

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie
Zentrum für Experimentelle Medizin

Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

Martinistr. 52
20246 Hamburg

**Der Einfluss des Makrolidantibiotikums
Roxithromycin auf erg-Kaliumkanäle**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt

von

Patrizia Johanna Dorothee Bonk
aus Reinbek

Hamburg 2009

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 01.03.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Christiane Bauer

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rainer Böger

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. Dirk Isbrandt

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung	2
3	Material und Methoden	9
3.1	Material	9
3.1.1	Lösungen	9
3.1.2	Pharmaka	10
3.2	Zellbiologische Methoden	11
3.2.1	Zellen	11
3.2.2	Heterologe Expression	12
3.3	Elektrophysiologische Methoden	13
3.3.1	Patch-Clamp-Technik	13
3.3.2	Aufbau des Messplatzes	14
3.3.3	Patchpipetten	16
3.3.4	Datenaufzeichnung	16
3.3.5	Durchführung der Patch-Clamp-Technik	16
3.4	Theoretische Grundlagen	20
3.4.1	Hill-Gleichung	20
3.4.2	Boltzmann-Gleichung	20
3.4.3	„envelope of tails“-Gleichung	21
3.4.4	Lineare Regression	21

3.4.5	Zeitkonstanten der Inaktivierung, der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung.....	22
3.4.6	Berechnung der Inhibition.....	23
3.4.7	Statistische Signifikanz	23
3.5	Herstellerverzeichnis.....	23
3.6	Abkürzungsverzeichnis.....	24
4	Ergebnisse	25
4.1	Heteromultimere erg1a/1b-Kanäle.....	25
4.1.1	Aktivierung	27
4.1.2	Deaktivierung.....	36
4.1.3	Dosis-Wirkungs-Beziehung	50
4.1.4	Inaktivierung	52
4.1.5	Erholung von der Inaktivierung	55
4.2	Konkatinerte erg1/2-Kanäle.....	60
4.2.1	Aktivierung	60
4.2.2	Deaktivierung.....	63
4.2.3	Erholung von der Inaktivierung	67
4.2.4	Interaktion von Roxithromycin und Terfenadin.....	67
4.3	Native erg-Kanäle bei GH ₃ /B ₆ -Zellen.....	71
5	Diskussion.....	76
5.1	Heterologe erg1a/1b-Kanäle	77
	Dosis-Wirkungs-Beziehung	78
	Vergleich der Inhibitionen von Ein- und Auswärtsströmen.....	80

Aktivierung	81
Deaktivierung.....	82
Inaktivierung	84
Erholung von der Inaktivierung	86
5.2 Konkatinerte erg1/2-Kanäle.....	87
Aktivierung	87
Deaktivierung.....	88
Erholung von der Inaktivierung	88
Interaktion von Roxithromycin und Terfenadin.....	88
Entwickelt sich der Block durch Roxithromycin bei Depolarisation?	90
5.3 Native erg-Kanäle bei GH ₃ /B ₆ -Zellen.....	91
Aktivierung	92
5.4 Dosierung.....	93
6 Zusammenfassung.....	94
7 Literatur.....	96
8 Danksagung.....	102
9 Eidesstattliche Versicherung.....	103

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der Interaktion des Makrolidantibiotikums Roxithromycin mit K^+ -Kanälen der erg-Familie, deren Mitglieder in vielen unterschiedlichen Gewebetypen – wie beispielsweise im Myokard und im Gehirn - funktionell exprimiert werden.

Der Schwerpunkt der Arbeit liegt dabei auf der Beschreibung des Roxithromycin-Einflusses am Herzen. Heteromultimere erg1a/1b-Kanäle, die durch Koexpression beider Isoformen der porenbildenden α -Untereinheit entstanden, wurden stellvertretend für den kardialen I_{Kr} untersucht. Neben Studien zur Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde auch auf Veränderungen des spannungsabhängigen Schaltverhaltens besonderes Augenmerk gerichtet, um einen möglichen Einfluss von erg1b auf die pharmakologische Antwort des Kanals ausfindig zu machen. Als Grundlage dieser Untersuchungen diente die Vielzahl an vorhandenen Erkenntnissen über die Beeinflussbarkeit von erg1a-(HERG)-Kanälen durch eine Bandbreite von ganz unterschiedlichen Substanzen inklusive Makrolidantibiotika.

Desweiteren wurden konkatinerte erg1/2-Kanäle und native erg-Kanäle in GH₃/B₆-Zellen experimentell auf die Möglichkeit hin untersucht, ob Roxithromycin durch Einwirkung auf deren erg-Strom einen Einfluss am Gehirn haben könnte.

Die vorliegende Arbeit soll mithilfe von Roxithromycin also dazu beitragen,

- zu klären, ob die Koexpression beider α -Untereinheiten die pharmakologische Beeinflussbarkeit des erg- K^+ -Stromes verändert, und
- einen Einblick zu liefern auf potenzielle pharmakologisch induzierte Störungen im zentralen Nervensystem, denen die Beeinflussung des erg- K^+ -Stromes zugrunde liegt.

Elektrophysiologische Messungen sind der Goldstandard, um die Blockade von erg-Kanälen durch Pharmaka zu testen (Witchel et al., 2002). Die Experimente wurden gänzlich unter Anwendung der Patch-Clamp-Technik durchgeführt.

2 Einleitung

In der Vielzahl der Ionenkanalproteine bilden die K^+ -Kanäle die umfangreichste Untergruppe. K^+ -Kanäle lassen sich nach morphologischen und funktionellen Kriterien einteilen. Erg-(ether-à-go-go-related gene)- K^+ -Kanäle gehören der Familie der spannungsabhängigen EAG-(ether-à-go-go)- K^+ -Kanäle an. Sie wurde erstmals bei einer *Drosophila melanogaster*-Mutante beschrieben, die unter Äthernarkose eine Art „Gogo“-Tanz aufführte (Kaplan et Trout, 1969). Von diesem Phenotyp leitet sich der eigentümliche Name dieser Kanäle ab. Alle Mitglieder dieser Familie – eag-, erg- und elk-(ether-à-go-go-like)- K^+ -Kanäle - teilen eine ähnliche Überstruktur (Warmke et Ganetzky, 1994). Sie bestehen aus einem zentralen hydrophoben Kern, der 7 hydrophobe Domänen enthält, und zwar die 6 transmembranen α -Helix-Domänen (S1-S6) und die Porenregion. Der hydrophobe Kern wird von langen zyttoplasmatischen Domänen am N- und C-Terminus flankiert (Warmke et Ganetzky, 1994). Die erg-Subfamilie der Ratte enthält 3 Mitglieder: *reg1*, *reg2* und *reg3* (Schwarz et Bauer, 2004). Humane erg-(HERG = *herg1a*)-cDNA-Klone wurden erstmals 1994 aus dem humanen Hippocampus isoliert (Warmke et Ganetzky, 1994).

Ionenkanäle sind keine starren Gebilde, sondern dynamische Strukturen. Der HERG- K^+ -Kanal kann seine Konformation ändern (= gating) und in einem der drei Hauptzustände vorliegen: In der geschlossenen deaktivierten, in der offenen oder in der inaktivierten Konformation. Der Übergang vom geschlossenen deaktivierten in den offenen Zustand wird als Aktivierung bezeichnet und der vom offenen zurück in den geschlossenen Zustand als Deaktivierung. Der inaktivierte Zustand bezieht sich auf eine Konformation des Kanals, in der das Aktivierungstor offen ist, der Kanal jedoch nicht in der Lage ist, Strom zu leiten. Der Übergang in diesen Zustand wird als Inaktivierung bezeichnet, der umgekehrte Prozess als Erholung von der Inaktivierung (Vandenberg et al., 2003). Erg-Kanäle sind insofern besonders, als dass sie die Architektur von klassischen spannungsabhängigen K^+ -Kanälen (K_v) aufweisen, jedoch funktionell wie Einwärtsrektifizierer, eine Kanalfamilie mit anderem molekularem Aufbau, agieren (Smith et al., 1996). Die ungewöhnliche Kinetik von HERG - insbesondere die schnelle Inaktivierung - führt zur Einwärtsrektifizierung (Smith et al., 1996; Spector et al., 1996), was bedeutet, dass der Kanal in eine Richtung – einwärts gerichtet - besser leitet als in die andere (Numberger et Draguhn, 1996).

Erg-Kanäle sind bereits in vielen Gewebetypen entdeckt worden (Bauer et Schwarz, 2001). Bisher sind *reg1*-Kanäle mit ihrer vitalen Funktion im Myokard am besten charakterisiert.

Das Herz ist eine Pumpe, dessen mechanische Aktivität durch intrinsische elektrische Impulse kontrolliert und auch neuronal über das autonome Nervensystem moduliert wird. Die rhythmische Aktivität des humanen Herzens ist bereits in der 5. Schwangerschaftswoche mittels Ultraschall nachweisbar. Erwähnenswert ist, wie fehlerlos dieser Muskel im Laufe eines Lebens arbeitet mit etwa 70 Schlägen pro Minute über 75-90 Jahre. Mit seinen 36 Millionen Schlägen, die das Herz pro Jahr leisten muss, wird deutlich, dass es kaum eine Toleranz für Fehler gibt. Wie bei anderen erregbaren Zellen resultiert die Erregbarkeit der kardialen Myozyten aus Aktionspotentialen, die eine charakteristische Dauer von etwa 300 ms aufweisen (Übersicht in Keating et al., 2001). Das kardiale Aktionspotential besteht aus fünf Phasen, während jeder der Phasen kommt es zum koordinierten Öffnen und Schließen von kardialen Ionenkanälen. Die Ausbreitung dieser elektrischen Aktivität über das Herzgewebe kann mittels Elektrokardiogramm (EKG) an der Körperoberfläche aufgezeichnet werden. Untersuchungen des Aktionspotentials des Kardiomyozyten zeigten, dass sich der späte, auswärts gerichtete Kaliumstrom („delayed rectifier“), der die Plateau-Phase beendet und die Repolarisation einleitet, in den relativ schnell aktivierenden I_{Kr} und in den langsam aktivierenden I_{Ks} unterteilen lässt (Sanguinetti et Jurkiewicz, 1990). Zunächst wurde angenommen, dass dabei der I_{Kr} von den α -Untereinheiten *erg1a* (HERG) getragen wird (Sanguinetti et al., 1995), die die Pore formen und sich eventuell mit β -Untereinheiten (MiRP1= MinK related peptide) zu stabilen Komplexen zusammenschließen (Abbott et al., 1999). Bis heute ist jedoch die genaue molekulare Identität des I_{Kr} bezogen auf mögliche β -Untereinheiten umstritten, ebenso wie die Frage, ob präklinische Untersuchungen zur Medikamentensicherheit routinemäßig an HERG/MiRP1-Komplexen durchgeführt werden sollten (Witchel et al., 2002). Unumstritten ist hingegen die Entdeckung zweier verschiedener Isoformen der α -Untereinheit – *erg1a* und *erg1b* – auf Proteinebene im kardialen Ventrikelmyozyten von Säugern (Jones et al., 2004) und auf mRNA-Ebene im rechten Atrium sowie im linken Ventrikel (Larsen et al., 2008). Es konnte in vivo nachgewiesen werden, dass sich *erg1a*- und *erg1b*-Proteine im Herzen zusammenschließen, um den nativen I_{Kr} zu bilden (London et al., 1997; Jones et al., 2004). Um sich im heterologen System so dicht wie möglich dem nativen Status anzunähern, bedarf es zumindest der Koexpression von *erg1a* und *erg1b* (Lees-Miller et al., 1997; Jones et al., 2004).

Unstrittig ist auch die Funktion des I_{Kr} im Herzen, die auf dem ungewöhnlichen Schaltverhalten von *erg*-Kanälen basiert. Die initiale Depolarisation des Aktionspotentials führt zur Aktivierung der *erg*-Kanäle, die langsam vonstatten geht und von der schnellen Inaktivierung begleitet wird. Während der Plateau-Phase des Aktionspotentials ist somit die

Stromamplitude lediglich sehr klein. Diese Funktion von I_{Kr} unterstützt die Bildung des Plateau-Potentials und resultiert aus seiner einwärtsrektifizierenden Eigenschaft, die auf der schnellen Inaktivierung der erg-Kanäle beruht (Smith et al., 1996; Spector et al., 1996). Im Verlauf der weiteren Repolarisation tritt ein transienter erg-Auswärtsstrom infolge der schnellen Erholung von der Inaktivierung in Kombination mit der langsamen Deaktivierung auf. Dieser erg-Strom und der I_{Ks} -Strom, gepaart mit der Aktivierung des klassischen kardialen Einwärtsrektifizierers (I_{K1}), repolarisiert das Aktionspotential (Bauer et Schwarz, 2001). Eine Reduktion von I_{Kr} infolge einer Beeinflussung von HERG verlängert das kardiale Aktionspotential. Diese Störung kann genetischer oder pharmakologischer Natur sein und schlägt sich im EKG in Form einer Verlängerung der QT-Zeit nieder. Man spricht vom Long QT-Syndrom (LQT-Syndrom). Interessanterweise inhibieren fast alle für dieses Syndrom bekannten Medikamente den I_{Kr} , obwohl theoretisch die Verlängerung der QT-Zeit aus der Störung eines jeden der kardialen Ionenkanäle resultieren könnte (De Ponti et al., 2001). Gerade wenn zusätzlich gefährdende Kofaktoren vorliegen, wie beispielsweise Störungen im Elektrolythaushalt, Bradykardie und/oder weibliches Geschlecht, besteht die Gefahr, schwere Arrhythmien, sog. Torsades de pointes, zu entwickeln, die schlimmstenfalls über ventrikuläre Fibrillation zum Tod führen können. Die Verlängerung der QT-Zeit ist hier ein stellvertretender Marker für die Kardiotoxizität einer Substanz, der aus regulatorischen Gründen gebraucht wird, da medikamentös induzierte Torsaden selten auftreten und kein Konsens für den Grad an QT-Verlängerung existiert, der klinisch signifikant in Erscheinung tritt (De Ponti et al., 2001).

Bis heute ist eine Vielzahl an Pharmaka bekannt, die eine Inhibition von HERG, zumeist als unerwünschte Arzneimittelnebenwirkung, induziert (Arizona CERT <http://www.QTdrugs.org>; The HERG Association <http://www.herg.ch/4736.html>). HERG ist als molekulares Angriffsziel prädestiniert. Die Erklärung dafür stützt sich vermutlich auf drei Hauptgründe: Zum einen weisen die Kanäle eine schnelle Inaktivierung auf, die eine Substanzbindung fördert und stabilisiert. Zweitens besitzt die HERG-Pore ein großes Lumen und kann so eine Vielzahl an Substanzen beherbergen. Drittens erleichtert die Anwesenheit von multiplen aromatischen Ringen, die die Pore säumen, die Bindung von Stoffen, die selbst aromatische Ringe enthalten (Vandenberg et al., 2001). Zur Identität möglicher Bindungsstellen im HERG-Kanal ist bereits einiges in der Literatur zu finden (Mitcheson et al., 2000; Kamiya et al., 2008). Zieht man das breite Spektrum von HERG-Blockern in Betracht sowie die Beobachtungen, dass verschiedene Substanzen an den unterschiedlichen Kanalzuständen binden, ist es wahrscheinlich, dass es multiple Bindungsstellen für Stoffe am HERG-Kanal

geben muss (Vandenberg et al., 2001). Aus diesem Grund ist es zudem notwendig, die Vielzahl an HERG-Blockern auch an heteromultimeren *erg1a/1b*-Kanälen zu testen, da sie in Zusammensetzung und funktionellen Eigenschaften stark dem nativen I_{Kr} ähneln (Sale et al., 2008). Einen Hinweis darauf, dass die Koexpression beider α -Untereinheiten möglicherweise die pharmakologische Antwort der Kanäle beeinflusst, gibt es bereits (Sale et al., 2008).

In Gehirn sind alle drei *erg*-Kanäle präsent und weisen ein bestimmtes Verteilungsmuster auf (Saganich et al., 2001). Auch die *erg1b*-Kanaluntereinheit ist auf Proteinebene im Gehirn der Maus (Guasti et al., 2005) und der Ratte (Hirdes et al., 2005) vorhanden. Die Analyse zur Funktion dieser Kanäle im Gehirn steht jedoch am Anfang (Saganich et al., 2001; Schwarz et Bauer, 2004). Ansätze bieten Entdeckungen, nach denen *erg*-Kanäle zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials beisteuern, sich an der Prolaktin-Sekretion in laktotrophen Zellen beteiligen oder womöglich zur K^+ -Homöostase beitragen (Übersicht in Bauer et Schwarz, 2001). Vermutlich bilden die Kanäle Heteromultimere, da sich Überlappungen im Expressionsmuster in derselben neuronalen Population finden (Saganich et al., 2001; Guasti et al., 2005). Dass *erg*-Kanäle in der Lage sind, Heteromultimere zu bilden, konnte nachgewiesen werden (Wimmers et al., 2001).

Epilepsie, eine Störung der neuronalen Funktion, ist ebenfalls korreliert mit Ionenkanal-dysfunktionen (Omichi et al., 2009). Seit kurzem wird die Möglichkeit diskutiert, ob sich einige Kanalopathien auf zwei Arten manifestieren können: Als Epilepsie und LQT-Syndrom. Der molekulare Schlüssel, der für diese Verbindung verantwortlich sein soll, ist das *KCNH2*-Gen, das für kardial und neuronal exprimierte HERG- K^+ -Kanäle kodiert (Johnson et al., 2009; Omichi et al., 2009). Auch das Krankheitsbild der Schizophrenie wird neuerdings mit einer Primaten-spezifischen Isoform des *KCNH2*-Gens im Gehirn in Zusammenhang gebracht (Huffaker et al., 2009).

Das semisynthetische Antibiotikum Roxithromycin gehört zu der Gruppe der „modernen“ Makrolide und ist strukturell mit dem Prototyp-Makrolid Erythromycin verwandt. Sein chemischer Name lautet (E)-erythromycin-9-[*O*-(2-methoxyethoxy)methyl]oxime] (Zhong et al., 2000), die Summenformel ist $C_{41}H_{76}N_2O_{15}$ und sein Molekulargewicht beträgt 837,05 g/mol. Generell sind Makrolide eine Gruppe von chemisch verwandten Substanzen, denen ein makrozyklischer Lakton-Ring mit Zuckerresten gemein ist (Volberg et al., 2002). Ihr Einsatzgebiet ist in der Humanmedizin breit gefächert aufgrund ihrer Effektivität gegen grampositive Mikroorganismen (Volberg et al., 2002). Auch auf dem Gebiet der Zahn-

medizin haben sich moderne Makrolide, wie Roxithromycin, als effektives Therapeutikum gegen dentogene Infektionen erwiesen (Wissenschaftliche Stellungnahme der DGZMK, 2002).

Therapeutische Dosen von Roxithromycin liegen bei 300 mg/Tag (Nilsen, 1995), die oral verabreicht werden (Zhong et al., 2000). Roxithromycin weist unter den modernen Makroliden den höchsten Grad an Plasmaproteinbindung auf (Nilsen, 1995), der bei etwa 92-96 % liegt (Datenblatt Romicin, 2000). Die Konzentration an freier Substanz im Plasma gleicht der freien Konzentration im Gewebe, sobald ein Verteilungsgleichgewicht erreicht wird. Die freie Konzentration im Plasma ist also ein guter Indikator für die Verfügbarkeit im Gewebe und weist auf ein ausgewogenes pharmakokinetisches Verhalten hin (Nilsen, 1995). Nach der einmaligen Gabe von 300 mg Roxithromycin können nach 1,5 Std maximale Plasmakonzentrationen von 9,7 mg/l (11,6 μ M; Datenblatt Romicin, 2000) und nach Erreichen eines Verteilungsgleichgewichts 2,0 mg/l (2,4 μ M) gemessen werden (Nilsen, 1995). Moderne Makrolide weisen aufgrund ihrer höheren Stabilität in saurer Umgebung und ihrer erhöhten Halbwertszeit (Roxithromycin: 19 Std) pharmakologische Eigenschaften auf, die denen von Erythromycin überlegen sind (Nilsen, 1995). Roxithromycin wird in der Leber hauptsächlich über das Cytochrom-P-450-Enzymsystem metabolisiert (Yamazaki et al., 1998). Es besitzt nur eine geringe Potenz, dieses Enzym zu inhibieren, im Gegensatz dazu können andere Makrolide über Interferenzen mit Cytochrom P-450 den oxidativen Metabolismus anderer Medikamente behindern (Villa et al., 1988; Yamazaki et al., 1998; West et al., 1998).

Es gibt viele Berichte, nach denen das klassische Makrolid Erythromycin wie viele andere Substanzen auch im Verdacht steht, eine Verlängerung der QT-Zeit - durch Inhibition des I_{Kr} , I_{Ks} bleibt unbeeinflusst (Antzelevitch et al., 1996) - zu verursachen (West et al., 1998; Volberg et al., 2002; Gou et al., 2005). Es treten in der Literatur aber auch immer häufiger Fälle auf, in denen Patienten eine Verlängerung des QT-Intervalls und Torsaden unter Roxithromycin-Gabe entwickelten (Woywodt et al., 2000; Justo et al., 2004). Die Fallbeispiele standen jedoch häufig im Zusammenhang mit der Verabreichung weiterer repolarisationsverlängernder Medikamente. Lange Zeit existierten keine offiziellen Warnungen vor dem Gebrauch von Roxithromycin (De Ponti et al., 2001), es taucht jedoch mittlerweile mit anderen potentiell gefährlichen Medikamenten gelistet auf (Arizona CERT <http://www.QTdrugs.org>; The HERG Association <http://www.herg.ch/4736.html>).

Terfenadin ist ein Histamin- H_1 -Rezeptorblocker, der sich 1985 im klinischen Gebrauch bewährt hatte und bald ein weit gebräuchliches Medikament in der Behandlung von Aller-

gien wurde (Kamiya et al., 2008). Terfenadin ist ein äußerst potenter HERG-Inhibitor (Mitcheson et al., 2000; Kamiya et al., 2008). Aufgrund der daraus resultierenden proarrhythmischen Potenz und der Verfügbarkeit von alternativen und sicheren Antihistaminika, wurde Terfenadin 1998 vom Markt genommen (Vandenberg et al., 2001; Kamiya et al., 2008). Es wird in der Leber über das Cytochrom-P-450-Enzym ins aktive Antihistaminikum Terfenadin-Carboxylat metabolisiert (West et al., 1998; Eschenhagen, 2005). Dieses hepatische Enzymsystem baut also das stark herzscheidigende Terfenadin in den antiallergisch wirkenden, herzscheidigenden Metaboliten um, eine Blockade dieses Umbauprozesses resultiert konsequenterweise in dem Erhalt dieses kardiotoxischen Effekts (Eschenhagen, 2005).

In der Literatur werden Interaktionen zwischen bestimmten Makroliden - Roxithromycin bisher ausgenommen - und Terfenadin beschrieben, die zu einer gesteigerten Plasmakonzentration des nicht verstoffwechselten, herzscheidigenden Terfenadins führen können (Datenblatt Romicin, 2000). Eine wahrscheinliche Erklärung ist, dass es zu Interferenzen von Makroliden mit dem Metabolismus von Terfenadin in der Leber kommt (West et al., 1998).

Nicht nur durch Interaktionen zwischen verschiedenen Medikamenten können bedrohlich hohe Konzentrationen von kardiotoxischen Substanzen im Plasma erreicht werden. Auch die bei gesundheitsbewussten Menschen äußerst beliebte Pampelmuse führt zu solch gearteten Wechselwirkungen, da sie im Dünndarm und in der Leber vom gleichen Enzymsystem, dem Cytochrom P-450, verstoffwechselt wird, das am Abbau von mehr als 50 Prozent aller Medikamente beteiligt ist (Eschenhagen, 2005). Ein exemplarischer Fall, nach dem ein junger Mann starb, der gegen seinen allergischen Schnupfen das Antihistaminikum Terfenadin einnahm und täglich Grapefruit-Saft trank, ist somit zu erklären und durchaus keine Seltenheit (Eschenhagen, 2005). Bei der Autopsie fanden Mediziner im Blut des Mannes eine um das 30-fache erhöhte Konzentration des Medikaments. Auch gängige Antibiotika, wie Makrolide, können in Verbindung mit Pampelmusen gefährlich werden (Eschenhagen, 2005).

Besonders bemerkenswert ist auch, dass ebenso Naringenin, eines der wichtigsten Flavonoide der Pampelmuse, selbst ein sehr potenter HERG-Inhibitor ist (Zitron et al., 2005). Mit dieser Entdeckung wurden erstmals direkte Effekte einer diätischen Komponente auf die kardiale Repolarisation nachgewiesen (Zitron et al., 2005).

Anhand der Bandbreite der Substanzen mit inhibitorischer Potenz und der dargestellten Wechselwirkungen wird deutlich, wie gefährlich Unachtsamkeit bei der Verschreibung von

Medikamenten oder auch der unbedachte Konsum von Grapefruit-Saft werden kann. Auch die Tatsache, dass fatale Arrhythmien bei jedem Menschen auftreten können, der die „richtige“ Kombination an Medikamenten, Hypokaliämie und langer Sinus-Pause aufweist (Keating et al., 2001), betont die klinische Relevanz dieses Forschungsfeldes.

Der erste Abschnitt dieser Arbeit (Kap. 4.1) befasst sich mit der Frage, ob Roxithromycin eine konzentrationsabhängige Inhibition des Stromes der heteromultimeren $erg1a/1b$ -Kanäle bewirkt und inwieweit es die vier Kinetiken dieser Kanäle beeinflusst. Insbesondere, ob und wie die koexprimierte α -Untereinheit $erg1b$ die Antwort auf das untersuchte Makrolid im Vergleich zu reinen $erg1a$ -Kanälen verändert, ist Ziel dieses Abschnitts der Arbeit. Dem ist hinzuzufügen, dass bisher kaum Literatur vorliegt, in der die Medikamentensicherheit anhand von $erg1a/1b$ -Kanälen erörtert wurde. Um herauszufinden, ob Roxithromycin auf neuronaler Ebene durch Beeinflussung von erg -Kanälen potentielle Gefahren birgt, werden konkatinierte $erg1/2$ -Kanäle (Kap. 4.2) und native erg -Kanäle in Hypophysentumorzellen der Ratte (Kap. 4.3) näher beleuchtet. Sich nativer Kanäle zu bedienen, zielte darauf ab, die Ergebnisse an heterologen Kanälen zu bekräftigen und möglicherweise zu reproduzieren. Generell besteht auch für mögliche Funktionen im zentralen Nervensystem und die Konsequenzen einer pharmakologischen Beeinflussung der erg -Kanäle erheblicher Forschungsbedarf.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Lösungen

Die für die Herstellung der Lösungen verwendeten Materialien wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Sigma bezogen.

Alle Lösungen wurden mit destilliertem Wasser hergestellt.

Intrazelluläre Lösung (mM):

KCl 141

MgCl₂ 2

CaCl₂ 1 (Fa. Merck)

EGTA 2,5

HEPES 10

Der pH-Wert der Lösung wurde bei Raumtemperatur mit KOH auf 7,3 adjustiert.

Für die Perforated-patch-Methode wurde die intrazelluläre Lösung mit Nystatin, einem porenbildenden Antibiotikum, versetzt. Es wurde eine Stocklösung in einer Konzentration von 5,3 mg/100 µl (≈57 mM) angesetzt. Anschließend wurde diese ohne Zeitverzug in aliquotierter Form (à 4 µl) eingefroren. Am Tag des Experiments wurde die Stocklösung mit der intrazellulären Lösung versehen, sodass die Endkonzentration des Nystatins bei circa 230 µM lag. Da Nystatin wärme- und lichtempfindlich ist, wurde diese intrazelluläre Lösung in einem opaken Röhrchen aufbewahrt und auf Eis gelegt. Die Lösung war bis zu 3-5 Stunden nach dem Anmischen verwendbar.

Extrazelluläre oder Ringer-Lösung (mM):

NaCl 143,5-144

KCl 5

MgCl₂ 0,8

CaCl₂ 1 (Fa. Merck)

HEPES 10

Glucose 5

Der pH-Wert der Lösung wurde bei Raumtemperatur mit NaOH auf 7,3 adjustiert.

Extrazelluläre 40 mM K⁺-Lösung (mM):

KCl 40

NaCl 100

MgCl₂ 2

CaCl₂ 1 (Fa. Merck)

EGTA 2,5

HEPES 10

Glucose 5

TTX 1µM

Das TTX wurde zugefügt, um die endogenen Na⁺-Kanäle der GH₃/B₆-Zellen zu blockieren. Der pH-Wert der Lösung wurde bei Raumtemperatur mit NaOH auf 7,3 adjustiert.

3.1.2 Pharmaka

Roxithromycin

Für die Herstellung einer Stocklösung wurde Roxithromycin in DMSO gelöst. Die Konzentration des Stocks betrug 100 mM. Die aliquotierte Stocklösung wurde bei -20°C eingefroren. Am Tag des Experiments wurde durch Verdünnung mit oben aufgeführter extrazellulärer Lösung die in den Versuchen benötigte Konzentration hergestellt. Die Konzentration des Lösungsmittels bei den durchgeführten Messungen lag höchstens bei 0,3 %.

Terfenadin

Es wurde eine Stocklösung in einer Konzentration von 1 mM hergestellt, indem Terfenadin in Methanol gelöst wurde. Die Aufbewahrung des Stocks erfolgte im Gefrierschrank bei -20°C. Die Verdünnung erfolgte entsprechend der Verdünnung für Roxithromycin.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellen

Folgende Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

1. CHO-Zellen: Die Zelllinie entstammt dem Ovar des *Cricetus griseus*, dem chinesischen Hamster, kurz als CHO-Zellen bezeichnet. Diese Linie wurde seit April 1997 geführt und vom ZMNH (Hamburg-Eppendorf) bezogen. Diese Zellart eignet sich sehr gut als heterologes Expressionssystem für Injektion und Transfektion mit anschließenden elektrophysiologischen Messungen. Die CHO-Zellen wurden kultiviert in einem Nährmedium, das MEM (22571-038, Fa. Gibco), 10 % FCS (PAA GmbH) und 1 % PSG (10378-016, Fa. Gibco) enthält. Die Aufbewahrung erfolgte bei 95 % Luft und 5 % CO₂ sowie bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank in wassergesättigter Atmosphäre. Der Mediumwechsel und das Passagieren der Zelllinie mit Trypsin/EDTA fanden 3x wöchentlich statt. Die CHO-Zellen wurden 3x wöchentlich vereinzelt und auf Polylysin-beschichtete Deckgläschen (CELLocate®, Fa. Eppendorf) in Kulturschälchen von 35 mm im Durchmesser (Nunc Surface, Nunc GmbH) für die Injektion aufgebracht. Für die Beschichtung wurde ein Poly-D-Lysin mit einem Molekulargewicht von 70.000-150.000 (P-6407, Fa. Sigma) verwendet. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 3-5x10⁴ Zellen pro cm² ausgesät und am selben oder am folgenden Tag mit pcDNA-Lösung injiziert. Die Aufbewahrung der Zellen nach der Injektion erfolgte wiederum im Brutschrank bei 95 % Luft, 5 % CO₂ und 37°C.
2. GH₃/B₆-Zellen: Zusätzlich wurden an einer zweiten Zellart elektrophysiologische Messungen durchgeführt. Diese Subklone der GH₃-Zelllinie, genannt GH₃/B₆-Zellen, entstammen einem Hypophysentumor der Ratte und wurden 1994 vom Labor Prof. Richter (UKE, Hamburg) bezogen. Die Kultivierung erfolgte in DMEM/HAM F12 (Fa. Sigma), HS 15 % (Fa. Gibco), FCS 2,5 % und L-Glutamin (2 mM, Fa. Sigma). Die Aufbewahrung fand unter den oben genannten Bedingungen im Brutschrank statt. Der Mediumwechsel erfolgte 3x wöchentlich, das Passagieren 1x pro Woche. Für die elektrophysiologischen Messungen wurden die Zellen vereinzelt und in 35 mm-Kulturschälchen aus Kunststoff (Nunc Surface, Nunc GmbH) überführt. Da die endogenen erg-Ströme der GH₃/B₆-Zellen gemessen werden

sollten, fand keine Injektion statt. Die Messungen erfolgten in einem Zeitraum von 1-4 Tagen nach Überführung.

3.2.2 Heterologe Expression

Die CHO-Zellen wurden mit einer in destilliertem Wasser gelösten cDNA injiziert. Bei der cDNA, die für erg1a kodierte, handelte sich um RERG-DNA, dem HERG-Korrelat der Ratte (Bauer et al., 1998). Die erg1b-DNA wurde von Hirdes et al. 2005 aus der Rattenhypophyse kloniert. Die cDNA für die konkatinierten erg1/2-Kanäle wurde 2002 durch Wimmers et al. aus erg-Untereinheiten der Ratte hergestellt. Die rerg-cDNA wurde zu Injektionszwecken in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 subkloniert.

Die Injektionsstation bestand aus einem Transjector (Transjector 5246, Fa. Eppendorf) und aus einem inversen Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss GmbH). Die DNA-Lösung wurde mithilfe feiner Kunststoffpipetten (Microloader, Fa. Eppendorf) in die Injektionspipetten aus Glas (Femtotips, Fa. Eppendorf) gefüllt.

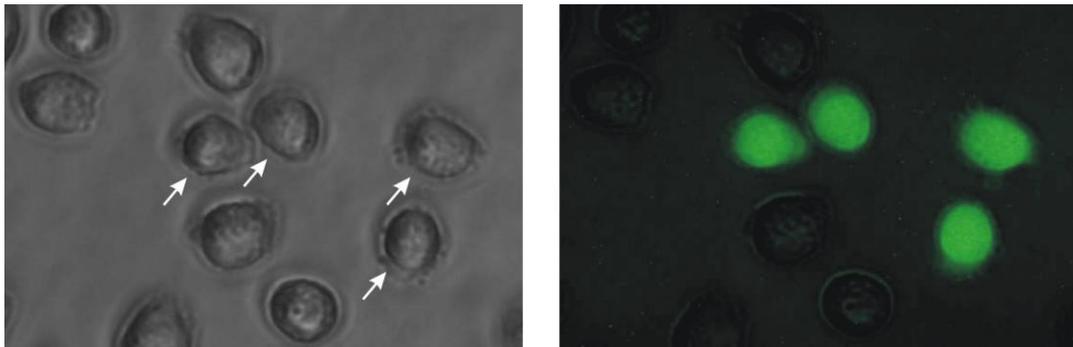


Abb. 1:

CHO-Zellen auf einem Deckgläschen, die mit EGFP-cDNA injiziert und unter dem Mikroskop fotografiert wurden. Das linke Foto zeigt die Zellen bei normaler Beleuchtung (Phasenkontrast), die Pfeile zeigen auf die erfolgreich injizierten Zellen. Das rechte Foto zeigt denselben Ausschnitt bei gefiltertem UV-Licht (485 nm). Die EGFP-exprimierenden Zellen leuchten grün. Die Fotos entstanden 20 Stunden nach der Injektion bei 32-facher Vergrößerung.

Zur Herstellung dieser Lösung wurden die frisch aufgetauten DNA-Stocks (Konzentration 1 µg/µl) für 10 min bei 14.000 Upm und 4°C in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5415C, Fa. Eppendorf) zentrifugiert, damit keine Schmutzpartikel in die DNA-Lösung gelangen. Anschließend wurde die gewünschte Konzentration mit dem sterilen destillierten Wasser eingestellt: Die Konzentration der Kanal-DNA lag für erg1a/1b sowie für erg1/2 bei

80 ng/ μ l. Für die Untersuchungen von *erg1a/1b* erfolgte die Koinjektion in einem Verhältnis von 1:1. Die Injektionslösung enthielt zusätzlich cDNA, die für das fluoreszierende Protein EGFP kodierte, in einer Konzentration von 20 ng/ μ l zur Detektion der erfolgreich injizierten Zellen (Abb. 1).

Die elektrophysiologischen Messungen der heterolog exprimierten Kanalproteine erfolgten 6-48 Stunden nach der Injektion.

3.3 Elektrophysiologische Methoden

3.3.1 Patch-Clamp-Technik

Seit den fünfziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts kann man elektrische Ströme durch die Zellmembran messen. Die Technik war in den Anfangszeiten, gemessen an der Größe des Objekts, sehr grob, sodass sich lediglich das Verhalten vieler Ionenkanäle gleichzeitig erfassen ließ. 1976 führten Erwin Neher und Bert Sakmann die von ihnen entwickelte Patch-Clamp-Technik ein. Diese Methode ermöglichte es erstmals, solche Kanäle auch einzeln zu beobachten. Für diese Arbeit erhielten Neher und Sakmann 1991 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.

Die Patch-Clamp-Technik basiert auf folgendem Grundprinzip: Indem man die Spitze einer äußerst dünnen, speziell präparierten Glaspipette dicht auf die Zellmembran aufsetzt, isoliert man das eingegrenzte Membranareal, den Membranfleck, und die darin befindlichen Ionenkanäle elektrisch von der übrigen Membran (Neher et Sakmann, 1992). Die Hauptaufgabe ist es, Änderungen des Membranpotentials der untersuchten Zelle zu verhindern. Dazu erzeugt man einen Kompensationsstrom, der genauso groß ist wie der Strom, der durch die Membran fließt, der diesem aber entgegengerichtet ist. Dies erfolgt durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem das Membranpotential gemessen und mit dem vorgegebenen gewünschten Wert – der Sollspannung – verglichen wird. Jeder Unterschied zwischen der Kommandospannung, wie die Sollspannung auch genannt wird, und der tatsächlich gemessenen Membranspannung aktiviert den Verstärker, der als Regler fungiert und einen entgegengerichteten Strom über die Elektrode in die Zelle injiziert (Abb. 2). Dieser Kompensationsstrom wird in Patch-Clamp-Experimenten gemessen. Er lässt unmittelbar Schlüsse auf die Leitfähigkeit der Membran zu, die unter anderem von den Ionenkanälen oder Ionentransportern bestimmt wird (Numberger et Draguhn, 1996).

Die zu messende Zelle befindet sich in einem Bad aus Ringer-Lösung. Mithilfe eines Mikromanipulators wird die Glaspipette, die mit intrazellulärer Lösung gefüllt ist und die Elektrode beherbergt, dicht auf die Zelle aufgebracht. Diese Elektrode ist ein metallischer Leiter, der die Pipettenlösung mit dem Vorverstärker verbindet. Eine zweite Elektrode befindet sich im Bad, um die Badlösung als Referenz mit dem Erdleiter zu verbinden. Der vor dem Eintauchen in die Badlösung an der Glaspipette angelegte Überdruck wird abgelassen, um die Bildung eines sog. „Seals“, dem hohen Abdichtungswiderstand zwischen Pipette und Zellmembran, zu ermöglichen. Man befindet sich in der Cell-attached-Konfiguration. Es werden die kapazitiven Ströme (C_{fast}) kompensiert und ein negatives Haltepotential eingestellt, das dem zu erwartenden Ruhemembranpotential der Zelle entspricht. Der elektrische Zugang zur Zelle kann auf unterschiedliche Art und Weise erreicht werden. Hier wurden zwei verschiedene Methoden angewendet: Durch Anlegen eines Unterdrucks im Pipetteninneren wird der Membranfleck unter der Glaspipettenöffnung „herausgesogen“ (konventionelle Whole-cell-Konfiguration). Bei der Perforated-patch-Methode fügt man der Pipettenlösung ein porenbildendes Antibiotikum hinzu. Von Lippiat et al. wurde diese Methode 2008 zusammenfassend beschrieben: Perforationen können mit Hilfe von Nystatin oder Amphotericin B erreicht werden, diese sind permeabel für kleine monovalente Ionen wie Na^+ , K^+ und Cl^- . Die permeablen Poren stellen den elektrischen Zugang zwischen der Pipette und der Zelle, bezogen auf die Ströme dieser Ionen, bereit. Sie stellen jedoch eine physikalische Barriere für impermeable Ionen (Ca^{2+}) dar und für Moleküle, die ein Molekulargewicht über 200 aufweisen (ATP und Glucose). Amphotericin B ist ein polyenes Antibiotikum, das üblicherweise als Fungizid gebräuchlich ist. Es hat eine Affinität zu Ergosterol, das sich in der fungalen Membran befindet, dort akkumuliert es, um Poren zu bilden, die die zelluläre Homöostase stören. In höheren Konzentrationen, wie in der Pipettenlösung üblich, befällt Amphotericin B den Membranfleck, der unter der Pipette eingeschlossen ist, durch Interaktionen mit Cholesterol.

Im weiteren Verlauf des Experiments folgt die Kompensation für Kapazität (C_{slow}) und Serienwiderstand. Bei diesen Ganzzelleableitungen können wie oben beschrieben Ionenströme durch die Membran der Zelle gemessen werden.

3.3.2 Aufbau des Messplatzes

Die Messapparatur für die Patch-Clamp-Technik war auf einem schwingungsfreien Tisch mit Metalltischplatte aufgebaut. Ein inverses Mikroskop (Axiovert 35, Zeiss GmbH) diente der visuellen Überwachung und Beherbergung des Messaufbaus. Eine Quecksilber-

dampflampe (Mercury Short Arc (HBO 50W), OSRAM GmbH; Lampengehäuse: Zeiss GmbH) diente der Detektion der EGFP-exprimierenden Zellen. Über einen Schwenkarm waren Vorverstärker und Elektrode seitlich am Mikroskop befestigt. Die Glaspipetten wurden nach Aufnahme der Elektrode in eine spezielle Vorrichtung eingeschraubt. Die Referenzelektrode war über ein Kabel am Vorverstärker befestigt. Die Glaspipette wurde mit einem Mikromanipulator (SM 1, Luigs & Neumann GmbH) bewegt, der sich auf einer über dem schwingungsfreien Tisch montierten Platte befand. Durch einen Überzug der Elektrode mit einer Silberchloridschicht war die Pipettenlösung elektrisch mit dem Vorverstärker verbunden. Die elektrische Verbindung der Badlösung zum Erdleiter wurde durch ein Ag-Cl-Pellet, der Bad- oder Referenzelektrode, gewährleistet.

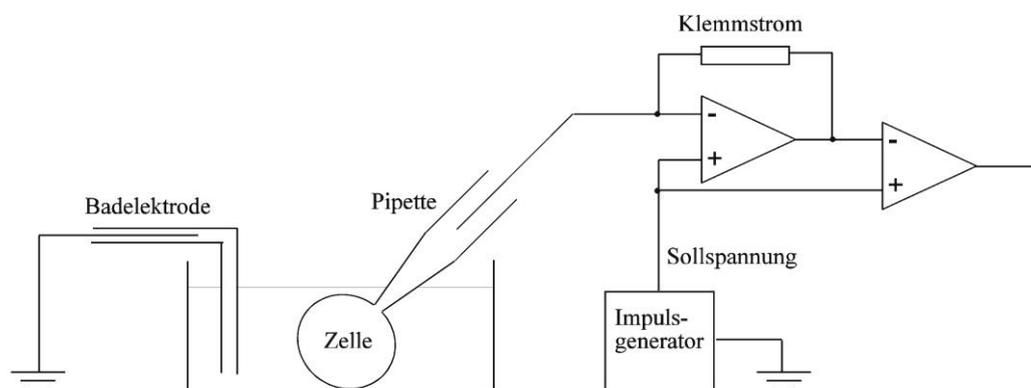


Abb. 2:

Vereinfachtes Schaltbild eines Verstärkers. Der Vorverstärker, ein Strom-Spannungs-Wandler, besteht aus Operationsverstärker (linkes Dreieck) und Rückkopplungswiderstand. Die Sollspannung gibt der Experimentator vor, das Pipettenpotential wird mit der Sollspannung abgeglichen und bei Bedarf durch den in die Pipette fließenden Klemmstrom angepasst. Dem Rückkopplungswiderstand liegt eine zum Klemmstrom proportionale Spannung an (Numberger et Draguhn, 1996).

Bei einem Teil der Experimente wurden zum Austausch der Badlösung in der Messkammer ein peristaltisches Perfusionssystem (Maßanfertigung durch T. Homfeldt, UKE) und eine Absaugvorrichtung benutzt. Die Lösung wurde mit einer Geschwindigkeit von etwa 1,3 ml/min ins Bad gepumpt. Der gesamte Messplatz war zur Abschirmung von einem Faraday-Käfig umgeben. Ergänzt wurde der Messaufbau durch einen Verstärker (EPC-9, Fa. HEKA Elektronik) und einen Computer (Optiplex GX 280, Fa. Dell).

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Experimente bei Raumtemperatur ($21 \pm 1,5^\circ\text{C}$) durchgeführt. Die Experimente bei erhöhter Temperatur wurden an einem anderen

vergleichbar aufgebauten Messstand durchgeführt. Zur Erwärmung des Kulturschälchens mitsamt der extrazellulären Lösung diente ein spezieller Wassererhitzer (WK 14-1 DS, Colora Messtechnik GmbH), der über ein wassergefülltes Schlauchsystem die Haltevorrichtung des Kulturschälchens am Mikroskop erwärmte und so indirekt die Wärme auf selbiges übertrug.

3.3.3 Patchpipetten

Die Glaspipetten wurden aus Borosilikatglas (Vitrex GB 150T-8P, Science Products GmbH) mithilfe eines horizontalen Elektrodenziehgerätes (DMZ Universal Puller, Zeitz-Instrumente GmbH) ausgezogen und in einem zweiten Schritt poliert. Sie besaßen nach Füllung mit und nach Eintauchen in entsprechende Lösungen einen Elektrodenwiderstand von 2-4 M Ω . Die Glaspipetten wurden mithilfe dünner Kunststoffpipetten (Microloader, Fa. Eppendorf) mit ungefähr 5 μ l der intrazellulären Lösung beschickt. Jede Patchpipette wurde nur einmal verwendet und am Tag der Herstellung verbraucht.

Vor der Montage am Mikromanipulator wurden die Pipetten in eine silikonähnliche Flüssigkeit (Sigmacote, Fa. Sigma) getaucht, die sich als dünner Film um den Pipettenschaft legte und verhinderte, dass sich ein Wasserfilm an selbigem hochzog. Das kapazitive Rauschen sollte auf diese Art reduziert werden.

3.3.4 Datenaufzeichnung

Zur Datenaufzeichnung wurde ein EPC-9-Patch-Clamp-Verstärker in Kombination mit der Pulse Stimulation- und Datenaquisitionsoftware (Pulse v8.74, Fa. HEKA Elektronik) benutzt. Ausgewertet wurden die Stromaufnahmen mit den Programmen PulseFit (PulseFit v8.65, Fa. HEKA Elektronik), SigmaPlot (SigmaPlot 2001 for Windows, SPSS GmbH) und Excel (Office 2003, Microsoft GmbH). Die Daten wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben.

3.3.5 Durchführung der Patch-Clamp-Technik

3.3.5.1 Ablauf

Die Experimente im Perforated-patch-Modus wurden begonnen, nachdem der Serienwiderstand eine gesetzte Schwelle von 25 M Ω unterschritten hatte. Bei den anderen Experimenten wurde darauf geachtet, dass ein Wert von 10 M Ω möglichst nicht überschritten wurde. Die Kompensation für den Serienwiderstand lag zwischen 10 und 75 %. Die Stimu-

lation der Ionenkanäle erfolgte, soweit nicht anders angegeben, ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV. Bei diesem Potential befinden sich die Kanäle mit hoher Wahrscheinlichkeit im geschlossenen Zustand.

Bei den GH₃/B₆-Zellen wurde nur das unten genannte Aktivierungs- und Testpulsprotokoll verwendet. Da GH₃/B₆-Zellen in einer Badlösung mit erhöhtem K⁺-Anteil gemessen wurden, kamen andere Pulsprotokolle als bei CHO-Zellen zur Anwendung.

3.3.5.2 Aktivierungsprotokoll für CHO-Zellen

Bei dem Aktivierungsprotokoll untersucht man das Öffnungsverhalten der erg-Kanäle in Abhängigkeit von der Membranspannung. Im ersten Schritt wurde das Haltepotential von -80 mV für 1 s beibehalten. Anschließend wurde ein Vorpuls angelegt, der die Zellen für 4 s auf -100 mV bis +60 mV (10 mV-Schritte) klemmte. Es folgte ein 5 s langer Abschnitt bei -40 mV, um auswärts gerichtete Tail-Ströme aufzuzeichnen. Bei den Untersuchungen zur Aktivierung wurden neben den Tail-Strömen auch die Stromamplituden am Ende des ersten depolarisierenden Schrittes ($I_{V_{\text{orpuls}}}$ = stationärer Auswärtsstrom) ausgewertet. HERG-Kanäle sind Einwärtsgleichrichter (Spector et al., 1996), an dieser Stelle an der Glockenform der Strom-Spannung-Funktion zu erkennen. Dieses Charakteristikum der HERG-Kanäle ist dadurch zu erklären, dass die Inaktivierung umso schneller und vollständiger vonstatten geht, je positiver das Potential des Vorpulses ist. Es stehen somit bei positiven Potentialen weniger Kanäle im offenen Zustand zur Verfügung, die Strom passieren lassen, die Amplitude nimmt wieder ab.

3.3.5.3 Aktivierungsprotokoll für GH₃/B₆-Zellen

Die GH₃/B₆-Zellen wurden aktiviert, nachdem das Membranpotential von -80 mV für 1 s gehalten wurde, indem das Potential schrittweise von -80 bis +80 mV um 10 mV pro Durchlauf für 4 s erhöht und anschließend auf -100 mV abgesenkt wurde. Dadurch wurden einwärts gerichtete Tail-Ströme erzeugt. Abschließend wurden die Zellen erneut für 500 ms auf das Haltepotential von -80 mV geklemmt.

3.3.5.4 Deaktivierungs- oder Verfügbarkeitsprotokoll

Das Deaktivierungs- oder Verfügbarkeitsprotokoll (= availability) wurde ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV durchgeführt und besteht aus folgenden Teilschritten: Zuerst wurde das Membranpotential auf +60 mV für 500 ms angehoben, um die Kanäle zu aktivieren. Es folgte sogleich auch die schnelle Inaktivierung. Im zweiten Schritt (Vorpuls) untersuchte man das Verhalten bei der stufenweisen Rückkehr der Membranspannung auf

Potentiale von +40 mV bis -130 mV (in 10 mV-Schritten, Dauer 1 s). Ab einem Potential von ungefähr -80 mV wurden mit den hyperpolarisierenden Pulsen, die negativer als das K⁺-Gleichgewichtspotential sind, große transiente Einwärtsströme (I_{peak}) erzeugt. Der initiale Stromanstieg wurde als Ergebnis der schnellen Erholung von der Inaktivierung (= recovery) interpretiert, und der nachfolgende Abfall des Stromes wurde durch die langsame Deaktivierung erklärt (Sanguinetti et al., 1995). Den typischen einwärtsgerichteten Charakter kann man graphisch durch Auftragung der I_{peak} -Amplitude gegen das Potential des Pulses darstellen (Sanguinetti et al., 1995). Die Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung wurden bestimmt, indem man die Stromspuren dieses zweiten Abschnitts mit den im Folgenden genannten Exponentialfunktionen unterlegte. Durch einen dritten konstanten Puls - die Membranspannung wurde für 500 ms auf -100 mV geklemmt - konnte die Fraktion der erg-Kanäle, die am Ende des Vorpulses verfügbar war, festgestellt werden. Durch die Auswertung der erzeugten Tail-Stromamplitude konnte die Spannungsabhängigkeit der „steady-state“-Deaktivierung abgeschätzt werden. Die maximale Amplitude des einwärts gerichteten Tail-Stromes wurde zu diesem Zwecke gegen das Potential des vorherigen Pulses aufgetragen. Das Deaktivierungsprotokoll endete mit einem 50 ms langen Sprung auf -20 mV. Zwischen den Stromspuren lag kein Intervall.

3.3.5.5 Testpulsprotokolle

Um den Zeitgang der blockierenden Wirkung zu prüfen, kam ein Testpulsprotokoll zur Anwendung. Hierbei wurde in einem Intervall von 20 s stets der gleiche Spannungspuls angelegt. Bei Einstellung der erzeugten Tail-Stromamplitude auf einen „steady-state“-Wert, d.h. die Amplitude nahm nicht weiter ab, wurde davon ausgegangen, dass das Maximum an blockierender Wirkung erreicht war. Das Protokoll für die CHO-Zellen unterschied sich von dem für die GH₃/B₆-Zellen folgendermaßen:

- CHO-Zellen: Das Potential wurde für 1 s bei -80 mV gehalten, es folgte eine Depolarisation auf +60 mV für ebenfalls 1 s. Anschließend wurde das Potential auf -60 mV abgesenkt für 2 s und kehrte abschließend wieder zu -80 mV zurück.
- GH₃/B₆-Zellen: Der Spannungspuls ging vom Haltepotential (-80 mV) aus, das für 1 s angelegt wurde. Im nachfolgenden Abschnitt wurden die Zellen auf +40 mV depolarisiert und nach 4 s auf -100 mV hyperpolarisiert. Der dadurch erzeugte einwärts gerichtete Tail-Strom diente der Abschätzung der Wirkung des Blockers auf die Ionenkanäle. Die Rückkehr des Potentials auf -80 mV für 500 ms beendete den Spannungspuls.

3.3.5.6 „envelope of tails“-Protokoll

Um die Zeitabhängigkeit der Aktivierung und den Einfluss des Pharmakons auf selbige zu untersuchen, wurde ein sog. „envelope of tails“-Protokoll verwendet. In einem ersten Schritt wurde das Membranpotential auf -110 mV für 2 s abgesenkt, um anschließend durch einen zweiten Schritt die Kanäle zu aktivieren: Man sprang auf ein Potential von +20 mV. Charakteristisch für das „envelope of tails“-Protokoll ist die variable Dauer dieses zweiten Pulses. Sie lag zwischen einer und 4097 ms (Delta t- Faktor = 2, Delta-t-Inkrement (ms) = 1). Die Amplituden der Tail-Ströme wurden bei einem nachfolgenden Schritt auf -100 mV (für 800 ms) aufgezeichnet. Anhand dieses Protokolls konnten sowohl die Zeitkonstante der Aktivierung als auch die Verzögerung (= delay) des Einsetzens der Aktivierung abgeschätzt werden.

3.3.5.7 Inaktivierungsprotokoll

Zur Untersuchung der Erholung von der Inaktivierung und der Inaktivierung wurden ein Inaktivierungs- und ein „steady-state“-Inaktivierungsprotokoll angewendet.

Beim Inaktivierungsprotokoll wurden die Zellen bei einem Potential von -20 mV gehalten. Um möglichst viele Kanäle in den inaktivierten Zustand zu bringen, wurde in einem Vorpuls das Membranpotential auf +80 mV depolarisiert für eine Dauer von 500 ms. Es folgte der variable Hauptpuls auf -140 mV bis +60 mV (10 mV-Schritte) für lediglich 10 ms, um die Erholung der Kanäle von der Inaktivierung zu erreichen. Durch den nachfolgenden Schritt auf +60 mV für 150 ms wurden große transiente Auswärtsströme erzeugt. Diese wurden gegen das Potential des Hauptpulses aufgetragen, um die Potentialabhängigkeit der Erholung von der Inaktivierung darzustellen.

3.3.5.8 „steady-state“-Inaktivierungsprotokoll

Bei diesem Protokoll lag das Haltepotential ebenfalls bei -20 mV, und es kamen wiederum drei Spannungssprünge zur Anwendung. Der erste Puls auf +80 mV erfolgte für 500 ms mit dem oben genannten Ziel. Der zweite Puls auf -140 mV, der eine Erholung von der Inaktivierung bewirkte, dauerte 10 ms. Mit der kurzen Dauer dieses Pulses wurde bezweckt, dass sich möglichst viele Kanäle im offenen Zustand befinden, die durch die nachfolgende Depolarisation – den dritten Puls - in den inaktivierten Zustand überführt wurden. Auswärts gerichtete transiente Ströme wurden durch diesen Puls auf +60 bis -20 mV (für 300 ms) erzeugt. Anhand der Abnahme der transienten Ströme infolge der schnellen Inaktivierung

konnten die Zeitkonstanten der Inaktivierung bestimmt werden. Je weniger positiv der Sprung im letzten Puls war, desto kleiner wurde die Triebkraft für den Ausstrom.

3.4 Theoretische Grundlagen

3.4.1 Hill-Gleichung

Mit Hilfe einer Hill-Gleichung konnte aus den Messwerten bei verschiedenen Konzentrationen eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt werden:

$$f(\text{Inhibition}) = y_0 + a \cdot x^h / (EC_{50}^h + x^h)$$

y_0 : Amplitudenabnahme im Blindversuch (= „rundown“).

a : maximal erreichte Inhibition durch Substanz.

h : Hill-Koeffizient.

EC_{50} : Konzentration, bei der der blockierende Effekt halbmaximal ist.

Der sog. „rundown“ wurde in Blindversuchen ermittelt, bei denen lediglich extrazelluläre Lösung appliziert wurde, und beschreibt die Amplitudenabnahme, die im Laufe des Experiments auftrat. Der Hill-Koeffizient beschreibt die Anzahl der Liganden, die benötigt werden, am Rezeptor zu binden, um einen funktionalen Effekt zu produzieren.

3.4.2 Boltzmann-Gleichung

Zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Verfügbarkeit diene eine Boltzmann-Funktion:

$$f(I) = I_{\min} + I_{\max} / (1 + \exp(-(x - V_{0,5})/S))$$

I_{\min} : Abweichung der Kurve von 0 auf der Ordinate.

I_{\max} : maximale Amplitude der Kurve.

$V_{0,5}$: Potential, bei dem die Aktivierung bzw. Verfügbarkeit halbmaximal ist.

S : Steigungsfaktor.

S gibt die Steilheit der Kurve an, indem es den Bereich der Abszisse charakterisiert, innerhalb dessen die Amplitude von $I_1 = 1/e$ ($\approx 37\%$) auf $I_2 = 1-1/e$ ($\approx 63\%$) zunimmt. Diese auch als Steigungsfaktor (= slope) bezeichnete Variable beschreibt also den Kurvenverlauf im Bereich der größten Dynamik: Je größer der Wert für den Steigungsfaktor ist, desto flacher ist der Kurvenverlauf.

3.4.3 „envelope of tails“-Gleichung

Den Messergebnissen des „envelope of tails“-Protokolls wurde folgende Exponentialfunktion angepasst:

$$f(I) = I_{\text{schnell}} \cdot (1 - \exp(-(x-x_0)/\tau_{\text{schnell}})) + I_{\text{langsam}} \cdot (1 - \exp(-(x-x_0)/\tau_{\text{langsam}}))$$

I_{schnell} : Amplitude der schnellen Aktivierungskomponente.

τ_{schnell} : Zeitkonstante der schnellen Aktivierungskomponente.

x_0 : Verzögerung des Einsetzens der Aktivierung (= delay).

I_{langsam} : Amplitude der langsamen Aktivierungskomponente.

τ_{langsam} : Zeitkonstante der langsamen Aktivierungskomponente.

Die Zeitkonstante τ beschreibt grundsätzlich die Dauer, in der die Amplitude des Stromes auf $1-1/e$ ($\approx 63\%$) ansteigt. Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ließ sich diese Exponentialfunktion mit zwei Aktivierungskomponenten am genauesten anpassen. Da im Zuge der Auswertung für die langsame Aktivierungskomponente oft irrationale Werte auftraten, werden sich im Abschnitt 4.1.1 des Kapitels „Ergebnisse“ nur Angaben zu einer Aktivierungskomponente, der schnellen Komponente, finden.

3.4.4 Lineare Regression

Durch eine lineare Regression wurde die Verteilung der Einzelversuche im Bezug auf die Inhibition im Aktivierungs- und Deaktivierungsprotokoll charakterisiert. Ebenso wurde die Verschiebung der spannungsabhängigen halbmaximalen Inaktivierung mithilfe einer linearen Regression errechnet. Dies war möglich, weil im Bereich der halbmaximalen Inaktivierung beinahe eine lineare Beziehung vorlag.

$$f(x) = y_0 + a \cdot x$$

y_0 : Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate.

a : Steigung der Geraden.

3.4.5 Zeitkonstanten der Inaktivierung, der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung

Die Bestimmung der Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung erfolgte anhand des oben beschriebenen Deaktivierungsprotokolls: Den Stromspuren des zweiten Protokollabschnitts wurden Exponentialfunktionen angeglichen. Die Zeitkonstante für die Erholung von der Inaktivierung bedurfte lediglich einer einfachen Exponentialfunktion. Die Deaktivierung wurde anhand von zwei Zeitkonstanten charakterisiert (für Potentialwerte von -40 mV und positiver konnte für die Deaktivierung von *erg1a/1b*-Kanälen zum Teil nur eine Konstante bestimmt werden, und teilweise zeigten die Stromspuren ab einem Potential von -20 mV und positiver - für *erg1/2* ab einem Potential von -40 mV - keine ausgeprägte Kinetik, sodass diese Spuren nicht ausgewertet werden konnten):

$$I(t) = I_0 + I_{\text{schnell}} \exp(-t/\tau_{\text{schnell}}) + I_{\text{langsam}} \exp(-t/\tau_{\text{langsam}}) \text{ und}$$

$$I(t) = I_0 + I_{\text{Erholung}} \exp(-t/\tau_{\text{Erholung}})$$

I_0 : Amplitude des Stromes an der „Cursor“-Position zum Zeitpunkt 0.

I_{schnell} und I_{langsam} : Amplituden der schnellen und langsamen Deaktivierungskomponente, jeweils extrapoliert auf den Zeitpunkt 0.

I_{Erholung} : Amplitude der Erholung von der Inaktivierung, extrapoliert auf den Zeitpunkt 0.

τ_{schnell} , τ_{langsam} , τ_{Erholung} : Zeitkonstanten, die die Zu- oder Abnahme der jeweiligen Stromkomponenten über die Zeit beschreiben.

Die Inaktivierung wurde analog zu der Erholung von der Inaktivierung mittels einer Zeitkonstanten und entsprechender Funktion charakterisiert. Den abfallenden Spuren der transienten Auswärtsströme im „steady-state“-Inaktivierungsprotokoll wurde diese einfache Exponentialfunktion angeglichen.

3.4.6 Berechnung der Inhibition

Bei allen Experimenten wurde die Inhibition anhand der Tail-Stromamplituden mit nachfolgender Formel berechnet:

$$\text{Inhibition} = (1 - I_{\text{Roxithromycin}}/I_{\text{Kontrolle}}) \cdot 100 \%$$

$I_{\text{Roxithromycin}}$: Stromamplitude unter dem Einfluss von Roxithromycin.

$I_{\text{Kontrolle}}$: Stromamplitude vor Medikamenteneinfluss.

3.4.7 Statistische Signifikanz

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der beidseitige T-Test nach Student für gepaarte Stichproben verwendet. Um herauszufinden, ob der Unterschied zwischen den Ergebnissen der Roxithromycin-Experimente und den der Blindversuche statistisch signifikant war, wurden diese mittels T-Test für ungepaarte Stichproben verglichen. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Excel-Programm durchgeführt (Office 2003, Microsoft GmbH). Eine statistische Signifikanz wurde angenommen, wenn für p ein Wert $\leq 0,05$ errechnet worden war. Ein Wert von $p \leq 0,01$ kennzeichnete ein hochsignifikantes und ein Wert von $p \leq 0,001$ ein höchstsignifikantes Ergebnis. In den Abbildungen des Ergebnisteils wurde die Unterschreitung des Signifikanzniveaus mit Sternsymbolen in oben genannter Abstufung gekennzeichnet.

3.5 Herstellerverzeichnis

Carl Zeiss Jena GmbH, D-07745 Jena

Colora Messtechnik GmbH, D-73547 Lorch

Dell Deutschland, D-63325 Langen

Eppendorf AG, D-22339 Hamburg

Gibco, D-76131 Karlsruhe

HEKA Elektronik, D-66466 Lambrecht

Homfeldt T., UKE, D-20246 Hamburg

Luigs & Neumann Feinmechanik und Elektrotechnik GmbH, D-40880 Ratingen

Merck KGaA, D-64293 Darmstadt

Microsoft Deutschland GmbH, D-85716 Unterschleißheim

Nunc GmbH & Co. KG, D-63505 Langenselbold

OSRAM GmbH, D-86167 Augsburg

PAA Laboratories GmbH, D-35091 Cölbe

Science Products GmbH, D-65719 Hofheim

Sigma, D-82041 Deisenhofen

SPSS GmbH Software, D-80339 München

Zeitz-Instrumente GmbH, D-81377 München

3.6 Abkürzungsverzeichnis

DMEM: Dulbecco`s modified Eagle`s Medium

DMSO: Dimethylsulfoxid

EDTA: Ethylendiamintetraacetat

EGTA: Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N`-tetraessigsäure

FCS: Fetal calf serum (= fetales Kälberserum)

HAM: Ham`s Nutrient Mixture

HEPES: N-(2Hydroxyethyl)-piperazine-N-(2-ethansulfonsäure)

HS: Horse serum (= Pferdeserum)

MEM: Minimum Essential Medium

PSG: Penicillin-Streptomycin-Glutamin

SEM: Standard Error of the Mean (= Standardfehler)

TTX: Tetrodotoxin

4 Ergebnisse

Alle Experimente wurden als gepaarte Stichproben durchgeführt. Es wurde jeweils eine Zelle vor und nach Hinzufügen der Substanz untersucht. Zusätzlich wurden Blindmessungen für den Großteil der beschriebenen Experimente durchgeführt. Zu diesem Zwecke wurde entweder lediglich extrazelluläre Lösung oder das Lösungsmittel DMSO in einer Konzentration von 0,1% appliziert. So konnte dargestellt werden, wie sich die untersuchten Parameter der Kanäle per se unter den Versuchsbedingungen ohne pharmakologischen Einfluss bzw. in Anwesenheit des Lösungsmittels änderten. Diese Experimente wurden im Folgenden als „Blindversuche“ bezeichnet. Es wurde jeweils explizit erwähnt, was appliziert worden war.

Die für die Aufzeichnung verwendeten Pulsprotokolle wurden ausführlich im vorherigen Kapitel (s. 3.3.5 Durchführung der Patch-Clamp-Technik) beschrieben.

Die Zahlen der Achsenskalierung in diesem Kapitel wurden auf Englisch angegeben.

Grundsätzlich wurden die Ergebnisse auf eine Stelle nach dem Komma gerundet. Bei der Angabe der Zeitkonstanten wurde teilweise davon abgewichen, da die Werte an sich sehr klein waren. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde entweder auf die vierte Stelle nach dem Komma gerundet oder es wurde lediglich angegeben, ob p die gesetzten Signifikanzwerte über- bzw. unterschritten hat.

4.1 Heteromultimere erg1a/1b-Kanäle

Heteromultimere erg1a/1b-Kanäle wurden pharmakologisch durch Roxithromycin beeinflusst (Abb. 3). Der folgende Abschnitt der Arbeit befasst sich zunächst mit der durch Roxithromycin induzierten Änderung der Parameter der Aktivierung, der Deaktivierung, der Inaktivierung und der Erholung von der Inaktivierung bei heteromultimeren erg1a/1b-Kanälen. Aus didaktischen Gründen wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung in Abschnitt 4.1.3 im Anschluss an die Abschnitte über Aktivierung und Deaktivierung beschrieben, obwohl die entsprechenden Messungen zu Beginn der Versuchsreihe durchgeführt wurden. Sofern nicht explizit erwähnt, wurde in allen Experimenten eine Konzentration von 100 μM Roxithromycin appliziert und die Ströme in konventioneller Whole-cell-Konfiguration gemessen.

Es wurde zusätzlich angestrebt, am Ende des Experiments durch die Zugabe von Terfenadin (10 μM) den pharmakologisch-sensitiven Strom herauszufiltern. Eine solche Konzentration des Terfenadins sorgte für eine vollständige Blockade des spezifischen Stromes. Es konnten jedoch nicht alle Experimente auf diese Art zu Ende geführt werden.

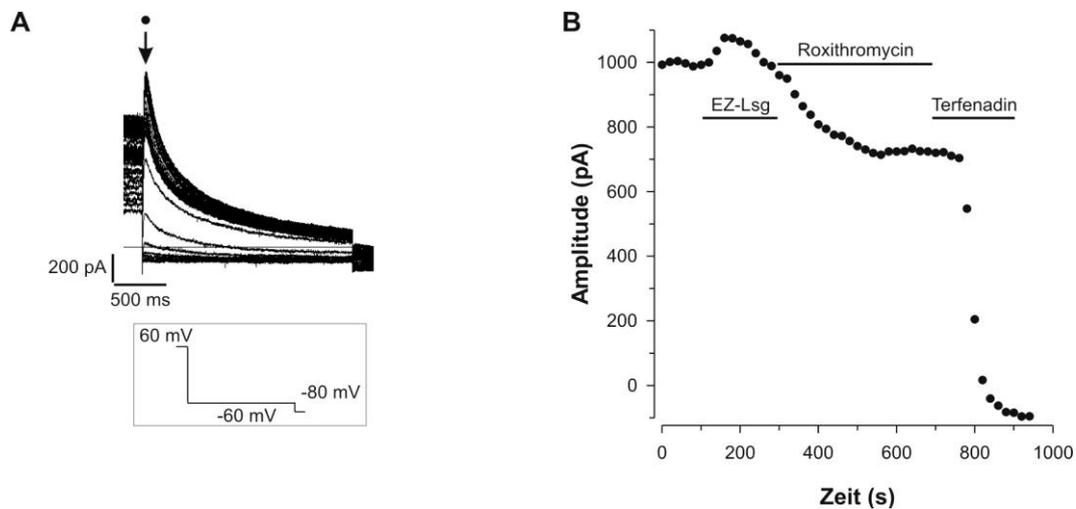


Abb. 3:

Einfluss von Roxithromycin auf die *erg1a/1b*-Stromamplituden im Testpulsprotokoll.

A Auszug aus Testpulsprotokoll: Stromantwort der Zelle, im Kasten entsprechender Spannungspuls (Perforated-patch-Modus). Der Pfeil markiert die in B aufgetragene Stromamplitude.

B Amplitudenverlauf im Zeitgang: Die Amplitude ohne Zulauf, unter Zulauf von extrazellulärer Lösung, 100 μM Roxithromycin und 10 μM Terfenadin wurde gegen die Versuchsdauer aufgetragen.

In Abb. 3A und B ist dargestellt, wie in den Versuchen die einsetzende Wirkung und die Sättigung des Effekts im Zeitgang mithilfe des Testpulsprotokolls überwacht wurden. In vielen Fällen konnte dieser typische Zeitgang, der in Abb. 3B wiedergegeben wurde, beobachtet werden: Die Amplitude war anfänglich konstant. Sobald das Perfusionssystem in Gang gesetzt wurde, reagierte die Zelle auf das Anströmen der extrazellulären Lösung mit einer geringen Amplitudenzunahme (= „run up“), die dann in eine Abnahme der Amplitude überging. Erst wenn die Amplitude wieder relativ stabil war, wurde die Substanz perfundiert. Die Zellen reagierten stets mit einer deutlichen Amplitudenabnahme, hier gezeigt durch 100 μM Roxithromycin und 10 μM Terfenadin.

4.1.1 Aktivierung

In Abb. 4 ist zur Veranschaulichung der pharmakologischen Effekte eine Übersicht über die sensitiven Ströme gezeigt. Abb. 4A, B und C zeigen die aufgezeichneten Original-Stromspuren, Abb. 4D und E die mithilfe des Programms PulseFit (Fa. HEKA Elektronik) subtrahierten Ströme. Die zusätzliche Applikation von Terfenadin, einem äußerst potenten erg-Blocker (Kamiya et al., 2008), diente der Ausschaltung des maximalen sensitiven Stromes, der auf pharmakologische Weise inhibierbar war. Abb. 4C verdeutlicht, dass die CHO-Zellen wenig endogene und wenig Leckströme besitzen. Es war zu erkennen, dass die sensitiven Ströme nahezu den Charakter der Kontrollströme beibehielten.

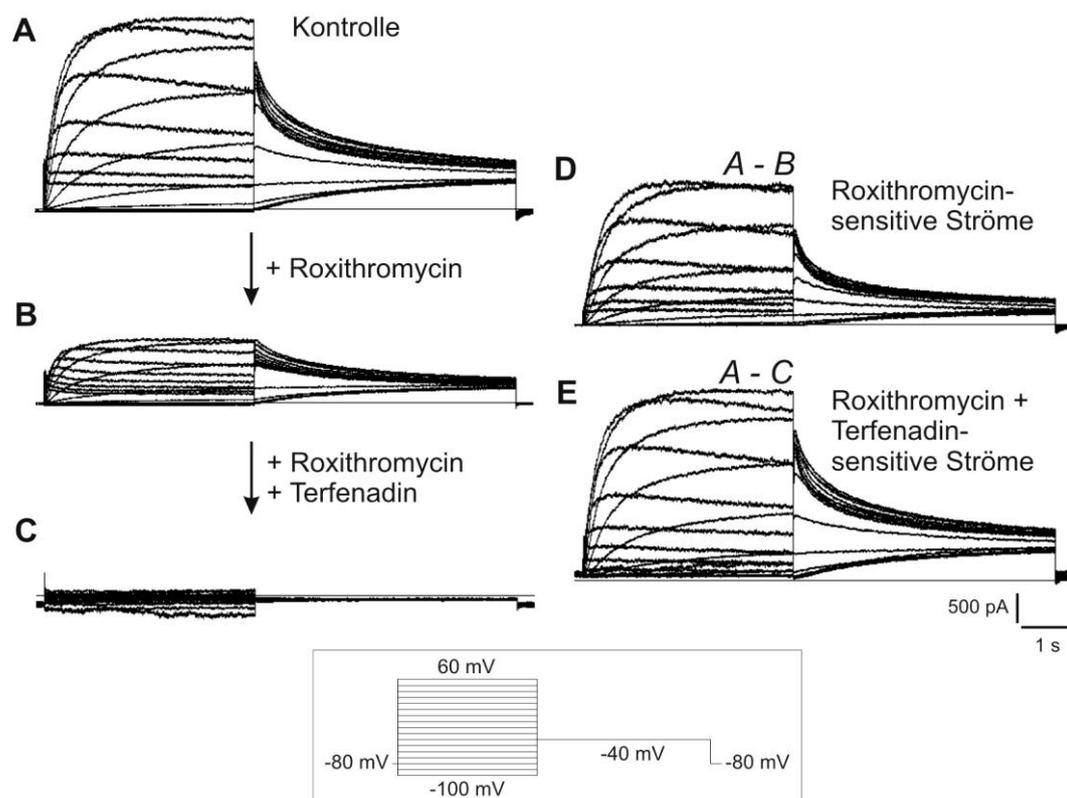


Abb. 4:

Vergleich der Roxithromycin- und Terfenadin-sensitiven Ströme einer erfolgreich injizierten CHO-Zelle anhand des Aktivierungsprotokolls.

A Membranströme einer erg1a/1b exprimierenden CHO-Zelle, gemessen mit dem unten gezeigten Pulsprotokoll im konventionellen Whole-cell-Modus.

B Ströme nach Applikation von 100 μM Roxithromycin.

C Ströme nach zusätzlicher Applikation von 10 μM Terfenadin.

D Roxithromycin-sensitive Ströme als Differenz der Stromspuren in A und B.

E Roxithromycin- und Terfenadin-sensitive Ströme als Differenz der Stromspuren in A und C.

In Abb. 5A und B sind Stromspuren dargestellt, die mit dem im Kasten dargestellten Aktivierungsprotokoll erzeugt wurden. Um die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung unter Kontrollbedingungen und unter Roxithromycin-Einfluss zu untersuchen, wurden zunächst die maximalen Amplituden der Tail-Ströme (I_{Tail}) untersucht. Zwischen der Durchführung der Aktivierungsprotokolle vor und nach Roxithromycin-Applikation lag eine Dauer von $9 \text{ min } 49 \text{ s} \pm 24 \text{ s}$ ($n=5$), in den Blindversuchen mit DMSO betrug die Dauer $9 \text{ min } 39 \text{ s} \pm 21 \text{ s}$ ($n=3$). Auch die Zeit zwischen Applikation der Substanzen und dem nachfolgenden Protokoll war in beiden Versuchsreihen vergleichbar lang.

Durch Auftragung der Mittelwerte dieser normierten Amplituden gegen das Potential des Vorpulses entstand der typische sigmoidale Verlauf, der sehr gut mit einer Boltzmann-Funktion beschrieben werden konnte, dies wurde zunächst in Abb. 5C für die Kontrollen dargestellt. Die Amplituden unter Roxithromycin wurden auf die Amplituden der Kontrollen normiert und anschließend gemittelt, sodass sie im Verhältnis Größenrichtig abgebildet wurden. Zur Veranschaulichung der Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung wurden diese Amplituden zusätzlich zwischen Werten von 0 und 1 normiert und als unterbrochene Linie wiedergegeben. In allen nachfolgenden Abbildungen, in denen eine Boltzmann-Funktion zur Anwendung kam, erfolgte die Darstellung analog und wird daher nicht nochmal explizit erklärt.

Unter Kontrollbedingungen war der Beginn der Aktivierung bei einem Potential von -60 mV zu erkennen, mit zunehmendem Membranpotential stieg die Amplitude und erreichte ihr Maximum ab einem Potential von $+10 \text{ mV}$. Das Potential, bei dem die Aktivierung halbmaximal ist, halbmaximale Aktivierung ($V_{0,5}$) genannt, lag unter Kontrollbedingungen bei $-31,2 \pm 2,4 \text{ mV}$ ($n=5$). Unter dem Einfluss von $100 \mu\text{M}$ Roxithromycin erfuhr die Aktivierungskurve eine Verschiebung nach links zu negativeren Potentialen. Sowohl der Beginn der Aktivierung als auch ihr Maximalwert wurden bei negativeren Potentialen beobachtet (Abb. 5C), die halbmaximale Aktivierung lag bei $-41,7 \pm 2,8 \text{ mV}$ ($p < 0,001$). Der Steigungsfaktor betrug unter Kontrollbedingungen $6,5 \pm 0,3 \text{ mV}$ und $5,8 \pm 0,2 \text{ mV}$ nach Roxithromycin-Applikation ($p > 0,05$, Tab. 1). Die Abnahme der Tail-Stromamplitude unter dem Einfluss von $100 \mu\text{M}$ Roxithromycin lag bei $58,4 \pm 4,7 \%$ und war höchstsignifikant ($p < 0,001$, Tab. 7).

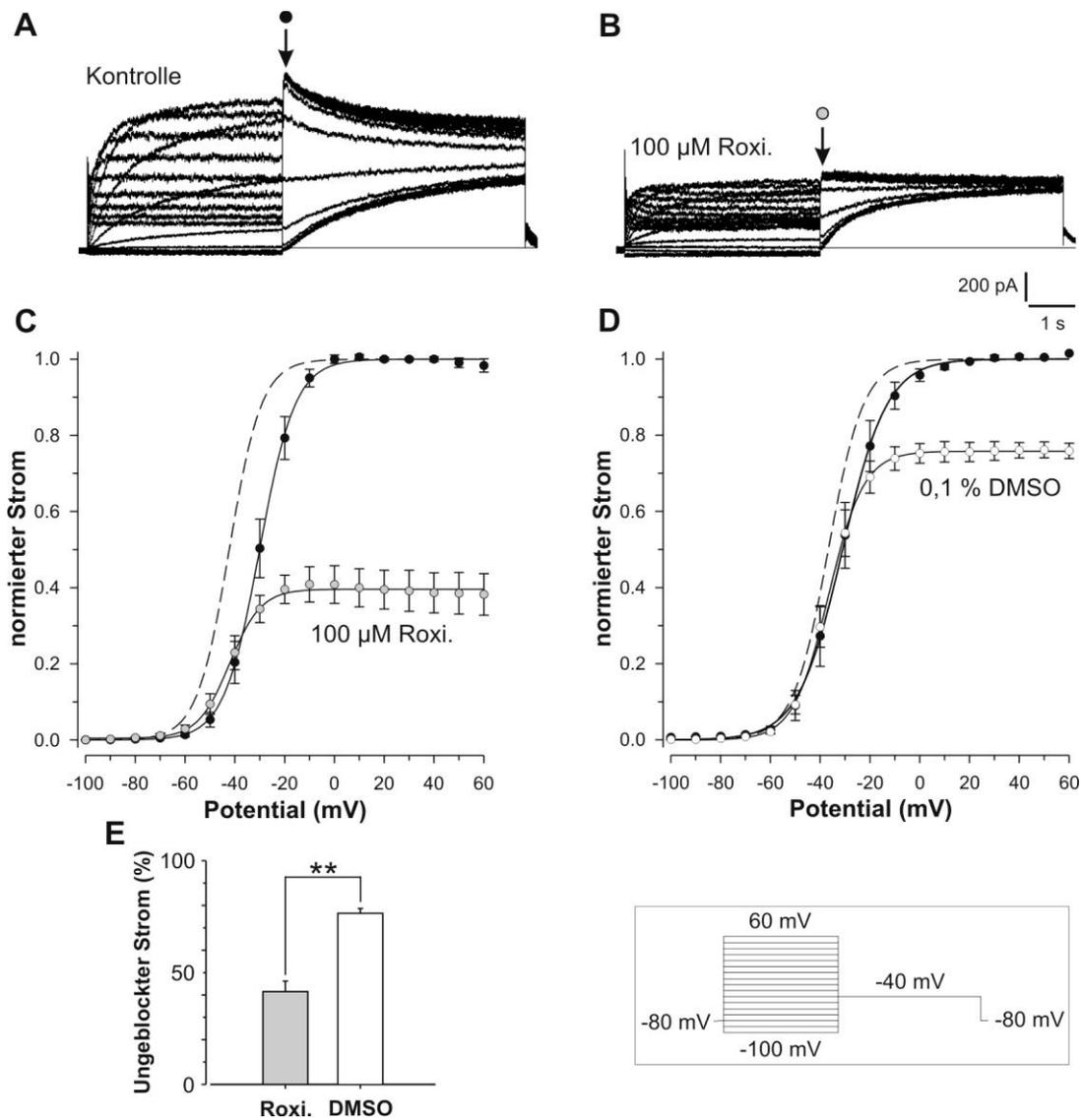


Abb. 5:

Einfluss von Roxithromycin auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von *erg1a/1b*. Darstellung anhand der Tail-Stromamplituden.

A Membranströme unter Kontrollbedingungen, gemessen mit im Kasten gezeigten Pulsprotokoll.

B Membranströme unter dem Einfluss von 100 μM Roxithromycin, Protokoll wie in A.

C Spannungsabhängigkeit der Aktivierung: Auftragung des maximalen Auswärtsstromes beim Nachpuls auf -40 mV gegen das Potential des Vorpulses, die Pfeile in A und B markieren den in C ausgewerteten Bereich. Für die Kontrolle (schwarzer Kreis) ergibt sich $V_{0,5} = -31,2 \pm 2,4$ mV, unter 100 μM Roxithromycin (grauer Kreis und unterbrochene Linie) liegt $V_{0,5}$ bei $-41,7 \pm 2,8$ mV ($p < 0,001$). Der Steigungsfaktor

beträgt $6,5 \pm 0,3$ mV (Kontrolle) und $5,8 \pm 0,2$ mV nach Roxithromycin-Applikation ($n=5$; $p>0,05$).

D Spannungsabhängigkeit der Aktivierung im Blindversuch: Auftragung des maximalen Auswärtsstromes gegen das Potential des Vorpulses der Kontrolle und nach Einwirkung von 0,1 % DMSO. Für die Kontrolle (schwarzer Kreis) ergibt sich $V_{0,5} = -31,0 \pm 3,4$ mV, unter 0,1 % DMSO (weißer Kreis und unterbrochene Linie) liegt $V_{0,5}$ bei $-36,5 \pm 2,3$ mV ($p<0,05$). Der Steigungsfaktor von $8,4 \pm 0,6$ mV sinkt auf $6,8 \pm 0,5$ mV ($n=3$; $p<0,05$).

E Verhältnis zwischen ungeblockten Stromamplituden nach Roxithromycin und DMSO: Durch 100 μ M Roxithromycin nimmt die Amplitude des Tail-Stromes auf $41,6 \pm 4,7$ %, unter 0,1 % DMSO auf $76,5 \pm 2,2$ % ihres Ursprungswertes ab ($p<0,01$).

In den entsprechenden Blindversuchen mit 0,1 % DMSO fand ebenfalls eine Linksverschiebung von $V_{0,5}$ statt. Diese betrug ca. $-5,5$ mV und lag ebenfalls unterhalb des Signifikanzniveaus ($n=3$; $p<0,05$). Bei der Testung des Ausmaßes der Spannungsverschiebungen unter Roxithromycin und unter DMSO gegeneinander war der Unterschied signifikant ($p<0,05$). Der Steigungsfaktor nahm unter DMSO von $8,4 \pm 0,6$ auf $6,8 \pm 0,5$ mV ab, diese Veränderung war signifikant ($p<0,05$). Die Amplituden in den Experimenten mit DMSO nahmen nicht signifikant um $23,5 \pm 2,2$ % ab ($p>0,05$). Da es wie unter Roxithromycin zu einer Reduktion der Amplitude, wenngleich in geringerem Maße, kam, wurde das Ausmaß der jeweiligen Amplitudenabnahmen gegeneinander getestet. In Abb. 5E wurde der ungeblockte Strom in den Roxithromycin- und in den Blindversuchen aufgetragen, der Unterschied war hochsignifikant ($p=0,002$).

Tabelle 1:

Halbmaximale Aktivierung, Steigungsfaktor und Irrtumswahrscheinlichkeit für erg1a/1b unter Kontrollbedingungen und unter 100 μ M Roxithromycin. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=5$).

	Kontrolle	100 μ M Roxi.	p
$V_{0,5}$ (mV)	$-31,2 \pm 2,4$	$-41,7 \pm 2,8$	0,0003 ***
S (mV)	$6,5 \pm 0,3$	$5,8 \pm 0,2$	0,1038

Desweiteren wurden auch Blindversuche mit extrazellulärer Lösung durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Amplitudenabnahme war bei diesen Messungen größer als nach 0,1 % DMSO-Applikation, sie betrug $39,5 \pm 9,9$ % ($n=3$) und unterschied sich statistisch nicht signifikant von den Amplitudenabnahmen nach 100 μ M Roxithromycin ($p=0,0973$).

Durch das bereits erwähnte Aktivierungsprotokoll entstanden die in Abb. 6A und B dargestellten Stromspuren. Die Pfeile markieren den interessierenden Bereich. Auch das spannungsabhängige Amplitudenmaximum des stationären Auswärtsstromes erfuhr eine Linksverschiebung durch Roxithromycin.

Die erg-Kanäle sind Einwärtsgleichrichter (Spector et al., 1996). In Abb. 6C und E wurde die Einwärtsrektifizierung graphisch dargestellt: Indem man die maximalen Amplituden am Ende des Vorpulses gegen das Potential desselbigen auftrug, entstand eine Kurve mit dem typischen glockenförmigen Verlauf. Die Amplitude stieg bis auf einen Maximalwert an, der unter Kontrollbedingungen bei einem Potential von -10 mV lag, um dann, je positiver das Potential wurde, wieder abzufallen. Dieses Verhalten ist durch die rasche Inaktivierung der Kanäle zu erklären (Smith et al., 1996; Spector et al., 1996), die umso schneller und vollständiger vonstatten ging, je positiver das Potential wurde. Es standen dann immer weniger Kanäle im offenen Zustand zur Verfügung, die den Strom leiten konnten, die Amplitude nahm ab.

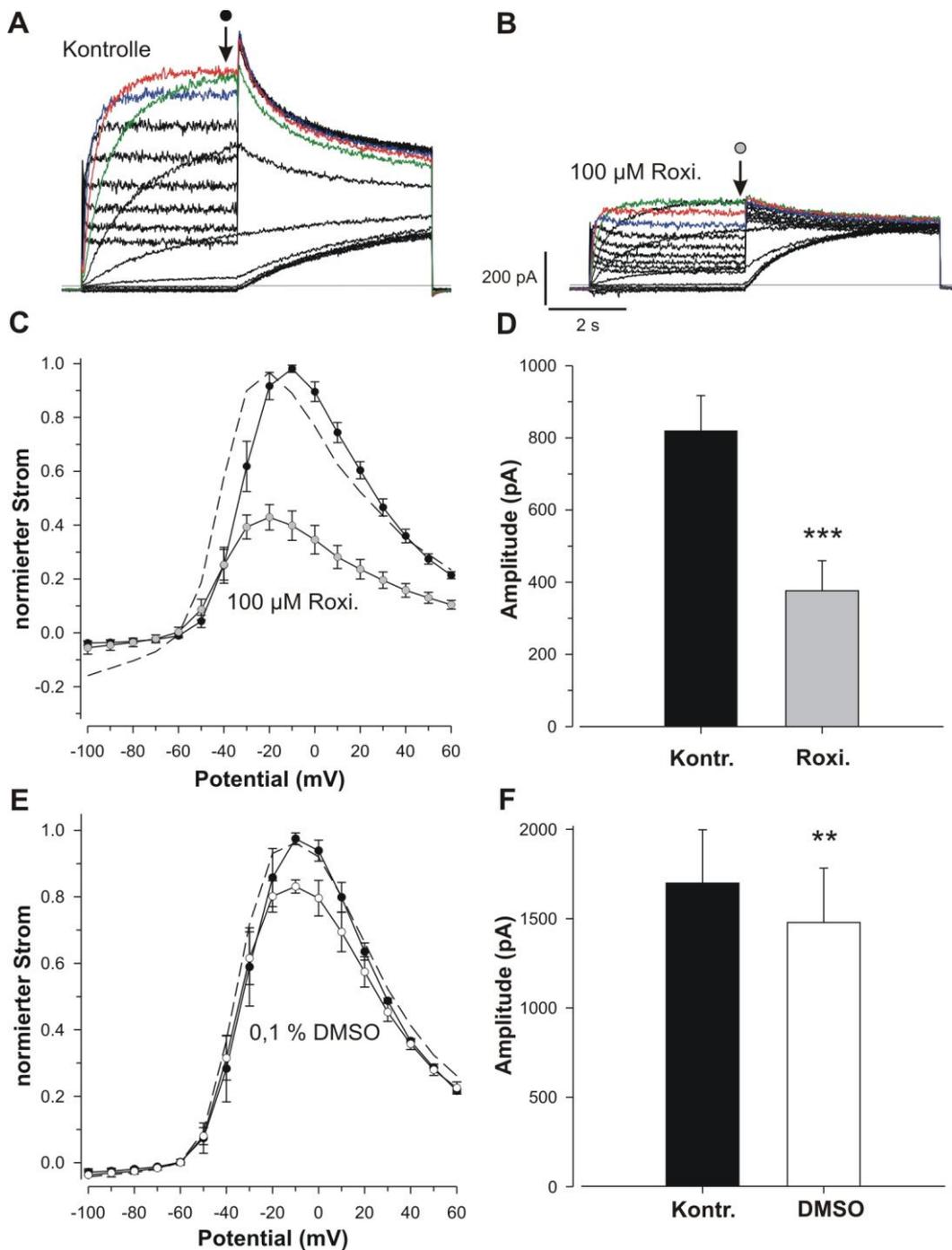


Abb. 6:

Einfluss von Roxithromycin auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von erg1a/1b. Darstellung anhand des stationären Auswärtsstromes.

A Membranströme unter Kontrollbedingungen gemessen mit bereits erwähntem Aktivierungsprotokoll. Stromspuren bei -10 mV in grün, bei 0 mV in rot und bei +10 mV in blau.

B Membranströme unter 100 μM Roxithromycin. Farbgebung entspricht der in A.

C Auftragung der Amplituden am Ende des Vorpulses (Kontrolle: schwarzer Kreis, 100 μ M Roxithromycin: grauer Kreis und unterbrochene Linie) gegen das Potential des Vorpulses. Entsprechender Bereich in A und B durch Pfeile markiert.

D Inhibition: Vergleich der Amplituden unter Kontrollbedingungen und 100 μ M Roxithromycin beim Potential von -10 mV (Kontrolle schwarz, Roxithromycin grau; n=5; p<0,001).

E Auftragung der Amplituden am Ende des Vorpulses (Kontrolle: schwarzer Kreis, 0,1 % DMSO: weißer Kreis und unterbrochene Linie) gegen das Potential des Vorpulses. Ausgewerteter Bereich entspricht dem in C.

F Amplitudenreduktion: Vergleich der Amplituden unter Kontrollbedingungen und 0,1 % DMSO beim Potential vom -10 mV (Kontrolle schwarz, DMSO weiß; n=3; p<0,01).

Um die Spannungsverschiebung der Glockenkurven graphisch wiederzugeben, wurden die Amplituden unter Roxithromycin und unter DMSO auf ihr Maximum normiert (Abb. 6C und E, unterbrochene Linie). Anschließend wurden daraus Mittelwerte gebildet, was die Tatsache erklärt, dass die Maxima der unterbrochenen Linien den Wert von 1 nicht mehr erreichen, da die Maximalwerte bei unterschiedlichen Potentialen lagen. Unter dem Einfluss von 100 μ M Roxithromycin verschob sich das Maximum der glockenförmigen Kurve um 10 mV nach links auf -20 mV (Abb. 6C, unterbrochene Linie). Durch die Zunahme des Leckstromes, der linear war, floss bei den sehr negativen Potentialen im Bereich von -100 bis -80 mV verhältnismäßig mehr Strom als unter Kontrollbedingungen. Um die Amplituden nach Zugabe von Roxithromycin bzw. DMSO im Verhältnis zur Kontrolle größenrichtig darzustellen, wurde diese auf das Kontrollmaximum normiert und zusätzlich in Abb. 6C bzw. E gezeigt (Roxithromycin: grauer Kreis, DMSO: weißer Kreis). In Abb. 6D und F wurden die Mittelwerte der Amplituden beim Potential von -10 mV zum Vergleich aufgetragen. Die Amplitudeninhibition bei -10 mV war unter Roxithromycin höchstsignifikant (n=5; p=0,0004) und unter DMSO wurde das Signifikanzniveau ebenfalls unterschritten (n=3; p<0,01). Deshalb wurden die Amplitudenabnahmen anschließend gegeneinander getestet, und es konnte ein hochsignifikanter Unterschied festgestellt werden (p=0,0066).

Durch 100 μ M Roxithromycin wurde eine Inhibition der Maximalamplituden von $51,7 \pm 3,5$ % erzielt (p<0,001). In den gleichartigen Blindversuchen mit DMSO nahmen die Maximalamplituden um $12,4 \pm 0,6$ % (p<0,05) ab. Beim Vergleich der Reduktion der Maximalamplituden unter Roxithromycin und DMSO konnte wiederum ein höchstsignifikanter Unterschied festgestellt werden (p=0,0001).

Zur Untersuchung des Zeitverlaufs der Aktivierung mit seinen charakteristischen Größen wurde das sog. „envelope of tails“-Protokoll angewendet (Abb. 7A und B). Die erste auswertbare Konstante bezieht sich auf die Zeit, bis die Amplitude des Stromes einen Wert

von $1-1/e$ ($\approx 63\%$) erreicht hat. Diese $\tau_{\text{Aktivierung}}$ genannte Konstante repräsentiert, wie bereits im Abschnitt 3.4.3 des Kapitels „Material und Methoden“ beschrieben, den schnellen Anteil der Aktivierung. Die zweite Kenngröße ist die Verzögerung (= delay), mit der die Aktivierung einsetzt, und ist ebenfalls ein Beurteilungskriterium für den Zeitverlauf des Aktivierungsprozesses. Durch die eluzierten Stromamplituden, die zwischen Werten von 0 bis 1 normiert wurden, ließ sich eine Exponentialfunktion legen (Abb. 7C). Anschließend wurden die Ergebnisse unter Roxithromycin-Einfluss auf die Kontrollwerte normiert (Abb. 7C, unterbrochene Linie).

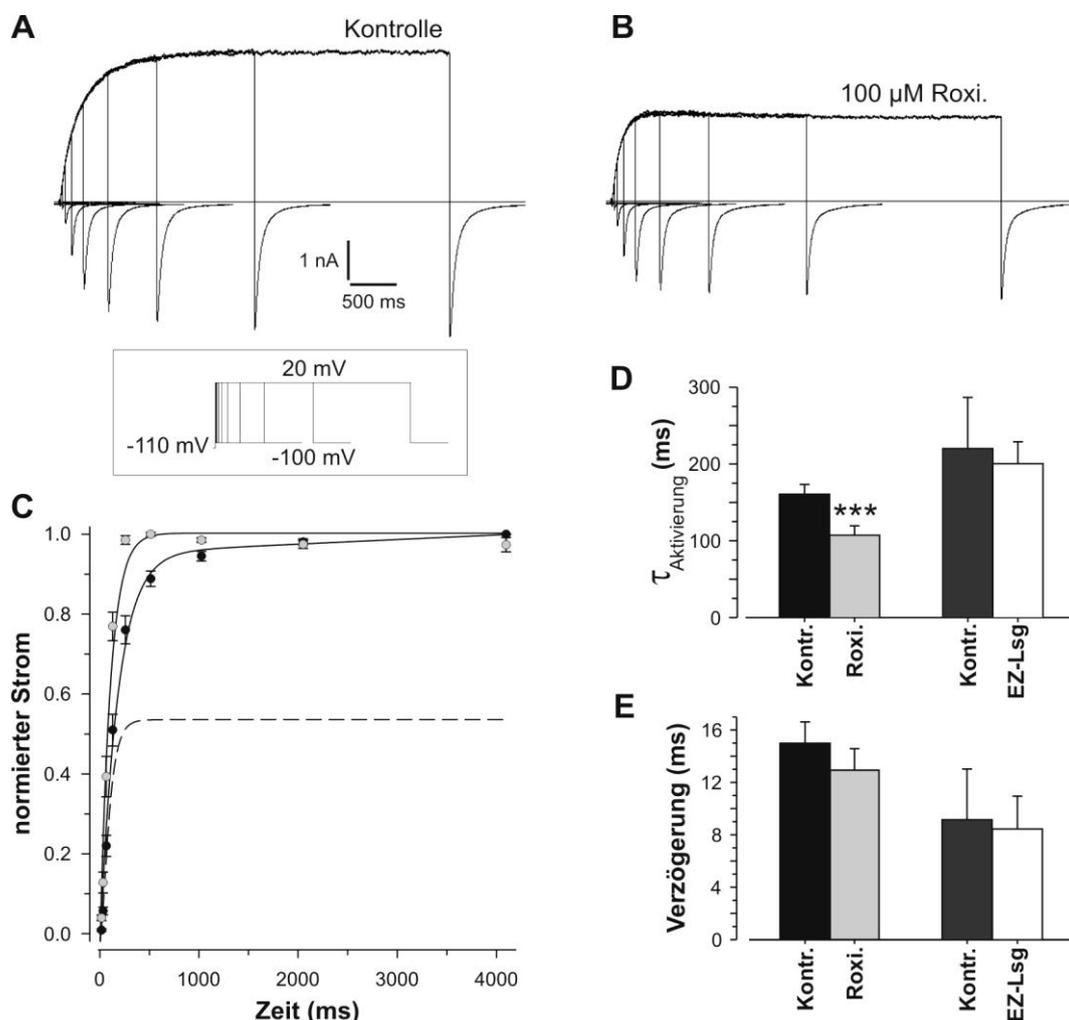


Abb. 7:

Einfluss von Roxithromycin auf die Zeitkonstante der Aktivierung und auf die Verzögerung des Einsetzens der Aktivierung von erg1a/1b-Kanälen.

A Membranströme unter Kontrollbedingungen, durch „envelope of tails“-Protokoll (Kasten) erzeugt.

B Membranströme unter 100 μM Roxithromycin, Protokoll wie in A.

C Darstellung der Aktivierung im Zeitgang: Auftragung der normierten Amplituden unter Kontrollbedingungen (schwarzer Kreis) und 100 μM Roxithromycin (grauer Kreis und unterbrochene Linie) gegen die Zeit ($n=6$).

D Zeitkonstanten der Aktivierung. Links: $\tau_{\text{Aktivierung}}$ unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter 100 μM Roxithromycin (grau; $n=6$; $p<0,001$). Rechts: $\tau_{\text{Aktivierung}}$ der Blindversuche unter Kontrollbedingungen (dunkelgrau) und extrazellulärer Lösung (weiß; $n=3$).

E Verzögerung. Links: Verzögerung der Aktivierung unter Kontrollbedingungen (schwarz) und unter 100 μM Roxithromycin (grau; $n=6$). Rechts: Verzögerung der Blindversuche unter Kontrollbedingungen (dunkelgrau) und extrazellulärer Lösung (weiß; $n=3$).

Unter Kontrollbedingungen nahmen die Amplituden der Tail-Ströme mit der zur Verfügung stehenden Aktivierungszeit zu, ein „steady-state“ konnte gerade nicht erreicht werden. $\tau_{\text{Aktivierung}}$ betrug $160,61 \pm 12,7$ ms, der Prozess war um $14,99 \pm 1,63$ ms verzögert ($n=6$; Tab. 2, Abb. 7D und E). Durch 100 μM Roxithromycin konnte eine Veränderung im Zeitgang beobachtet werden: Ein Amplitudenplateau wurde rasch erreicht (Abb. 7C). Initial lagen die Amplituden der Kontrolle und die unter Roxithromycin übereinander (Abb. 7C). Die Tail-Amplitude der Stromspur mit der längsten Pulsdauer war im Mittel um $45,7 \pm 8,4$ % inhibiert. Der Auswärtsstrom, der durch die Depolarisation auf +20 mV erzeugt wurde, nahm unter Roxithromycin bei den lang andauernden Pulsen mit zunehmender Depolarisationsdauer ab (Abb. 7B). Diese Beobachtung wurde in allen „envelope-of-tails“-Versuchen gemacht. $\tau_{\text{Aktivierung}}$ verkürzte sich höchstsignifikant ($p=0,0004$) auf $107,27 \pm 12,19$ ms (Tab. 2, Abb. 7D), die Verzögerung änderte sich in geringerem nicht-signifikantem Maße ($p=0,1450$). Die Verzögerung betrug $12,94 \pm 1,64$ ms (Tab. 2, Abb. 7E). Die jeweils maximal erzielbaren Stromamplituden wurden unter Roxithromycin schon bei einer kürzeren Dauer des Testpulses erreicht. In Blindversuchen mit extrazellulärer Lösung wurde für $\tau_{\text{Aktivierung}}$ teilweise eine Zu- und teilweise eine Abnahme beobachtet. Im Mittel nahm $\tau_{\text{Aktivierung}}$ nicht signifikant um ca. 20 ms mit einer großen Schwankungsbreite ab ($n=3$; $p=0,6902$). Die Verzögerung änderte sich wiederum nicht signifikant ($p=0,9076$).

Tabelle 2:

Zeitkonstanten der Aktivierung und die Verzögerung des Einsetzens der Aktivierung bei erg1a/1b unter Kontrollbedingungen und unter 100 μM Roxithromycin. Angegeben sind die Werte für die einzelnen Messungen sowie Mittelwerte, der SEM und die Irrtumswahrscheinlichkeit p (n=6).

Messung	Kontrolle		100 μM Roxithromycin	
	τ Aktivierung (ms)	Verzögerung (ms)	τ Aktivierung (ms)	Verzögerung (ms)
1	210,61	13,88	147,33	16,69
2	179,47	21,15	123,07	17,43
3	135,11	16,26	101,82	10,23
4	155,95	17,04	121,26	15,44
5	124,55	10,50	62,77	8,56
6	157,95	11,11	87,38	9,26
MW	160,61	14,99	107,27	12,94
SEM	12,70	1,63	12,19	1,64
p	-	-	0,0004 ***	0,1450

4.1.2 Deaktivierung

Zu Beginn wurde in Abb. 8, wie schon vom Aktivierungsprotokoll bekannt, eine Übersicht über die pharmakologisch sensitiven Ströme wiedergegeben. Auch anhand des Deaktivierungsprotokolls ist zu erkennen, dass die Differenz-Stromspuren den Charakter der Original-Ströme weitgehend beibehielten.

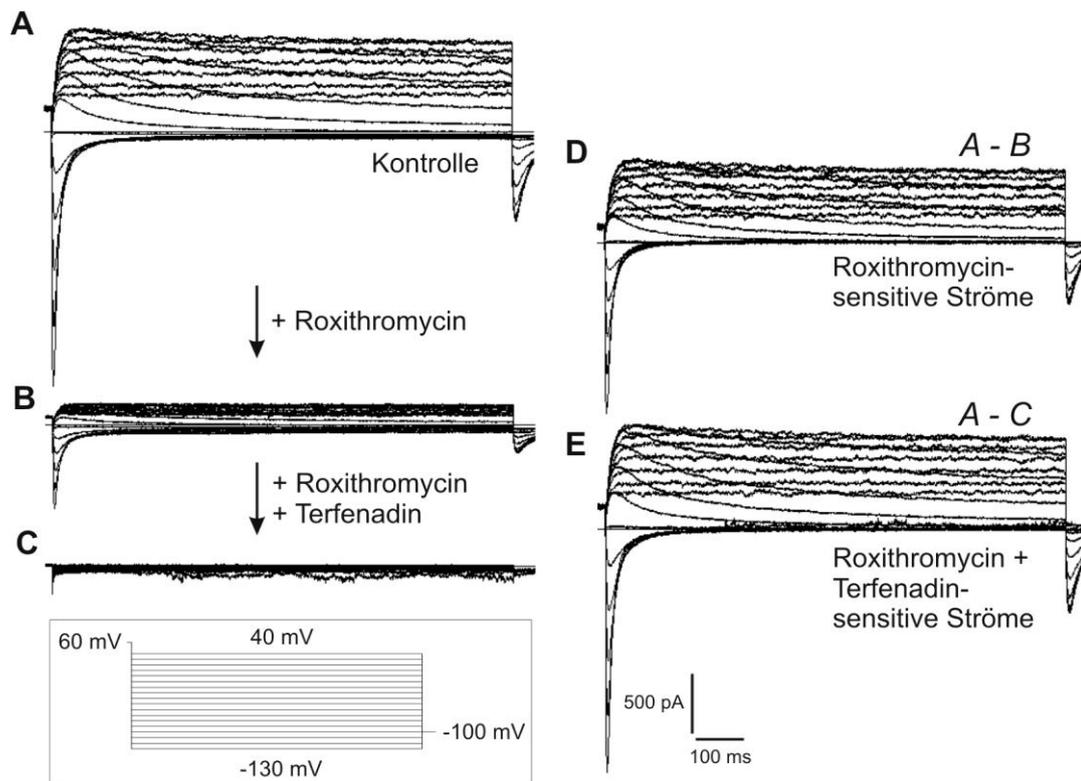


Abb. 8:

Vergleich der Roxithromycin- und Terfenadin-sensitiven Ströme einer erfolgreich injizierten CHO-Zelle anhand des Deaktivierungsprotokolls.

A Membranströme einer *erg1a/1b* exprimierenden CHO-Zelle, gemessen mit unten gezeigtem Pulsprotokoll.

B Ströme nach Applikation von 100 μM Roxithromycin.

C Ströme nach zusätzlicher Applikation von 10 μM Terfenadin.

D Roxithromycin-sensitiven Ströme als Differenz der Stromspuren in A und B.

E Roxithromycin- und Terfenadin-sensitiven Ströme als Differenz der Stromspuren in A und C.

Mit dem Deaktivierungsprotokoll kann die Verfügbarkeit von *erg*-Kanälen untersucht werden. Stromspuren einer Beispielmessung unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluss von 100 μM Roxithromycin sind in Abb. 9A und B dargestellt. Die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung wurde betrachtet, indem die normierten Amplituden der einwärts gerichteten Tail-Ströme des Nachpulses gegen das Potential des Vorpulses aufgetragen wurden (Abb. 9C). Dieser Vorgang wurde bereits entsprechend für die Aktivierung durchgeführt, den Werten wurde ebenfalls eine Boltzmann-Funktion angeglichen. Die Kanäle begannen unter Kontrollbedingungen ab einem Vorpulspotential von -20 mV und negativer vom aktivierten Zustand in den deaktivierten Zustand

überzugehen, sodass die Amplitude des Tail-Stromes abnahm. Es befanden sich ab -20 mV immer weniger Kanäle im inaktivierten Zustand, denen der hyperpolarisierende Nachpuls eine Erholung aus der Inaktivierung gestattete. Die Kanäle, die schon deaktivierten, waren im Nachpuls nicht mehr verfügbar. Die halbmaximale Deaktivierung war bei einem Potential von $V_{0,5} = -48,6 \pm 1,4$ mV ($n=5$) erreicht. Der Steigungsfaktor der Kontrolle betrug $8,8 \pm 0,3$ mV. Unter dem Einfluss von 100 μ M Roxithromycin setzte die Deaktivierung erst ab einem Potential von -30 mV ein, die unterbrochene Linie in Abb. 9C setzte die Experimente unter Roxithromycin graphisch in Vergleich zur Kontrolle. Auch die halbmaximale Deaktivierung $V_{0,5}$ wurde signifikant zu negativeren Potentialen verschoben ($p < 0,01$). Sie betrug $-57,1 \pm 1,9$ mV (Tab. 3), der Steigungsfaktor sank auf $S = 8,1 \pm 0,3$ mV ($p < 0,05$), der Kurvenverlauf im Bereich der größten Dynamik wurde also steiler. Der gesamte Prozess unterlag einer Linksverschiebung. Die Werte wurden in Tab. 3 zusammengefasst. Durch 100 μ M Roxithromycin wurde der Strom auf $40,6 \pm 7,0$ % seines ursprünglichen Wertes minimiert ($p < 0,01$, Tab. 7).

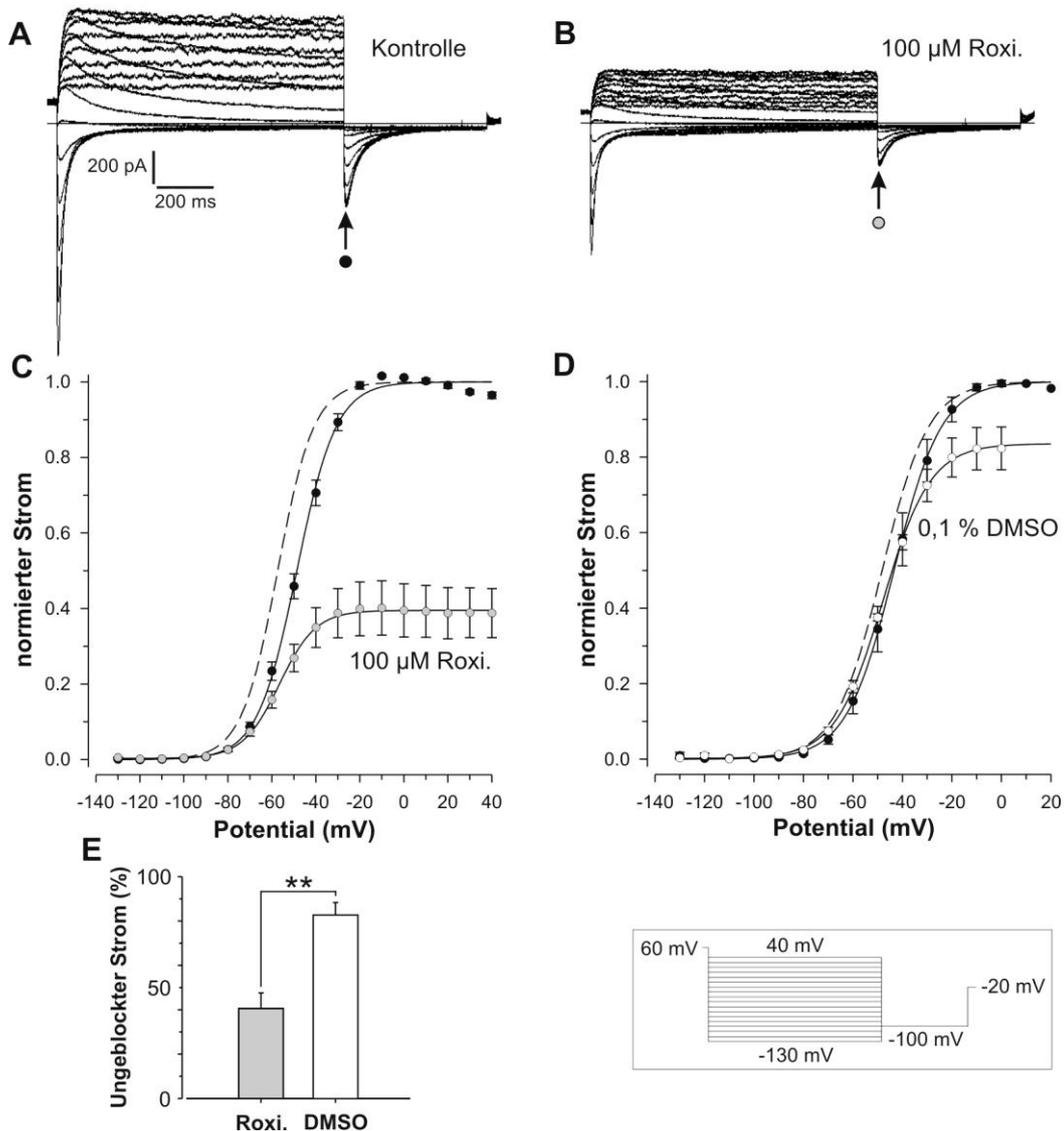


Abb. 9:

Einfluss von Roxithromycin auf die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung von *erg1a/1b*. Darstellung anhand der Tail-Stromamplituden.

A Membranströme unter Kontrollbedingungen, gemessen mit im Kasten gezeigten Pulsprotokoll.

B Membranströme unter dem Einfluss von 100 μM Roxithromycin, Protokoll wie in A.

C Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung: Auftragung des maximalen Einwärtsstromes beim Nachpuls auf -100 mV gegen das Potential des Vorpulses, die Pfeile in A und B markieren den in C ausgewerteten Bereich. Für die Kontrolle (schwarzer Kreis) ergibt sich $V_{0,5} = -48,6 \pm 1,4\text{ mV}$, unter 100 μM Roxithromycin (grauer Kreis und unterbrochene Linie) liegt $V_{0,5}$ bei $-57,1 \pm 1,9\text{ mV}$ ($p < 0,01$). Der Steigungsfaktor von $8,8 \pm 0,3\text{ mV}$ sinkt auf $8,1 \pm 0,3\text{ mV}$ ($n = 5$; $p < 0,05$).

D Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung im Blindversuch: Auftragung des maximalen Einwärtsstromes gegen das Potential des Vorpulses der Kontrolle und nach Einwirkung von 0,1 % DMSO. Für die Kontrolle (schwarzer Kreis) ergibt sich $V_{0,5} = -43,1 \pm 2,6$ mV, unter 0,1 % DMSO (weißer Kreis und unterbrochene Linie) liegt $V_{0,5}$ bei $-48,0 \pm 0,9$ mV ($p > 0,05$). Der Steigungsfaktor von $9,5 \pm 0,7$ mV bleibt konstant bei $9,6 \pm 1,0$ mV ($n=3$; $p > 0,05$).

E Verhältnis zwischen ungeblockten Stromamplituden nach Roxithromycin und DMSO: Durch $100 \mu\text{M}$ Roxithromycin nimmt die Amplitude des Tail-Stromes auf $40,6 \pm 7,0$ %, unter 0,1 % DMSO auf $82,7 \pm 5,6$ % ihres Ursprungswertes ab ($p < 0,01$).

In den entsprechenden Blindversuchen mit 0,1 % DMSO wurde eine nicht-signifikante Verschiebung der halbmaximalen Deaktivierung zu negativeren Werten beobachtet. Diese lag bei circa $-4,9$ mV ($n=3$; $p > 0,05$). Der Steigungsfaktor hingegen änderte sich kaum ($p > 0,05$). Die Amplitude des Tail-Stromes betrug unter DMSO $82,7 \pm 5,6$ % ihres Ausgangswertes. Da man sowohl unter Roxithromycin als auch unter DMSO eine Amplitudenabnahme beobachten konnte, wurden die Höhen der jeweiligen Abnahmen gegeneinander getestet. Der Unterschied war hochsignifikant ($p=0,0062$, Abb. 9E).

Zwischen der Durchführung der Deaktivierungsprotokolle vor und nach Roxithromycin-Applikation lag eine Dauer von $13 \text{ min } 58 \text{ s } \pm 73 \text{ s}$ ($n=5$), in den Blindversuchen mit DMSO betrug die Dauer $13 \text{ min } 59 \text{ s } \pm 45 \text{ s}$ ($n=3$). Auch die Zeit zwischen Applikation der Substanzen und dem nachfolgenden Protokoll war in beiden Versuchsreihen vergleichbar lang.

Tabelle 3:

Halbmaximale Deaktivierung, Steigungsfaktor und Irrtumswahrscheinlichkeit für erg1a/1b unter Kontrollbedingungen und unter $100 \mu\text{M}$ Roxithromycin. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=5$).

	Kontrolle	100 μM Roxi.	p
$V_{0,5}$ (mV)	$-48,6 \pm 1,4$	$-57,1 \pm 1,9$	0,0039 **
S (mV)	$8,8 \pm 0,3$	$8,1 \pm 0,3$	0,0211 *

Kurz erwähnt werden sollte an dieser Stelle, dass auch für die Deaktivierung Blindversuche mit extrazellulärer Lösung durchgeführt wurden (Daten nicht gezeigt), bei denen ein stärkerer „rundown“ auftrat als unter 0,1 % DMSO. Dieser betrug $54,3 \pm 5,2$ % ($n=3$) und unterschied sich nicht signifikant vom Effekt durch $100 \mu\text{M}$ Roxithromycin ($p=0,6302$).

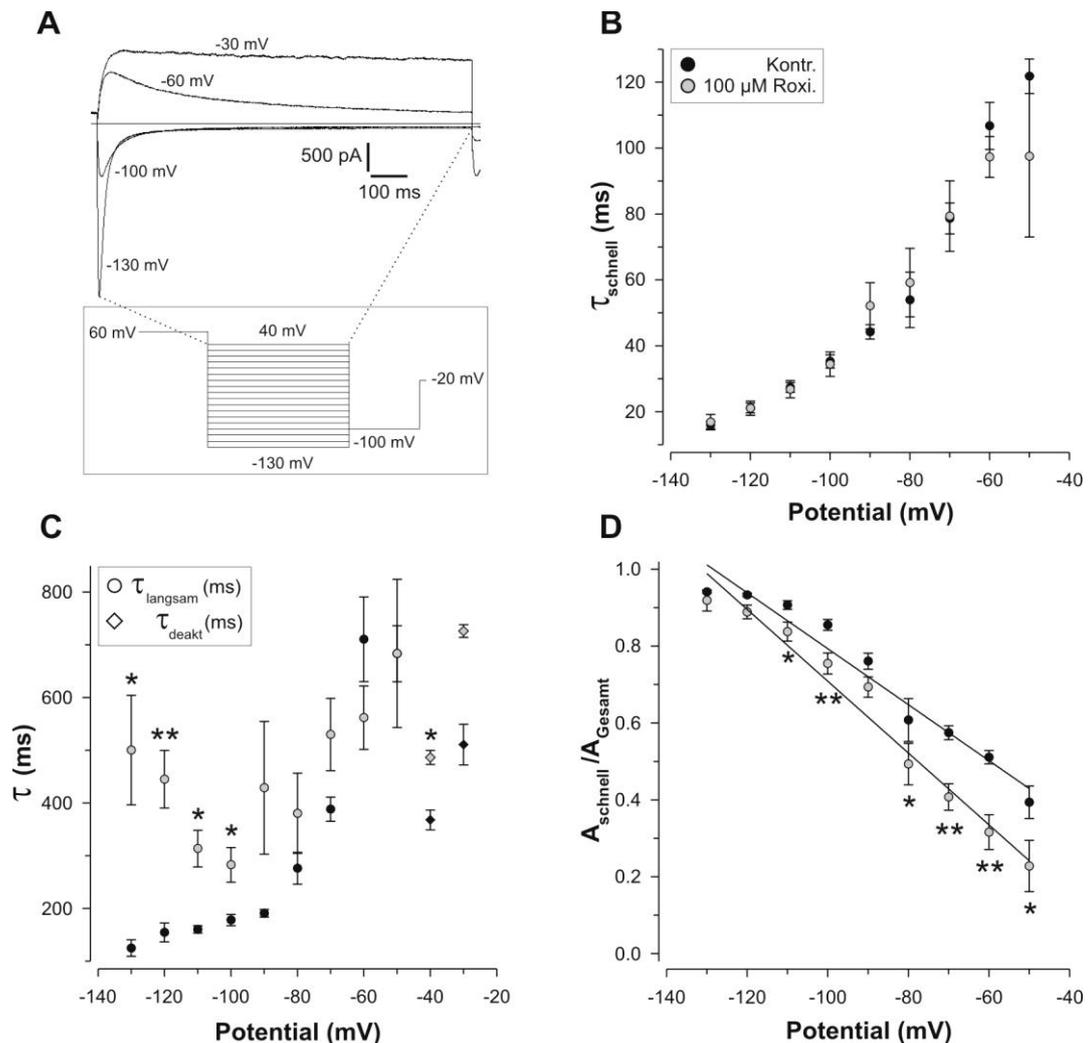


Abb. 10:

Einfluss von Roxithromycin auf die Zeitkonstanten der Deaktivierung und den Anteil der schnellen Komponente an der gesamten Deaktivierung von erg1a/1b-Kanälen.

A Auswahl an Membranströmen bei -130, -100, -60 und -30 mV, hervorgerufen durch das Deaktivierungsprotokoll im Kasten. Gezeigt ist der für die Auswertung der Zeitkonstanten relevante Bereich (gepunktete Linien).

B Zeitkonstanten der schnellen Deaktivierungskomponente: Kontrolle (schwarzer Kreis) und 100 μ M Roxithromycin (grauer Kreis).

C Zeitkonstanten der langsamen Deaktivierungskomponente: Kontrolle (schwarzer Kreis) und 100 μ M Roxithromycin (grauer Kreis) sowie Darstellung der Auswertung mit einer Zeitkonstanten bei den Potentialen -30 und -40 mV: Kontrolle (schwarzer Diamant) und 100 μ M Roxithromycin (grauer Diamant).

D Anteil der schnellen Komponente an der gesamten Deaktivierung unter Kontrollbedingungen (schwarzer Kreis) und unter 100 μ M Roxithromycin (grauer Kreis; n=5).

Mit der Abb. 10 und der Tab. 4 wurde eine Übersicht über die Zeitkonstanten und das Verhältnis der Deaktivierungskomponenten zueinander geliefert. In Abb. 10A wurden zur Orientierung ausgewählte Stromspuren des interessierenden Auswertungsbereichs des Protokolls dargestellt. Den einzelnen Stromspuren wurde wie in 3.4.5 des Kapitels „Material und Methoden“ beschrieben eine entsprechende Exponentialfunktion angeeignet. Durch Auftragung der Zeitkonstanten gegen das zugehörige Membranpotential erhielt man in Abb. 10B und C eine Übersicht über die Änderung der Konstanten mit dem anliegenden Potential und den Einfluss des Roxithromycins auf selbige. Die schnelle Komponente (τ_{schnell}) wurde umso langsamer, je positiver das Membranpotential wurde. Durch 100 μM Roxithromycin entstanden keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollmessung. Auch die langsame Deaktivierungskomponente (τ_{langsam}) wurde unter Kontrollbedingungen mit positiverem Potential langsamer. Durch das Roxithromycin (100 μM) kam es im Potentialbereich von -130 mV bis -100 mV zu einer signifikanten Vergrößerung der Zeitkonstanten, beim Potential von -120 mV war die Veränderung hochsignifikant. Im Potentialbereich zwischen -90 und -50 mV lagen keine signifikanten Änderungen vor (Abb. 10C, Tab. 4). Die Stromspuren bei den Spannungen -40 und -30 mV wurden nur mit einer Zeitkonstanten ausgewertet und zeigten, dass Roxithromycin die Deaktivierung bei -40 mV signifikant verlangsamte.

Tabelle 4:

Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung sowie der Anteil der schnellen Komponente an der gesamten Deaktivierung unter Kontrollbedingungen und unter 100 μM Roxithromycin bei *erg1a/1b*. Bei den Potentialen von -40 und -30 mV wurde für die Deaktivierung nur jeweils eine Konstante bestimmt (Kasten). Die hellgrau unterlegten Felder zeigen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) an, die grau bzw. dunkelgrau unterlegten Felder einen hoch- bzw. höchstsignifikanten Unterschied ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM ($n=5$).

Tabelle 4

Potential (mV)	Kontrolle				100 µM Roxithromycin			
	τ Erholung (ms)	τ schnell (ms)	τ langsam τ_{deakt} (ms)	$I_{schnell} / I_{Gesamt}$	τ Erholung (ms)	τ schnell (ms)	τ langsam τ_{deakt} (ms)	$I_{schnell} / I_{Gesamt}$
-130	1,05±0,11	16,0±1,1	124,7±15,7	0,94±0,00	0,94±0,2	16,8±2,3	500,3±103,8	0,92±0,03
-120	1,36±0,12	21,1±1,5	154,4±18	0,93±0,00	1,44±0,23	21,6±2,1	445±54,6	0,89±0,02
-110	1,84±0,08	27,3±1,5	160,2±7	0,91±0,01	1,99±0,28	26,8±2,6	313,4±34,8	0,84±0,02
-100	2,44±0,19	353±2	177,8±10,7	0,86±0,01	2,65±0,41	34,4±3,7	282,6±32,9	0,75±0,03
-90	3,45±0,24	44,2±2,2	190,6±7,4	0,76±0,02	5,5±1,76	52,1±7,0	428,8±125,9	0,69±0,03
-80	4,64±0,5	53,9±8,4	276±30,1	0,61±0,06	3,36±0,9	59,2±10,4	380,3±76,1	0,49±0,05
-70	6,13±0,27	78,6±4,7	388,2±22,8	0,57±0,02	6,11±0,53	79,3±10,7	529,8±68,6	0,41±0,03
-60	8,14±0,27	106,7±7,1	710,4±80,4	0,51±0,02	8,32±0,77	97,3±6,2	561,8±60,2	0,32±0,05
-50	10,3±0,54	121,8±5,2	683±53,2	0,39±0,04	9,78±0,68	97,5±24,5	683,5±140,5	0,23±0,07
-40	12,14±0,33	-	376,8±18,9	-	11,76±0,77	-	486,3±13,3	-
-30	14,06±0,57	-	510,6±38,5	-	12,09±0,77	-	726±12	-
-20	14,72±0,6	-	-	-	12,16±0,69	-	-	-
-10	14,52±0,82	-	-	-	11,66±0,72	-	-	-
0	13,46±0,54	-	-	-	9,75±0,81	-	-	-
10	12,8±0,7	-	-	-	9,94±0,27	-	-	-
20	10,67±0,77	-	-	-	9,4±0,74	-	-	-
30	9,62±0,58	-	-	-	8,25±0,68	-	-	-
40	7,33±0,41	-	-	-	6,03±1,03	-	-	-

Bei Blindversuchen, die Aufschluss über die Änderung der Deaktivierungskinetik unter 0,1 % DMSO geben sollten, konnte gezeigt werden, dass sich die Kinetik der schnellen Komponente außer bei Potentialen von -70 und -60 mV nicht signifikant änderte (Tab. 5). Bei diesen Potentialen kam es jeweils zu einer Vergrößerung von τ_{schnell} um je circa 7 ms, bei -60 mV war die Änderung hochsignifikant ($n=3$; $p=0,0070$). Die Zeitkonstante der langsamen Komponente wurde im Vergleich zu den Ausgangswerten teilweise schneller im Bereich negativer Potentiale (Tab. 5), bei -130 mV unterschritt die Verkleinerung von τ_{langsam} das Signifikanzniveau ($p<0,05$). Bei den Potentialen von -70 und -60 mV kam es zu Verlängerungen der Zeitkonstanten um jeweils circa 36 ms ($p<0,05$).

Mit der Abb. 10D wurde der Anteil der schnellen Deaktivierungskomponente am gesamten Deaktivierungsprozess dargestellt. Sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Roxithromycin-Einfluss nahm dieser ab, je positiver das Potential wurde. Beim Potential von -130 mV lag der Anteil bei $0,94\pm 0,00$ unter Kontrollbedingungen und bei $0,92\pm 0,03$ in Anwesenheit von Roxithromycin ($n=5$; $p>0,05$), bei -50 mV sank er auf $0,39\pm 0,04$ und auf $0,23\pm 0,07$ ($p<0,05$). In den entsprechenden Blindmessungen mit 0,1 % DMSO unterschieden sich die Werte nicht signifikant, die Werte beim Potential von -50 mV bildeten eine Ausnahme. Hier nahm der Anteil der schnellen Komponente von $0,47\pm 0,03$ auf $0,41\pm 0,04$ ab ($p<0,01$, Tab. 5). Bei den Potentialen, bei denen durch Roxithromycin eine signifikante bzw. hochsignifikante Abnahme erzielt wurde (-110, -100, -80, -70, -60, -50 mV; Abb. 10D, Tab. 4), wurden die Ausmaße der Veränderungen nach Roxithromycin mit denen nach DMSO als ungepaarte Stichproben verglichen. Dabei unterschritten die Irrtumswahrscheinlichkeiten bei allen obengenannten Potentialen – mit Ausnahme von -80 mV – das Signifikanzniveau ($p<0,05$). Die Unterschiede bei -50 mV waren höchstsignifikant ($p=0,0004$).

Tabelle 5:

Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung sowie der Anteil der schnellen Komponente an der gesamten Deaktivierung unter Kontrollbedingungen und unter 0,1 % DMSO bei erg1a/1b. Bei den Potentialen von -30, -20 und -10 mV wurde für die Deaktivierung nur jeweils eine Konstante bestimmt (Kasten). Die hellgrau unterlegten Felder zeigen einen signifikanten Unterschied ($p<0,05$) an, die dunkelgrau unterlegten Felder einen hochsignifikanten Unterschied ($p<0,01$). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM ($n=3$).

Tabelle 5

Potential (mV)	Kontrolle				0,1 % DMSO			
	τ Erholung (ms)	τ schnell (ms)	τ langsam τ_{deakt} (ms)	I schnell / I Gesamt	τ recovery (ms)	τ schnell (ms)	τ langsam τ_{deakt} (ms)	I schnell / I Gesamt
-130	0,70±0,06	14,0±2,1	181,7±12,7	0,96±0,01	0,53±0,10	12,9±2,5	132,7±22,0	0,97±0,01
-120	0,81±0,08	17,8±2,7	151,3±3,7	0,94±0,01	0,78±0,05	16,7±3,1	115,4±20,5	0,96±0,02
-110	1,04±0,06	23,3±3,2	171,3±5,2	0,93±0,01	1,02±0,04	23,3±4,1	187,7±9,2	0,95±0,01
-100	1,43±0,08	27,6±3,7	147±11,0	0,86±0,02	1,35±0,02	29,2±3,7	192,3±36,8	0,90±0,04
-90	1,86±0,10	33,6±4,1	155,7±5,2	0,78±0,04	1,85±0,08	35,2±6,1	147,3±31,4	0,77±0,02
-80	2,49±0,16	38,6±3,9	202,7±10,7	0,74±0,14	1,32±0,54	27,1±10,5	222,7±52,7	0,41±0,17
-70	3,27±0,32	51,8±2,8	273,3±22,7	0,60±0,04	3,12±0,24	58,7±1,7	309±15,3	0,59±0,03
-60	4,42±0,45	60,5±2,5	367± 28,6	0,53±0,04	4,31±0,37	67,4±3,0	403,7±31,0	0,49±0,01
-50	5,67±0,50	71,3±3,0	438,3±35,6	0,47±0,03	5,57±0,49	75±5,4	465,3±22,8	0,41±0,04
-40	7,05±0,48	84,4±5,2	458,3±26,9	0,41±0,03	6,82±0,50	96,3±4,4	513,7±18,5	0,37±0,05
-30	8,4±0,50	-	273,7±32,0	-	8,22±0,52	-	307,3±25,8	-
-20	9,72±0,26	-	285,7±17,0	-	9,28±0,19	-	345,7±25,9	-
-10	10,12±0,43	-	363,3±32,3	-	9,37±0,39	-	325±51,4	-
0	10,04±0,76	-	-	-	9,21±0,68	-	-	-
10	9,53±0,77	-	-	-	8,65±0,47	-	-	-
20	7,47±0,71	-	-	-	7,27±0,77	-	-	-
30	5,61±0,16	-	-	-	6,28±0,39	-	-	-
40	4,71±0,30	-	-	-	4,93±0,44	-	-	-

Durch den Einfluss von 100 μM Roxithromycin wurde insgesamt eine Verlangsamung des Deaktivierungsprozesses in toto bewirkt, indem die langsame Deaktivierungskonstante verlängert und der relative Anteil der schnellen Komponente reduziert wurde.

Diese Verlangsamung der Deaktivierung konnte besonders deutlich beim Vergleich von Kontroll- mit Roxithromycin-Stromspuren beobachtet werden, die bei relativ positiven Potentialen (≥ -50 mV) aufgezeichnet wurden. Da in diesen Spannungsbereichen die Spuren durch immer weniger Kinetik geprägt waren, konnte die PulseFit-Software diese kaum noch auswerten, sodass für *erg1a/1b* in den Roxithromycin-Versuchen bei Raumtemperatur teilweise schon ab -20 mV und positiver keine Daten vorliegen. Entsprechendes gilt für die Auswertungen in den nachfolgenden Abschnitten.

Erhöhte Temperaturen führten bei *erg1a/1b* zu einer Beschleunigung der Kinetik und einer halbmaximalen Deaktivierung, die bei positiveren Spannungen erreicht wurde als bei Raumtemperatur (Abb. 11). Auch bei Temperaturen von $28,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ($n=4$) bewirkte eine Konzentration von 100 μM Roxithromycin eine Inhibition der Tail-Stromamplitude des Deaktivierungsstromes. Die Inhibition lag bei $51,1 \pm 6,3$ % und unterschied sich zu der bei Raumtemperatur ($59,4 \pm 7,0$ %, Tab. 7) nicht signifikant ($p=0,4209$).

Die halbmaximale Deaktivierung verschob sich nicht signifikant. Unter Kontrollbedingungen betrug sie $-43,3 \pm 3,4$ mV, unter Roxithromycin betrug $V_{0,5}$ $-48,8 \pm 3,6$ mV ($p=0,0637$). Der Steigungsfaktor änderte sich ebenfalls nicht signifikant von $7,8 \pm 0,2$ mV auf $7,4 \pm 0,7$ mV ($p=0,5917$).

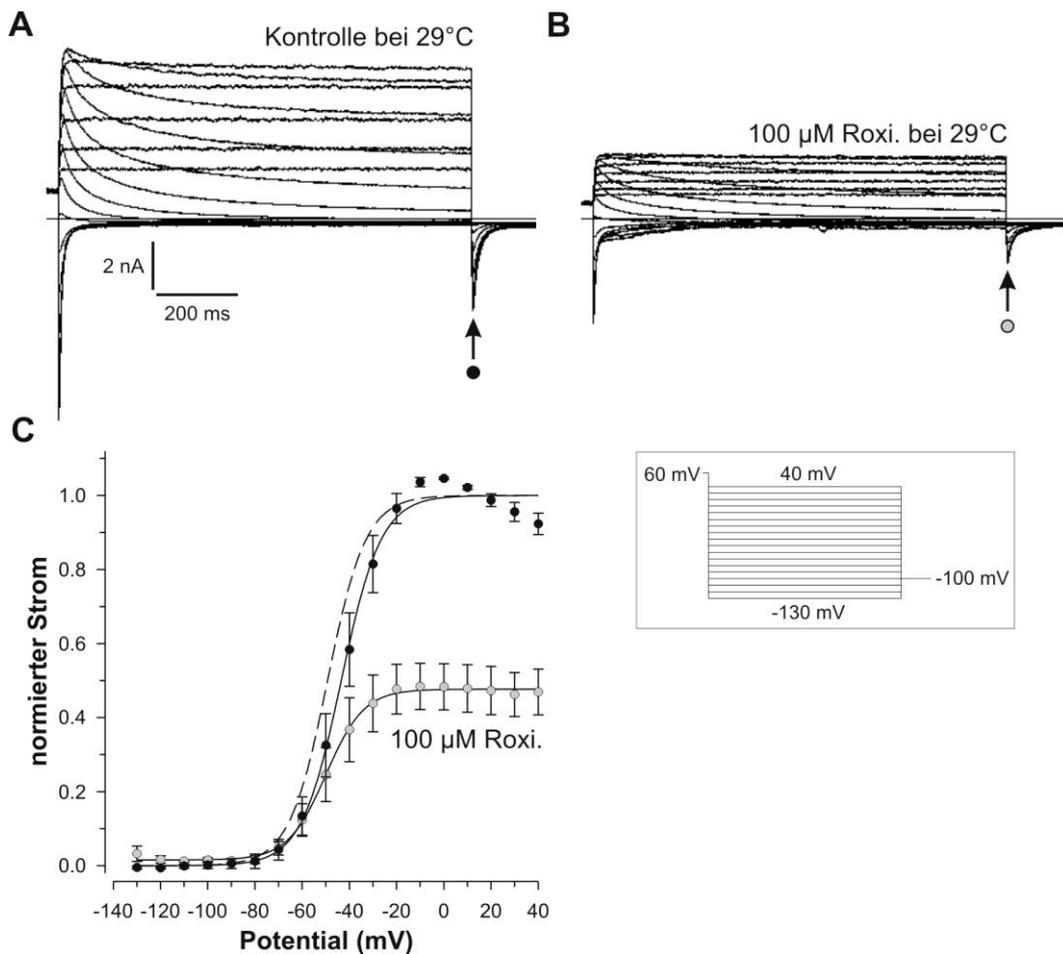


Abb. 11:

Einfluss von Roxithromycin auf die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung von *erg1a/1b* bei erhöhter Temperatur. Darstellung anhand der Tail-Stromamplituden.

A Membranströme unter Kontrollbedingungen bei 29°C, gemessen mit im Kasten gezeigten Pulsprotokoll.

B Membranströme unter dem Einfluss von 100 μM Roxithromycin bei 29°C, Protokoll wie in A.

C Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung: Auftragung des maximalen Einwärtsstromes beim Nachpuls auf -100 mV gegen das Potential des Vorpulses, die Pfeile in A und B markieren den in C ausgewerteten Bereich. Für die Kontrolle (schwarzer Kreis) ergibt sich $V_{0,5} = -43,3 \pm 3,4$ mV, unter 100 μM Roxithromycin (grauer Kreis und unterbrochene Linie) liegt $V_{0,5}$ bei $-48,8 \pm 3,6$ mV ($p > 0,05$). Der Steigungsfaktor von $7,8 \pm 0,2$ mV sinkt nicht signifikant auf $7,4 \pm 0,7$ mV ($n=4$; $p > 0,05$).

Tabelle 6:

Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung sowie der Anteil der schnellen Komponente an der gesamten Deaktivierung bei $28,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ unter Kontrollbedingungen und unter $100 \mu\text{M}$ Roxithromycin bei erg1a/1b. Bei den Potentialen von -30 und -20 mV wurde für die Deaktivierung nur jeweils eine Konstante bestimmt (Kasten). Die hellgrau unterlegten Felder zeigen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) an, die dunkelgrau unterlegten Felder einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,01$). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM ($n=4$).

Tabelle 6

Potential (mV)	Kontrolle				100 μ M Roxithromycin			
	τ Erholung (ms)	τ schnell (ms)	τ langsam τ_{deakt} (ms)	$I_{schnell} / I_{Gesamt}$	τ Erholung (ms)	τ schnell (ms)	τ langsam τ_{deakt} (ms)	$I_{schnell} / I_{Gesamt}$
-130	0,51 \pm 0,27	6,6 \pm 0,7	64,4 \pm 11,0	0,94 \pm 0,02	0,57 \pm 0,35	5,4 \pm 0,8	131,2 \pm 28,5	0,84 \pm 0,03
-120	0,45 \pm 0,04	8,5 \pm 0,8	75,5 \pm 16,3	0,93 \pm 0,02	0,45 \pm 0,07	8,0 \pm 0,9	141 \pm 19,9	0,80 \pm 0,03
-110	0,59 \pm 0,05	11,0 \pm 0,9	64,3 \pm 2,1	0,95 \pm 0,06	0,67 \pm 0,10	10,7 \pm 1,1	111,9 \pm 10,1	0,72 \pm 0,04
-100	0,84 \pm 0,11	14,6 \pm 1,5	67,2 \pm 6,3	0,83 \pm 0,01	1,03 \pm 0,16	15,4 \pm 2,5	128,8 \pm 29,9	0,66 \pm 0,08
-90	1,12 \pm 0,18	17,4 \pm 1,4	74,3 \pm 5,8	0,70 \pm 0,03	1,46 \pm 0,37	21,2 \pm 5,3	215,9 \pm 102,7	0,62 \pm 0,02
-80	1,6 \pm 0,22	32,9 \pm 1,1	154,3 \pm 22,5	0,69 \pm 0,02	1,46 \pm 0,23	46,3 \pm 5,4	465,3 \pm 216,1	0,48 \pm 0,04
-70	2,01 \pm 0,33	35,3 \pm 4,7	191,5 \pm 29,2	0,58 \pm 0,02	2,20 \pm 0,26	40,0 \pm 9,2	265,3 \pm 41,0	0,38 \pm 0,04
-60	2,57 \pm 0,38	45,1 \pm 6,9	283,8 \pm 38,8	0,50 \pm 0,04	2,71 \pm 0,36	52,1 \pm 10,4	380,8 \pm 57,8	0,32 \pm 0,06
-50	3,20 \pm 0,45	61,1 \pm 10,9	395,3 \pm 47,8	0,43 \pm 0,06	3,32 \pm 0,39	50,2 \pm 4,5	392 \pm 30,4	0,27 \pm 0,07
-40	3,83 \pm 0,47	61,3 \pm 11,3	402,3 \pm 59,0	0,42 \pm 0,05	3,69 \pm 0,34	56,4 \pm 0,6	414 \pm 42	0,24 \pm 0,01
-30	4,38 \pm 0,45	-	287,5 \pm 54,3	-	4,06 \pm 0,38	-	325 \pm 63,7	-
-20	4,93 \pm 0,43	-	317,5 \pm 62,4	-	4,31 \pm 0,32	-	551,7 \pm 169,0	-
-10	5,01 \pm 0,33	-	-	-	4,32 \pm 0,36	-	-	-
0	5,01 \pm 0,29	-	-	-	3,63 \pm 0,26	-	-	-
10	4,77 \pm 0,38	-	-	-	3,30 \pm 0,13	-	-	-
20	4,35 \pm 0,26	-	-	-	2,59 \pm 0,09	-	-	-
30	2,93 \pm 0,32	-	-	-	2,09 \pm 0,17	-	-	-
40	2,3 \pm 0,23	-	-	-	2,00 \pm 0,27	-	-	-

Der Einfluss Roxithromycins auf die Kinetik der Deaktivierung bei erhöhter Temperatur ähnelte dem bei Raumtemperatur.

Die schnelle Komponente der Deaktivierung wurde mit positiverem Potential auch bei höherer Temperatur immer langsamer, und 100 μM Roxithromycin bewirkte keine signifikante Veränderung (Tab. 6). Auf die langsame Komponente hatte es aber sehr wohl einen Einfluss. Besonders im Bereich der negativen Potentiale (-130, -120 und -110 mV) fand eine mindestens signifikante Veränderung statt. Zum Vergleich wurde beim Potential von -130 mV τ_{langsam} bei Raumtemperatur von $124,7 \pm 15,7$ ms unter Kontrollbedingungen auf $500,3 \pm 103,8$ ms unter Roxithromycin ($n=5$; $p<0,05$) und bei $28,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ von $64,4 \pm 11,0$ ms auf $131,2 \pm 28,5$ ms ($n=4$; $p<0,05$) verlängert.

Auch bei erhöhter Temperatur nahm der Anteil der schnellen Komponente an der Gesamtdeaktivierung besonders im Potentialbereich von -80 mV und positiver unter Roxithromycin signifikant ab. Die Werte wurden in Tabelle 6 zusammengefasst. Um zu untersuchen, ob sich der Roxithromycin-Effekt bei erhöhter Temperatur von dem bei Raumtemperatur unterschied, wurden die Ausprägungen der jeweiligen Veränderungen als ungepaarte Stichproben gegeneinander getestet. Untersucht wurden die Ergebnisse bei den Potentialen, bei denen übereinstimmend eine mindestens signifikante Verminderung des relativen Anteils der schnellen Komponente vorlag, also bei -80 mV und positiver. Es konnten bei diesem Vergleich keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

4.1.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Die Verhältniswerte zwischen der Konzentration eines Wirkstoffes in Bezug auf die durch ihn ausgelösten Reaktionen ergeben die Dosis-Wirkungs-Kurve.

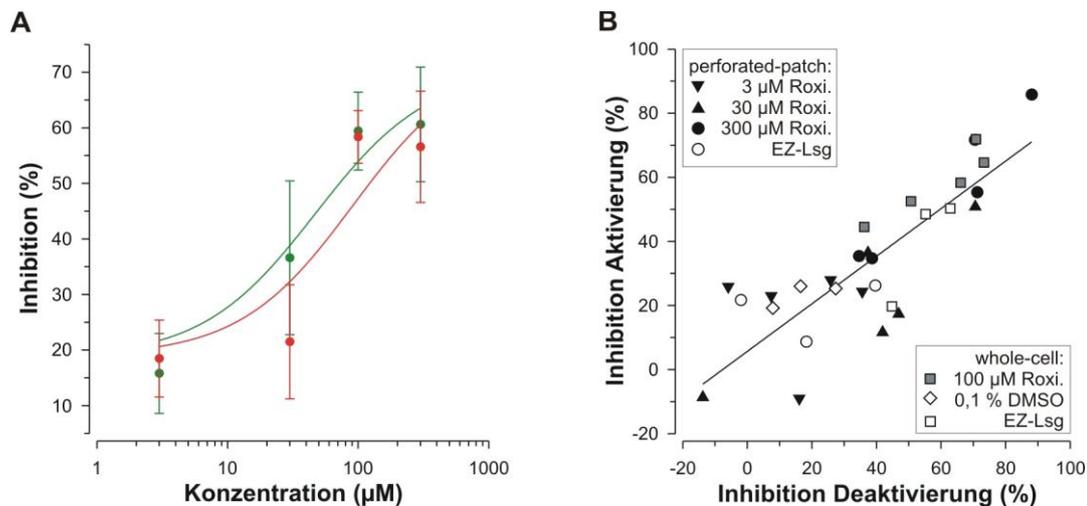


Abb. 12:

Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Roxithromycin auf *erg1a/1b*-Kanäle.

A Dosis-Wirkungs-Kurve: Tail-Strominhibition im Aktivierungs- (rot) und Deaktivierungsprotokoll (grün), aufgetragen gegen die Konzentration (3, 30, 100 und 300 µM), unterlegt mit einer Hill-Funktion (Perforated-patch-Modus und konventionelle Whole-cell-Konfiguration; je Konzentration n=5).

B Einzelversuche: Inhibition des Tail-Stromes des Deaktivierungsprotokolls gegen die des Aktivierungsprotokolls aufgetragen. Konzentrationen: 3, 30, 100 und 300 µM (je n=5), Blindversuche in Whole-cell-Konfiguration (je n=3) und im Perforated-patch-Modus („rundown“; n=3). Die Symbollegende befindet sich in den Kästchen. Durch die Ergebnisse wurde eine lineare Regression gelegt ($a=0,74$).

Für die Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Roxithromycin auf *erg1a/1b*-Kanäle wurde sowohl im Perforated-patch-Modus mit Perfusionsystem als auch in konventioneller Whole-cell-Konfiguration mit Applikation der Substanzen gemessen. Die Experimente mit 3, 30 und 300 µM und zum Teil mit 100 µM Roxithromycin sind im Perforated-patch-Modus durchgeführt worden, um möglichst stabile Versuchsbedingungen zu erreichen.

Dem in den Blindexperimenten (im Perforated-patch-Modus mit extrazellulärer Lösung) gemessenen „rundown“, den die Zellen während der Versuchsdurchführung zwangsweise durchliefen, wurde Rechnung getragen, indem er vor Auftragen der Inhibition gegen die Konzentration in Abb. 12A als y_0 (Aktivierung: $y_0=18,9$; Deaktivierung: $y_0=18,6$; n=3) festgelegt wurde.

Tabelle 7:

Inhibition der Ströme in den verschiedenen Protokollen, Konzentration für den halbmaximalen Effekt und Hill-Koeffizient für erg1a/1b. Inhibition unter Einfluss von 3, 30, 100 und 300 μM Roxithromycin. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM (je $n=5$).

C (μM)	Aktivierung	Deaktivierung
	Inhibition der Tail-Stromamplitude (%)	
3	18,5 \pm 6,9	15,8 \pm 7,2
30	21,5 \pm 10,3	36,6 \pm 13,8
100	58,4 \pm 4,7	59,4 \pm 7,0
300	56,6 \pm 10,0	60,6 \pm 10,3
EC ₅₀ (μM)	91,7	47,1
h	1	1

Zwischen der Konzentrationszunahme in der Versuchsanordnung und dem inhibitorischen Effekt bestand keine lineare Beziehung. Der sigmoidale Kurvenverlauf entstand durch halblogarithmisches Auftragen der Konzentrationen auf der Abszisse. Ab einer bestimmten Konzentration erfuhr die Kurve eine Abflachung, was auf eine eintretende Sättigung des Effekts hinwies. Zur Beschreibung dieses Effektes wurde eine Hill-Funktion benutzt. Die Ergebnisse zeigten zudem, dass Unterschiede in der blockierenden Potenz von Roxithromycin bezüglich der unterschiedlichen Protokolle bestanden. Wie man Abb. 12A und Tab. 7 entnehmen kann, lag die durch das Aktivierungsprotokoll ermittelte halbmaximale Inhibition bei einer Konzentration von 91,7 μM , aus dem Deaktivierungsprotokoll folgte $\text{EC}_{50}=47,1 \mu\text{M}$. Auch die lineare Regression in Abb. 12B weist eine Steigung auf, die <1 ist ($a=0,74$), was bedeutet, dass im Aktivierungsprotokoll eine geringere Inhibition beobachtet wurde.

Durch Auswertung der Tail-Stromamplituden konnten exemplarisch für eine Konzentration von 100 μM Roxithromycin Inhibitionen von 58,4 \pm 4,7 % ($p<0,001$) und 59,4 \pm 7 % ($p<0,01$) erreicht werden ($n=5$; Tab. 7).

4.1.4 Inaktivierung

Als Inaktivierung von erg-Kanälen wird der Übergang von einem offenen stromführenden Zustand in den inaktivierten Zustand bezeichnet. Obwohl der Kanal in einer Konformation

vorliegt, in der das Aktivierungstor offen ist, ist er nicht in der Lage, Strom zu leiten (Vandenberg et al., 2003). Um den Einfluss Roxithromycins auf die Inaktivierung zu charakterisieren, wurde das sog. „steady-state“-Inaktivierungsprotokoll durchgeführt.

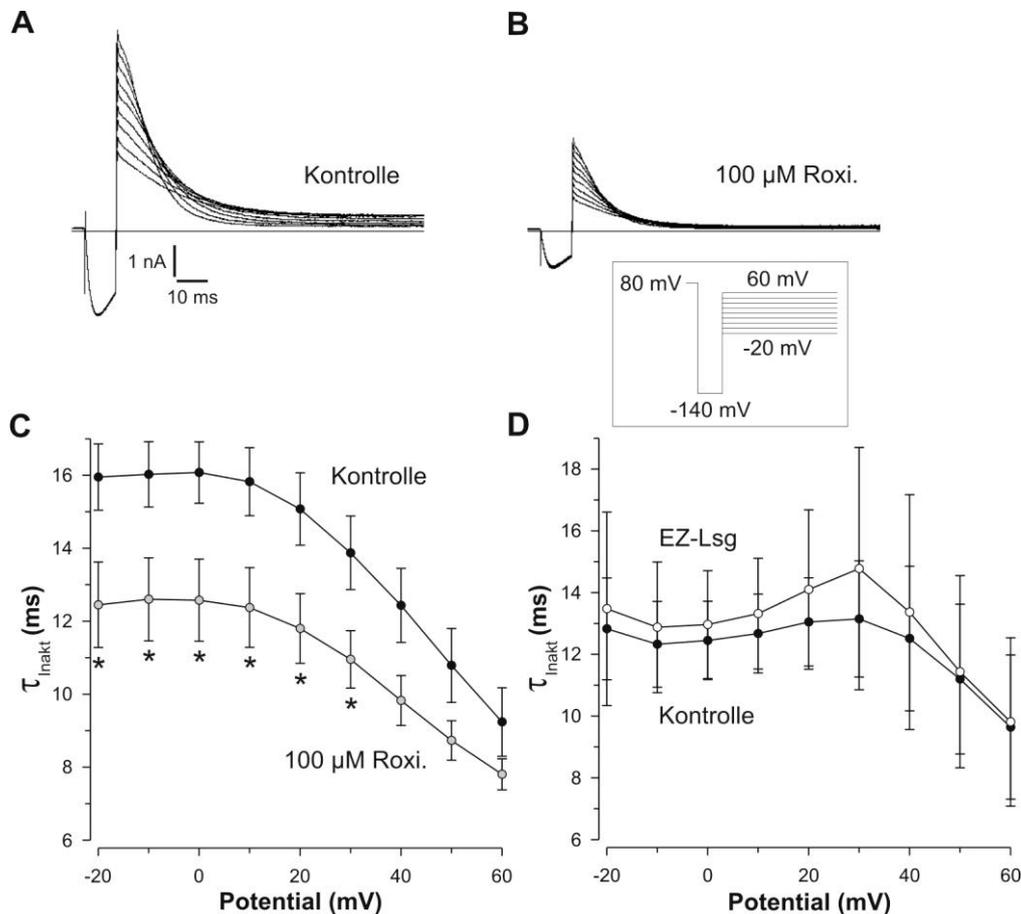


Abb. 13:

Einfluss von Roxithromycin auf die Zeitkonstanten der Inaktivierung von *erg1a/1b*-Kanälen.

A Membranströme unter Kontrollbedingungen als Antwort auf das im Kästchen gezeigte Protokoll, gemessen in konventioneller Whole-cell-Konfiguration.

B Membranströme unter dem Einfluss von 100 μM Roxithromycin, Protokoll und Methode wie in A.

C Zeitkonstanten der Inaktivierung: τ_{Inakt} unter Kontrollbedingungen (schwarzer Kreis) und unter 100 μM Roxithromycin (grauer Kreis) gegen das Pulspotential aufgetragen (n=4).

D Zeitkonstanten der Inaktivierung im Blindversuch: τ_{Inakt} unter Kontrollbedingungen (schwarzer Kreis) und extrazellulärer Lösung (weißer Kreis) gegen das Pulspotential aufgetragen (n=4).

In Abb. 13A und B wurden repräsentative Stromspuren unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluss von 100 μ M Roxithromycin abgebildet. Durch die Depolarisation auf +80 mV wurde dafür gesorgt, dass sich möglichst viele Kanäle im inaktivierten Zustand befanden, denen der Sprung auf -140 mV eine Erholung von der Inaktivierung gestattete. Während dieses Pulses waren diese Kanäle offen, und nur ein geringer Anteil konnte aufgrund der kurzen Dauer (10 ms) schon in den deaktivierten Zustand zurückkehren, sodass im nachfolgenden Protokollabschnitt große transiente Ströme aufgezeichnet wurden. Die Abnahme der Stromamplituden war durch die einsetzende Inaktivierung bedingt. Je weniger man die Zellen in diesem Abschnitt depolarisierte, desto kleiner wurde die Triebkraft für den Ausstrom, die Amplitude nahm ab. Durch Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an den Verlauf der Stromkurven konnten die Zeitkonstanten der Inaktivierung bestimmt werden. Die Abb. 13B deutet an, dass unter dem Einfluss von Roxithromycin eine stärkere „steady-state“-Inaktivierung vorliegt. Dies führte dazu, dass die Amplitude des Stromes am Ende des dritten Pulses – des sog. „steady-state“-Stromes – sehr klein war und bei allen Potentialen ähnlich.

Die gemittelten Werte für die Zeitkonstanten der Inaktivierung wurden in Abb. 13C gegen das Potential des Pulses dargestellt. Bei einem Membranpotential von -20 mV lagen die Konstanten bei $\tau_{\text{Kontrolle}}=15,95\pm 0,91$ ms und $\tau_{\text{Roxithromycin}}=12,45\pm 1,17$ ms ($n=4$; $p<0,05$; Tab. 8). Im Vergleich dazu waren die Zeitkonstanten bei einem Membranpotential von +60 mV deutlich kleiner: $\tau_{\text{Kontrolle}}=9,24\pm 0,94$ ms und $\tau_{\text{Roxithromycin}}=7,8\pm 0,42$ ms ($p>0,05$). Im Bereich positiver Membranpotentiale verlief die Inaktivierung schneller als bei negativen Potentialen. Der Einfluss von Roxithromycin bewirkte eine Verringerung der Inaktivierungszeitkonstanten bei allen Membranpotentialen, der Unterschied war bei Potentialen zwischen -20 und +30 mV statistisch signifikant ($p<0,05$; Abb. 13C, Tab. 8).

Tabelle 8:

Zeitkonstanten der Inaktivierung von erg1a/1b unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluss von 100 μM Roxithromycin. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit p ($n=4$).

Potential (mV)	Kontrolle	100 μM Roxi.	p
	τ_{Inakt} (ms)	τ_{Inakt} (ms)	
-20	15,95 \pm 0,91	12,45 \pm 1,17	0,0104 *
-10	16,03 \pm 0,90	12,6 \pm 1,14	0,0132 *
0	16,08 \pm 0,84	12,58 \pm 1,13	0,0146 *
10	15,83 \pm 0,93	12,38 \pm 1,09	0,0296 *
20	15,08 \pm 0,99	11,8 \pm 0,96	0,0409 *
30	13,88 \pm 1,01	10,95 \pm 0,79	0,0415 *
40	12,43 \pm 1,01	9,83 \pm 0,69	0,0733
50	10,79 \pm 1,01	8,73 \pm 0,54	0,116
60	9,24 \pm 0,94	7,80 \pm 0,42	0,1984

In den entsprechenden Blindversuchen mit extrazellulärer Lösung konnten keine signifikanten Unterschiede für die Zeitkonstanten der Inaktivierung beobachtet werden ($n=4$; $p>0,05$, Abb. 13D). Im Gegenteil wurde die Kinetik im Mittel tendenziell langsamer.

4.1.5 Erholung von der Inaktivierung

Mit Hilfe des Inaktivierungsprotokolls wurde die Erholung von der Inaktivierung näher beleuchtet. In Abb. 14A und B wurden die Stromantworten auf dieses Protokoll dargestellt. Der Depolarisation auf +80 mV, die die Inaktivierung der Kanäle zum Ziel hatte, folgte der kurze, variable Hauptpuls. Bei den negativen Membranpotentialen erfolgte die Erholung von der Inaktivierung schnell und vollständig, sodass im nächsten Abschnitt große Membranströme erzeugt werden konnten. Je positiver das Potential des variablen Pulses wurde, desto weniger Kanäle erholten sich von der Inaktivierung. Die Amplitude des nachfolgenden auswärts gerichteten Stromes nahm sukzessive ab, nachdem sie bei einem Potential von -120 mV ihr Maximum erreicht hatte. Dies galt sowohl für die Kontrolle als auch unter Einwirkung von 100 μM Roxithromycin. Bei Potentialen von -140 und -130 mV konnte das

Amplitudenmaximum nicht erreicht werden, da dadurch, dass bei diesen negativen Spannungen einige Kanäle schon während des sehr kurzen Hauptpulses inaktivierten, dieselben nicht mehr fähig waren, Strom zu leiten, um zur Größe der Amplitude beizutragen. Abb. 14C bildet diese spannungsabhängige Erholung von der Inaktivierung ab. Die Größe der Amplituden unter Roxithromycin wurde im tatsächlichen Verhältnis zu den Kontrollamplituden dargestellt (Abb. 14C, grauer Kreis). Desweiteren wurden diese Amplituden zwischen den Werten von 0 und 1 normiert. Aus diesen Normierungen wurde anschließend der Mittelwert gebildet, ohne diesen erneut zwischen 0 und 1 zu normieren (Abb. 14C, unterbrochene Linie), um eine Spannungsverschiebung des Prozesses beurteilen zu können. Verglichen wurden die Potentiale, bei denen die Inaktivierung halbmaximal war. Um diese Potentialwerte zu erhalten, wurde durch die beiden Messpunkte, deren Ordinatenwerte den halbmaximalen Strom säumten, eine lineare Regression gelegt. Dies war möglich, da in diesem Bereich eine lineare Beziehung bestand. Anhand dieser Funktion konnte die halbmaximale Inaktivierung errechnet werden. Roxithromycin bewirkte keine statistisch signifikante Verschiebung der halbmaximalen Inaktivierung von $-65,9 \pm 2,3$ mV auf $-73,4 \pm 2,4$ mV ($n=4$; $p>0,05$). Die Stromamplitude wurde beim Potential von -120 mV um $45,1 \pm 10,3$ % ($p<0,05$) inhibiert. Anhand der Abb. 14C läßt sich unter Roxithromycin-Einfluss eine Veränderung, die sich bereits in Abb. 13B andeutende, feststellen: Im Potentialbereich von -20 bis $+60$ mV sind die Stromamplituden nach Roxithromycin-Gabe – besonders im Vergleich zur Blindmessung - deutlich kleiner als die der Kontrolle.

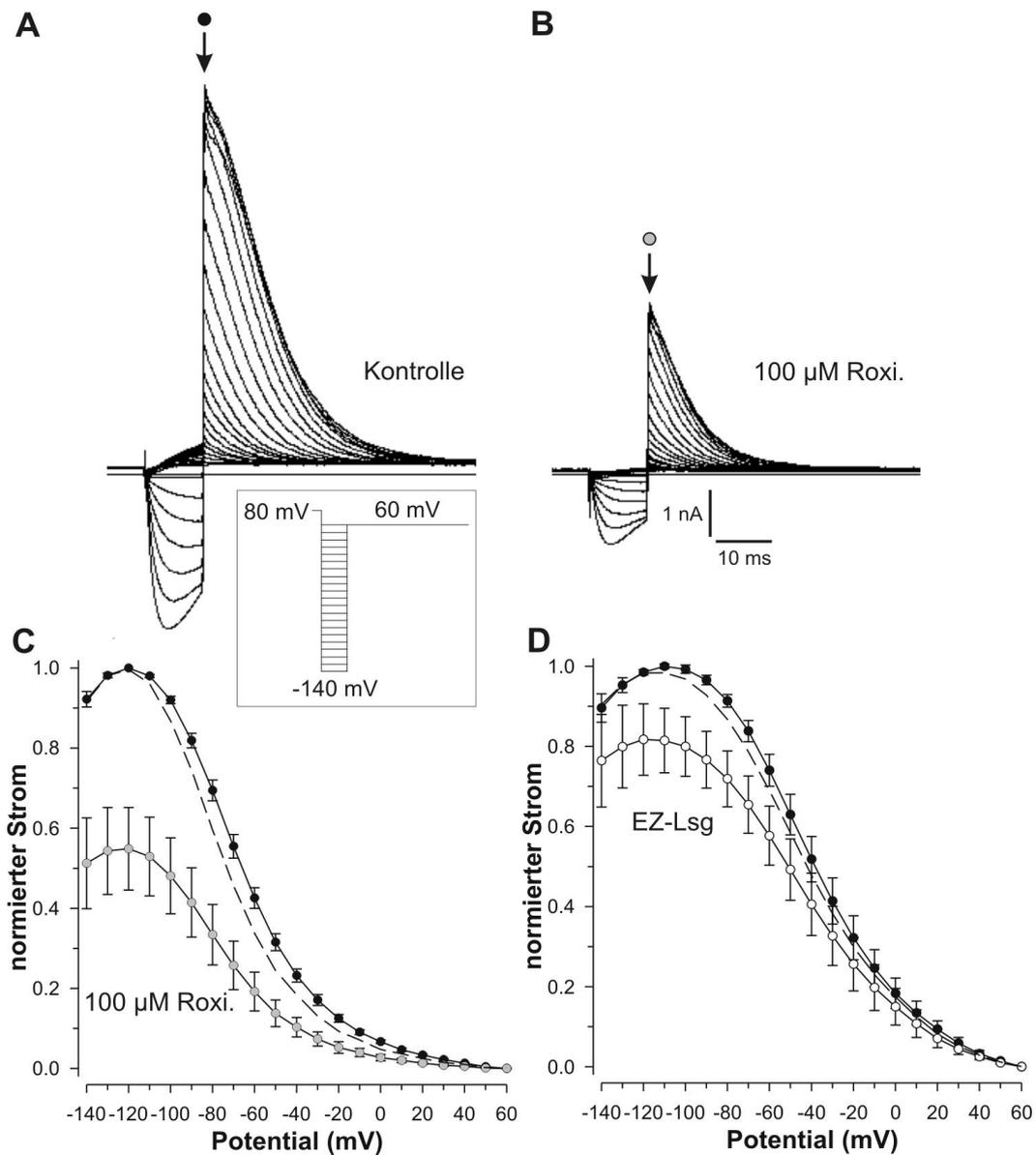


Abb. 14:

Einfluss von Roxithromycin auf die Spannungsabhängigkeit der Erholung von der Inaktivierung bei *erg1a/1b*-Kanälen.

A Stromantwort auf das im Kasten gezeigte Inaktivierungsprotokoll unter Kontrollbedingungen.

B Stromantwort unter dem Einfluss von 100 μM Roxithromycin, Protokoll wie in A.

C Auftragung der normierten Stromamplitude der Kontrolle (schwarzer Kreis) und der dazu ins Verhältnis gesetzten Amplitude unter Roxithromycin-Einfluss (grauer Kreis und unterbrochene Linie) gegen das Potential des Vorpulses ($n=4$).

D Blindversuch: Auftragung der normierten Stromamplitude der Kontrolle (schwarzer Kreis) und der dazu ins Verhältnis gesetzten Amplitude nach Applikation von extrazellulärer Lösung (weißer Kreis und unterbrochene Linie) gegen das Potential des Vorpulses ($n=4$).

In den entsprechenden Blindversuchen mit extrazellulärer Lösung (Abb. 14D) wurde beim Potential von -110 mV eine nicht signifikante Abnahme der Tail-Amplitude von $17,9 \pm 8,2$ % ($n=4$; $p>0,05$), die dem „rundown“ entsprach, beobachtet. In diesen Versuchen wurde im Mittel eine Verschiebung des Amplitudenmaximums um -10 mV festgestellt, die Verschiebung der halbmaximalen Inaktivierung betrug $-2,2 \pm 1,9$ mV und lag unterhalb des Signifikanzniveaus ($p=0,2355$).

Die Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung wurden mit Hilfe einer einfachen Exponentialfunktion bestimmt (Abb. 15A). Bei sehr negativen Potentialen erfolgte die Erholung schnell und vollständig, wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt. Je positiver das Potential wurde, desto größer wurde τ_{Erholung} . Bei einem Potential von -20 mV erreichte die Konstante unter Kontrollbedingungen ihr Maximum und wurde anschließend sukzessive wieder kleiner. Unter dem Einfluss von 100 μM Roxithromycin wurden die Zeitkonstanten im Bereich der negativen Potentiale nicht verändert, es entstanden jedoch im Bereich von -30 bis +10 mV signifikante Verkleinerungen von τ_{Erholung} , bei -20 mV war diese hochsignifikant, bei 0 mV sogar höchstsignifikant ($n=5$; Abb. 15B, Tab. 4). Im Bereich des Umkehrpotentials (etwa -80 mV) war die Auswertung der Zeitkonstanten oft nur schwer möglich, sodass es hier teilweise zu ganz unterschiedlichen Ergebnissen kam (Abb. 15B und C).

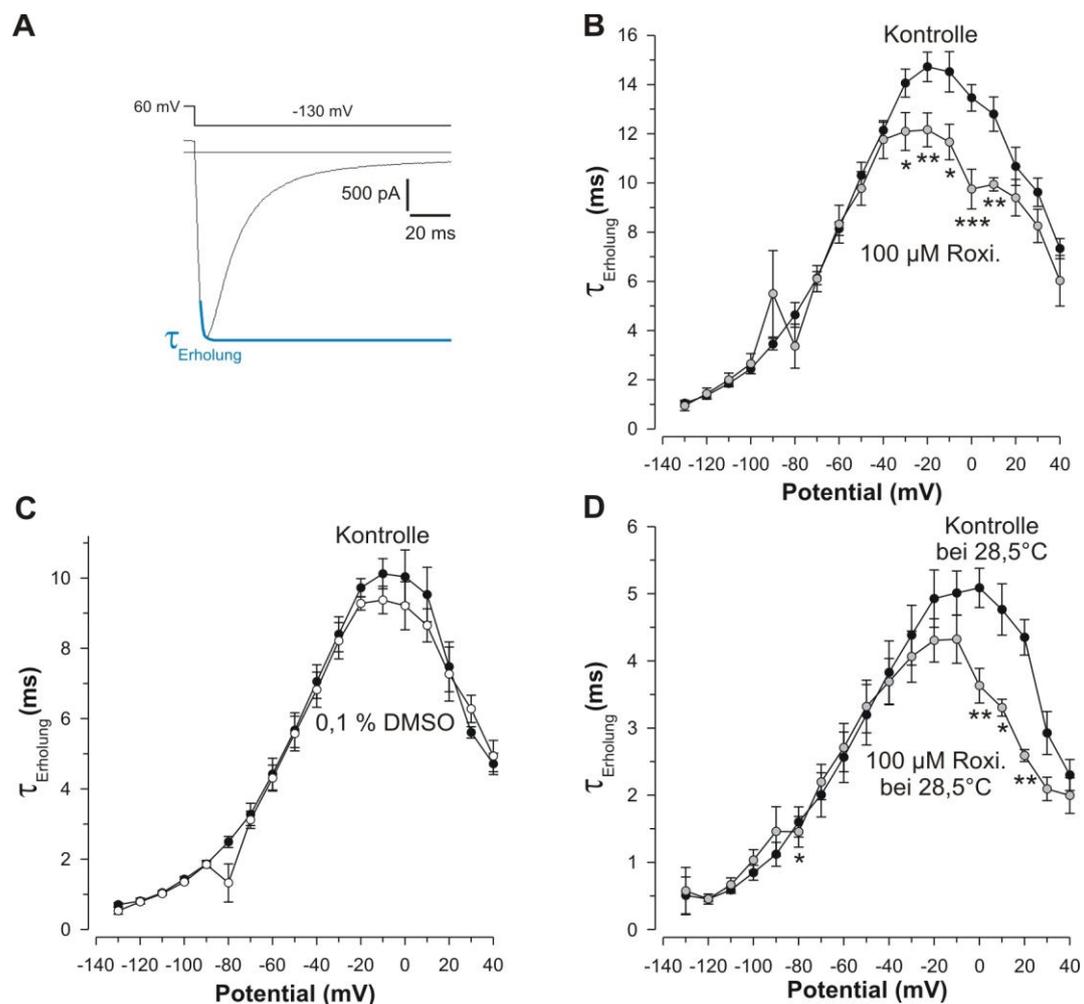


Abb. 15:

Einfluss von Roxithromycin auf die Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung von *erg1a/1b*-Kanälen.

A Ausschnitt einer Stromspur des Deaktivierungsprotokolls: τ_{Erholung} wurde mit einer Exponentialfunktion bestimmt (blaue Linie).

B Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung: τ_{Erholung} unter Kontrollbedingungen (schwarzer Kreis) und unter 100 μM Roxithromycin (grauer Kreis) gegen das Potential aufgetragen ($n=5$).

C Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung im Blindversuch: τ_{Erholung} unter Kontrollbedingungen (schwarzer Kreis) und unter 0,1 % DMSO (weißer Kreis) gegen das Potential aufgetragen ($n=3$).

D Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung bei $28,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$: τ_{Erholung} unter Kontrollbedingungen (schwarzer Kreis) und unter 100 μM Roxithromycin (grauer Kreis) gegen das Potential aufgetragen ($n=4$).

In den entsprechenden Blindversuchen mit 0,1 % DMSO kam es zu keiner signifikanten Veränderung von τ_{Erholung} , lediglich tendenziell wurden die Zeitkonstanten im Bereich von

-20 bis +10 mV kleiner (Abb. 15C). In gleichartigen Blindversuchen mit extrazellulärer Lösung (Daten nicht gezeigt), kam es ebenfalls zu einer Verkleinerung von τ_{Erholung} im Vergleich zu den Ausgangswerten im Bereich von -30 bis +20 mV. Die Veränderungen unterschritten bei -30, 0 und +10 mV das Signifikanzniveau ($n=3$; $p<0,05$). Da sich die Veränderungen nach Applikation von Roxithromycin und die nach Applikation von extrazellulärer Lösung stark ähnelten, wurde das Ausmaß der Veränderung beider Versuchsreihen gegeneinander getestet. Es resultierte nur beim Potential von +10 mV ein signifikanter Unterschied ($p=0,0367$) zwischen den jeweiligen Effekten, allerdings dahingehend, dass die Erholung von der Inaktivierung nach Applikation von extrazellulärer Lösung bei +10 mV signifikant schneller wurde als unter Roxithromycin.

Auch bei erhöhter Temperatur kam es zu ähnlichen Veränderungen. Beim Potential von +10 mV lag eine signifikante Verkleinerung vor ($n=4$; $p=0,0431$), bei 0 und +20 mV war diese hochsignifikant ($p=0,0016$ und $p=0,0091$, Abb. 15D, Tab. 6). Bei diesen Temperaturen wurden keine Blindmessungen durchgeführt, sodass das Ausmaß dieser Veränderungen nicht beurteilt werden konnten.

Insgesamt waren keine maßgeblichen Veränderungen der Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung unter Roxithromycin-Einfluss erkennbar, da entsprechende Effekte auch nach Applikation von extrazellulärer Lösung beobachtet wurden.

4.2 Konkatinerte erg1/2-Kanäle

In diesem Abschnitt der Arbeit werden die Ergebnisse der Patch-Clamp-Messungen der konkatinerten erg1/2-Kanäle beschrieben. Diese Kanäle wurden anhand des bekannten Aktivierungs-, Deaktivierungs- und Testpulsprotokolls untersucht. Die Ergebnisse für die Konkatemere wurden in Anlehnung an den Abschnitt über die heteromultimeren erg1a/1b, jedoch im Vergleich zu selbigen Ergebnissen in verkürzter Weise dargestellt.

4.2.1 Aktivierung

Auch bei den konkatinerten erg1/2-Kanälen führte der Einfluss von 100 μM Roxithromycin zu einer Linksverschiebung der spannungsabhängigen halbmaximalen Aktivierung, die anhand der Tail-Ströme ausgewertet wurde. Unter Kontrollbedingungen betrug $V_{0,5} = -20,5 \pm 2,2$ mV und unter Roxithromycin-Einwirkung lag $V_{0,5}$ bei $-29,9 \pm 4,3$ mV ($n=5$; $p<0,05$). Der Steigungsfaktor änderte sich kaum: $S_{\text{Kontrolle}} = 7,1 \pm 0,3$ mV vs.

$S_{\text{Roxithromycin}} = 7,4 \pm 0,4 \text{ mV}$ ($p > 0,05$, Tab. 9). Die Tail-Stromamplituden wurden im Mittel um $55,0 \pm 4,0 \%$ inhibiert ($p < 0,05$).

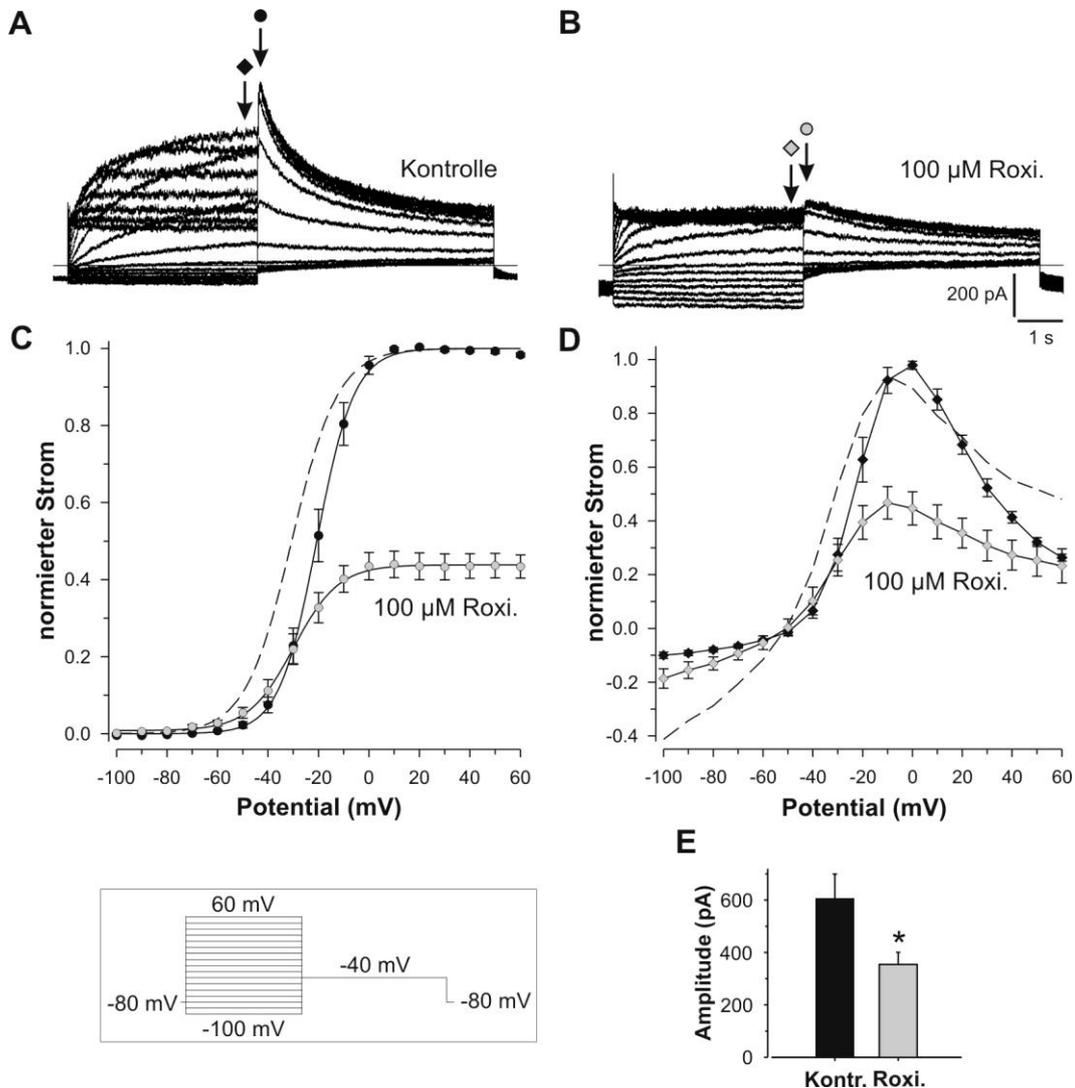


Abb. 16:

Einfluss von Roxithromycin auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von erg 1/2. Darstellung anhand der Tail-Stromamplituden und anhand des stationären Auswärtsstromes.

A Membranströme unter Kontrollbedingungen als Antwort auf das im Kasten gezeigte Pulsprotokoll. Gemessen im konventionellen Whole-cell-Modus.

B Membranströme unter dem Einfluss von 100 μM Roxithromycin, Protokoll und Methode wie in A.

C Spannungsabhängigkeit der Aktivierung: Auftragung des maximalen Auswärtsstromes beim Nachpuls auf -40 mV gegen das Potential des Vorpulses, die Pfeile mit Kreissymbol in A und B markieren den in C ausgewerteten Bereich. Für die Kontrolle (schwarzer Kreis) ergibt sich $V_{0,5} = -20,5 \pm 2,2 \text{ mV}$, unter 100 μM Roxithro-

mycin (grauer Kreis und unterbrochene Linie) liegt $V_{0,5}$ bei $-29,9 \pm 4,3$ mV ($p < 0,05$). Der Steigungsfaktor von $7,1 \pm 0,3$ mV (Kontrolle) ändert sich nicht signifikant auf $7,4 \pm 0,4$ mV unter Roxithromycin ($n=5$; $p > 0,05$).

D Auftragung der Amplituden am Ende des Vorpulses (Kontrolle: schwarzer Diamant, 100 μ M Roxithromycin: grauer Diamant und unterbrochene Linie) gegen das Potential des Vorpulses. Entsprechender Bereich in A und B durch Pfeile mit Diamantsymbol markiert.

E Inhibition: Vergleich der Amplituden des stationären Auswärtsstromes unter Kontrollbedingungen und 100 μ M Roxithromycin beim Potential vom 0 mV (Kontrolle schwarz, Roxithromycin grau; $n=5$; $p < 0,05$).

In den entsprechenden Blindmessungen mit extrazellulärer Lösung betrug die Amplitudenabnahme $19,5 \pm 10,9$ % ($n=3$; $p > 0,05$). Die halbmaximale Aktivierung erfuhr in diesen Experimenten eine ebenfalls nicht signifikante Verschiebung nach links um etwa -10 mV von $-26,9 \pm 6,9$ mV auf $-37,1 \pm 1,2$ mV ($p=0,2163$). Der Steigungsfaktor von ursprünglich $7,8 \pm 0,4$ mV stieg signifikant auf $9,6 \pm 0,8$ mV ($p=0,0462$; Daten nicht gezeigt), was auf eine Verlangsamung im Bereich der größten Dynamik hinwies.

Tabelle 9:

Halbmaximale Aktivierung und Deaktivierung, Steigungsfaktoren, Inhibitionen der Tail-Stromamplituden und Irrtumswahrscheinlichkeiten für erg 1/2 unter Kontrollbedingungen und unter 100 μ M Roxithromycin. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=5$).

	Aktivierung			Deaktivierung		
	Kontrolle	100 μ M Roxi.	p	Kontrolle	100 μ M Roxi.	p
$V_{0,5}$ (mV)	$-20,5 \pm 2,2$	$-29,9 \pm 4,3$	0,0323 *	$-50,3 \pm 4,2$	$-58,6 \pm 4,3$	0,0180 *
S (mV)	$7,1 \pm 0,3$	$7,4 \pm 0,4$	0,2680	$9,9 \pm 0,8$	$8,9 \pm 0,7$	0,0671
Inhib. (%)	-	$55,0 \pm 4,0$	0,0136 *	-	$59,9 \pm 10,3$	0,0411 *

Wie schon bei den heteromultimeren erg1a/1b-Kanälen wurden auch bei den Konkaternen die Ströme am Ende des depolarisierenden Vorpulses untersucht. Durch Auftragung der Amplituden dieses stationären Auswärtsstromes gegen das Pulspotential entstand die typische glockenförmige Kurve. Dies zeigte, dass auch die erg1/2-Kanäle eine ausgeprägte Einwärtsrektifizierung aufwiesen. Unter Kontrollbedingungen erreichte die Amplitude bei 0 mV ihr Maximum (Abb. 16D). Im Vergleich zur Kontrolle führten 100 μ M Roxithromycin

zu einer Linksverschiebung, also zu einer Verschiebung in Richtung negativer Potentiale, sodass der Maximalstrom bei -10 mV erreicht wurde (unterbrochene Linie, Abb. 16D). Sehr ausgeprägt war auch die Zunahme des Leckstromes in diesen Experimenten. Insgesamt wurde die Maximalamplitude des stationären Auswärtsstromes durch Roxithromycin um $37,9 \pm 3,6$ % inhibiert ($n=5$; $p<0,05$). In Abb. 16E wurden die Amplituden bei 0 mV unter Kontrollbedingungen und unter 100 μ M Roxithromycin zum Vergleich gezeigt. Auch bei diesem Potential wurden die Amplituden signifikant kleiner ($p=0,0119$).

In den passenden Blindversuchen wurden die Amplituden bei einem Potential von -10 mV verglichen, es konnte keine signifikante Amplitudenabnahme festgestellt werden ($n=3$; $p=0,6605$). Es kam jedoch ebenfalls zur Verschiebung in Richtung negativer Potentiale um -10 mV, sodass das Amplitudenmaximum nach Applikation von extrazellulärer Lösung bei -20 mV zu liegen kam. Insgesamt wurde die Kurve jedoch weniger stark verschoben als unter Roxithromycin.

4.2.2 Deaktivierung

Die halbmaximale Deaktivierung wurde ebenfalls in Richtung negativer Potentiale verschoben. Unter Kontrollbedingungen betrug diese $-50,3 \pm 4,2$ mV und unter dem Einfluss von 100 μ M Roxithromycin $-58,6 \pm 4,3$ mV ($n=5$; Abb. 17C). Der Unterschied war signifikant ($p=0,0180$). Die Steigung der Boltzmann-Funktion nahm durch Roxithromycin zu, jedoch nicht signifikant. Der Steigungsfaktor nahm nicht signifikant von $9,9 \pm 0,8$ mV auf $8,9 \pm 0,7$ mV ab ($p=0,0671$). Insgesamt wurde die Tail-Stromamplitude um $59,9 \pm 10,3$ % inhibiert ($p<0,05$, Tab. 9).

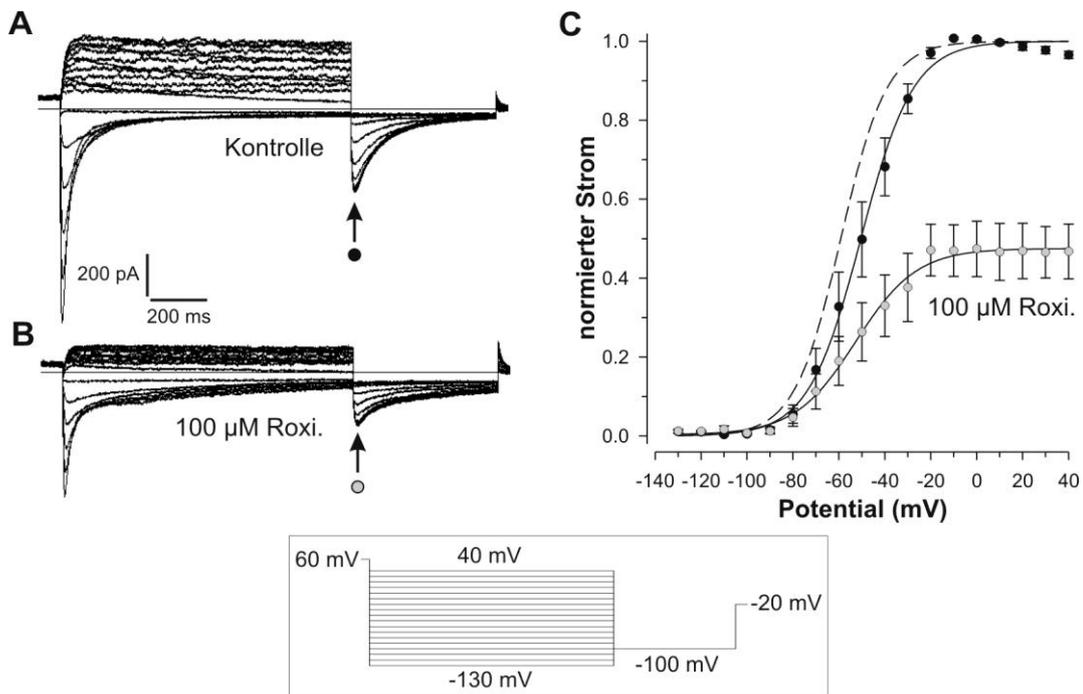


Abb. 17:

Einfluss von Roxithromycin auf die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung von *erg1/2*. Darstellung anhand der Tail-Stromamplituden.

A Membranströme unter Kontrollbedingungen, gemessen mit im Kasten gezeigten Pulsprotokoll.

B Membranströme unter dem Einfluss von 100 μM Roxithromycin, Protokoll wie in A.

C Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung: Auftragung des maximalen Einwärtsstromes beim Nachpuls auf -100 mV gegen das Potential des Vorpulses, die Pfeile in A und B markieren den in C ausgewerteten Bereich. Für die Kontrolle (schwarzer Kreis) ergibt sich $V_{0,5} = -50,3 \pm 4,2$ mV, unter 100 μM Roxithromycin (grauer Kreis und unterbrochene Linie) liegt $V_{0,5}$ bei $-58,6 \pm 4,3$ mV ($p < 0,05$). Der Steigungsfaktor von $9,9 \pm 0,8$ mV sinkt nicht signifikant auf $8,9 \pm 0,7$ mV ($n=5$; $p > 0,05$).

In den entsprechenden Blindversuchen mit extrazellulärer Lösung wurde wiederum ein „rundown“ beobachtet: Die Amplitudenabnahme betrug $29,4 \pm 7,8$ % ($n=3$; $p > 0,05$). Die halbmaximale Deaktivierung verschob sich nicht signifikant um etwa -6 mV von $-65,6 \pm 1,8$ mV auf $-71,7 \pm 1,7$ mV ($p=0,1715$). Auch in diesen Experimenten wurde wiederum eine nicht signifikante Verkleinerung des Steigungsfaktors festgestellt von $8,0 \pm 0,4$ mV auf $7,1 \pm 0,6$ mV ($p=0,0973$).

Ähnlich wie bei den heteromultimeren *erg1a/1b*-Kanälen wurde auch die Deaktivierung der Konkatemere anhand zweier Zeitkonstanten charakterisiert. Dies war bis zum Potential von -50 mV möglich.

Die Zeitkonstante der schnellen Komponente der Deaktivierung stieg, wie bereits von *erg1a/1b* bekannt, mit positiverem Potential stetig an. Unter der Einwirkung von 100 μ M Roxithromycin konnten keine Veränderungen festgestellt werden (Tab. 10).

Desweiteren kann man Tabelle 10 entnehmen, dass sich die zweite Deaktivierungskomponente im Mittel durchgehend nicht signifikant unter Roxithromycin verlangsamt. Diese Veränderung unterschritt nur bei -120 mV das Signifikanzniveau ($n=5$; $p<0,01$).

Auch der Anteil der schnellen Komponente an der Gesamtdeaktivierung war im Mittel unter Roxithromycin bei jedem Potential geringer als unter Kontrollbedingungen. Jedoch konnte nur bei den Potentialen von -80 und -50 mV ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,0259$ und $p=0,0364$).

Tabelle 10:

Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung sowie der Anteil der schnellen Komponente an der gesamten Deaktivierung unter Kontrollbedingungen und unter 100 μ M Roxithromycin bei *erg1/2*. Die hellgrau unterlegten Felder zeigen einen signifikanten Unterschied ($p<0,05$) an, die dunkelgrau unterlegten Felder einen hochsignifikanten Unterschied ($p<0,01$). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM ($n=5$).

Tabelle 10

Potential (mV)	Kontrolle				100 µM Roxithromycin			
	τ Erholung (ms)	τ schnell (ms)	τ langsam (ms)	$I_{\text{schnell}} / I_{\text{Gesamt}}$	τ Erholung (ms)	τ schnell (ms)	τ langsam (ms)	$I_{\text{schnell}} / I_{\text{Gesamt}}$
-130	1,12±0,11	17,9±2,7	142,8±32,2	0,92±0,01	1,29±0,07	20±0,6	586±182	0,84±0,09
-120	1,44±0,17	23,3±3,7	138,8±24,4	0,89±0,01	1,49±0,17	25,8±1,4	412,3±51,1	0,81±0,05
-110	1,81±0,25	31,8±6	161,6±28,3	0,85±0,01	2,24±0,3	29±3,3	429,4±144	0,75±0,05
-100	2,41±0,24	42,8±8,5	177±28,7	0,78±0,01	3,59±0,57	39,6±6,4	346,2±74,9	0,67±0,05
-90	3,73±0,33	51,3±9,7	226,8±23,1	0,66±0,05	5,06±0,69	48,8±4,5	474,5±105,3	0,51±0,11
-80	3,41±0,61	61±3,3	357±8	0,64±0,04	4,81±0,74	69,8±1,5	610±139	0,4±0,03
-70	5,95±0,47	74,9±3,8	472,8±48,6	0,52±0,09	6,58±0,9	77,6±12,5	597,8±146,7	0,4±0,06
-60	7,85±0,54	84±3,9	427,3±31	0,49±0,03	8,4±0,83	83,3±6,5	680±108,4	0,3±0,1
-50	10,07±0,51	117,3±10,5	628±104,7	0,43±0,04	10,17±0,75	113,3±22,9	708,7±184,4	0,24±0,04
-40	12,12±0,29	-	-	-	11,13±0,58	-	-	-
-30	13,62±0,44	-	-	-	12±0,48	-	-	-
-20	13,56±0,41	-	-	-	11,6±0,6	-	-	-
-10	14,14±0,64	-	-	-	12,04±0,7	-	-	-
0	12,94±0,47	-	-	-	11,35±0,71	-	-	-
10	11,35±1,06	-	-	-	8,97±0,44	-	-	-
20	10,28±0,7	-	-	-	8,31±0,62	-	-	-
30	7,76±0,76	-	-	-	7,23±0,62	-	-	-
40	6,35±1,11	-	-	-	5,97±1,03	-	-	-

Zum Vergleich wurden die Zeitkonstanten in Blindversuchen mit extrazellulärer Lösung bestimmt (Daten nicht gezeigt). Die oben beschriebenen Vergrößerungen von τ_{langsam} konnten dort nicht beobachtet werden. Der relative Anteil der schnellen Komponente nahm auch bei diesen Experimenten im Vergleich zu den Kontrollen ab, es konnte aber keine statistische Signifikanz festgestellt werden.

Insgesamt wurde die Deaktivierungskinetik der *erg1/2*-Konkatemere durch Roxithromycin verlangsamt, was rein optisch zu erkennen war (Abb. 17B). Die Verlangsamung resultierte vor allem aus der Vergrößerung von τ_{langsam} und aus der Verminderung des Anteils der schnellen Komponente an der gesamten Deaktivierung. Da die Ergebnisse in sich recht inhomogen waren, konnten lediglich wenige Messwerte das Signifikanzniveau unterschreiten.

4.2.3 Erholung von der Inaktivierung

Die Erholung von der Inaktivierung wurde auch bei *erg1/2*-Kanälen durch Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die Stromspuren des Deaktivierungsprotokolls bestimmt. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 10 zusammengefasst.

Unter Roxithromycin lagen keine ausgeprägten Veränderungen vor: Die Werte für τ_{Erholung} wurden ab einschließlich -40 mV und positiver im Mittel nicht signifikant kleiner als die Kontrollwerte. Signifikant waren die Änderungen nur bei -20 und 0 mV ($n=5$; $p<0,05$).

In Blindversuchen konnte nach Applikation von extrazellulärer Lösung in diesen Potentialbereichen zum Teil ähnliche Veränderungen beobachtet werden. Beim Potential von -20 mV kam es beispielsweise ebenfalls zu einer Verkürzung von τ_{Erholung} von $13,3\pm 0,4$ auf $12\pm 0,3$ ms ($n=3$; $p<0,01$; Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde das Ausmaß der Veränderungen beider Versuchsreihen auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Lediglich bei 0 und +30 mV unterschieden sich die Effekte nach Applikation von Roxithromycin und extrazellulärer Lösung signifikant ($p<0,01$ bei 0 mV und $p<0,05$ bei +30 mV).

4.2.4 Interaktion von Roxithromycin und Terfenadin

Auch bei den Experimenten an den konkatinierten *erg1/2*-Kanälen sollte nach Hinzufügen des Roxithromycins der pharmakologisch-sensitive Strom herausgefiltert werden. Dies wurde, wie bereits beschrieben, durch Applikation von 10 μM Terfenadin angestrebt.

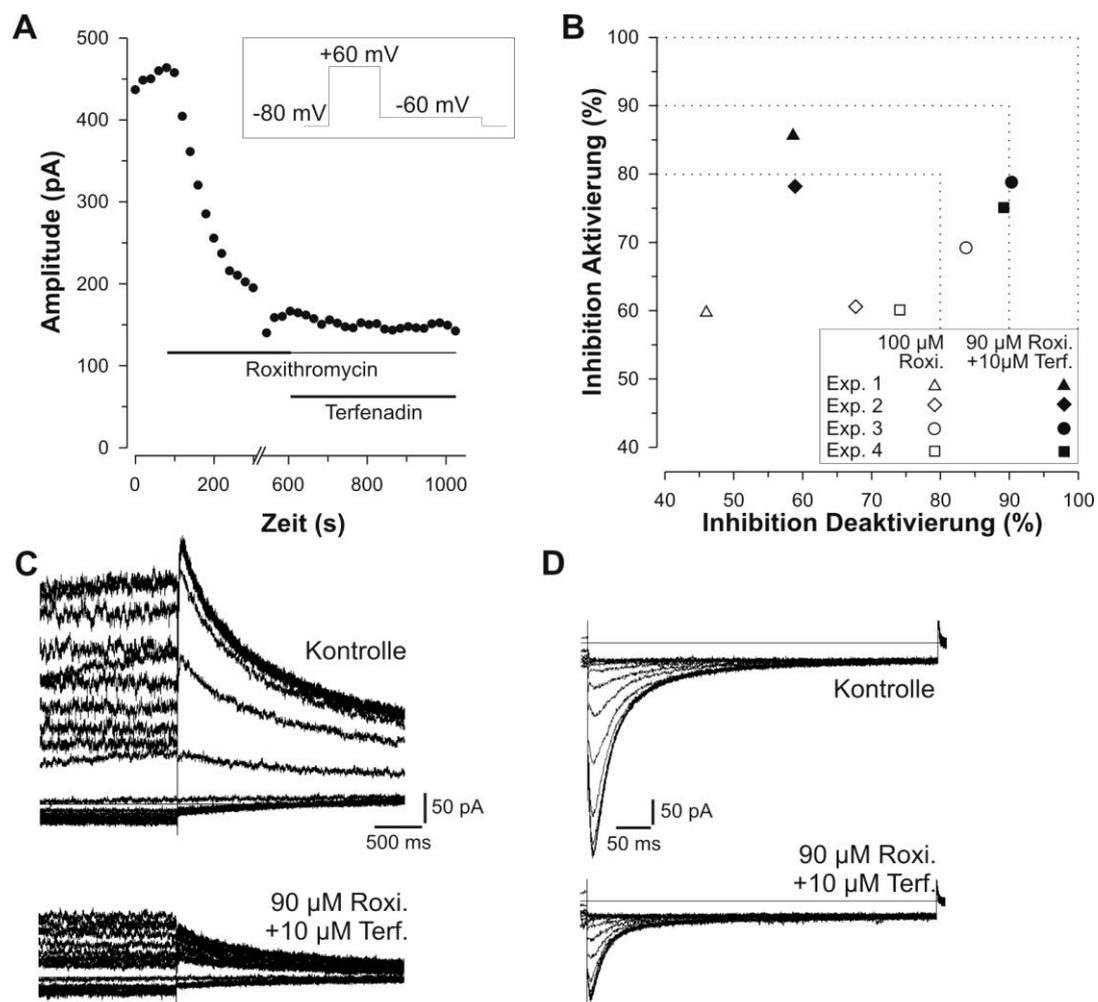


Abb. 18:

Inhibition der *erg1/2*-Ströme durch Roxithromycin und durch anschließende Terfenadin-Gabe.

A Amplitudenabnahme im Zeitgang: Ohne Substanzeinfluss, unter Einwirkung von 100 μM Roxithromycin und anschließend 90 μM Roxithromycin und 10 μM Terfenadin. Stromamplitude gegen die Zeit aufgetragen, mit Testpulsprotokoll (Kasten) aufgezeichnet. Der Bruch der Abszisse resultiert aus einer Unterbrechung der Messung, in der andere Protokolle durchgeführt wurden.

B Einzelversuche: Inhibition des Tail-Stromes des Deaktivierungsprotokolls gegen die des Aktivierungsprotokolls aufgetragen. Die leeren Symbole entsprechen den Einzelversuchen nach Applikation von 100 μM Roxithromycin, die entsprechenden gefüllten Symbole sind dieselben Zellen unter dem Einfluss von 90 μM Roxithromycin und 10 μM Terfenadin ($n=4$).

C Ausschnitt aus Aktivierungsströmen: Tail-Strom unter Kontrollbedingungen (oben) und unter dem Einfluss von 90 μM Roxithromycin und 10 μM Terfenadin (unten).

D Ausschnitt aus Deaktivierungsströmen: Tail-Strom unter Kontrollbedingungen (oben) und unter dem Einfluss von 90 μM Roxithromycin und 10 μM Terfenadin (unten).

Wider der Erwartung, dass das Terfenadin eine gänzliche Blockade des sensitiven Stromes bewirkte, konnte nur eine unvollständige zusätzliche Inhibition beobachtet werden. In Abb. 18A wurde die Abnahme des Stromes aufgezeigt. Nach der Applikation von 100 μM Roxithromycin nahm die Stromamplitude ab, nach der Applikation von 10 μM Terfenadin erfolgte keine merkliche Verstärkung des inhibierenden Effekts. Durch die zusätzliche Applikation der Terfenadin-Lösung wurde das Roxithromycin im Bad auf eine Konzentration von 90 μM verdünnt. Die Abb. 18B zeigt eine Übersicht über die durchgeführten Einzelmessungen. Die freien Symbole standen für je eine Zelle, deren prozentuale Inhibitionen durch 100 μM Roxithromycin im Aktivierungs- und Deaktivierungsprotokoll gegeneinander aufgetragen wurden. Die entsprechenden gefüllten Symbole standen für dieselben Zellen, auf die 90 μM Roxithromycin und zusätzlich 10 μM Terfenadin einwirkten. Anhand des Diagramms konnte dargestellt werden, dass keine vollständige Stromblockade erreicht werden konnte. Die Inhibition von $62,4 \pm 2,3$ % des Aktivierungstail-Stromes durch Roxithromycin konnte durch Terfenadin lediglich auf $79,4 \pm 2,2$ % gesteigert werden, diese Veränderung war hochsignifikant ($n=4$; $p=0,0073$). Im Deaktivierungsprotokoll betragen die Inhibitionen $67,9 \pm 8,0$ % vor Terfenadin-Applikation und $74,3 \pm 9,0$ % danach (Tab. 11, $p>0,05$). Mit den Strömen in Abb. 18C und D sollte verdeutlicht werden, dass unter Einwirkung von Roxithromycin und zusätzlich Terfenadin immer noch spezifischer Strom vorhanden war.

Zusätzlich wurden Experimente durchgeführt, in denen ausschließlich die Wirkung von Terfenadin auf die *erg1/2*-Konkatemere untersucht wurde (Daten nicht gezeigt). Es konnte eine annähernd vollständige Stromblockade durch 10 μM Terfenadin erzielt werden.

Tabelle 11:

Halbmaximale Aktivierung und Deaktivierung, zugehörige Steigungsfaktoren und Inhibition der Ströme in den verschiedenen Protokollen, sowie Irrtumswahrscheinlichkeiten für $erg_{1/2}$ unter Kontrollbedingungen, unter 100 μM Roxithromycin, sowie unter 90 μM Roxithromycin und 10 μM Terfenadin. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten beschreiben den Unterschied zwischen den Roxithromycin- und den Roxithromycin/Terfenadin-Effekten. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4).

Aktivierung				
	Kontrolle	100 μM Roxi.	90 μM Roxi. + 10 μM Terf.	p
$V_{0,5}$ (mV)	$-22,2 \pm 2,1$	$-30,7 \pm 2,7$	$-35,1 \pm 4,1$	0,1173
S (mV)	$6,7 \pm 0,4$	$6,8 \pm 0,6$	$5,8 \pm 0,4$	0,2547
Inhib. (%)	-	$62,4 \pm 2,3$	$79,4 \pm 2,2$	0,0073 **
Deaktivierung				
	Kontrolle	100 μM Roxi.	90 μM Roxi. + 10 μM Terf.	p
$V_{0,5}$ (mV)	$-46,9 \pm 6,1$	$-56,6 \pm 5,2$	$-54,3 \pm 5,3$	0,3256
S (mV)	$8,3 \pm 0,5$	$7,3 \pm 0,5$	$11,6 \pm 1,9$	0,1065
Inhib. (%)	-	$67,9 \pm 8,0$	$74,3 \pm 9,0$	0,3162

Die Tabelle 11 bietet auch eine Übersicht über die halbmaximalen Aktivierungs- und Deaktivierungswerte sowie die entsprechenden Steigungsfaktoren und Irrtumswahrscheinlichkeiten zwischen den Ergebnissen vor und nach Terfenadin-Applikation. Wie bereits besprochen wurde, führte der Einfluss von 100 μM Roxithromycin zu einer Linksverschiebung des halbmaximalen Prozesses sowohl bei der Aktivierung als auch bei der Deaktivierung. Der Einfluss von Terfenadin bewirkte eine weitere, jedoch nicht signifikante Verschiebung in Richtung negativer Potentiale bei der Aktivierung ($V_{0,5 \text{ Roxithromycin}} = -30,7 \pm 2,7$ vs. $V_{0,5 \text{ Terfenadin}} = -35,1 \pm 4,1$ mV, $p = 0,1173$), die halbmaximale Deaktivierung wurde nach Terfenadin-Applikation nicht-signifikant positiver

($V_{0,5 \text{ Roxithromycin}} = -56,6 \pm 5,2$ vs. $V_{0,5 \text{ Terfenadin}} = -54,3 \pm 5,3$ mV, $p > 0,05$). Die Steigungsfaktoren beider Prozesse unter Kontrollbedingungen und unter 100 μM Roxithromycin verhielten sich wie bereits besprochen, durch zusätzliche Terfenadin-Einwirkung sankt der Steigungsfaktor der Aktivierungskurve nicht signifikant von $6,8 \pm 0,6$ auf $5,8 \pm 0,4$ mV ($p = 0,2547$). Der Steigungsfaktor der Deaktivierung lag vor Terfenadin-Applikation bei $7,3 \pm 0,5$ mV und danach bei $11,6 \pm 1,9$ mV, diese Veränderung war nicht signifikant ($p > 0,05$, Tab. 11).

4.3 Native erg-Kanäle bei GH₃/B₆-Zellen

GH₃/B₆-Zellen besitzen einen nativen $I_{K,IR}$, der vermutlich durch r_{erg} -Kanäle vermittelt wird (Bauer et al., 1998). Nach den Ergebnissen von Wulfsen et al. (2000) und Kirchberger et al. (2006) werden in diesen Zellen die Untereinheiten $erg1a$ und $erg2$ auf RNA-Ebene exprimiert, die mRNAs für $erg1b$ und $erg3$ fehlen.

Um einen ersten Eindruck zu erlangen, ob und wie Roxithromycin auf diese nativen Kanäle wirkt, wurden Ströme der GH₃/B₆-Zellen unter Kontrollbedingungen und anschließend unter dem Einfluss von 100 μM Roxithromycin mithilfe des speziellen Aktivierungs- und Testpulsprotokolls (s. 3.3.5) in 40 mM K^+ -Lösung (s. 3.1.1) gemessen.

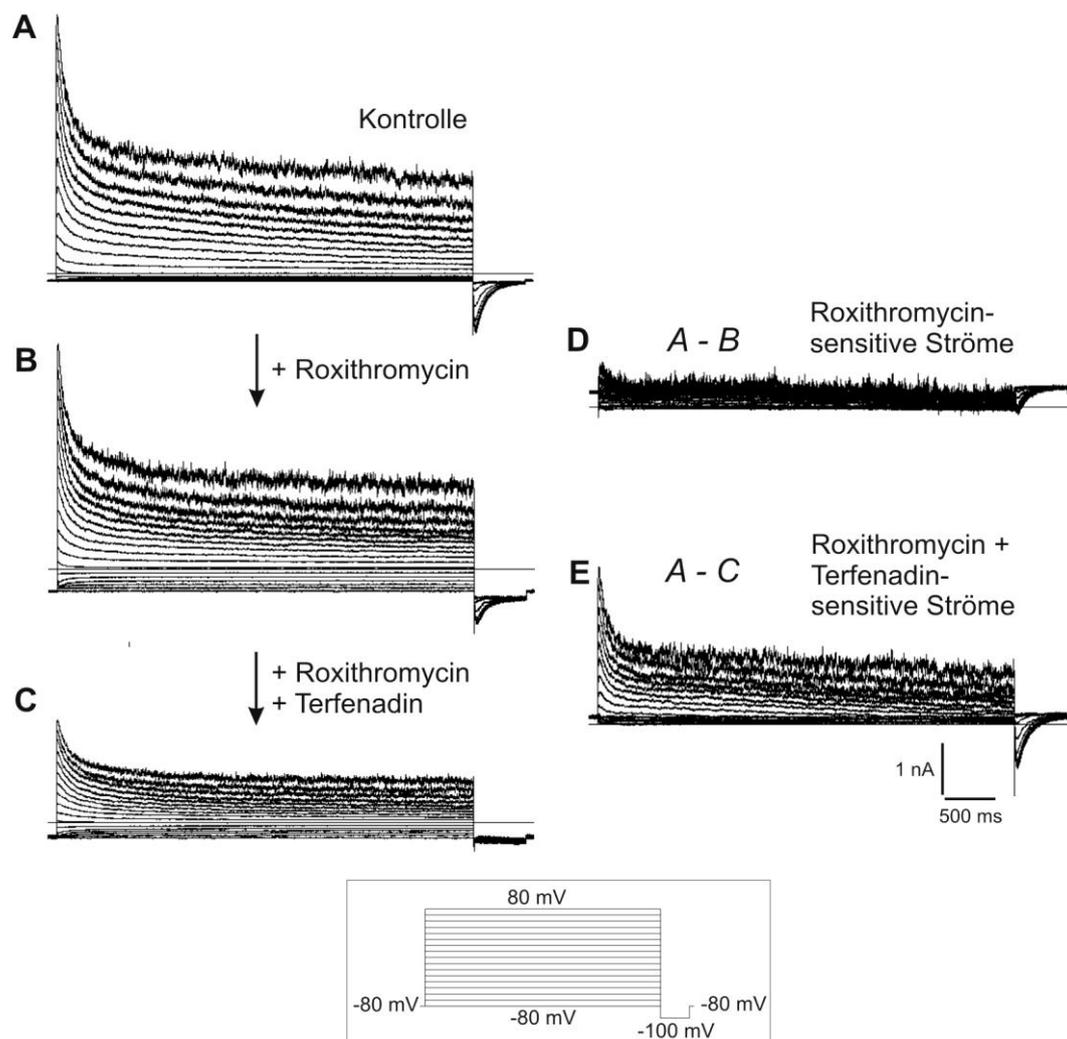


Abb. 19:

Vergleich der Roxithromycin- und Terfenadin-sensitiven Ströme einer GH₃/B₆-Zelle anhand des Aktivierungsprotokolls in 40 mM K⁺-Lösung.

A Native Membranströme einer GH₃/B₆-Zelle, gemessen mit unten gezeigtem Pulsprotokoll in konventionellem Whole-cell-Modus.

B Ströme nach Applikation von 100 μM Roxithromycin.

C Ströme nach zusätzlicher Applikation von 10 μM Terfenadin.

D Roxithromycin-sensitiven Ströme als Differenz der Stromspuren in A und B.

E Roxithromycin- und Terfenadin-sensitiven Ströme als Differenz der Stromspuren in A und C.

In Abb. 19 wurde, wie schon von den heterolog exprimierten Kanälen bekannt, ein Überblick über die pharmakologisch-sensitiven Ströme gegeben. Der Tail-Strom, bei dem es sich um erg-spezifischen Strom handelte, konnte durch die Zugabe von 10 μM Terfenadin

vollständig inhibiert werden. Die erg-unspezifischen Auswärtsströme der Zellen wurden durch Roxithromycin wenig beeinflusst, das Terfenadin inhibierte diese jedoch zum Teil.

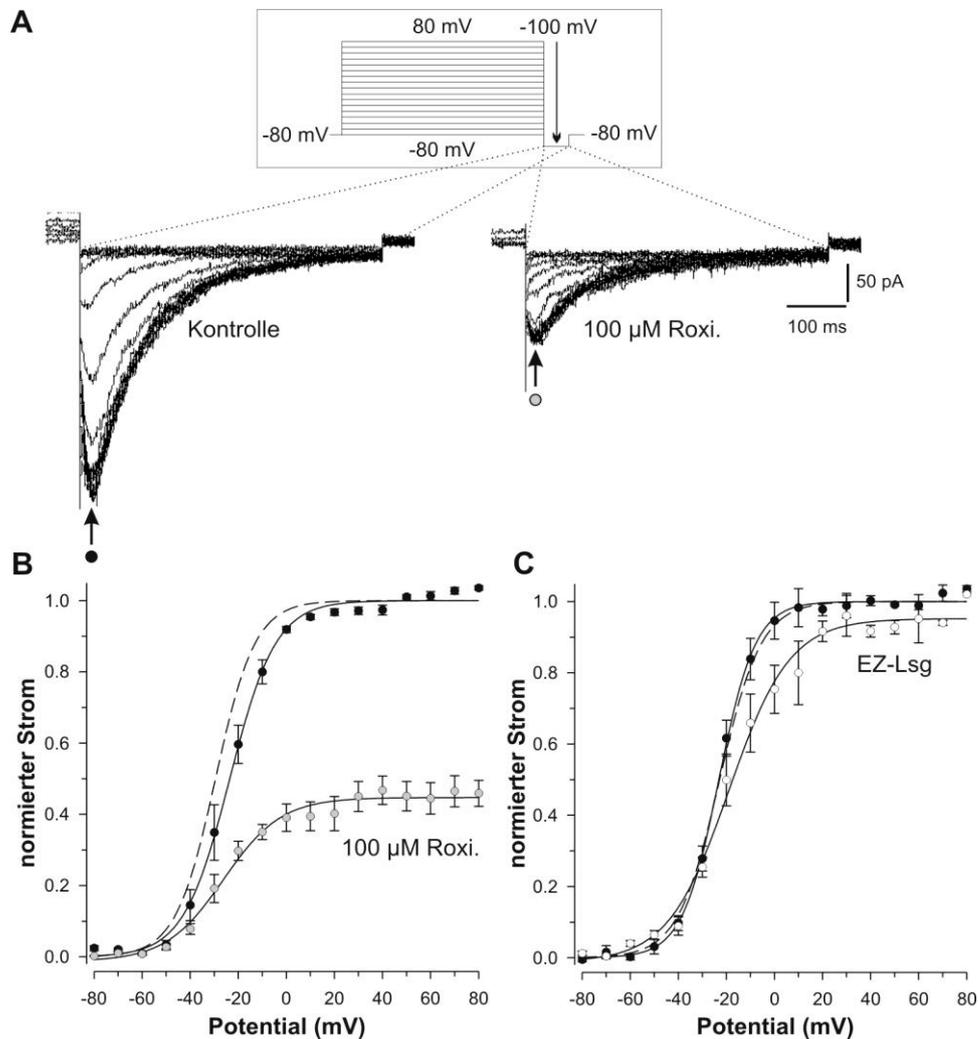


Abb. 20:

Einfluss von Roxithromycin auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von nativen erg-Kanälen in GH₃/B₆-Zellen. Darstellung anhand der Tail-Stromamplituden in 40 mM K⁺-Lösung.

A Auszüge aus der Stromantwort auf das Aktivierungsprotokoll (Kasten): Unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluss von 100 μM Roxithromycin.

B Spannungsabhängigkeit der Aktivierung: Auftragung des maximalen Einwärtsstromes beim Nachpuls auf -100 mV gegen das Potential des Vorpulses, die Pfeile in A markieren den in B ausgewerteten Bereich. Für die Kontrolle (schwarzer Kreis) ergibt sich $V_{0,5} = -23,9 \pm 2,7$ mV, unter 100 μM Roxithromycin (grauer Kreis und unterbrochene Linie) liegt $V_{0,5}$ bei $-29,3 \pm 2,4$ mV ($p < 0,05$). Der Steigungsfaktor von $8,4 \pm 0,6$ mV sinkt nicht signifikant auf $7,3 \pm 1,0$ mV ($n = 6$; $p > 0,05$).

C Spannungsabhängigkeit der Aktivierung im Blindversuch: Auftragung des maximalen Einwärtsstromes beim Nachpuls auf -100 mV gegen das Potential des Vorpulses (Kontrolle und nach Applikation von extrazellulärer Lösung). Für die Kontrolle (schwarzer Kreis) ergibt sich $V_{0,5} = -23,0 \pm 1,1$ mV, nach Applikation von extrazellulärer Lösung (weißer Kreis und unterbrochene Linie) liegt $V_{0,5}$ bei $-22,3 \pm 1,1$ mV ($p > 0,05$). Der Steigungsfaktor von $8,3 \pm 2,3$ mV steigt nicht signifikant auf $8,9 \pm 0,8$ mV ($n=3$; $p > 0,05$).

In Abb. 20 wurde die Spannungsabhängigkeit des Aktivierungsprozesses gezeigt. In Graphik A dieser Abbildung ist lediglich der interessierende spezifische erg-Strom - der Tail-Strom - zu sehen. Es wurde eine repräsentative Messung abgebildet, die die Inhibition des Stromes durch 100 μ M Roxithromycin von $57,7 \pm 4,4$ % ($n=6$; $p < 0,05$; Tab. 13) im Mittel in etwa größenrichtig wiedergab. Unter Kontrollbedingungen lag die Spannung, bei der die Aktivierung der Kanäle halbmaximal war, bei $-23,9 \pm 2,7$ mV. Unter Roxithromycin erfolgte die bereits bekannte Verschiebung in Richtung negativer Potentiale auf $-29,3 \pm 2,4$ mV (Tab. 12). Dieser Unterschied lag unterhalb des Signifikanzniveaus ($p=0,0421$). Der Steigungsfaktor verkleinerte sich jedoch nicht signifikant ($S_{\text{Kontrolle}} = 8,4 \pm 0,6$ mV vs. $S_{\text{Roxithromycin}} = 7,3 \pm 1,0$ mV, $p=0,3938$).

Tabelle 12:

Halbmaximale Aktivierung, Steigungsfaktor und Irrtumswahrscheinlichkeit für native erg-Kanäle in GH₃/B₆-Zellen unter Kontrollbedingungen und unter 100 μ M Roxithromycin. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=6$).

	Kontrolle	100 μ M Roxi.	p
$V_{0,5}$ (mV)	$-23,9 \pm 2,7$	$-29,3 \pm 2,4$	0,0421 *
S (mV)	$8,4 \pm 0,6$	$7,3 \pm 1,0$	0,3938

Tabelle 13:

Inhibition der Ströme im Aktivierungsprotokoll für native erg-Kanäle. Inhibition der Einzelmessungen unter Einfluss von 100 μM Roxithromycin, zusätzlich sind Mittelwert, SEM und Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben (n=6).

Messung	Inhibition (%)
1	45,4
2	66,8
3	47,9
4	70,0
5	51,3
6	64,6
MW	57,7
SEM	4,4
p	0,0116 *

In den passenden Blindversuchen mit extrazellulärer Lösung konnte keine Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung beobachtet werden: Der Ausgangswert lag bei $-23,0 \pm 1,1$ mV und änderte sich nach Applikation der extrazellulären Lösung lediglich minimal ($V_{0,5} = -22,3 \pm 1,1$ mV; n=3; $p > 0,05$; Abb. 20C). Auch der Steigungsfaktor von $8,3 \pm 2,3$ mV vergrößerte sich nicht signifikant ($S = 8,9 \pm 0,8$ mV, $p = 0,8705$). Die Amplitudenabnahme in den Blindmessungen lag im Mittel bei $14,1 \pm 12,1$ % und war wiederum nicht signifikant ($p = 0,3932$).

Zusammenfassend gesagt verursachte Roxithromycin in GH_3/B_6 -Zellen also eine deutliche Amplitudeninhibition und Linksverschiebung der halbmaximalen Aktivierung, die Veränderung des Steigungsfaktors war nicht signifikant.

5 Diskussion

Erg1b ist eine Kaliumkanal- α -Untereinheit, die durch ein alternatives Transkript vom KCNH2-Gen kodiert wird und sich mit erg1a zusammenschließt, um das molekulare Korrelat des nativen I_{Kr} zu bilden (Lees-Miller et al., 1997; London et al., 1997; Jones et al., 2004). Der I_{Kr} besitzt eine tragende Rolle für die Repolarisation des Herzaktionspotentials (Übersicht in Bauer et Schwarz, 2001). Durch sog. Klasse-III-Antiarrhythmika wie E-4031 (Sanguinetti et Jurkiewicz, 1990; Weinsberg et al., 1997; Kamiya et al., 2008) wird die Repolarisationsphase durch pharmakologische Blockade von Kaliumkanälen gewollt verlängert. Eine solche Verlängerung kann jedoch auch bei einer Reihe von nicht primär kardial wirksamen Pharmaka durch Blockade des I_{Kr} als Nebenwirkung in Erscheinung treten. Das Makrolid Roxithromycin, das als Antibiotikum angewandt wird, wurde auf diesen unerwünschten Nebeneffekt bereits 2002 von Volberg et al. untersucht. Diese Arbeitsgruppe befasste sich mit dem Einfluss von 6 verschiedenen Makroliden auf HERG in Säugerzellen. Elektrophysiologische Untersuchungen zum Interaktionsmechanismus von Roxithromycin mit erg1a/1b fanden bislang nicht statt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Mechanismus der blockierenden Wirkung auf heterolog exprimierte erg1a/1b-Kanäle zu studieren.

Im Anschluss an diese Experimente wurden weitere Mitglieder der erg-Subfamilie auf ihre Anfälligkeit für eine pharmakologische Blockade durch Roxithromycin untersucht: Es handelte sich zum einen um konkatinierete erg1/2-Kanäle und zum anderen um native erg-Kanäle in GH₃/B₆-Zellen. Diese Kanäle besitzen ihre Bedeutung auf neuronaler Ebene.

Parallel zu den Messungen wurden Blindversuche durchgeführt. Mittels Applikation von extrazellulärer Lösung konnte festgestellt werden, wie sich die Parameter der Zelle über die Zeit und mit zunehmender Dialyse des Zellinhaltes in Whole-cell-Konfiguration änderten. Die Auswertungen dieser Versuche dienten stets als Anhaltspunkt für die kritische Beurteilung der Roxithromycin-Effekte. Der Einfluss des Lösungsmittels DMSO wurde zusätzlich geprüft. Es konnte gezeigt werden, dass der erg1a/1b-Strom nach Applikation von DMSO in einer Konzentration von 0,1 % im Vergleich zur Applikation von extrazellulärer Lösung keine signifikanten Veränderungen dahingehend verursachte, dass unter DMSO stärkere Abweichungen von den Kontrollwerten beobachtet wurden (Daten nicht gezeigt). Einige Parameter änderten sich sogar weniger stark als in den Blindversuchen mit extrazellulärer Lösung. Diese Ergebnisse bezüglich des DMSO-Einflusses decken sich mit den Beobachtungen von Du et al. aus dem Jahr 2006. Hohe DMSO-Konzentrationen führen zu

einer erhöhten Osmolarität in der Badlösung. Um DMSO-induzierte Veränderungen der Zellmorphologie und der Membraneigenschaften zu vermeiden, sind DMSO-Konzentrationen auf einen Anteil von 0,1-0,3 % im Bad limitiert (Du et al., 2006). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde nach den Blindversuchen davon ausgegangen, dass das Lösungsmittel DMSO in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Blockade der erg-Kanäle durch Roxithromycin hatte.

Als heterologes Expressionssystem wurde in dieser Arbeit die CHO-Zelle gewählt. Um auszuschließen, dass endogene Kanäle dieser Zellen die Messungen beeinflussen, wurde eine Kontrollgruppe nicht-injizierter Zellen gemessen (Daten nicht gezeigt). Beispielsweise besitzen Oozyten eine Vielzahl an endogenen Kanälen. Der Großteil von ihnen ist zwar im Vergleich zu den heterologen Strömen klein, bisweilen können sie jedoch in ihrer Natur und Amplitude variieren und gelegentlich Probleme verursachen (Witchel et al., 2002).

Die Koexpression von zwei verschiedenen erg- α -Untereinheiten, wie es in der vorliegenden Arbeit für erg1a/1b zutraf, kann theoretisch zu einer Reihe an verschiedenen Zusammensetzungen der Untereinheiten führen. Geht man davon aus, dass sich erg-Kanäle durch den Zusammenschluss von 4 Untereinheiten formieren, sind nach Koexpression von 2 verschiedenen Untereinheiten 6 Kanalkompositionen denkbar (Wimmers et al., 2002). Aufgrund dessen konnten keine exakten Aussagen über die Gestalt der Kanalpopulationen in den Experimenten getroffen werden. Dieses Problem bestand nicht für die Konkatemere. Die Konkatinierung „erzwingt“ gewissermaßen eine definierte Zusammensetzung der Kanäle. Die Identität der nativen Kanäle in GH₃/B₆-Zellen kann wiederum nur in sofern benannt werden, als dass die Expression auf RNA-Ebene für erg1a und erg2 und das Fehlen von erg1b- und erg3-mRNA nachgewiesen werden konnte (Schäfer et al., 1999; Wulfsen et al., 2000; erg1b: Kirchberger et al., 2006). Inwieweit die verschiedenen Kanaluntereinheiten exprimiert und funktionell in die Membran integriert werden, bleibt unklar.

5.1 Heterologe erg1a/1b-Kanäle

Die Experimente dieser Arbeit sollten Aufschluss darüber liefern, ob Roxithromycin eine konzentrationsabhängige Inhibition des erg1a/1b-Stromes bewirkt und inwieweit es die vier Kinetiken dieser Kanäle beeinflusst. Besonderes Augenmerk sollte auch darauf gelegt werden, ob die Anwesenheit von erg1b die pharmakologische Antwort der Kanäle im Vergleich

zu reinen $erg1a$ -Kanälen verändert. Die Ergebnisse werden im Folgenden in der genannten Reihenfolge diskutiert.

Dosis-Wirkungs-Beziehung

Zur Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung kam hauptsächlich die Perforated-patch-Methode in Kombination mit dem Substanzzulauf über ein peristaltisches Perfusionssystem zur Anwendung. Die Entscheidung hierfür begründete sich in der Forderung, möglichst stabile Versuchsbedingungen zu schaffen, um auch mögliche Effekte durch geringe Konzentrationen (3 und 30 μM) von den üblichen Veränderungen während der Versuchsdurchführung trennen zu können. Auch im Perforated-patch-Modus konnte ein „run down“, der Verlust an Kanalaktivität über längere Zeit, beobachtet werden, der jedoch weit weniger ausgeprägt war als der in konventioneller Whole-cell-Konfiguration. Nach Lippiat et al. (2008) wird diese Verhaltensänderung, der „run down“, der Auswaschung von Substanzen (z.B. von Nukleotiden) aus dem Zellinneren beigemessen, die zur Aufrechterhaltung der Kanalaktivität notwendig sind. Auch Witchel et al. (2002) begründeten den reduzierten „run down“ im Perforated-patch-Experiment mit einer geringeren Dialyse des Zellinneren.

Diesem Nachteil des konventionellen Whole-cell-Modus stellten Lippiat und seine Gruppe (2008) aber auch eine Reihe von Vorteilen dieser Methode gegenüber: Der Experimentator ist fähig, das chemische Milieu auf beiden Seiten der Zellmembran durch sorgfältige Zusammensetzung der intra- und extrazellulären Lösung festzulegen. Nach der Ruptur des Membranflecks mischt sich der Zellinhalt mit der Pipettenlösung, es erfolgt eine Diffusion in zwei Richtungen. Neben der Unfähigkeit, das intrazelluläre Milieu genau kontrollieren zu können, barg die Perforated-patch-Methode mögliche Ungenauigkeiten in Bezug auf den Serienwiderstand. Die Messungen wurden gestartet, sobald der Serienwiderstand die gesetzte Marke von 25 $\text{M}\Omega$ unterschritten hatte. Über die Dauer der Messung verringerte sich dieser jedoch meist weiter, woraus möglicherweise eine mangelnde Vergleichbarkeit resultierte. Außerdem vergeht prinzipiell sehr viel Zeit, bis ein elektrischer Zugang zur Zelle erlangt werden kann, und zudem besteht die Gefahr der ungewünschten Ruptur des Membranflecks (Witchel et al., 2002).

Das Perfusionssystem diente dem Austausch der Badlösung. Durch das Anströmen der Lösung konnte häufig eine progressive Amplitudenzunahme der Ströme während der depolarisierenden Pulse des Testpulsprotokolls beobachtet werden. Witchel et al. (2002) beschrieben dieses Phänomen des sog. „run up“ bei *Xenopus*-Oozyten und wiesen auf eine Fehlerquelle in diesem Zusammenhang hin. Ignoriert man diesen „run up“, der sehr lange

dauern kann, wird die Kontrollbasis der Stromamplitude unterschätzt, sodass in pharmakologischen Experimenten ein künstlich hoher EC_{50} -Wert resultiert. Dies ist besonders bei langsam wirkenden Substanzen ein Problem. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde abgewartet, bis ein relativ stabiles initiales Amplitudenniveau erreicht war, bevor die Perfusion von Roxithromycin begonnen wurde. Desweiteren wurden zur Beurteilung der inhibitorischen Potenz die Reduktionen der Tail-Stromamplituden des Aktivierungs- und Deaktivierungsprotokolls herangezogen.

Die Auswertung des Aktivierungsprotokolls ergab einen EC_{50} -Wert von 91,7 μM , die des Deaktivierungsprotokolls einen EC_{50} von 47,1 μM . Der Hill-Koeffizient wurde für diese Berechnungen auf einen Wert von 1 festgelegt, da die Ergebnisse an HERG von Volberg et al. (2002) eine Orientierung boten. Der errechnete Hill-Koeffizient für Roxithromycin lag dort bei $h=1,16$. Auch für andere Makrolide wurde ein Koeffizient nahe 1 errechnet, was auf eine einzelne Bindungsstelle am HERG-Kanal hinwies (Volberg et al., 2002). Um dem „run down“ in den Experimenten dieser Arbeit Rechnung zu tragen, wurde dieser als Ordinatenabschnitt festgelegt. Der Verlauf der Hill-Kurve deutete auf eine eintretende Sättigung des Roxithromycin-Effektes hin, sodass trotz zunehmender Konzentration keine vollständige Inhibition erreicht werden konnte.

Auch bei der Auftragung der Inhibition in den beiden Protokollen gegeneinander war ersichtlich, dass die Amplituden im Deaktivierungsprotokoll stärker inhibiert wurden. Im Zuge der Dosis-Wirkungs-Experimente wurden jeweils beide Protokolle an ein und derselben Zelle durchgeführt. Dabei wurde meistens mit dem Deaktivierungsprotokoll begonnen, es folgten das Aktivierungs- und das Testpulsprotokoll. Das nächste war wiederum das Aktivierungsprotokoll und erst im Anschluss das der Deaktivierung. Durch den „run down“, der im Laufe der Experimente auftrat, könnte im Deaktivierungsprotokoll eine vermeintlich höhere Inhibition vorgetäuscht werden, was diese deutlichen Unterschiede der EC_{50} -Werte erklären würde.

Volberg et al. untersuchten 2002 die Wirkung von Roxithromycin auf HERG. Der inhibitorische Effekt wurde anhand der Blockade der Stromamplituden eines Rampenprotokolls dargestellt. Dabei wurde die Roxithromycin-Konzentration kumulativ hinzugefügt, bis eine Maximalkonzentration von 100 μM erreicht war. Es resultierte ein EC_{50} -Wert von 36,5 μM . Zum einen erklären sich die Unterschiede zwischen den vorliegenden Ergebnissen und denen der Volberg-Publikation sicherlich aus der unterschiedlichen methodischen Herangehensweise. Zum anderen erklären sich die Unterschiede womöglich auch durch die Koexpression der α -Untereinheiten *erg1a* und *erg1b*. Sie bilden stabile Komplexe, deren

funktionelle Attribute denen von nativen kardialen K^+ -Kanälen ähneln. Verglichen mit Kanälen, die nur durch erg1a - HERG - gebildet werden, zeigen diese zum Teil veränderte Kinetiken und Spannungsabhängigkeiten (Lees-Miller et al., 1997; London et al., 1997; Larsen et al., 2008) und Unterschiede in der Empfindlichkeit auf E-4031 (Sale et al., 2008). Heteromultimere erg1a/1b-Kanäle wurden - soweit bekannt - vor Anfertigung der vorliegenden Arbeit nicht unter dem Einfluss anderer Pharmaka untersucht. Die Ergebnisse könnten dahingehend interpretiert werden, dass die Anwesenheit der erg1b-Untereinheit die Empfindlichkeit des Kanals gegenüber Roxithromycin leicht reduzierte. Sale et al. (2008) machten für die geringere Empfindlichkeit von erg1a/1b auf E-4031 die Unterschiede in der N-terminalen Struktur verantwortlich, da erg1a- und erg1a/1b-Kanalporen die gleiche Grundstruktur und somit wahrscheinlich die gleiche Bindungsstelle für Pharmaka teilen. Für Roxithromycin könnten Parallelen bestehen. Der Unterschied in der Empfindlichkeit auf Substanzen zwischen erg1a und erg1a/1b liefert einen Einblick in den Mechanismus für die Substanzblockade (Sale et al., 2008). Die bekannten HERG-Blocker sollten im Zuge weiterer Arbeiten an erg1a/1b-Komplexen untersucht werden.

Vergleich der Inhibitionen von Ein- und Auswärtsströmen

Um herauszufinden, ob ein Unterschied der Roxithromycin-induzierten blockierenden Potenz auf ein- bzw. auswärts gerichtete Ströme besteht, wurden die Strominhibitionen miteinander verglichen.

Die Inhibition des einwärts gerichteten Tail-Stromes im Deaktivierungsprotokoll durch 100 μ M Roxithromycin lag bei $59,4 \pm 7,0$ %, die des auswärts gerichteten Tail-Stromes im Aktivierungsprotokoll betrug $58,4 \pm 4,7$ % ($n=5$). Dieser Vergleich deutet darauf hin, dass die Richtung des Stromflusses keinen Einfluss auf das Ausmaß der Inhibition hatte, obwohl sich im Abschnitt „Dosis-Wirkungs-Beziehung“ (s. 4.1.3 und 5.1) Unterschiede aufgetan hatten. Im Aktivierungsprotokoll wurden desweiteren die Amplituden am Ende des depolarisierenden Vorpulses bezüglich ihrer Blockade ausgewertet. Die Maximalamplituden dieses stationären Auswärtsstromes nahmen um $51,7 \pm 3,5$ % ab. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Inhibitionen der Tail-Ströme und denen der stationären Auswärtsströme in ein und demselben Protokoll festgestellt werden. Dieser Unterschied lässt sich womöglich dadurch erklären, dass es sich beim Tail-Strom um reinen erg-Strom handelt und der stationäre Auswärtsstrom die Summe verschiedener Ströme darstellt. Zum erg-Strom addieren sich Leck- und endogene Ströme, auf die Roxithromycin vermutlich keinen

Einfluss nimmt. Um die inhibierende Potenz Roxithromycins beurteilen zu können, richtet sich das Augenmerk auf die Tail-Ströme.

Die Auswertungen lassen den Schluss zu, dass Roxithromycin möglicherweise die Repolarisation des Herzaktionspotentials behindern könnte, indem es gezielt den auswärts gerichteten Tail-Strom reduziert.

Der Vergleich der Strominhibitionen der verschiedenen Protokollabschnitte kann besonders bei nativen Ionenströmen zum Erkenntnisgewinn beitragen. Antzelevitch et al. untersuchten 1996 die Effekte von Erythromycin auf den nativen I_K („delayed rectifier“) in ventrikulären Myozyten des Hundes anhand eines Aktivierungsprotokolls. Verglichen wurden ebenfalls die Inhibitionen des Stromes an zwei verschiedenen Stellen des Protokolls. Die Ergebnisse machten deutlich, dass die Inhibition des Tail-Stromes größer war als die des sich entwickelnden Stromes des Vorpulses. Diese Erkenntnis stimmte mit den bisherigen der Arbeitsgruppe überein, nach denen Erythromycin bevorzugt den I_{Kr} und nicht den I_{Ks} beeinflusst.

Aktivierung

Um herauszufinden, inwieweit Roxithromycin die Aktivierung von $erg1a/1b$ -Kanälen beeinflusst, wurden die sensitiven Ströme, die Spannungsabhängigkeit und die Zeitkonstanten des Aktivierungsprotokolls näher beleuchtet.

Die Roxithromycin- und die Roxithromycin-Terfenadin-sensitiven Ströme behielten im wesentlichen den Charakter der Kontrollströme bei. Dies zeigte, dass es sich bei Roxithromycin bevorzugt um einen Blocker handelt und nicht um einen sog. „gating modifier“. Dies gilt auch für die kombinierte Gabe von Roxithromycin und Terfenadin.

Unter dem Einfluss von $100 \mu\text{M}$ Roxithromycin kam es zu einer signifikanten Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung in den negativeren Potentialbereich. Der Verlauf der Boltzmann-Kurve veränderte sich im Bereich der größten Dynamik nicht signifikant. Auch das Maximum der glockenförmigen Kurve des stationären Auswärtsstromes erfuhr eine Linksverschiebung. Sowohl der Tail-Strom als auch der Strom am Ende des depolarisierenden Vorpulses wurden signifikant durch Roxithromycin inhibiert. Der Beschreibung des Zeitverlaufs der Aktivierung diente das „envelope of tails“-Protokoll: Unter Kontrollbedingungen vergrößerte sich die Amplitude mit zunehmender Testpulsdauer, ein „steady-state“-Wert konnte mit der zur Verfügung stehenden Pulsdauer nicht erreicht werden. Unter dem Einfluss von Roxithromycin wurden die größten Stromamplituden bereits nach einer Dauer von circa 500 ms beobachtet. Die Zeitkonstante der Aktivierung nahm um etwa ein

Drittel ab. Die Verzögerung des Einsetzens der Aktivierung wurde nicht beeinflusst. Ein schnelleres Erreichen des Strommaximums unter Roxithromycin wäre vereinbar mit der Linksverschiebung der Aktivierungskurve und der der Glockenkurve des stationären Auswärtsstromes.

Die Erkenntnisse über die Verschiebung von $V_{0,5}$ von *erg1a/1b* lehnen sich an publizierte Daten über Makrolide und HERG in Säugerzellen an: Unter 30 μM Clarithromycin, ebenfalls ein modernes Makrolid, verschob sich die halbmaximale Aktivierung von HERG-Kanälen um circa -5 mV, der Steigungsfaktor nahm allerdings zu (Volberg et al., 2002). Unter 100 μM Erythromycin konnte bei 37°C ebenfalls eine Verschiebung von $V_{0,5}$ um -10 mV bei HERG beobachtet werden (Guo et al., 2005).

Auch Volberg et al. (2002) beschrieben die Zeitkonstanten der Aktivierung anhand eines „envelope of tails“-Protokolls und stellten jedoch fest, dass durch 30 μM Clarithromycin keine Veränderung der Aktivierungskinetik induziert wurde.

Deaktivierung

Um der Frage nachzugehen, wie sich Roxithromycin auf die Deaktivierung in Bezug auf die sensitiven Ströme, die Spannungsabhängigkeit und die Zeitkonstanten sowie das Verhältnis der schnellen und langsamen Deaktivierungskomponente zueinander auswirkte, werden die Ergebnisse des Deaktivierungsprotokolls im folgenden Abschnitt kritisch beurteilt.

Auch die Darstellung der sensitiven Ströme anhand des Deaktivierungsprotokolls zeigte, dass Roxithromycin und die kombinierte Gabe von Roxithromycin und Terfenadin einen Block der Ströme verursachte und es sich weniger um „gating modifier“ handelte.

Roxithromycin bewirkte eine signifikante Verschiebung der Boltzmann-Deaktivierungskurve in Richtung negativer Potentiale. Der Steigungsfaktor nahm um 0,7 mV ab, und auch der Tail-Strom erfuhr eine signifikante Inhibition. Diese durch Roxithromycin induzierte Linksverschiebung der Verfügbarkeitskurve würde normalerweise einen stabilisierenden Effekt auf die Kanäle haben, da jedoch der Gesamtstrom stark inhibiert wurde, ist hiermit auch diese an sich positive Wirkung überlagert worden.

Der Deaktivierungsprozess wurde insgesamt verlangsamt, was auf die Vergrößerung von τ_{langsam} und einen gesteigerten Anteil der langsamen Komponente an der Gesamtdeaktivierung zurückzuführen war. Dabei sollte hinzugefügt werden, dass grundsätzlich ein Zusammenhang zwischen dem Einfluss der Kinetik und der Länge des Vorpulses besteht: Je kürzer dieser ist, desto größer ist auch der Einfluss der Kinetik auf die Verfügbarkeit. Die Verlangsamung der Deaktivierungskinetik in Kombination mit dem kurzen Vorpuls (1 s) war

also mit der Linksverschiebung der Verfügbarkeitskurve logisch vereinbar. Volberg et al. (2002) konnten im Zuge ihrer Untersuchungen keine Veränderungen der Deaktivierungskinetik von HERG durch Clarithromycin beobachten.

Um eine potentielle Temperaturabhängigkeit der Inhibition durch Roxithromycin zu untersuchen, wurden Versuche bei Raumtemperatur ($21 \pm 1,5^\circ\text{C}$) und bei $28,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durchgeführt. Auch bei den erhöhten Temperaturen wurden die Tail-Stromamplituden inhibiert. Die Ergebnisse bei den unterschiedlichen Temperaturen wiesen statistisch keinen signifikanten Unterschied auf. Auch die halbmaximale Deaktivierung und der Steigungsfaktor der Boltzmann-Kurve veränderten sich qualitativ wie bei Raumtemperatur, das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht unterschritten. Die Kinetik der Deaktivierung wirkte auch bei erhöhter Temperatur nach Roxithromycin-Applikation langsamer durch die ebenfalls bei Raumtemperatur ausgelösten Veränderungen. Die Ergebnisse bei den verschiedenen Temperaturen wiesen statistisch keinen signifikanten Unterschied auf. Die Experimente dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass der Einfluss von Roxithromycin auf *erg1a/1b*-Kanäle weitgehend temperaturunabhängig ist. Die Tatsache, dass sich die Temperatur in den vorliegenden Experimenten nicht im physiologischen Bereich bewegte, könnte diese Aussage schwächen. Sie steht jedoch im Gegensatz zu den bisherigen Publikationen, in denen der Wirkung von Erythromycin auf HERG (Kirsch et al., 2004; Gou et al., 2005) eine merkliche Temperatursensitivität nachgesagt wird. Und auch elektrophysiologische Messungen von HERG mit Roxithromycin wurden vornehmlich im physiologischen Temperaturbereich durchgeführt (West et al., 1998; Volberg et al., 2002). Die Arbeitsgruppe von Kirsch (2004) stellte fest, dass die Evaluation des Blocks bei Raumtemperatur den EC_{50} -Wert Erythromycins um den Faktor 7 unterschätzte und legte nahe, die Messungen bei annähernd physiologischen Temperaturen durchzuführen. Der Grund dafür ist, dass temperaturabhängige Prozesse zum „steady-state“-Block von HERG beitragen können, wie etwa das Öffnungs-Schließ-Verhalten, die Rezeptorbindung und die Akkumulation der Substanz nahe der intrazellulären aktiven Region. Um herauszufinden, ob Diffusionsbarrieren dazu beitragen, dass Erythromycin bei Raumtemperatur keine Inhibition des HERG-Stromes zeigte, versahen Gou et al. (2005) die Pipettenlösung mit Erythromycin. Sie nahmen an, wenn der transmembrane Zugang zur Bindungsstelle im intrazellulären Anteil des Kanals der limitierende Schritt der Blockade wäre, könnte ein schneller Block sogar bei Raumtemperatur erwartet werden, nachdem Erythromycin durch Dialyse in die Zelle gelangt ist. Unter diesen Bedingungen konnte eine schnelle und progressive Inhibition durch $100 \mu\text{M}$ Erythromycin erreicht werden. Sie schlussfolgerten, dass der temperatur-

abhängige Zugang zur intrazellulären Bindungsdomäne der kritische Punkt für die Temperatursensitivität war. Wie Erythromycin die Zellmembran passiert, ist noch nicht nachgewiesen (Gou et al., 2005). Die Diffusion via Brown'scher Molekularbewegung wird als ein möglicher Weg diskutiert. Daher könnte eine temperaturabhängige Veränderung der Membranfluidität verantwortlich für den vermehrten intrazellulären Zugang bei erhöhten Temperaturen und für einen temperaturabhängigen Transportmechanismus für Pharmaka sein (Gou et al., 2005). Eine kürzlich erschienene Studie von Mc Bride et al. (2009) etablierte eine neue Hypothese für Mechanismen, die zur Variabilität von I_{Kr} -Inhibitoren betragen könnten: Der unterschiedliche Zugang der Substanzen zur intrazellulären Bindungsstelle des HERG-Kanals über modulierende Transporter verändert womöglich die Empfänglichkeit für medikamentös induzierte Torsaden. Der OCTN1, ein organischer Kationentransporter, wird in humanen Kardiomyozyten exprimiert und ist so positioniert, dass er den Zugang von pharmakologischen Substanzen zum Intrazellularraum moduliert (Mc Bride et al., 2009). Die Bindungsdomäne für solche Substanzen befindet sich auf der intrazellulären Seite der Porenregion (Mitcheson et al., 2000). In Zellen, die den OCTN1 zusätzlich exprimierten, verursachte eine Reihe von I_{Kr} -Blockern eine stärkere Inhibition und einen geringeren Grad an Erholung von der Blockade als in OCTN1-neaktiven Zellen. Auf diese Ergebnisse hatte die Temperatur keinen Einfluss. Eine Steigerung der Inhibition durch Erythromycin konnte der OCTN1 jedoch nicht bewirken (Mc Bride et al., 2009).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass sich das moderne Makrolid Roxithromycin von dem klassischen Makrolid Erythromycin in Bezug auf die Temperatursensitivität erheblich unterscheidet. So wäre auch denkbar, dass der OCTN1 sehr wohl einen Einfluss auf die Ausprägung der Inhibition durch Roxithromycin im Gegensatz zu Erythromycin haben könnte. Für solche Untersuchungen wären weitere Studien angebracht.

Inaktivierung

Zur Investigation des Roxithromycin-Einflusses auf die Inaktivierung wurden die Zeitkonstanten der Inaktivierung bestimmt. Roxithromycin beschleunigte die Inaktivierung, besonders im Bereich von -20 bis +30 mV und führte zu einer stärkeren „steady-state“-Inaktivierung.

Smith et al. untersuchten 1996 den Effekt des klassischen K^+ -Kanallockers Tetraethylammonium (TEA) auf die Inaktivierung von HERG. Sie fanden heraus, dass intrazellulär appliziertes TEA den Strom reduzierte, jedoch keine Veränderung des Zeitverlaufs der

Inaktivierung herbeiführte. Dies schloss eine N-Typ-Inaktivierung, die auf einem „Ball-Ketten“-Mechanismus basiert (Schönherr et al., 1996), und eine TEA-Blockade von intrazellulär aus. Eine solche Bindung an der intrazellulären Porenöffnung durch TEA würde mit der N-Inaktivierung in Konkurrenz stehen, die in Gegenwart von TEA langsamer wäre. Im Gegensatz dazu blockierte extrazelluläres TEA den Strom und führte zu einer Verlangsamung des Inaktivierungsprozesses. Die Arbeitsgruppe von Smith schlussfolgerte, dass es sich um C-Typ-Inaktivierung, die auf einer Konformationsänderung der äußeren Porenöffnung basiert, handeln muss und dass blockierte Kanäle nicht inaktivieren können.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich nicht in das von Smith et al. (1996) dargestellte Schema einordnen, da die Kinetik zum einen beschleunigt wurde und zudem die Kanäle trotz Blockade die Fähigkeit zur Inaktivierung nicht verloren haben. Auch die Beobachtungen von Volberg et al. (2002), nach denen Clarithromycin die Inaktivierungskinetik nicht beeinflusste, stehen im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen.

Die Inaktivierungskinetik macht die wichtige Rolle deutlich, die HERG zur normalen physiologischen Unterdrückung von Arrhythmien spielt, speziell bezogen auf die Unterdrückung von sich generierenden unreifen Schlägen (Smith et al., 1996). Die Arbeitsgruppe um Smith (1996) zeigte das Verhalten von HERG als Unterdrücker von unreifen Schlägen anhand eines Pulsprotokolls, das dem in dieser Arbeit verwendeten „steady-state“-Inaktivierungsprotokoll ähnelte: Nach einem langen depolarisierenden Puls, der die Kanäle aktivierte und inaktivierte, wurde die Membran hyperpolarisiert. Die Kanäle erholten sich von der Inaktivierung und begannen, langsam zu schließen. Bevor die Deaktivierung jedoch vollzogen war, wurde die Membran erneut depolarisiert, wie es bei einem Auftreten eines vorzeitigen unreifen Aktionspotentials passiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die Kanäle immer noch aktiviert, da sie sich noch nicht geschlossen hatten. Es wurde ein großer transienter Auswärtsstrom induziert, dessen physiologische Aufgabe es wäre, die Generation solcher zusätzlichen Schläge zu unterdrücken. Die Inaktivierung setzte anschließend erneut ein und führte zum exponentiellen Verfall des Auswärtsstromes, anhand dessen in dieser Arbeit die Zeitkonstanten der Inaktivierung bestimmt wurden. Unter dem Einfluss von Roxithromycin wurden in den durchgeführten Experimenten stark reduzierte auswärts gerichtete Ströme aufgezeichnet. Daraus wird ersichtlich, dass die Fähigkeit der *erg1a/1b*-Kanäle, solche vorzeitigen unreifen Schläge und somit potentielle Arrhythmien zu unterdrücken, unter der Einwirkung Roxithromycin erheblich vermindert sein könnte.

Ohne Inaktivierung weisen HERG-Kanäle keine Einwärtsrektifizierung auf (Smith et al., 1996). Aus den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde ersichtlich, dass die *erg1a/1b*-

Kanäle ihre Fähigkeit zu inaktivieren und somit ihren einwärtsrektifizierenden Charakter unter Roxithromycin nicht verloren haben.

Die Rektifizierung von HERG ist insofern physiologisch relevant, als dass sie den auswärts gerichteten HERG-Strom bei positiven Potentialen, die während der Plateau-Phase des kardialen Aktionspotentials auftreten, signifikant reduziert (Spector et al., 1996) und die Zelle befähigt, diese lange andauernde Depolarisation ohne signifikanten Kaliumverlust zu überstehen (diskutiert in Weinsberg et al., 1997).

Erholung von der Inaktivierung

Um den Einfluss Roxithromycins auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu untersuchen, wurde ein Inaktivierungsprotokoll durchgeführt. Die Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung wurden anhand des Deaktivierungsprotokolls bestimmt.

Die halbmaximale Inaktivierung wurde nicht signifikant verändert, tendenziell erfuhr sie aber eine leichte Verschiebung in Richtung negativer Potentiale. Das Einsetzen der Inaktivierung bei negativeren Membranpotentialen, wie es hier im Ansatz zu erkennen war, könnte Folge der linksverschobenen Aktivierungskurve sein oder durch eine direkte Veränderung des Inaktivierungsprozesses, wie die beschriebene Beschleunigung der Inaktivierung, bedingt sein. Für das klassische Makrolid Erythromycin konnte in vergleichbarer Konzentration und bei erhöhten Temperaturen keine Verschiebung der halbmaximalen Inaktivierung nachgewiesen werden (Gou et al., 2005).

Der Zeitgang der Erholung von der Inaktivierung von erg-Kanälen ist spannungsabhängig und funktionell wichtig für die Repolarisation lang andauernder Aktionspotentiale (Bauer et Schwarz, 2001). Die Zeitkonstanten wurden durch Roxithromycin nicht beeinflusst. Die Veränderungen, die zu beobachten waren, sollten den Veränderungen, die die Kanäle per se während der Versuchsdurchführung durchlaufen, zugeschrieben werden. Auch nach Applikation von extrazellulärer Lösung wurden vergleichbare Differenzen festgestellt. Diese Ergebnisse gehen konform mit denen von Volberg et al. (2002) bei der Investigation des Clarithromycin-Einflusses auf die Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung, in denen ebenfalls keine signifikanten Effekte festgestellt wurden.

5.2 Konkatinerte erg1/2-Kanäle

Ergänzend zu der Roxithromycin-Wirkung auf die heteromultimeren erg1a/1b-Kanäle und zum Zwecke der möglichen Abgrenzung gegeneinander wurden auch einige Parameter der konkatinerten erg1/2-Kanäle unter dem Einfluss von 100 μ M Roxithromycin untersucht.

Im Gehirn weisen die Kanäle erg1, erg2 und erg3 eine bestimmte Verteilung auf (Saganich et al., 2001; Guasti et al., 2005; Hirdes et al., 2005). Neuronale erg-Ströme werden wahrscheinlich über heteromultimere erg-Kanälen vermittelt (Hirdes et al., 2005). Dass die 3 reg-Untereinheiten in der Tat in der Lage sind, heteromultimere Kanäle zu bilden, wurde bereits 2001 durch Wimmers et al. nachgewiesen. Als probates Mittel zur Untersuchung dieser heteromultimeren Kanäle in definierter Zusammensetzung ist die Konkatinierung beschrieben (Isacoff et al., 1990; Wimmers et al., 2002). Man erhält homogene Kanalpopulationen, deren funktionelle Eigenschaften den typischen erg-Kanaleigenschaften nach heterologer Expression in Säugerzellen entsprechen (Wimmers et al., 2002). Bis zum heutigen Kenntnisstand wurden Konkatemere noch nicht in Bezug auf ihre pharmakologische Beeinflussbarkeit untersucht, und generell steht die Analyse der Funktion von erg-Kanälen im Gehirn noch ganz am Anfang (Schwarz et Bauer, 2004). Da beispielsweise erg1-Kanäle durch ihr pharmakologisches Profil gut charakterisiert werden können (Bauer et Schwarz, 2001), bot es sich im Zuge dieser Arbeit an, auch einen Ausblick auf die Beeinflussbarkeit der konkatinerten erg1/2-Kanäle durch Pharmaka zu liefern.

Aktivierung

Um herauszufinden, wie Roxithromycin die Aktivierung der Konkatemere beeinflusst, wurde das bereits bekannte Aktivierungsprotokoll durchgeführt.

Roxithromycin bewirkte eine Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung in Richtung negativer Potentiale sowie eine signifikante Abnahme der Tail-Stromamplitude, die in etwa in der Größenordnung der Inhibition bei erg1a/1b lag. Der Steigungsfaktor wurde nicht verändert. Auch der stationäre Auswärtsstrom am Ende des Vorpulses wurde signifikant inhibiert, und das Maximum der glockenförmigen Kurve dieses Stromes erfuhr eine Verschiebung nach links.

Das Ruhemembranpotential von Neuronen wird durch klassische einwärtsrektifizierende Kaliumkanäle aufrecht erhalten. Es gibt jedoch auch eine Vielzahl von Zelltypen, die keine klassischen Einwärtsrektifizierer exprimieren, sondern erg-Kanäle besitzen (Schwarz et Bauer, 2004). In diesen Zellen übernehmen die erg-Kanäle die Aufgabe, das Ruhemembran-

potential aufrecht zu erhalten. Die Blockade dieser erg-Kanäle induziert eine Depolarisation des Ruhemembranpotentials, die mit zellulären Funktionen korreliert. Die beobachtete Verschiebung des Aktivierungsprozesses in Richtung Hyperpolarisation führt tendenziell zur Aufrechterhaltung relativ negativer Membranpotentiale. Aufgrund des reduzierten Gesamtstromes ist jedoch anzunehmen, dass die Linksverschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung beim Vergleich dieser gegenläufigen Prozesse eine untergeordnete Rolle spielt.

Deaktivierung

Inwieweit Roxithromycin Auswirkungen auf die Deaktivierung der konkatinierten erg1/2-Kanäle hatte, wurde im nachfolgenden Abschnitt dargestellt.

Auch bei den Konkatemeren kam es unter dem Einfluss von 100 µM Roxithromycin zu einer Verschiebung der Verfügbarkeitskurve in Richtung negativer Potentiale. Der Steigungsfaktor wurde kaum beeinflusst, der Tail-Strom hingegen wurde deutlich inhibiert, und die Deaktivierungskinetik wurde insgesamt verlangsamt, wobei jedoch nur wenige Ergebniswerte das Signifikanzniveau unterschreiten konnten. Die Wirkung Roxithromycins auf die erg1/2-Konkatemere ähnelte insgesamt der auf erg1a/1b-Kanäle.

Schäfer und Kollegen (1999) vermuteten, dass sogar eine kleine Linksverschiebung der Verfügbarkeitskurve unter „steady-state“-Bedingungen zu einem negativeren Membranpotential in nativen laktotrophen Zellen, die eine betont langsam deaktivierende Stromkomponente besitzen, führte. In spontan-aktiven laktotrophen Zellen würde eine langsamere Deaktivierungskinetik des erg-Stromes zudem die Aktionspotentialfrequenz mindern.

Erholung von der Inaktivierung

Der Einfluss von Roxithromycin auf die Erholung von der Inaktivierung wurde analog zu den erg1a/1b-Kanälen anhand des Deaktivierungsprotokolls bestimmt.

Wie schon für erg1a/1b beschrieben, wurde auch die Erholung von der Inaktivierung bei erg1/2-Kanälen durch Roxithromycin nicht signifikant beeinflusst.

Interaktion von Roxithromycin und Terfenadin

Auch bei den konkatinierten erg1/2-Kanälen wurde im Anschluss an die Roxithromycin-Gabe zusätzlich Terfenadin appliziert, um den spezifischen Strom vollständig zu blockieren. Während der Versuchsdurchführung wurde deutlich, dass sich in dieser pharmakologischen Konstellation der erg-Strom nicht vollständig blockieren ließ. Die maximal erzielten Inhibitionen betragen im Aktivierungsprotokoll $79,4 \pm 2,2$ % und im Deaktivierungsprotokoll

74,3±9 % (n=4). In einem der Experimente (Abb. 18B, Experiment 2) wurde nach der Applikation von Terfenadin sogar eine weniger starke Inhibition des Tail-Stromes im Deaktivierungsprotokoll beobachtet. Die durch die zusätzliche Applikation von Volumen ins Bad bedingte Verdünnung der Roxithromycin-Konzentration von 100 µM auf 90 µM könnte die Schwächung der Inhibition bewirkt haben. Grundsätzlich konnte durch Terfenadin-Gabe alleine eine vollständige Stromblockade erzielt werden (Daten nicht gezeigt).



Abb. 21:

Modell der Bindungsstelle für Substanzen an HERG. Dargestellt sind die S5-, S6-Domäne und die Porenhelix zweier Untereinheiten. Die hier interessierenden aromatischen Reste Y652 (gelb) und F656 (pink) sind auf der S6-Domäne lokalisiert und interagieren mit strukturell unterschiedlichen Substanzen (Sanguinetti et Tristani-Firouzi, 2006).

Schon Volberg et al. führten 2002 eine Studie zur kompetitiven Ligandenbindung zwischen Makroliden und dem Klasse-III-Antiarrhythmikum Dofetilid durch. Die aromatischen Reste (Y652 und F656, Abb. 21) der S6-Domäne interagieren auf hydrophobem Wege mit Klasse-III-Antiarrhythmika (Mitcheson et al., 2000). In den Experimenten konnte beobachtet werden, dass Makrolide eine konzentrationsabhängige Inhibition der Dofetilid-Bindung am HERG-Kanal im mikromolaren Bereich zeigten, was dahingehend interpretiert wurde, dass beide Substanzen womöglich mit derselben Bindungsstelle wechselwirken.

Das Antihistaminikum Terfenadin interagiert ebenfalls mit dieser Bindungsstelle, insbesondere mit Y652 und F656 (Mitcheson et al., 2000). Durch Punktmutation der Aminosäure F656 konnte nachgewiesen werden, dass auch Erythromycin wahrscheinlich in eben dieser molekularen „Tasche“ an der distalen S6-Domäne bindet (Gou et al., 2005). Aus diesen Erkenntnissen und den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit könnten Schlüsse

dahin gehend gezogen werden, dass auch Roxithromycin und Terfenadin um dieselbe Bindungsstelle an den konkatinierten *erg1/2*-Kanälen konkurrieren.

Kumulative Effekte, die bei simultaner Einwirkung mehrerer Substanzen auftreten, spielen beim Herzen im Bezug auf die Kardiotoxizität eine kritische Rolle, da sich die einzelnen Inhibitionen potenzieren (Justo et al., 2004). Die Beobachtungen dieser Arbeit könnten einen Hinweis darauf geben, dass solche kumulativen Effekte von mehreren Substanzen im Gehirn womöglich keine Rolle spielen.

Die möglichen Erkenntnisse dieser Arbeit könnten als Ansatz für weiterführende Untersuchungen auf diesem Gebiet dienen. Die Funktion von HERG am Herzen ist die am besten erforschte physiologische Aufgabe von Kanälen der EAG-Familie (Bauer et Schwarz, 2001). Im Gegensatz dazu besteht für die weiteren physiologischen Funktionen, die *erg*-Kanäle erfüllen, beispielsweise auf neuronaler Ebene, noch erheblicher Forschungsbedarf

Entwickelt sich der Block durch Roxithromycin bei Depolarisation?

Um Hinweise auf den Zustand der *erg*-Kanäle zu erhalten, in dem Roxithromycin bevorzugt blockt, werden in diesem Abschnitt Beobachtungen, die in dieser Arbeit an verschiedenen Stellen gemacht wurden, näher beleuchtet.

In den „envelope of tails“-Versuchen für *erg1a/1b* nahm die Amplitude des Auswärtsstromes bei den langen depolarisierenden Pulsen ab. Es hatte den Anschein, als entwickle sich die Blockade durch Roxithromycin bei Depolarisation. Durch die Anhebung des Membranpotentials aktivierten die Kanäle, parallel dazu fand die schnelle Inaktivierung statt. Als logische Konsequenz müsste man annehmen, dass die inaktivierte Kanalkonformation die bevorzugte für den Block ist.

Im Zuge der Untersuchungen zur Deaktivierung wurde deutlich, dass besonders die langsame Deaktivierungskomponente durch Roxithromycin beeinflusst wurde und zwar dahingehend, dass sich τ_{langsam} vergrößerte. Diese Beobachtung könnte Schlüsse zulassen, nach denen das gebundene Roxithromycin den Deaktivierungsmechanismus mechanisch behinderte.

Um herauszufinden, in welchen Zustand Roxithromycin bevorzugt blockt, müssten spezielle Versuche durchgeführt werden. Generell tritt die Blockade von HERG-Kanälen vorzugsweise auf, wenn die Kanäle entweder im offenen oder im inaktivierten Zustand vorliegen (Kirsch et al., 2004). Gou et al. (2005) konnten für Erythromycin nachweisen, dass dieses in der Lage ist, HERG in geschlossener Konformation zu blockieren. Während der Superfusion mit Erythromycin wurden die Zellen bei -110 mV gehalten. Unter solch starker Hyperpolarisi-

sation war es wahrscheinlich, dass sich die Kanäle im geschlossenen Zustand befanden. Nach einer Dauer von 5 min folgte eine Serie depolarisierender Testpulse. Erythromycin zeigte einen sofortigen Block. Es war kein weiterer Block durch repetitive Stimuli zu erreichen. Wäre das Öffnen des Kanals für den Block notwendig gewesen, wäre die Bindungsstelle während der Hyperpolarisation nicht zugänglich gewesen. Auch Volberg et al. (2002) bedienten sich eines ähnlichen Versuchsaufbaus, um nachzuweisen, dass auch das moderne Makrolid Clarithromycin in der Lage ist, HERG im geschlossenen Zustand zu blockieren.

5.3 Native erg-Kanäle bei GH₃/B₆-Zellen

Um der Frage nachzugehen, ob auch native erg-Kanäle durch Roxithromycin beeinflusst werden und ob die Ergebnisse an heterologen Kanälen an den nativen Kanälen reproduziert werden können, wurden Experimente an GH₃/B₆-Zellen durchgeführt.

In GH₃/B₆-Zellen wurde 1990 durch Bauer et al. ein einwärtsrektifizierender K⁺-Strom (I_{K,IR}) beschrieben, der mit seinen biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften, wie die selektive Blockade durch E-4031 (Weinsberg et al., 1997), den von HERG vermittelten Strömen sehr ähnlich ist. Diese Ähnlichkeit drückt sich besonders aus in dem fast identischen Zeitverlauf der Deaktivierung sowie in der Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeitskurven (Hirdes et al., 2005). Diese Beobachtungen gehen konform mit der Expression von mRNA, die für erg1a und erg2 kodiert, und dem Fehlen von erg3-mRNA in GH₃/B₆-Zellen (Schäfer et al., 1999, Wulfsen et al., 2000). Auch für erg1b konnte keine RNA nachgewiesen werden (Kirchberger et al., 2006). Im Vergleich der erg-Ströme zeigten erg1a- und erg2-Ströme viel langsamere Deaktivierungskinetiken als erg1b- und erg3-Ströme (Wimmers et al., 2002; Hirdes et al., 2005). Desweiteren gibt es Hinweise darauf, dass sich womöglich auch die erg1a- und erg2-Untereinheiten in GH₃/B₆-Zellen zu heteromultimeren Kanälen zusammenschließen (Wulfsen et al., 2000; Wimmers et al., 2001).

Die Messungen der nativen Ströme fanden in einer extrazellulären Lösung mit einem auf 40 mM erhöhten K⁺-Anteil statt. Dies war nötig, um die an sich äußerst kleinen endogenen erg-Ströme in GH₃/B₆-Zellen in ihrer Amplitude zu vergrößern. Auch bei heterolog exprimierten Kanälen führt eine Erhöhung des extrazellulären Kaliums zu einem größeren Auswärtsstrom (Sturm et al., 2005). Dies ist ein paradoxer Effekt, da durch eine Erhöhung der Kaliumkonzentration im Extrazellularraum die chemische Triebkraft für den K⁺-Ausstrom

gesenkt wird man erwarten würde, dass dies den Ausstrom mindert und nicht verstärkt (Sanguinetti et al., 1995). Dass der Lösung zusätzlich Tetrodotoxin (TTX) zugefügt werden musste, stellte eine weitere Besonderheit dar. Zellen mit nativen erg-Strömen haben häufig andere kontaminierende Ströme, die pharmakologisch oder auf elektrophysiologische Weise ausgeschaltet werden müssen (Witchel et al., 2002). Das TTX blockierte die endogenen Na⁺-Kanäle der GH₃/B₆-Zellen. Aus diesem Grund bedienen sich die meisten Studien molekularbiologischer Methoden, um erg-Kanäle in ausgewählten Zelllinien heterolog zu exprimieren (Witchel et al., 2002).

Aktivierung

Die nativen erg-Ströme in GH₃/B₆-Zellen wurden anhand eines für diesen Zelltyp speziellen Aktivierungsprotokolls untersucht. Die pharmakologisch sensitiven Ströme wurden zu Beginn untersucht. Es zeigte sich, dass Roxithromycin hauptsächlich auf den Tail-Strom, also den erg-spezifischen Strom, wirkte. Durch die nachfolgende Gabe von Terfenadin konnte der Tail-Strom vollständig inhibiert werden, und auch der erg-unspezifische Auswärtsstrom wurde zum Teil blockiert. Dies zeigte, dass sich das Wirkspektrum von Terfenadin womöglich nicht auf erg-Ströme beschränkt. Da der Tail-Strom vollständig blockiert wurde, konnte in diesen Experimenten nicht die zuvor für die Konkatemere beschriebene Interaktion von Roxithromycin und Terfenadin beobachtet werden, obwohl es sich mutmaßlich auch in GH₃/B₆-Zellen um erg1a- und erg2-Kanäle handelt. Es könnten Vermutungen angestellt werden, nach denen die Konkatinierung an sich mit dem daraus resultierenden speziellen Kanalaufbau zu einem solchen Verhalten der Konkatemere führte.

Die Tail-Stromamplitude wurde durch das Roxithromycin signifikant und deutlich um $57,7 \pm 4,4$ % (n=6) inhibiert, auch die Aktivierungskurve erfuhr eine signifikante Verschiebung um etwa -5,4 mV nach links. Der Steigungsfaktor änderte sich nicht signifikant. Diese Ergebnisse reihen sich nahtlos in die Beobachtungen für die heteromultimeren erg1a/1b- und die konkatinieren erg1/2-Kanäle ein.

Auffällig war, dass die nativen erg-Kanäle in den entsprechenden Blindversuchen mit extrazellulärer Lösung deutlich stabiler in Bezug auf den „run down“ und die häufig in Whole-cell-Konfiguration beobachtete Linksverschiebung waren.

5.4 Dosierung

Im klinischen Alltag ist es von besonderer Bedeutung, sich über die Zusammenhänge zwischen einer Behandlung mit repolarisationsverlängernden Medikamenten und der daraus resultierenden proarrhythmischen Gefahr im Klaren zu sein. Die Tatsache, dass dieses Medikamentenspektrum viele primär nicht-kardial wirkende Substanzen abdeckt, betont seine klinische Relevanz. Vor der Anwendung jeglicher Medikamente mit QT-verlängernder Potenz ist es besonders wichtig, mögliche Risikofaktoren zu eruieren und wenn möglich zu beseitigen.

Im Zusammenhang mit der Einnahme von Roxithromycin wurden bereits einige Fälle von Torsaden berichtet (Woywodt et al., 2000; Justo et al., 2004). In diesen Publikationen führte vermutlich die Einnahmekombination von mehreren proarrhythmischen Substanzen zu den fatalen Folgen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Anwendung von Roxithromycin allein in antibiotischen Dosen (300 mg/Tag) ungefährlich sein dürfte. Klinische Argumente dafür lieferten West et al. (1998): Roxithromycin wird normalerweise nicht intravenös verabreicht, und seine höchsten Serumkonzentrationen im „steady-state“-Zustand bewegen sich in einer Größenordnung von 5-10 µg/ml (7-11 µM). Dabei beziehen sich diese Zahlen auf die Gesamtkonzentration. Zieht man nun die extensive Proteinbindung in Betracht, ist es unwahrscheinlich, dass die Konzentration an freier Substanz 1-3 µM überschreitet. Nur der freie Anteil an Roxithromycin ist für die Ionenkanalblockade relevant (West et al., 1998).

Von der Möglichkeit, dass Roxithromycin mit dem Metabolismus anderer für Torsaden bekannten Substanzen interagiert, kann man nicht gänzlich absehen. Es hat sich jedoch bereits herausgestellt, dass Roxithromycin weniger Potential als beispielsweise Erythromycin besitzt, das Cytochrom-P-450-System zu beeinträchtigen (West et al., 1998).

Es muss in Betracht gezogen werden, dass mehrere Risikofaktoren - für sich alleine harmlos - parallel auftreten und sich so zu einer fatalen Kombination potenzieren können. Solche Faktoren sind beispielsweise: Bis dato klinisch stumme Gendefekte, Leberschäden, Bradykardie, Hypokaliämie, übermäßiger Konsum von Grapefruit-Saft sowie versehentliche Überdosierungen, wie sie gerade bei Kindern vorkommen können. Interessanterweise waren die Unterschiede bei Untersuchungen zur Dauer der Gesamtelimination von Roxithromycin innerhalb der untersuchten Gruppen (Erwachsene, ältere Erwachsene, Kinder und Patienten mit Nieren- oder Leberschäden) geringer als erwartet (Nilsen, 1995).

6 Zusammenfassung

K⁺-Kanäle der erg-Familie werden in vielen Gewebetypen – wie im Myokard und im Gehirn - exprimiert. Heteromultimere erg1a/1b-Kanäle entstehen durch Koexpression beider Isoformen der porenbildenden α -Untereinheit. Sie wurden in der vorliegenden Arbeit stellvertretend für den kardialen I_{Kr}, den schnellen Anteil des „delayed rectifier“-Stromes, untersucht. Lange Zeit galt ausschließlich erg1a, besser bekannt unter „HERG“, als molekulares Korrelat des I_{Kr}. Die elektrophysiologische Patch-Clamp-Technik ist die Methode der Wahl, um die Sicherheit von Medikamenten präklinisch zu evaluieren. Die pharmakologisch-induzierte Form des LQT-Syndroms ist im Zusammenhang mit HERG bereits recht gut erforscht. Wie heteromultimere erg-Kanäle durch Medikamente beeinflusst werden, ist noch weitgehend unklar. Der Strom der erg1a/1b-Kanäle wurde konzentrationsabhängig durch das Makrolidantibiotikum Roxithromycin blockiert mit EC₅₀-Werten von 91,7 μ M bzw. 47,1 μ M. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die koexprimierte α -Untereinheit erg1b die pharmakologische Anfälligkeit des Kanals im Vergleich zu reinen erg1a-Kanälen leicht reduzierte. Dabei hat die Richtung des Stromflusses vermutlich keinen Einfluss auf das Ausmaß der Inhibition. Bei Roxithromycin scheint es sich bevorzugt um einen Blocker und weniger um einen „gating modifier“ zu handeln. Die Aktivierungskurve und das Maximum der Glockenkurve des stationären Auswärtsstromes erfuhren eine Linksverschiebung in Richtung negativer Potentiale, die Zeitkonstanten der Aktivierung nahmen um etwa ein Drittel ab. Auch die Boltzmann-Kurve der Deaktivierung wurde nach links verschoben, der Steigungsfaktor nahm leicht ab. Die Deaktivierungskinetik wurde verlangsamt durch Vergrößerung von τ_{langsam} und durch Zunahme seines relativen Anteils. Der Einfluss Roxithromycins auf erg1a/1b-Kanäle scheint weitgehend temperaturunabhängig zu sein. Es beschleunigte zudem den Inaktivierungsprozess und führte zu einer stärkeren „steady-state“-Inaktivierung. Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung und die Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung wurden nicht signifikant verändert. Insgesamt scheint der Einfluss des Makrolids auf die Kinetik des Kanals klinisch weniger relevant zu sein. Die Kumulation mehrerer Substanzen am Herzen birgt vermutlich die größten Gefahren. Diese Arbeit befasste sich zusätzlich mit konkatinierten erg1/2-Kanälen, die ihre Bedeutung auf neuronaler Ebene besitzen und bis dato noch nicht unter Medikamenteneinfluss untersucht wurden. Auch diese Kanäle reagierten auf Roxithromycin mit einer vergleichbaren Stromblockade, Verschiebung der Spannungsabhängigkeiten und Kinetikänderung. Ein kumulativer Effekt verschiedener Pharmaka spielt am Gehirn womöglich eine weniger wichtige

Rolle. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Roxithromycin und das Antihistaminikum Terfenadin sich gegenseitig behindern, da sie vermutlich um die gleiche Bindungsstelle an den Konkaternen konkurrieren. Unterschiedliche Beobachtungen deuten an, dass sich die Blockade durch Roxithromycin möglicherweise bei Depolarisation entwickelt. Die inaktivierte Kanalkonformation ist eventuell der bevorzugte Zustand für den Block. Auch native erg-Kanäle in GH₃/B₆-Zellen wurden durch Roxithromycin inhibiert. Die Blockade war vergleichbar stark zu der von heterologen Kanälen. Die Aktivierungskurve verschob sich ebenfalls in Richtung negativer Potentiale. Um die Physiologie von erg-Kanälen im Gehirn besser verstehen zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

In den üblichen antibiotischen Dosierungen scheint eine Anwendung von Roxithromycin sicher zu sein, sofern andere Risikofaktoren fehlen. Bei der Verordnung von Medikamenten sollte sich der Arzt stets der Komplexität der Interaktionsmöglichkeiten bewusst sein, da unter unglücklichen Umständen selbst ein vermeintlich sicheres Medikament wie Roxithromycin gefährlich werden kann.

7 Literatur

Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann, MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SAN (1999) MiRP1 Forms I_{Kr} Potassium Channels with HERG and Is Associated with Cardiac Arrhythmia. *Cell* **97**: 175-187.

Antzelevitch C, Sun ZQ, Zhang ZQ, Yan GX (1996) Cellular and Ionic Mechanisms Underlying Erythromycin-Induced Long QT Intervals and Torsades de Pointes. *JACC* **28(7)**: 1836-1848.

Bauer CK, Meyerhof W, Schwarz JR (1990) An inward-rectifying K^+ current in clonal rat pituitary cells and its modulation by thyrotrophin-releasing hormone. *J Physiol* **429**:169-189.

Bauer CK, Engeland B, Wulfsen I, Ludwig J, Pong O, Schwarz JR (1998) RERG is a molecular correlate of the inward-rectifying K current in clonal rat pituitary cells. *Receptors Channels* **6**: 19-29.

Bauer CK, Schwarz JR (2001) Physiology of EAG K^+ Channels. *J Membrane Biol* **182**: 1-15

Datenblatt Romicin (2000) Roxithromycin. URL:

<http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/discontinued/Romicintab.htm> [Stand: 24.09.09, 21:03].

De Ponti F, Poluzzi E, Montanaro N (2001) Organising evidence on QT prolongation and occurrence of *Torsades de Pointes* with non-antiarrhythmic drugs: a call for consensus. *Eur J Clin Pharmacol* **57**: 185-209.

Du X, Lu D, Daharsh ED, Yao A, Dewoody R, Yao JA (2006) Dimethyl sulfoxide effects on hERG channels expressed in HEK293 cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* **54**: 164-172.

Eschenhagen (2005) Kombination von Grapefruit-Saft und Medikamenten gefährlich. URL: <http://www.leukaemie-online.de/modules.php?op=modload&name=News&files=article&sid=195> [Stand: 25.09.09, 17:33].

Guasti L, Cilia E, Crociani O, Hofman G, Polvani S, Becchetti A, Wanke E, Tempia F, Arcangeli A (2005) Expression Pattern of the Ether-A-Go-Go-related (ERG) Family Proteins in the Adult Mouse Central Nervous System: Evidence for Coassembly of Different Subunits. *JCN* **491**: 157-174.

Guo J, Zhan S, Lees-Miller JP, Teng GQ, Duff HJ (2005) Exaggerated block of hERG (KCNH2) and prolongation of action potential duration by erythromycin at temperatures between 37°C and 42°C. *Heart Rhythm* **2**: 860-866.

Hirdes W, Schweizer M, Schuricht KS, Guddat SS, Wulfsen I, Bauer CK, Schwarz JR (2005) Fast erg K⁺ currents in rat embryonic serotonergic neurones. *J Physiol* **564**: 33-49.

Huffaker SJ, Chen J, Nicodemus KK, Sambataro F, Yang F, Mattay V, Lipska BK, Hyde TM, Song J, Rujescu D, Giegling I, Mayilyan K, Proust MJ, Soghoyan A, Caforio G, Callicott JH, Bertolino A, Meyer-Lindenberg A, Chang J, Ji Y, Egan MF, Goldberg TE, Kleinman JE, Lu B, Weinberger DR (2009) A primate-specific, brain isoform of KCNH2 affects cortical physiology, cognition, neuronal repolarization and risk of schizophrenia. *Nat Med* **15**: 509-518.

Isacoff EY, Jan YN, Jan LY (1990) Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature* **345**: 530-534.

Johnson JN, Hofman N, Haglund CM, Cascino GD, Wilde AAM, Ackerman MJ (2009) Identification of a possible pathogenic link between congenital long QT syndrome and epilepsy. *Neurology* **72**: 224-231.

Jones EMC, Roti Roti EC, Wang J, Delfosse SA, Robertson GA (2004) Cardiac I_{Kr} Channels Minimally Comprise hERG 1a and 1b Subunits. *J Biol Chem* **279(43)**: 44690-44694.

Justo D, Mardi T, Zeltser D (2004) Roxithromycin-induced *torsades de pointes*. *Eur J Inter Med* **15**: 326-327.

Kamiya K, Niwa R, Morishima M, Honjo H, Sanguinetti MC (2008) Molecular Determinants of hERG Channel Block by Terfenadine and Cisapride. *J Pharmacol Sci* **108**: 301-307.

Kaplan WD, Trout III WE (1969) The Behavior Of Four Neurological Mutants Of *Drosophila*. *Genetics* **61**: 399-409.

Keating MT, Sanguinetti MC (2001) Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiac Arrhythmias. *Cell* **104**: 569-580.

Kirchberger NM, Wulfsen I, Schwarz JR, Bauer CK (2006) Effects of TRH on heteromeric rat erg1a/1b K⁺ channels are dominated by the rerg1b subunit. *J Physiol* **571**: 27-42.

- Kirsch GE, Trepakova ES, Brimecombe JC, Sidach SS, Erickson HD, Kochan MC, Shyjka LM, Lacerda AE, Brown AM (2004) Variability in the measurement of hERG potassium channel inhibition: Effects of temperature and stimulus pattern. *J Pharmacol Toxicol Methods* **50**: 93-101.
- Larsen AP, Olesen SP, Grunnet M, Jespersen T (2008) Characterization of hERG1a and hERG1b potassium channels – a possible role for hERG1b in the I_{Kr} current. *Pflugers Arch* **456**: 1137-1148.
- Lees-Miller JP, Kondo C, Wang L, Duff HJ (1997) Electrophysiological characterization of an alternatively processed ERG K^+ channel in mouse and human hearts. *Circ Res* **81(5)**: 719-726.
- Lippiat JD (2008) Whole-Cell Recording Using the Perforated Patch Clamp Technique. In: *Methods in Molecular Biology, Potassium Channels Vol 491, Humana Press, Totowa*: 141-149.
- London B, Trudeau MC, Newton KP, Beyer AK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Satler CA, Robertson GA (1997) Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K^+ current. *Circ Res* **81(5)**: 870-878.
- McBride BF, Yang T, Liu K, Urban TJ, Giacomini KM, Kim RB, Roden DM (2009) The Organic Cation Transporter, OCTN1, Expressed in the Human Heart, Potentiates Antagonism of the HERG Potassium Channel. *J Cardiovasc Pharmacol* **0**: 1-9.
- Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC (2000) A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *PNAS* **97**: 12329-12333.
- Neher E, Sakmann B (1992) Die Erforschung von Zellsignalen mit der Patch-Clamp-Technik. *Spektrum der Wissenschaft Mai 1992*: 48-56.
- Nilsen OG (1995) Pharmacokinetics of Macrolides. Comparison of Plasma, Tissue and Free Concentrations with Special Reference to Roxithromycin. *Infection* **23**: 5-9.
- Numberger M, Draguhn A (1996) Patch-Clamp-Technik. *Spektrum Akad Verl, Heidelberg Berlin Oxford*, 67-70, 131.

- Omichi C, Momose Y, Kitahara S (2009) Congenital long QT syndrome presenting with a history of epilepsy: Misdiagnosis or relationship between channelopathies of the heart and brain? *Epilepsia* **50**(1): 1-4.
- Saganich MJ, Machado E, Rudy B (2001) Differential Expression of Genes Encoding Subthreshold-Operating Voltage-Gated K⁺ Channels in Brain. *J Neurosci* **21**(13): 4609-4624.
- Sale H, Wang J, O'Hara TJ, Tester DJ, Phartiyal P, He JQ, Rudy Y, Ackerman MJ, Robertson GA (2008) Physiological Properties of hERG 1a/1b Heteromeric Currents and a hERG 1b-Specific Mutation Associated With Long-QT Syndrome. *Circ Res.* **103**: e81-e95.
- Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK (1990) Two Components of Cardiac Delayed Rectifier K⁺ Current. *J Gen Physiol* **96**: 195-215.
- Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995) A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* **81**: 299-307.
- Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M (2006) hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* **440**: 463-469.
- Schäfer R, Wulfsen I, Behrens S, Weinsberg F, Bauer CK, Schwarz JR (1999) The erg-like potassium current in rat lactotrophs. *J Physiol* **518**: 401-416.
- Schönherr R, Heinemann SH (1996) Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *J Physiol* **493**: 635-642.
- Schwarz JR, Bauer CK (2004) Functions of erg K⁺ channels in excitable cells. *J Cell Mol Med* **8**(1): 22-30.
- Smith PL, Baukowitz T, Yellen G (1996) The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* **379**: 833-836.
- Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC (1996) Fast Inactivation Causes Rectification of the I_{Kr} Channel. *J Gen Physiol* **107**: 611-619.
- Sturm P, Wimmers S, Schwarz JR, Bauer CK (2005) Extracellular potassium effects are conserved within the rat erg K⁺ channel family. *J Physiol* **564**: 329-345.

- Vandenberg JI, Walker BD, Campbell TJ (2001) HERG K⁺ channels: friend and foe. *Pharmacol Sci* **22(5)**: 240-246.
- Vandenberg JI, Torres AM, Campbell TJ, Kuchel PW (2004) The HERG K⁺ channel: progress in understanding the molecular basis of its unusual gating kinetics. *Eur Biophys J* **33**: 89-97.
- Villa P, Sassella D, Corada M, Bartosek I (1988) Effects Of Roxithromycin, A New Semisynthetic Macrolide, And Two Erythromycins On Drug Metabolizing Enzymes In Rat Liver. *J Antibiotics* **XLI(4)**: 563-569.
- Volberg WA, Koci BJ, Su W, Lin J, Zhou J (2002) Blockade of Human Cardiac Potassium Channel Human *Ether-a-go-go*-Related Gene (HERG) by Macrolide Antibiotics. *JPET* **302**: 320-327.
- Warmke JW, Ganetzky B (1994) A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3438-3442.
- Weinsberg F, Bauer CK, Schwarz JR (1997) The class III antiarrhythmic agent E-4031 selectively blocks the inactivating inward-rectifying potassium current in rat anterior pituitary tumor cells (GH₃/B₆ cells). *Pflügers Arch* **434**: 1-10.
- West PD, Martin DK, Bursill JA, Wyse KR, Campbell TJ (1998) Comparative Study of the Effects of Erythromycin and Roxithromycin on Action Potential Duration and Potassium Currents in Canine Purkinje Fibers and Rabbit Myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol Therapeut* **3(1)**: 29-36.
- Wimmers S, Wulfsen I, Bauer CK, Schwarz JR (2001) Erg1, erg2 and erg3 K channel subunits are able to form heteromultimers. *Pflügers Arch* **441**: 450-455.
- Wimmers S, Bauer CK, Schwarz JR (2002) Biophysical properties of heteromultimeric erg K⁺ channels. *Pflugers Arch* **445**: 423-430.
- Wissenschaftliche Stellungnahme der DGZMK (2002) Einsatz von Antibiotika in der zahnärztlichen Praxis. URL: <http://www.dgzmk.de/zahnaerzte/wissenschaft-forschung/stellungnahmen/details/document/antibiotika-in-der-zahnaerztlichen-praxis.html> [Stand: 24.09.09, 9:53].

Witchel HJ, Milnes JT, Mitcheson JS, Hancox JC (2002) Troubleshooting problems with in vitro screening of drugs for QT interval prolongation using HERG K⁺ channels expressed in mammalian cell lines and *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Toxicol Methods* **48**: 65-80.

Woywodt A, Grommas U, Buth W, Rafflenbeul W (2000) QT prolongation due to roxithromycin. *Postgrad Med J* **76**: 651-654.

Wulfen I, Hauber HP, Schiemann D, Bauer CK, Schwarz JR (2000) Expression of mRNA for Voltage-Dependent and Inward-Rectifying K channels in GH₃/B₆ Cells and Rat Pituitary. *J Neuroendocrinol* **12**: 263-272.

Yamazaki H, Shimada T (1998) Comparative Studies Of *In Vitro* Inhibition Of Cytochrome P450 3A4-Dependent Testosterone 6 β -Hydroxylation By Roxithromycin And Its Metabolites, Troleandomycin, and Erythromycin. *DMD* **26(11)**: 1053-1057.

Zhong D, Li X, Wang A, Xu Y, Wu S (2000) Identification Of The Metabolites Of Roxithromycin In Humans. *DMD* **28(5)**: 552-559.

Zitron E, Scholz E, Owen RW, Lück S, Kiesecker C, Thomas D, Kathöfer S, Niroomand F, Kiehn J, Kreye VAW, Katus HA, Schoels W, Karle CA (2005) QTc Prolongation by Grapefruit Juice and Its Potential Pharmacological Basis. *Circulation* **111**: 835-838.

8 Danksagung

Ich möchte mich aufrichtig bei allen bedanken, die mich auf ganz unterschiedliche Weise unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Christiane K. Bauer für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit für die Dauer des Promotionsvorhabens. Ihre fachlichen Ratschläge und anregenden Diskussionen waren maßgeblich für das Zustandekommen dieser Arbeit.

Desweiteren danke ich Herrn Dr. Günter Glassmeier, der meine Arbeit stets mit Rat und Tat begleitet hat. Frau Annett Hasse und Frau Margrit Hölzel danke ich für die Unterstützung als Medizinisch-Technische Assistentinnen.

Herrn Prof. Dr. Jürgen R. Schwarz danke ich, dass er sich als Gutachter zur Verfügung gestellt hat.

Herrn Prof. Dr. Heimo Ehmke danke ich für die Möglichkeit, für diese Arbeit die Räume und Geräte des Instituts für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie am UKE nutzen zu dürfen.

Meiner Familie und insbesondere meinen Eltern möchte ich ein ganz besonders herzliches Dankeschön für die Unterstützung und die Bestärkung aussprechen.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Freunden für das Interesse an meiner Arbeit bedanken und dafür, dass sie stets an mich geglaubt haben.

Zum Schluss geht mein Dank an all jene, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber mich beim Verfassen dieser Arbeit unterstützt haben.

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Wentorf, im Oktober 2009

gez. Patrizia Bonk