002a; Friederich *et al.*, 2004). Auch wenn nicht auszuschließen ist, dass diese erhöhte Sensitivität auf das veränderte Schaltverhalten der mutierten Kanäle zurückzuführen ist, erscheint diese Möglichkeit aus mehreren Gründen sehr unwahrscheinlich. Erstens wird die Empfindlichkeit sowohl für KCNQ1-Homomere als auch für KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexe durch die Mutation A344V in einem ähnlichen Ausmaß erhöht, obwohl die Effekte der Mutation auf das Gating von KCNQ1-Kanälen und KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexen qualitativ unterschiedlich sind. In den KCNQ1-Homomeren führt die Mutation zu einer spannungsabhängigen Inaktivierung, während sie in KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexen eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung verursacht. Des Weiteren konnte in Mutagenese-Studien gezeigt werden, dass der Aminosäurerest A344 an der Bindung des Benzodiazepins L-7 beteiligt ist (Seeböhm *et al.*, 2003a). Auch bei der Modellierung der Bindung eines Pharmakophors an den KCNQ1-Kanal wurde die Seitenkette der Position A344 als Interaktionsstelle identifiziert (Du *et al.*, 2005). Das wichtigste Argument für einen direkten strukturellen Einfluss der Mutation A344V auf die pharmakologische Sensitivität liefern die Co-Expressionsexperimente von KCNQ1_{wt}- und KCNQ1_{A344V}-Kanälen. Die verschiedenen möglichen Kombinationen für Wildtyp- und mutierte α -Untereinheiten im Heterotetramer sind in Abbildung 5.2 dargestellt. Wenn man eine statistische Verteilung dieser Kombinationen annimmt, kommen Homotetramere mit einer Wahrscheinlichkeit von 6.25% vor. Wenn der Effekt der Mutation eine dominante Wirkung hat, sollten also 93.75% der Kanäle betroffen sein. Dies ist der Fall, wie die Inhibition der heteromeren Kanalkomplexe durch Bupivacain zeigt. Die Wirkung von 100 μ M Bupivacain auf KCNQ1_{A344V}/KCNE1- und KCNQ1_{wt}/KCNE1-Kanalkomplexe ist nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 4.34).

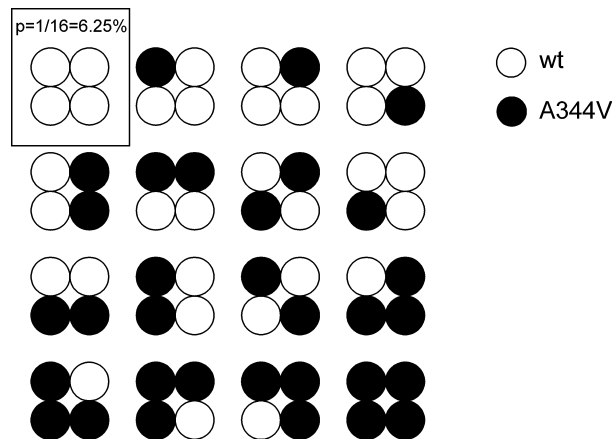


Abbildung 5.2: Statistische Möglichkeiten für die Kombination von Heterotetrameren.

Mögliche Kombinationen für heteromere Kanäle bei Co-Expression von Wildtyp-Untereinheiten (wt) und mutierten Untereinheiten (A344V). Die Wahrscheinlichkeit für reine Wildtyp-Homotetramere bzw. für reine A344V-Homotetramere beträgt jeweils 6.25%.

Das bedeutet, dass nur $KCNQ1_{wt}/KCNE1$ -Kanalkomplexe unempfindlich sind, bzw. dass die Empfindlichkeit für Lokalanästhetika erhöht wird, wenn nur eine mutierte Untereinheit vorhanden ist. Der Effekt der Mutation auf die pharmakologische Sensitivität ist also dominant. Wenn der Einfluss der Mutation auf das Schaltverhalten ebenfalls dominant wäre, d.h. bereits eine mutierte Untereinheit im Kanalkomplex zu einer deutlichen Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung führen würde, müsste der $V_{0.5}$ -Wert für den heteromeren Kanalkomplex dichter an dem Wert für $KCNQ1_{A344V}/KCNE1$ liegen. Der $V_{0.5}$ -Wert für $KCNQ1_{wt}/KCNQ1_{A344V}/KCNE1$ -Kanalkomplexe liegt jedoch genau zwischen den Werten für $KCNQ1_{A344V}/KCNE1$ und $KCNQ1_{wt}/KCNE1$. Da also der Einfluss der Mutation A344V auf das Schaltverhalten des Kanalkomplexes nicht dominant ist, der Einfluss auf die pharmakologische Sensitivität aber sehr wohl, ist es sehr unwahrscheinlich, dass die veränderte pharmakologische Sensitivität auf das veränderte Schaltverhalten zurückzuführen ist.

Aufgrund der Tatsache, dass die Affinität des $KCNQ1$ -Kanals für Lokalanästhetika durch einen Aminosäureaustausch zu einer hydrophoberen Aminosäure erhöht wird, könnte man annehmen, dass durch die Mutation A344V eine hydrophobe Interaktionsstelle erzeugt wird. Eine alternative oder ergänzende Erklärung wäre eine Veränderung der dreidimensionalen Struktur der Pore, so dass die hydrophoben Seitenketten von F340 und I377 (Du *et al.*, 2005) dem Lokalanästhetikum besser zugänglich werden. Wie bei der Untersuchung der HERG-Kanäle wurden auch für die $KCNQ1$ -Mutante A344V die IC_{50} -Werte logarithmisch gegen die Lipophilie des Lokalanästhetikums, dargestellt als die Länge des N-Substituenten, aufgetragen (Abbildung 5.3). Dabei zeigt sich auch für $KCNQ1_{A344V}$ bzw. für $KCNQ1_{A344V}/KCNE1$

eine lineare Korrelation zwischen der inhibitorischen Potenz und der Lipophilie der Substanzen. Dies deutet darauf hin, dass lipophile Wechselwirkungen bei der Interaktion von Lokalanästhetika mit $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}$ -Kanälen von Bedeutung sind.

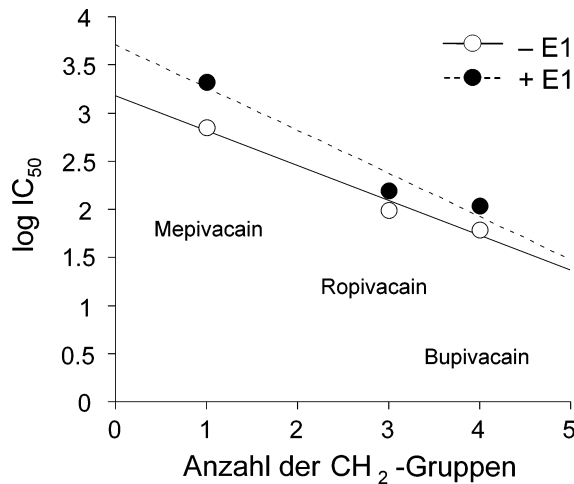


Abbildung 5.3: Einfluss der Lipophilie auf die Inhibition von $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}$ -Kanälen. Auftragung der $\log \text{IC}_{50}$ -Werte von Bupivacain, Ropivacain und Mepivacain für die Inhibition von $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}$ - und $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}/\text{KCNE1}$ -Kanälen in Abhängigkeit der Lipophilie, dargestellt als Länge des N-Substituenten.

Die Inhibition sowohl von KCNQ1_{wt} als auch von $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}$ -Kanälen durch Bupivacain und S-Ropivacain ist sehr ähnlich. Eine mögliche Ursache könnte in der Stereoselektivität der Inhibition liegen. Andere kardiale Kaliumkanäle, wie HERG und Kv1.5 zeigen eine deutliche Stereoselektivität der Inhibition durch Bupivacain und Ropivacain, wobei HERG-Kanäle stärker durch das S-Enantiomer inhibiert werden und Kv1.5-Kanäle stärker durch das R-Enantiomer (Valenzuela *et al.*, 1995a; Gonzalez *et al.*, 2001a; Gonzalez *et al.*, 2002a; Friederich *et al.*, 2004). Unter der Annahme, dass durch die Mutation $\text{KCNQ1}_{\text{A344V}}$ eine Interaktionsstelle für Lokalanästhetika entsteht, kann man vermuten, dass diese Interaktion ebenfalls stereoselektiv ist. Auch bei einer Auftragung der $\log \text{IC}_{50}$ -Werte gegen die Länge der Seitenkette (Abbildung 5.3) zeigt sich, dass der Wert für Ropivacain von der Geraden zwischen Bupivacain und Mepivacain abweicht. Dies könnte ebenfalls auf eine stereoselektive Inhibition hindeuten. Um diese Vermutung zu überprüfen, wären weitere Experimente mit Levobupivacain nötig. Gepaarte Experimente sind am besten geeignet, um geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Enantiomeren nachzuweisen. Diese sind jedoch in Oocyten nur schwer möglich, weil ein Auswasch der lipophilen Lokalanästhetika nur sehr langsam und unvollständig stattfindet. In CHO-Zellen, wo gepaarte Untersuchungen möglich wären, sind die Stromdichten von KCNQ1 -Homomeren jedoch sehr gering, so dass pharmakologische Untersuchungen schwierig sind. Die Co-Expression mit KCNE1 verändert allerdings auch die pharmakologische

Empfindlichkeit und beeinflusst daher eventuell auch die Stereoselektivität. Ein Hinweis hierauf ist die Tatsache, dass die Abweichung des Ropivacain-Wertes von der Bupivacain-Mepivacain-Geraden (Abbildung 5.3) bei KCNQ1_{A344V}/KCNE1-Kanälen stärker ausgeprägt ist als bei KCNQ1_{A344V}-Kanälen.

Es zeigte sich, dass KCNQ1-Kanäle empfindlicher für die Inhibition durch Lokalanästhetika waren, wenn sie ohne die Untereinheit KCNE1 exprimiert werden. Dies gilt sowohl für den Wildtyp-Kanal als auch für die Mutante KCNQ1_{A344V}. Da die Hill-Koeffizienten für die Inhibition von KCNQ1-Kanälen und von KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexen ähnlich sind, ist anzunehmen, dass sich die Stöchiometrie zwischen Kanal und Medikamentenmolekül nicht ändert. Dieser Effekt von KCNE1 wurde bereits für Bupivacain (Lipka *et al.*, 1998), aber auch für andere Substanzen wie Clofilium (Yang *et al.*, 1997) und XE991 (Wang *et al.*, 2000) beschrieben. Außerdem wurde gezeigt, dass KCNE1 die Aktivierung von KCNQ1 durch das Benzodiazepin R-L3 verhindert (Salata *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu erhöht KCNE1 die Sensitivität von KCNQ1-Kanälen für die Inhibition durch das Antiarrhythmikum Azimilid (Busch *et al.*, 1997), die Chromanole 293B (Busch *et al.*, 1997; Lerche *et al.*, 2000) und HMR 1556 (Lerche *et al.*, 2000) sowie das Benzodiazepin L-7 (Seebohm *et al.*, 2003a). Auch für die Aktivierung durch Mefenaminsäure und DIDS sind KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexe empfindlicher als KCNQ1-Kanäle allein (Busch *et al.*, 1997). Es wird dabei vermutet, dass die veränderte Sensitivität durch KCNE1 nicht auf eine direkte Interaktion von KCNE1 mit der Substanz in der Kanalpore, sondern auf strukturelle Veränderungen des gesamten Kanalkomplexes zurückzuführen ist, weil Mutationen in KCNE1 die Inhibition durch Chromanol 293B nicht veränderten (Lerche *et al.*, 2000). Dies könnte auch für Lokalanästhetika zutreffen. Veränderungen der pharmakologischen Sensitivität durch akzessorische Untereinheiten wurden auch für andere kardiale Kaliumkanäle beschrieben. So führt die Co-Expression von Kv β 1.3 bzw. KChIP2.2 zu einer reduzierten Empfindlichkeit von Kv1.5 bzw. Kv4.3 für Lokalanästhetika (Gonzalez *et al.*, 2002b; Friederich & Solth 2004; Solth *et al.*, 2005). Auch für diese cytoplasmatischen β -Untereinheiten wurde eher ein allosterischer als ein direkter Effekt auf die pharmakologische Empfindlichkeit der α -Untereinheit vermutet (Gonzalez *et al.*, 2002b; Friederich & Solth 2004; Solth *et al.*, 2005). Diese Unterschiede in der Sensitivität sind von Bedeutung, weil sich die Expressionsmuster von α - und β -Untereinheiten der Kaliumkanäle in den verschiedenen Schichten des Herzens unterscheiden (Wang *et al.*, 1996b; Rosati *et al.*, 2001; Bendahhou *et al.*,

2005). Eine unterschiedliche Empfindlichkeit für pharmakologische Substanzen in verschiedenen Schichten könnte die Dispersion des Aktionspotentials erhöhen und damit die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Arrhythmien erhöhen (Antzelevitch & Sicouri 1994).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Effekte der Mutation KCNQ1_{A344V} auf das Gating und auf die Lokalanästhetika-Empfindlichkeit unabhängig vom Expressionssystem sind. Dabei unterscheiden sich zwar die absoluten Werte zwischen *Xenopus laevis* Oocyten und CHO-Zellen, die relativen Effekte durch die Mutation sind jedoch sehr ähnlich. Die vorliegenden Ergebnisse, dass die Aktivierung von KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexe in CHO-Zellen schneller ist als in *Xenopus laevis* Oocyten, bestätigen frühere Befunde (Seebohm *et al.*, 2001a). Bei der Untersuchung der Lokalanästhetika-Empfindlichkeit waren KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexe in CHO-Zellen etwa dreimal so empfindlich wie in *Xenopus laevis* Oocyten (vgl. Tabelle 4.6 und Tabelle 4.8). Ein ähnliches Verhältnis wurde für die Inhibition von KCNQ1/KCNE1-Kanälen durch Chromanol 293B in Kardiomyocyten ($IC_{50} = 3 \mu M$), CHO-Zellen ($IC_{50} = 2 \mu M$) und in *Xenopus laevis* Oocyten ($IC_{50} = 7 \mu M$) beschrieben, wobei der Wert für CHO-Zellen dem für Kardiomyocyten am ähnlichsten ist (Seebohm *et al.*, 2001a). Daher erscheint es sinnvoll, auch für die vorliegenden Messungen den in CHO-Zellen erhaltenen Wert auf Kardiomyocyten zu übertragen. Mögliche Ursachen für die geringe Empfindlichkeit der *Xenopus* Oocyten sind die Vitellinmembran, die nicht entfernt wurde, und der hohe Fett- und Proteingehalt der Oocyten.

Bei der Simulation der Wirkung der Mutation A344V auf ein kardiales Aktionspotential wurde eine Zunahme der Dispersion beobachtet. Dies ist ein deutlicher Risikofaktor für kardiale Arrhythmien (Roden 1993; Antzelevitch & Sicouri 1994). In Übereinstimmung mit experimentellen Untersuchungen an Kardiomyocyten von Menschen oder von Hunden (Biliczki *et al.*, 2002; Jost *et al.*, 2005) zeigen die Simulationen dieser Arbeit, dass eine Blockade von I_{Ks} zu einer wesentlich ausgeprägteren Verlängerung des Aktionspotential führt, wenn gleichzeitig I_{Kr} blockiert wird. Daher könnten LQTS-Mutationen, die von sich aus zu keinem schweren klinischen Phänotyp führen, erst dann auffällig werden und die Wahrscheinlichkeit für schwere Arrhythmien erhöhen, wenn zusätzliche Faktoren wie eine Blockade von HERG-Kanälen hinzukommen (Roden 1998; Aerssens & Paulussen 2005; Roden & Viswanathan 2005). Patienten mit der LQT1-Mutation A344V zeigen einen eher milden

Phänotyp (Donger *et al.*, 1997), so dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Rolle von I_{Ks} als Repolarisationsreserve (Roden 1998; Silva & Rudy 2005) bestätigen. LQT1-Patienten haben daher ein erhöhtes Risiko, während einer Lokalanästhetika-Intoxikation schwere ventrikuläre Arrhythmien zu entwickeln. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine bestimmte Form des LQT1-Syndroms nicht nur einen generellen, sondern einen spezifischen pharmakogenetischen Risikofaktor für perioperative ventrikuläre Arrhythmien darstellt. Dies sollte bei Überlegungen zur perioperativen Behandlung von LQT-Patienten (Booker *et al.*, 2003; Kies *et al.*, 2005) berücksichtigt werden.

5.3 KCNQ1 Alanin-Scan

Den letzten Teil dieser Arbeit stellt ein Alanin-Scan der S5- und S6-Region von KCNQ1 dar. Ziel der Untersuchung war, herauszufinden, wie sich Mutationen zu Alanin in der S5- und der S6-Helix sowie der verbindenden Poren-Region auf das Öffnungsverhalten des Kanals auswirken. Die Ergebnisse sollen Schlussfolgerungen auf die dreidimensional Struktur des Kanals im Vergleich zu anderen Kaliumkanälen zulassen.

Ein Vergleich der Ergebnisse mit dem *Shaker*-Kaliumkanal bietet sich an, weil an diesem Kanal ebenfalls ein Alanin-Scan durchgeführt wurde (Yifrach & MacKinnon 2002) und bereits ein Kanal aus der *Shaker*-Familie kristallisiert wurde (Long *et al.*, 2005a). Anhand dieser Kristallstruktur wurden auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit modelliert. Im Vergleich mit dem Alanin-Scan des *Shaker*-Kaliumkanals (Yifrach & MacKinnon 2002) zeigte sich, dass durch die Mutation zu Alanin in KCNQ1 deutlich mehr Kanäle, die keinen Strom leiten, entstehen. Insgesamt führten 29% der untersuchten Mutationen zu nicht-funktionellen Kanälen, bzw. 22% wenn nur die S5- und S6-Region berücksichtigt werden. Beim *Shaker*-Alanin-Scan in der S5- und S6-Region führten nur 13% der Mutationen zu nicht funktionellen Kanälen. Dies lässt darauf schließen, dass KCNQ1-Kanäle empfindlicher für Veränderungen durch Mutationen sind als *Shaker*-Kanäle. Die Anteile an Mutationen, die das Gating nicht verändern sind bei KCNQ1 und *Shaker* ähnlich (46% aller Mutationen bei KCNQ1 und 43% bei *Shaker*). Dabei zeigte sich bei beiden Untersuchungen, dass die S6-Helix empfindlicher gegenüber Mutationen ist (36% bzw. 28% Mutanten ohne Einfluss auf das Schaltverhalten) als die S5-Helix (57% bzw. 55% Mutanten ohne Veränderung des Schaltverhaltens).

In Abbildung 5.4 ist die Korrelation von $\Delta V_{0,5}$ und Δz für den Alanin-Scan von KCNQ1 im Vergleich mit dem Alanin-Scan von *Shaker* (Yifrach & MacKinnon 2002) dargestellt. Dabei fallen zwei wesentliche Unterschiede zwischen KCNQ1 und *Shaker* auf. Zum einen zeigt sich, dass beim Alanin-Scan von KCNQ1 mehr Mutationen zu einer Verschiebung von $V_{0,5}$ zu positiven Potentialen als zu negativeren Potentialen führten. Beim Alanin-Scan von *Shaker* ist dies genau andersherum, mehr Mutationen führten zu einer Verschiebung des Aktivierungsmittelpunktes zu negativeren Potentialen.

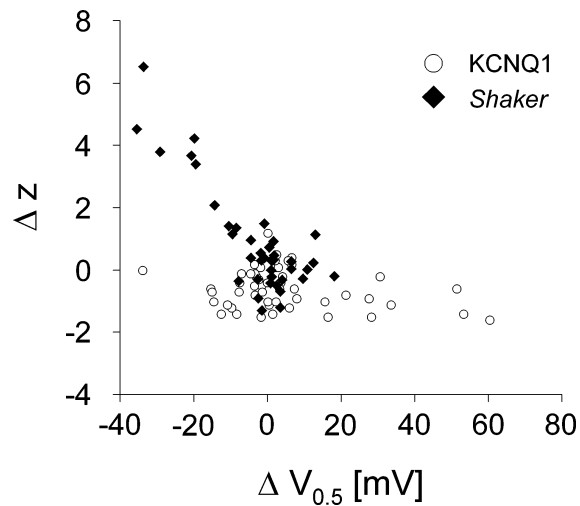


Abbildung 5.4: Vergleich der Korrelation von $\Delta V_{0.5}$ und Δz beim Alanin-Scan von KCNQ1 und *Shaker*. Die Veränderungen Parameter $V_{0.5}$ und z der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung durch Mutation zu Alanin ($\Delta V_{0.5}$ und Δz) bei KCNQ1 und bei *Shaker* wurden gegeneinander aufgetragen. (Werte für *Shaker* aus Yifrach & MacKinnon 2002).

Zum anderen ist beim Alanin-Scan von *Shaker* eine deutliche Korrelation $\Delta V_{0.5}$ und Δz zu erkennen. Eine Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson liefert einen Wert von -0.84 und deutet damit ebenfalls auf eine lineare Korrelation hin. Bei den Mutanten des Alanin-Scans von KCNQ1 hingegen ist keine lineare Korrelation zu erkennen; der Pearsonsche Korrelationskoeffizient beträgt -0.27. Dies hat auch zur Folge, dass eine Verschiebung von $V_{0.5}$ zu negativeren Potentialen nur bei einer Mutation auch zu einem stark negativen $\Delta\Delta G_0$ führte, während bei allen Mutationen mit positiven $\Delta V_{0.5}$ -Werten auch ein positiver $\Delta\Delta G_0$ -Wert zu finden waren. Insgesamt waren die Aktivierungskurven bei KCNQ1 deutlich flacher als bei *Shaker*, entsprechend waren die z -Werte niedriger. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das Öffnungsverhalten von KCNQ1-Kanälen nicht nur von der Spannung, sondern auch sehr stark von anderen Faktoren abhängt. Dazu zählen in ersten Linie die Temperatur und die Regulation durch Ca^{2+} (Busch & Lang 1993; Seeböhm *et al.*, 2001a; Ghosh *et al.*, 2006; Shamgar *et al.*, 2006). Dafür spricht auch der Aufbau der Kanäle: KCNQ1-Kanäle zeichnen sich durch eine relativ große C-terminale cytoplasmatische Domäne aus (Schmitt *et al.*, 2000), während Kanäle, die zur Kv-Familie gehören, eine große N-terminale cytoplasmatische Domäne besitzen (Li *et al.*, 1992; Long *et al.*, 2005a). An dieser cytoplasmatischen Domänen können regulatorische Proteine binden und auch die Tetramerisierung wird über diesen Bereich vermittelt. Man kann sich leicht vorstellen, dass durch die räumliche Nähe von regulatorischer Domäne und Kanalpore das Öffnen von KCNQ1-Kanälen stärker moduliert wird als das Öffnen von *Shaker*-Kanälen.

KCNQ1-Kanäle ähneln daher in ihrem Öffnungsverhalten möglicherweise eher den calciumabhängigen BK-Kanälen oder den temperaturabhängigen TRP-Kanälen als *Shaker*-Kanälen. Auch TRP-Kanäle zeigen eine spannungsabhängige Aktivierung mit einer relativ flachen Steigung; der Aktivierungsmittelpunkt wird durch die Temperatur oder Agonisten wie Menthol und Capsaicin verschoben (Voets *et al.*, 2004). Eine Regulation der Aktivierung von KCNQ1 durch Calcium-Calmodulin wurde erst kürzlich nachgewiesen (Shamgar *et al.*, 2006). Die Calmodulin-Bindungsstelle befindet sich C-terminal von der S6-Helix. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer Beschleunigung der Aktivierungskinetik und zu einer Linksverschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. Dieser Mechanismus zeigt Ähnlichkeit mit der allosterischen Regulation von BK-Kanälen (Horrigan & Aldrich 2002). Eine physiologische Rolle könnte dies bei der Anpassung der Repolarisation an die Aktionspotentialdauer spielen.

Die spannungsabhängige Inaktivierung, die bei einigen Alanin-Mutanten und auch bei der untersuchten LQT-Mutation KCNQ1_{A344V} auftrat, wurde bereits im Zusammenhang mit jener Mutation diskutiert (vgl. Abschnitt 5.2). Auch für die meisten Mutanten des Alanin-Scans lässt sich diese Inaktivierung mit einem Kolabieren der Pore erklären und wurde auch für Mutationen in diesem Bereich des Kanals beschrieben (Seeböhm *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht überprüft, wie sich diese Inaktivierung bei Co-Expression mit KCNE1 verändert, es ist jedoch anzunehmen, dass sie vermindert wird.

Um die verzögerte Inaktivierung von KCNQ1-Kanälen zu erklären wurde ein „Flicker“-Zustand des offenen Kanals postuliert (Pusch *et al.*, 2000; Seeböhm *et al.*, 2003b). Dieser „Flicker“-Zustand erklärt zum einen die Inaktivierung von KCNQ1-Kanälen, die im „hook“ der Tail-Ströme zu erkennen ist, und zum anderen die ungewöhnlich große relative Leitfähigkeit für Rb^+ . In der Arbeit von Seeböhm und Mitarbeitern (2003b) wurde eine deutliche Korrelation zwischen diesen beiden Phänomenen gefunden ($r = 0.79$). Im Gegensatz dazu konnte bei den untersuchten Alanin-Mutanten in der vorliegenden Arbeit keine eindeutige Korrelation zwischen dem Inaktivierungsverhalten und der relativen Rb^+/K^+ -Leitfähigkeit festgestellt werden. Der Korrelationskoeffizient beträgt nur 0.21. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist die Tatsache, dass in der Studie von Seeböhm *et al.* (2003b) insgesamt nur wenige Alanin-Mutationen

untersucht wurden. Außerdem wurden die Positionen der untersuchten Mutationen gezielt ausgewählt; sie lagen in Bereichen, von bereits zuvor gezeigt wurde, dass sie die Inaktivierung von KCNQ1-Kanälen beeinflussen (Seeböhm *et al.*, 2001b). Dagegen wurden im Alanin-Scan dieser Arbeit alle Alanin-Mutationen im Bereich der S6- und S6-Helix sowie der verbindenden Porenregion in die Analyse einbezogen. Dies deutet darauf hin, dass nur für bestimmte Bereiche in der Porenregion von KCNQ1 eine Kopplung von Inaktivierung und relativer Rb^+/K^+ -Leitfähigkeit besteht.

Anhand der Modellierung der verschiedenen Effekte der Alanin-Mutationen in der Kristallstruktur von Kv1.2 zeigte sich, dass die meisten Aminosäuren, deren Mutation zu Alanin das Öffnungsverhalten oder die Inaktivierung veränderten, in der unteren Hälfte des Kanals lagen. Obwohl die Übertragung der untersuchten Effekte auf die Kristallstruktur von Kv1.2 und die Interpretation dieser Modelle nur eine grobe Näherung darstellt, lassen sich diese Ergebnisse mit der Kristallstruktur des gesamten Kv1.2-Kanals vereinbaren, die eine dichte Packung und die Bewegung des Spannungssensors im unteren Bereich des Kanals postuliert (Long *et al.*, 2005a; Long *et al.*, 2005b). Allerdings wurden im Alanin-Scan von *Shaker* auch bei Mutationen im mittleren Bereich von S6 starke Veränderungen auf das Öffnungsverhalten festgestellt (Yifrach & MacKinnon 2002). Diese liegen jedoch oberhalb des postulierten „*glycine hinge*“ G466 in der S6-Helix (Shealy *et al.*, 2003). Dieser flexible Glycin-Rest soll eine Art Scharnier bei der Öffnung des Kanals darstellen. KCNQ1-Kanäle besitzen an dieser Position ein Alanin (A336). Es konnte gezeigt werden, dass ein Glycin an dieser Position für KCNQ1-Kanäle nicht wichtig ist, solange eine flexible Struktur PAG, bestehend aus P343, A344 und G345, vorhanden ist (Seeböhm *et al.*, 2006). Diese strukturellen Unterschiede könnten die unterschiedlichen Positionen der Mutationen mit einem Einfluss auf die Aktivierung erklären und zeigen die Grenzen der Modellierung auf.

6 Literaturverzeichnis

Abbott, G.W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M.E., Lehmann, M.H., Timothy, K.W., Keating, M.T. & Goldstein, S.A. (1999). MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*, **97**, 175-187.

Aerssens, J. & Paulussen, A.D. (2005). Pharmacogenomics and acquired long QT syndrome. *Pharmacogenomics*, **6**, 259-270.

Albright, G.A. (1979). Cardiac arrest following regional anesthesia with etidocaine or bupivacaine. *Anesthesiology*, **51**, 285-287.

Antoni, H. (2000). Erregungsphysiologie des Herzens. In *Physiologie des Menschen*. Schmidt, R.F., Thews, G. & Lang, F. Springer-Verlag. Berlin. 472-497.

Antzelevitch, C. & Sicouri, S. (1994). Clinical relevance of cardiac arrhythmias generated by afterdepolarizations. Role of M cells in the generation of U waves, triggered activity and torsade de pointes. *J Am Coll Cardiol*, **23**, 259-277.

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

Bauer, C.K. & Schwarz, J.R. (2001). Physiology of EAG K⁺ channels. *J Membr Biol*, **182**, 1-15.

Bendahhou, S., Marionneau, C., Haurogne, K., Larroque, M.M., Derand, R., Szuts, V., Escande, D., Demolombe, S. & Barhanin, J. (2005). In vitro molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart. *Cardiovasc Res*, **67**, 529-538.

Biliczki, P., Virag, L., Iost, N., Papp, J.G. & Varro, A. (2002). Interaction of different potassium channels in cardiac repolarization in dog ventricular preparations: role of repolarization reserve. *Br J Pharmacol*, **137**, 361-368.

Binder, S. (2006). Elektrophysiologische Untersuchungen humaner Ionenkanäle mit der Patch-Clamp Methode und biophysikalische Modellierung der Ergebnisse. Diplomarbeit am Fachbereich Physik der Universität Hamburg.

Booker, P.D., Whyte, S.D. & Ladusans, E.J. (2003). Long QT syndrome and anaesthesia. *Br J Anaesth*, **90**, 349-366.

Boyle, M.B., Azhderian, E.M., MacLusky, N.J., Naftolin, F. & Kaczmarek, L.K. (1987). Xenopus oocytes injected with rat uterine RNA express very slowly activating potassium currents. *Science*, **235**, 1221-1224.

Busch, A.E. & Lang, F. (1993). Effects of $[Ca^{2+}]_i$ and temperature on minK channels expressed in Xenopus oocytes. *FEBS Lett*, **334**, 221-224.

Busch, A.E., Busch, G.L., Ford, E., Suessbrich, H., Lang, H.J., Greger, R., Kunzelmann, K., Attali, B. & Stuhmer, W. (1997). The role of the IsK protein in the specific pharmacological properties of the IKs channel complex. *Br J Pharmacol*, **122**, 187-189.

Chen, J., Seebohm, G. & Sanguinetti, M.C. (2002). Position of aromatic residues in the S6 domain, not inactivation, dictates cisapride sensitivity of HERG and eag potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12461-12466.

Chouabe, C., Neyroud, N., Guicheney, P., Lazdunski, M., Romey, G. & Barhanin, J. (1997). Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *Embo J*, **16**, 5472-5479.

- Chouabe, C., Neyroud, N., Richard, P., Denjoy, I., Hainque, B., Romey, G., Drici, M.D., Guicheney, P. & Barhanin, J. (2000). Novel mutations in KvLQT1 that affect I_{ks} activation through interactions with Isk. *Cardiovasc Res*, **45**, 971-980.
- Cui, J., Kline, R.P., Pennefather, P. & Cohen, I.S. (1994). Gating of IsK expressed in *Xenopus* oocytes depends on the amount of mRNA injected. *J Gen Physiol*, **104**, 87-105.
- Curran, M.E., Splawski, I., Timothy, K.W., Vincent, G.M., Green, E.D. & Keating, M.T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell*, **80**, 795-803.
- del Camino, D., Holmgren, M., Liu, Y. & Yellen, G. (2000). Blocker protection in the pore of a voltage-gated K⁺ channel and its structural implications. *Nature*, **403**, 321-325.
- Dessertenne, F. (1966). [Ventricular tachycardia with 2 variable opposing foci]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, **59**, 263-272.
- Donger, C., Denjoy, I., Berthet, M., Neyroud, N., Cruaud, C., Bennaceur, M., Chivoret, G., Schwartz, K., Coumel, P. & Guicheney, P. (1997). KVLQT1 C-terminal missense mutation causes a forme fruste long-QT syndrome. *Circulation*, **96**, 2778-2781.
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. & MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, **280**, 69-77.
- Drolet, B., Simard, C. & Roden, D.M. (2004). Unusual effects of a QT-prolonging drug, arsenic trioxide, on cardiac potassium currents. *Circulation*, **109**, 26-29.
- Du, L.P., Li, M.Y., Tsai, K.C., You, Q.D. & Xia, L. (2005). Characterization of binding site of closed-state KCNQ1 potassium channel by homology modeling, molecular

- docking, and pharmacophore identification. *Biochem Biophys Res Commun*, **332**, 677-687.
- Einhorn, A. (1905). Novocain. *Dtsch Med Wochenschr*, **31**, 1668.
- Faber, G.M. & Rudy, Y. (2000). Action potential and contractility changes in [Na(+)](i) overloaded cardiac myocytes: a simulation study. *Biophys J*, **78**, 2392-2404.
- Fernandez, D., Ghanta, A., Kauffman, G.W. & Sanguinetti, M.C. (2004). Physicochemical features of the HERG channel drug binding site. *J Biol Chem*, **279**, 10120-10127.
- Ficker, E., Jarolimek, W., Kiehn, J., Baumann, A. & Brown, A.M. (1998). Molecular determinants of dofetilide block of HERG K⁺ channels. *Circ Res*, **82**, 386-395.
- Finlayson, K., Witchel, H.J., McCulloch, J. & Sharkey, J. (2004). Acquired QT interval prolongation and HERG: implications for drug discovery and development. *Eur J Pharmacol*, **500**, 129-142.
- Franqueza, L., Longobardo, M., Vicente, J., Delpon, E., Tamkun, M.M., Tamargo, J., Snyders, D.J. & Valenzuela, C. (1997). Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circ Res*, **81**, 1053-1064.
- Friederich, P. & Solth, A. (2004). Interaction of ropivacaine with cloned cardiac Kv4.3/KChIP2.2 complexes. *Anesthesiology*, **101**, 1347-1356.
- Friederich, P., Solth, A., Schillemeit, S. & Isbrandt, D. (2004). Local anaesthetic sensitivities of cloned HERG channels from human heart: comparison with HERG/MiRP1 and HERG/MiRP1 T8A. *Br J Anaesth*, **92**, 93-101.
- Ghosh, S., Nunziato, D.A. & Pitt, G.S. (2006). KCNQ1 assembly and function is blocked by long-QT syndrome mutations that disrupt interaction with calmodulin. *Circ Res*, **98**, 1048-1054.

- Gonzalez, T., Longobardo, M., Caballero, R., Delpon, E., Sinisterra, J.V., Tamargo, J. & Valenzuela, C. (2001a). Stereoselective effects of the enantiomers of a new local anaesthetic, IQB-9302, on a human cardiac potassium channel (Kv1.5). *Br J Pharmacol*, **132**, 385-392.
- Gonzalez, T., Longobardo, M., Caballero, R., Delpon, E., Tamargo, J. & Valenzuela, C. (2001b). Effects of bupivacaine and a novel local anesthetic, IQB-9302, on human cardiac K⁺ channels. *J Pharmacol Exp Ther*, **296**, 573-583.
- Gonzalez, T., Arias, C., Caballero, R., Moreno, I., Delpon, E., Tamargo, J. & Valenzuela, C. (2002a). Effects of levobupivacaine, ropivacaine and bupivacaine on HERG channels: stereoselective bupivacaine block. *Br J Pharmacol*, **137**, 1269-1279.
- Gonzalez, T., Navarro-Polanco, R., Arias, C., Caballero, R., Moreno, I., Delpon, E., Tamargo, J., Tamkun, M.M. & Valenzuela, C. (2002b). Assembly with the Kvbeta1.3 subunit modulates drug block of hKv1.5 channels. *Mol Pharmacol*, **62**, 1456-1463.
- Graf, B.M., Abraham, I., Eberbach, N., Kunst, G., Stowe, D.F. & Martin, E. (2002). Differences in cardiotoxicity of bupivacaine and ropivacaine are the result of physicochemical and stereoselective properties. *Anesthesiology*, **96**, 1427-1434.
- Groban, L., Deal, D.D., Vernon, J.C., James, R.L. & Butterworth, J. (2000). Ventricular arrhythmias with or without programmed electrical stimulation after incremental overdose with lidocaine, bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine. *Anesth Analg*, **91**, 1103-1111.
- Guo, J., Gang, H. & Zhang, S. (2006). Molecular determinants of cocaine block of human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther*, **317**, 865-874.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, **391**, 85-100.

Hancox, J.C., Levi, A.J. & Witchel, H.J. (1998). Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native "rapid" delayed rectifier K current during the cardiac ventricular action potential. *Pflugers Arch*, **436**, 843-853.

Hille, B. (2001). *Ion channels of excitable membranes*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA, USA.

Horrigan, F.T. & Aldrich, R.W. (2002). Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *J Gen Physiol*, **120**, 267-305.

Ion Channel Questionnaire Participants, T.N.R.D.D. (2004). THE STATE OF ION CHANNEL RESEARCH IN 2004. *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**, 239-278.

Jenzer, H.R. & Hagemeyer, F. (1976). Quinidine syncope: torsade de pointes with low quinidine plasma concentrations. *Eur J Cardiol*, **4**, 447-451.

Jervell, A. & Lange-Nielsen, F. (1957). Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J*, **54**, 59-68.

Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T. & MacKinnon, R. (2002). Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, **417**, 515-522.

Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T. & MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, **423**, 33-41.

Jost, N., Virag, L., Bitay, M., Takacs, J., Lengyel, C., Biliczki, P., Nagy, Z., Bogats, G., Lathrop, D.A., Papp, J.G. & Varro, A. (2005). Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: a vital role for IKs in human ventricular muscle. *Circulation*, **112**, 1392-1399.

Kamiya, K., Mitcheson, J.S., Yasui, K., Kodama, I. & Sanguinetti, M.C. (2001). Open channel block of HERG K(+) channels by vesnarinone. *Mol Pharmacol*, **60**, 244-253.

- Kamiya, K., Niwa, R., Mitcheson, J.S. & Sanguinetti, M.C. (2006). Molecular determinants of HERG channel block. *Mol Pharmacol*, **69**, 1709-1716.
- Keating, M.T. & Sanguinetti, M.C. (2001). Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell*, **104**, 569-580.
- Kies, S.J., Pabelick, C.M., Hurley, H.A., White, R.D. & Ackerman, M.J. (2005). Anesthesia for patients with congenital long QT syndrome. *Anesthesiology*, **102**, 204-210.
- Koller, K. (1884). Ueber die Verwendung des Cocains zur Anästhesierung am Auge. *Wien Med Wochenschr*, **43**, 1276-1278.
- Kurokawa, J., Chen, L. & Kass, R.S. (2003). Requirement of subunit expression for cAMP-mediated regulation of a heart potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2122-2127.
- Kurokawa, J., Motoike, H.K., Rao, J. & Kass, R.S. (2004). Regulatory actions of the A-kinase anchoring protein Yotiao on a heart potassium channel downstream of PKA phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 16374-16378.
- Lees-Miller, J.P., Duan, Y., Teng, G.Q. & Duff, H.J. (2000). Molecular determinant of high-affinity dofetilide binding to HERG1 expressed in *Xenopus* oocytes: involvement of S6 sites. *Mol Pharmacol*, **57**, 367-374.
- Lerche, C., Seebohm, G., Wagner, C.I., Scherer, C.R., Dehmelt, L., Abitbol, I., Gerlach, U., Brendel, J., Attali, B. & Busch, A.E. (2000). Molecular impact of MinK on the enantiospecific block of I(Ks) by chromanols. *Br J Pharmacol*, **131**, 1503-1506.
- Lesage, F. & Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol*, **279**, F793-801.

- Li, M., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1992). Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science*, **257**, 1225-1230.
- Li, R.A., Miake, J., Hoppe, U.C., Johns, D.C., Marban, E. & Nuss, H.B. (2001). Functional consequences of the arrhythmogenic G306R KvLQT1 K⁺ channel mutant probed by viral gene transfer in cardiomyocytes. *J Physiol*, **533**, 127-133.
- Lipka, L.J., Jiang, M. & Tseng, G.N. (1998). Differential effects of bupivacaine on cardiac K channels: role of channel inactivation and subunit composition in drug-channel interaction. *J Cardiovasc Electrophysiol*, **9**, 727-742.
- Löfgren, N. (1948). Studies on local anesthetics: xylocaine a new synthetic drug. Hoeggstroms. Stockholm.
- Löfgren, N. & Lundquist, B. (1948). Studies on local anesthetics. *Svensk Kem Tidskr*, **58**, 206.
- Long, S.B., Campbell, E.B. & MacKinnon, R. (2005a). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science*, **309**, 897-903.
- Long, S.B., Campbell, E.B. & MacKinnon, R. (2005b). Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science*, **309**, 903-908.
- Loussouarn, G., Park, K.H., Bellocq, C., Baro, I., Charpentier, F. & Escande, D. (2003). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *Embo J*, **22**, 5412-5421.
- Lu, Z., Klem, A.M. & Ramu, Y. (2002). Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J Gen Physiol*, **120**, 663-676.

- Luo, C.H. & Rudy, Y. (1991). A model of the ventricular cardiac action potential. Depolarization, repolarization, and their interaction. *Circ Res*, **68**, 1501-1526.
- Mari, F., Bertol, E., Fineschi, V. & Karch, S.B. (2004). Channelling the Emperor: what really killed Napoleon? *J R Soc Med*, **97**, 397-399.
- Milnes, J.T., Crociani, O., Arcangeli, A., Hancox, J.C. & Witchel, H.J. (2003). Blockade of HERG potassium currents by fluvoxamine: incomplete attenuation by S6 mutations at F656 or Y652. *Br J Pharmacol*, **139**, 887-898.
- Mitcheson, J.S., Chen, J., Lin, M., Culberson, C. & Sanguinetti, M.C. (2000a). A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12329-12333.
- Mitcheson, J.S., Chen, J. & Sanguinetti, M.C. (2000b). Trapping of a methanesulfonanilide by closure of the HERG potassium channel activation gate. *J Gen Physiol*, **115**, 229-240.
- Mitcheson, J.S. (2003). Drug binding to HERG channels: evidence for a 'non-aromatic' binding site for fluvoxamine. *Br J Pharmacol*, **139**, 883-884.
- Mohammad, S., Zhou, Z., Gong, Q. & January, C.T. (1997). Blockage of the HERG human cardiac K⁺ channel by the gastrointestinal prokinetic agent cisapride. *Am J Physiol*, **273**, H2534-2538.
- Mohler, P.J., Schott, J.J., Gramolini, A.O., Dilly, K.W., Guatimosim, S., duBell, W.H., Song, L.S., Haurogne, K., Kyndt, F., Ali, M.E., Rogers, T.B., Lederer, W.J., Escande, D., Le Marec, H. & Bennett, V. (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*, **421**, 634-639.
- Motulsky, H.J. & Christopoulos, A. (2003). Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. GraphPad Software Inc. San Diego, CA.

Nau, C., Wang, S.Y., Strichartz, G.R. & Wang, G.K. (2000). Block of human heart hH1 sodium channels by the enantiomers of bupivacaine. *Anesthesiology*, **93**, 1022-1033.

Neher, E., Sakmann, B. & Steinbach, J.H. (1978). The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch*, **375**, 219-228.

Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Faure, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C., Schwartz, K. & Guicheney, P. (1997). A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet*, **15**, 186-189.

Nichols, C.G. & Lopatin, A.N. (1997). Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol*, **59**, 171-191.

Nicolas, M., Dememes, D., Martin, A., Kupersmidt, S. & Barhanin, J. (2001). KCNQ1/KCNE1 potassium channels in mammalian vestibular dark cells. *Hear Res*, **153**, 132-145.

Numberger, M. & Dragun, A. (1996). *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg.

Oertel, R., Rahn, R. & Kirch, W. (1997). Clinical pharmacokinetics of articaine. *Clin Pharmacokinet*, **33**, 417-425.

Park, K.H., Piron, J., Dahimene, S., Merot, J., Baro, I., Escande, D. & Loussouarn, G. (2005). Impaired KCNQ1-KCNE1 and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate interaction underlies the long QT syndrome. *Circ Res*, **96**, 730-739.

Perry, M., de Groot, M.J., Helliwell, R., Leishman, D., Tristani-Firouzi, M., Sanguinetti, M.C. & Mitcheson, J. (2004). Structural determinants of HERG channel block by clofilium and ibutilide. *Mol Pharmacol*, **66**, 240-249.

- Polley, L.S. & Santos, A.C. (2003). Cardiac arrest following regional anesthesia with ropivacaine: here we go again! *Anesthesiology*, **99**, 1253-1254.
- Pongs, O. (1999). Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Lett*, **452**, 31-35.
- Pusch, M., Magrassi, R., Wollnik, B. & Conti, F. (1998). Activation and inactivation of homomeric KvLQT1 potassium channels. *Biophys J*, **75**, 785-792.
- Pusch, M., Bertorello, L. & Conti, F. (2000). Gating and flickery block differentially affected by rubidium in homomeric KCNQ1 and heteromeric KCNQ1/KCNE1 potassium channels. *Biophys J*, **78**, 211-226.
- Rampe, D., Roy, M.L., Dennis, A. & Brown, A.M. (1997). A mechanism for the proarrhythmic effects of cisapride (Propulsid): high affinity blockade of the human cardiac potassium channel HERG. *FEBS Lett*, **417**, 28-32.
- Roden, D.M. (1993). Early after-depolarizations and torsade de pointes: implications for the control of cardiac arrhythmias by prolonging repolarization. *Eur Heart J*, **14 Suppl H**, 56-61.
- Roden, D.M. (1998). Taking the "idio" out of "idiosyncratic": predicting torsades de pointes. *Pacing Clin Electrophysiol*, **21**, 1029-1034.
- Roden, D.M. & Viswanathan, P.C. (2005). Genetics of acquired long QT syndrome. *J Clin Invest*, **115**, 2025-2032.
- Roden, D.M. (2006). Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link. *J Intern Med*, **259**, 59-69.
- Romano, C., Gemme, G. & Pongiglione, R. (1963). [Rare Cardiac Arrhythmias Of The Pediatric Age. Ii. Syncopal Attacks Due To Paroxysmal Ventricular Fibrillation.

(Presentation Of 1st Case In Italian Pediatric Literature)]. *Clin Pediatr (Bologna)*, **45**, 656-683.

Rosati, B., Pan, Z., Lypen, S., Wang, H.S., Cohen, I., Dixon, J.E. & McKinnon, D. (2001). Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol*, **533**, 119-125.

Rossner, K.L. & Freese, K.J. (1997). Bupivacaine inhibition of L-type calcium current in ventricular cardiomyocytes of hamster. *Anesthesiology*, **87**, 926-934.

Roy, M., Dumaine, R. & Brown, A.M. (1996). HERG, a primary human ventricular target of the nonsedating antihistamine terfenadine. *Circulation*, **94**, 817-823.

Salata, J.J., Jurkiewicz, N.K., Wang, J., Evans, B.E., Orme, H.T. & Sanguinetti, M.C. (1998). A novel benzodiazepine that activates cardiac slow delayed rectifier K⁺ currents. *Mol Pharmacol*, **54**, 220-230.

Sanchez-Chapula, J.A., Navarro-Polanco, R.A., Culberson, C., Chen, J. & Sanguinetti, M.C. (2002). Molecular determinants of voltage-dependent human ether-a-go-go related gene (HERG) K⁺ channel block. *J Biol Chem*, **277**, 23587-23595.

Sanchez-Chapula, J.A., Ferrer, T., Navarro-Polanco, R.A. & Sanguinetti, M.C. (2003). Voltage-dependent profile of human ether-a-go-go-related gene channel block is influenced by a single residue in the S6 transmembrane domain. *Mol Pharmacol*, **63**, 1051-1058.

Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E. & Keating, M.T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IK_r potassium channel. *Cell*, **81**, 299-307.

Sanguinetti, M.C., Curran, M.E., Zou, A., Shen, J., Spector, P.S., Atkinson, D.L. & Keating, M.T. (1996). Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature*, **384**, 80-83.

Schmitt, N., Schwarz, M., Peretz, A., Abitbol, I., Attali, B. & Pongs, O. (2000). A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *Embo J*, **19**, 332-340.

Schulze-Bahr, E., Wang, Q., Wedekind, H., Haverkamp, W., Chen, Q., Sun, Y., Rubie, C., Hordt, M., Towbin, J.A., Borggrefe, M., Assmann, G., Qu, X., Somberg, J.C., Breithardt, G., Oberti, C. & Funke, H. (1997). KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet*, **17**, 267-268.

Seeböhm, G., Lerche, C., Busch, A.E. & Bachmann, A. (2001a). Dependence of I(Ks) biophysical properties on the expression system. *Pflugers Arch*, **442**, 891-895.

Seeböhm, G., Scherer, C.R., Busch, A.E. & Lerche, C. (2001b). Identification of specific pore residues mediating KCNQ1 inactivation. A novel mechanism for long QT syndrome. *J Biol Chem*, **276**, 13600-13605.

Seeböhm, G., Chen, J., Strutz, N., Culberson, C., Lerche, C. & Sanguinetti, M.C. (2003a). Molecular determinants of KCNQ1 channel block by a benzodiazepine. *Mol Pharmacol*, **64**, 70-77.

Seeböhm, G., Sanguinetti, M.C. & Pusch, M. (2003b). Tight coupling of rubidium conductance and inactivation in human KCNQ1 potassium channels. *J Physiol*, **552**, 369-378.

Seeböhm, G., Westenskow, P., Lang, F. & Sanguinetti, M.C. (2005). Mutation of colocalized residues of the pore helix and transmembrane segments S5 and S6 disrupt deactivation and modify inactivation of KCNQ1 K⁺ channels. *J Physiol*, **563**, 359-368.

Seebohm, G., Strutz-Seebohm, N., Ureche, O.N., Baltaev, R., Lampert, A., Kornichuk, G., Kamiya, K., Wuttke, T.V., Lerche, H., Sanguinetti, M.C. & Lang, F. (2006). Differential roles of S6 domain hinges in the gating of KCNQ potassium channels. *Biophys J*, **90**, 2235-2244.

Selzer, A. & Wray, H.W. (1964). Quinidine Syncope. Paroxysmal Ventricular Fibrillation Occurring During Treatment Of Chronic Atrial Arrhythmias. *Circulation*, **30**, 17-26.

Sesti, F., Abbott, G.W., Wei, J., Murray, K.T., Saksena, S., Schwartz, P.J., Priori, S.G., Roden, D.M., George, A.L., Jr. & Goldstein, S.A. (2000). A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10613-10618.

Shamgar, L., Ma, L., Schmitt, N., Haitin, Y., Peretz, A., Wiener, R., Hirsch, J., Pongs, O. & Attali, B. (2006). Calmodulin is essential for cardiac IKs channel gating and assembly: impaired function in long-QT mutations. *Circ Res*, **98**, 1055-1063.

Shealy, R.T., Murphy, A.D., Ramarathnam, R., Jakobsson, E. & Subramaniam, S. (2003). Sequence-function analysis of the K⁺-selective family of ion channels using a comprehensive alignment and the KcsA channel structure. *Biophys J*, **84**, 2929-2942.

Silva, J. & Rudy, Y. (2005). Subunit interaction determines IKs participation in cardiac repolarization and repolarization reserve. *Circulation*, **112**, 1384-1391.

Smith, P.L., Baukrowitz, T. & Yellen, G. (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature*, **379**, 833-836.

Solth, A., Siebrands, C.C. & Friederich, P. (2005). Inhibition of Kv4.3/KChIP2.2 Channels by Bupivacaine and Its Modulation by the Pore Mutation Kv4.3V401I. *Anesthesiology*, **103**, 796-804.

- Spector, P.S., Curran, M.E., Keating, M.T. & Sanguinetti, M.C. (1996). Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K⁺ channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ Res*, **78**, 499-503.
- Splawski, I., Tristani-Firouzi, M., Lehmann, M.H., Sanguinetti, M.C. & Keating, M.T. (1997). Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet*, **17**, 338-340.
- Strichartz, G.R., Sanchez, V., Arthur, G.R., Chafetz, R. & Martin, D. (1990). Fundamental properties of local anesthetics. II. Measured octanol:buffer partition coefficients and pK_a values of clinically used drugs. *Anesth Analg*, **71**, 158-170.
- Suessbrich, H., Waldegger, S., Lang, F. & Busch, A.E. (1996). Blockade of HERG channels expressed in *Xenopus* oocytes by the histamine receptor antagonists terfenadine and astemizole. *FEBS Lett*, **385**, 77-80.
- Takumi, T., Ohkubo, H. & Nakanishi, S. (1988). Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science*, **242**, 1042-1045.
- Tristani-Firouzi, M. & Sanguinetti, M.C. (1998). Voltage-dependent inactivation of the human K⁺ channel KvLQT1 is eliminated by association with minimal K⁺ channel (minK) subunits. *J Physiol*, **510 (Pt 1)**, 37-45.
- Tristani-Firouzi, M., Chen, J. & Sanguinetti, M.C. (2002a). Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K⁺ channels. *J Biol Chem*, **277**, 18994-19000.
- Tristani-Firouzi, M., Jensen, J.L., Donaldson, M.R., Sansone, V., Meola, G., Hahn, A., Bendahhou, S., Kwiecinski, H., Fidzianska, A., Plaster, N., Fu, Y.H., Ptacek, L.J. & Tawil, R. (2002b). Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin Invest*, **110**, 381-388.

- Trudeau, M.C., Warmke, J.W., Ganetzky, B. & Robertson, G.A. (1995). HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science*, **269**, 92-95.
- Valenzuela, C., Delpon, E., Tamkun, M.M., Tamargo, J. & Snyders, D.J. (1995a). Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. *Biophys J*, **69**, 418-427.
- Valenzuela, C., Snyders, D.J., Bennett, P.B., Tamargo, J. & Hondeghem, L.M. (1995b). Stereoselective block of cardiac sodium channels by bupivacaine in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation*, **92**, 3014-3024.
- van Oss, G.E., Vree, T.B., Baars, A.M., Termond, E.F. & Booij, L.H. (1989). Pharmacokinetics, metabolism, and renal excretion of articaine and its metabolite articainic acid in patients after epidural administration. *Eur J Anaesthesiol*, **6**, 49-56.
- Viswanathan, P.C., Shaw, R.M. & Rudy, Y. (1999). Effects of IKr and IKs heterogeneity on action potential duration and its rate dependence: a simulation study. *Circulation*, **99**, 2466-2474.
- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V. & Nilius, B. (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature*, **430**, 748-754.
- Walker, B.D., Singleton, C.B., Bursill, J.A., Wyse, K.R., Valenzuela, S.M., Qiu, M.R., Breit, S.N. & Campbell, T.J. (1999). Inhibition of the human ether-a-go-go-related gene (HERG) potassium channel by cisapride: affinity for open and inactivated states. *Br J Pharmacol*, **128**, 444-450.
- Wang, H.S., Brown, B.S., McKinnon, D. & Cohen, I.S. (2000). Molecular basis for differential sensitivity of KCNQ and I(Ks) channels to the cognitive enhancer XE991. *Mol Pharmacol*, **57**, 1218-1223.

- Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J.L., Moss, A.J., Towbin, J.A. & Keating, M.T. (1995). SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell*, **80**, 805-811.
- Wang, Q., Curran, M.E., Splawski, I., Burn, T.C., Millholland, J.M., VanRaay, T.J., Shen, J., Timothy, K.W., Vincent, G.M., de Jager, T., Schwartz, P.J., Toubin, J.A., Moss, A.J., Atkinson, D.L., Landes, G.M., Connors, T.D. & Keating, M.T. (1996a). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet*, **12**, 17-23.
- Wang, S., Morales, M.J., Liu, S., Strauss, H.C. & Rasmusson, R.L. (1997). Modulation of HERG affinity for E-4031 by [K⁺]_o and C-type inactivation. *FEBS Lett*, **417**, 43-47.
- Wang, Z., Kiehn, J., Yang, Q., Brown, A.M. & Wible, B.A. (1996b). Comparison of binding and block produced by alternatively spliced K β 1 subunits. *J Biol Chem*, **271**, 28311-28317.
- Ward, O.C. (1964). A New Familial Cardiac Syndrome In Children. *J Ir Med Assoc*, **54**, 103-106.
- Warmke, J., Drysdale, R. & Ganetzky, B. (1991). A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science*, **252**, 1560-1562.
- Warmke, J.W. & Ganetzky, B. (1994). A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3438-3442.
- Weerapura, M., Nattel, S., Chartier, D., Caballero, R. & Hebert, T.E. (2002). A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? *J Physiol*, **540**, 15-27.
- Yang, P., Kanki, H., Drolet, B., Yang, T., Wei, J., Viswanathan, P.C., Hohnloser, S.H., Shimizu, W., Schwartz, P.J., Stanton, M., Murray, K.T., Norris, K., George, A.L., Jr. &

Roden, D.M. (2002). Allelic variants in long-QT disease genes in patients with drug-associated torsades de pointes. *Circulation*, **105**, 1943-1948.

Yang, W.-P., Levesque, P.C., Little, W.A., Conder, M.L., Shalaby, F.Y. & Blannar, M.A. (1997). KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *PNAS*, **94**, 4017-4021.

Yifrach, O. & MacKinnon, R. (2002). Energetics of pore opening in a voltage-gated K(+) channel. *Cell*, **111**, 231-239.

Zhang, S., Rajamani, S., Chen, Y., Gong, Q., Rong, Y., Zhou, Z., Ruoho, A. & January, C.T. (2001). Cocaine Blocks HERG, but Not KvLQT1+minK, Potassium Channels. *Mol Pharmacol*, **59**, 1069-1076.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Amplitude
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , Varianzanalyse
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
cRNA	<i>copy</i> Ribonukleinsäure
C	Kapazität
C _p	Pipettenkapazität
C _m	Membrankapazität
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
Δ	Differenz zweier Werte (z.B. Mutante-Wildtyp)
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAD	<i>early afterdepolarisation</i> , frühe Nachdepolarisation
EAG	<i>ether-á-go-go</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , verbessertes grün fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
x g	relative Erdbeschleunigung
G	Leitfähigkeit
G _{max}	maximale Leitfähigkeit

h	<i>human</i> , Stunde
HEK293	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperzino)-ethansulfonsäure
HERG	<i>humane ether-á-go-go related gene</i>
I	Strom
IC_{50}	Konzentration der halbmaximalen Inhibition
I_{Kr}	<i>rapidly activating delayed rectifier potassium current</i>
I_{Ks}	<i>slowly activating delayed rectifier potassium current</i>
I_{max}	maximaler Strom
I_{to}	transienter Auswärtsstrom
JLNS	Jervell- und Lange-Nielson-Syndrom
k	Steigungsfaktor in der Boltzmann-Gleichung
$[K]_i$	intrazelluläre Kaliumkonzentration
$[K]_o$	extrazelluläre Kaliumkonzentration
KChIP	<i>K⁺-channel interacting protein</i>
Kv	spannungsabhängiger Kaliumkanal
λ_{em}	Wellenlänge der Emission
λ_{ex}	Wellenlänge der Anregung
LA	Lokalanästhetikum
LB	Luria Bertani
LQTS	long QT-Syndrom
MEM	<i>minimal essential medium</i> , Minimalmedium
MOPS	(4-(N-Morpholino)-propan)-sulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	Anzahl (der Experimente)
OD_x	optische Dichte bei x nm
OPA	<i>operational amplifier</i> , Operationsverstärker
p	p-Wert (Wahrscheinlichkeit) beim t-Test nach Student
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Q	Ladungsfluss

r	Korrelationskoeffizient
R	Widerstand
R_g	Sealwiderstand
R_m	Membranwiderstand
R_s	Serienwiderstand
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RWS	Romano-Ward-Syndrom
S1-S6	Membransegmente der Kv-Kanäle
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
τ	Zeitkonstante
TdP	<i>Torsades de pointes</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEA	Tetraethylammonium
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminoethan
UpM	Umdrehung pro Minute
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
V	Spannung
V_m	Membranspannung
$V_{0.5}$	Spannung der halbmaximalen Aktivierung bzw. Inaktivierung
z	effektive Ladung
ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg

Die Aminosäuren wurden im Ein-Buchstaben-Code angegeben.

7.2 Wissenschaftlicher Werdegang

10/1997-11/2002 Biochemie-Studium an der Universität Hannover

04/2002-10/2002 Diplomarbeit bei Prof. Gros am Institut für vegetative Physiologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Thema: „Einfluss von Elektrostimulation auf die Muskeltrophik: Beteiligung des Akt/mTOR-Weges und des Calcineurin/NFAT-Signalweges“

12/2002-08/2006 Promotion bei Prof. Pongs am Institut für neurale Signalverarbeitung, ZMNH, Universität Hamburg.

Thema: „Struktur-Funktionsanalyse von angeborenen und erworbenen schweren ventrikulären Herzrhythmusstörungen am Beispiel der humanen kardialen Kaliumkanäle KCNQ1 und HERG“

7.3 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Originalarbeiten:

Siebrands CC, Friederich P. (2006). Inhibition of HERG channels by the local anaesthetic articaine. [eingereicht zur Publikation beim *European Journal of Anaesthesiology*]

Siebrands CC, Binder S, Eckhoff U, Schmitt N, Friederich P. (2006). LQT1 mutation A344V increases local anesthetic sensitivity of IKs. [akzeptiert zur Publikation bei *Anesthesiology*]

Sanger JW, Kang S, Siebrands CC, Freeman N, Du A, Wang J, Stout AL, Sanger JM. (2006) How to build a myofibril. *J Muscle Res Cell Motil*, 1-12 [Epub ahead of print]

Wedekind H, Bajanowski T, Friederich P, Breithardt G, Wulfing T, Siebrands C, Engeland B, Monnig G, Haverkamp W, Brinkmann B, Schulze-Bahr E. (2006). Sudden infant death syndrome and long QT syndrome: an epidemiological and genetic study. *Int J Legal Med*; 120(3): 129-37.

Solth A,* Siebrands CC,* Friederich P. (2005). Inhibition of Kv4.3/KChIP2.2 Channels by Bupivacaine and Its Modulation by the Pore Mutation Kv4.3V401I. *Anesthesiology*; 103(4): 796-804. * geteilte Erstautorenschaft

Siebrands CC, Schmitt N, Friederich P. (2005). Local anesthetic interaction with human ether-a-go-go-related gene (HERG) channels: role of aromatic amino acids Y652 and F656. *Anesthesiology*; 103(1):102-12.

Siebrands CC, Sanger JM, Sanger JW. (2004). Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells in the presence of taxol. *Cell Motil Cytoskeleton*; 58(1):39-52.

Steinmann D, Bremer M, Rades D, Skawran B, Siebrands C, Karstens JH, Dork T. (2001). Mutations of the BRCA1 and BRCA2 genes in patients with bilateral breast cancer. *Br J Cancer*; 85(6):850-8.

Kongressbeiträge:

Siebrands CC, Friederich P. (2006). Molecular Determinants of HERG Channel Block by Local Anesthetics. [akzeptiert als Vortrag beim Jahrestreffen der American Society of Anesthesiologists in Chicago, 14.-18. Oktober 2006]

Siebrands CC, Solth A, Schmitt N, Friederich P (2004). Molecular site of bupivacaine interaction with HERG channels. *Pflügers Arch*; 447 (Suppl 1): S66 P 01-6. Posterpräsentation beim 83. Jahrestreffen der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Leipzig, 14.-17. März 2004.

7.4 Danksagung

Prof. Olaf Pongs danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit unter den hervorragenden Bedingungen des Instituts für Neurale Signalverarbeitung am ZMNH durchführen zu können.

Bei PD Dr. Patrick Friederich bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas und die umfassende Betreuung während der gesamten Zeit. Dr. Mark-Andree Punke danke ich für die Einführung in die Patch-Clamp-Technik und viele interessante Gespräche zu fachlichen und anderen Themen. Auch den anderen Mitarbeitern der AG Friederich, besonders Stephan Binder und Hanno Scheel, danke ich für viele unterhaltsame Stunden im Labor. Stephan Binder danke ich außerdem für das verwendete Simulationsprogramm. Dr. Anna Solth und Dr. Britta Callsen danke ich für die nette Gesellschaft in der ersten Zeit am ZMNH.

PD Dr. Robert Bähring danke ich für hilfreiche Diskussionen in allen elektrophysiologischen Fragen. Dr. Vitya Vardanyan danke ich für die Einführung in die Two-Electrode-Voltage-Clamp-Technik. Ich danke Dr. Nicole Schmitt und Silke Jacob für die Klonierung der zahlreichen Alanin-Mutanten.

Andrea Zaisser danke ich für die Arbeit in der Zellkultur.

Sabine Wehrmann und Sven Hartmann danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und interessante Gespräche zu molekularbiologischen und anderen Problemen. Simone Hubo danke ich für die unterhaltsamen Kaffeepausen.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für neurale Signalverarbeitung möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Außerdem bedanke ich mich besonders bei Simon und bei meiner Familie für die zuverlässige Unterstützung während der gesamten Zeit.