

Untersuchung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle  
KCNQ1 und  $I_{Ks}$  unter dem Einfluss des Chromanols 293B und  
die Bedeutung des  $I_{Ks}$  bei Arrhythmien

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von

**Guiscard Friedrich Aldous Seebohm**  
aus Braunschweig

Frankfurt 2001  
DF1

Untersuchung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle KCNQ1 und  $I_{Ks}$  unter dem Einfluss des Chromanols 293B und die Bedeutung des  $I_{Ks}$  bei Arrhythmien

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Engels

Gutachter: Prof. Dr. A.E. Busch, Prof. Dr. Dr. E. Mutschler

Datum der Disputation: 1 August 2001

Disputationskomitee: Prof. Dr. A.E. Busch, Prof. Dr. Dr. E. Mutschler, Prof. Dr. Dingermann, Prof. Dr. Bamberg

## Abkürzungen

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| AP                            | Aktionspotential   |
| $\alpha$ -UE                  | $\alpha$ -Untereinheit   |
| $A_s, A_l$                    | Amplitude <i>schnell</i> , Amplitude <i>langsam</i> , schnelle und langsame Amplituden eines exponentialen Fits mit zwei Komponenten |
| ATP                           | Adenosin-5'-triphosphat  |
| BSA                           | Rinderserumalbumin   |
| $\beta$ -UE                   | $\beta$ -Untereinheit  |
| cAMP                          | Zyklisches Adenosinmonophosphat  |
| CHO-Zellen                    | <i>chinese hamster ovary</i> -Zellen   |
| cRNA                          | <i>copy</i> RNA  |
| <i>Gating</i>                 | Übergang von unterschiedlichen Kanalzuständen ineinander   |
| DMEM                          | Dulbecco's modified Eagle's medium   |
| DMSO                          | Dimethylsulfoxid   |
| FCS                           | fetales Kälber Serum   |
| $IC_{50}$                     | halbmaximale Wirkkonzentration (Inhibition) eines Stoffes  |
| $E_{rev}$                     | Umkehrpotential  |
| $I_{Ks}$                      | Strom des langsam aktivierenden Kaliumstroms   |
| $I_{sK}$                      | $\beta$ -Untereinheit des $I_{Ks}$ , auch MinK genannt   |
| <i>KCNE1</i>                  | Gen der $\beta$ -Untereinheit MinK   |
| KCNQ1                         | Kaliumkanal, $\alpha$ -Untereinheit, auch KvLQT1 genannt   |
| MinK                          | minimaler Kaliumkanal, $\beta$ -Untereinheit des $I_{Ks}$ , auch IsK genannt   |
| <i>Offrate</i> $1/\tau_{off}$ | Rate der Auflösung der Bindung   |
| <i>Onrate</i> $1/\tau_{on}$   | Bindungsrate   |
| <i>onset</i>                  | <i>onset of inactivation</i> ; Einsetzen der Inaktivierung   |
| PKA                           | Proteinkinase A  |
| PKC                           | Proteinkinase C  |
| <i>recovery</i>               | <i>recovery from inactivation</i> ; Erholung von der Inaktivierung   |
| <i>steady state block</i>     | Block im Gleichgewicht von Bindung und Auflösung der Bindung   |
| $\tau_s, \tau_l$              | Tau <i>schnell</i> , Tau <i>langsam</i> , schnelle und langsame Zeitkonstanten eines exponentialen Fits mit zwei Komponenten         |
| TEA                           | Tetraethylammonium   |
| TEVC                          | <i>Two Electrode Voltage Clamp</i> ; Zwei-Elektroden-Spannungsklemme   |

|       |                                 |
|-------|---------------------------------|
| $V_h$ | Haltepotential                  |
| VRAC  | volumenregulierter Chloridkanal |

## Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>ABKÜRZUNGEN</b> .....  | 2  |
| <b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....   | 4  |
| <b>EINLEITUNG</b> .....   | 6  |
| IONENKANÄLE .....   | 6  |
| SPANNUNGSABHÄNGIGE KALIUMKANÄLE .....   | 9  |
| KCNQ-KANÄLE .....   | 10 |
| VERTEILUNG UND FUNKTION VON KCNQ1/MiNK -KANÄLEN .....                                 | 11 |
| LONG QT-SYNDROM (LQTS) .....  | 13 |
| KALIUMSTRÖME DES HERZENS .....  | 15 |
| <i>Arrhythmien und deren Therapie</i> .....   | 18 |
| <i>Wirkweise der Klasse-III-Antiarrhythmika</i> .....                                 | 20 |
| PROBLEMBESCHREIBUNG UND FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT .....                             | 21 |
| <b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....  | 23 |
| LÖSUNGEN .....  | 23 |
| <i>Oozytenlösungen</i> .....  | 24 |
| <i>Kulturmedium für CHO-KCNQ1/MiNK-Zellen</i> .....                                   | 24 |
| <i>NaCl (nach Dunne)</i> .....  | 25 |
| <i>Intra CHO</i> .....  | 25 |
| <i>I<sub>Ks</sub> Lösung*</i> .....   | 26 |
| OOZYTEN ALS EXPRESSIONSSYSTEM .....   | 8  |
| <i>Gewinnung der Oozyten</i> .....  | 26 |
| <i>Präparation der Oozyten</i> .....  | 27 |
| <i>Mikroinjektion in Oozyten</i> .....  | 28 |
| ELEKTROPHYSIOLOGISCHE METHODEN .....  | 30 |
| <i>Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode</i> .....                                 | 30 |
| <i>Aufbau des TEVC-Messplatzes</i> .....  | 31 |
| <i>Stabil transfizierte Zellen</i> .....  | 34 |
| <i>Die Patch-Clamp-Methode</i> .....  | 34 |
| <i>Aufbau des Patch-Clamp-Meßplatzes</i> .....  | 37 |
| DATENANALYSE .....  | 39 |
| <i>Kurvendiskussion</i> .....   | 39 |
| <i>Berechnung der Fraktion inaktivierter Kanäle aus den Schwanzströmen</i> .....      | 40 |
| <i>Analyse der Stöchiometrie der KCNQ1-Inaktivierung</i> .....                        | 40 |
| <i>Statistik</i> .....  | 45 |
| <b>VERSUCHE UND ERGEBNISSE</b> .....  | 47 |
| WIRKUNG DER CHROMANOL 293B-ENANTIOMERE AUF DEN KCNQ1- UND<br>KCNQ1/MiNK-KOMPLEX ..... | 47 |

|   |            |
|---|------------|
| „USE-DEPENDENCE“ DES CHROMANOLBLOCKS.....   | 50         |
| FREQUENZABHÄNGIGKEIT DES CHROMANOLBLOCKS.....   | 51         |
| SPANNUNGSABHÄNGIGKEIT DER CHROMANOL 293B-WIRKUNG .....  | 53         |
| ABHÄNGIGKEIT DES CHROMANOLBLOCKS VON DER EXTRAZELLULÄREN<br>KALIUMKONZENTRATION .....   | 54         |
| ANALYSE DER BLOCKKINETIK .....  | 55         |
| <i>Aktivierungskinetiken</i> .....  | 56         |
| <i>Vorpulsabhängigkeit</i> .....  | 57         |
| <i>Schnelle Reaktivierung des <math>I_{Ks}</math>-Kanals</i> .....  | 60         |
| <i>Inaktivierung</i> .....  | 62         |
| EINFLUSS VON PROTEINKINASE A AUF $I_{Ks}$ UND DIE 293B-INTERAKTION.....   | 66         |
| <i>Der Einfluss der PKA-abhängigen Phosphorylierung des <math>I_{Ks}</math>-Kanals auf die<br/>    Kanaleigenschaften</i> ..... | 67         |
| <i>Versuche mit PKA in CHO-KCNQ1/MINK-Zellen</i> .....  | 69         |
| <i>Einfluss von PKA-Aktivierung auf den Block durch Chromanol 293B</i> .....  | 70         |
| EINFLUSS VON KANALÖFFNUNG DURCH MEFENAMINSÄURE AUF DIE<br>BLOCKWIRKUNG DER CHROMANOLE .....                                     | 72         |
| MUTATIONEN IM KCNQ1 VERURSACHEN LONG-QT1-SYNDROM.....   | 73         |
| <i>Mutagenesestudie</i> .....   | 76         |
| <i>Stöchiometrie</i> .....  | 78         |
| <i>Homologiemodell</i> .....  | 80         |
| <b>DISKUSSION</b> .....   | <b>82</b>  |
| BLOCKKINETIK VON CHROMANOL 293B.....  | 82         |
| PHYSIOLOGISCHE RELEVANZ DER UNGEWÖHNLICHEN $I_{Ks}$ -KINETIK .....  | 89         |
| PATHOPHYSIOLOGISCHE RELEVANZ DES $I_{Ks}$ .....   | 90         |
| CHROMANOL ALS KLASSE III-ANTIARRHYTHMIKUM.....  | 92         |
| <b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....  | <b>94</b>  |
| <b>LITERATUR</b> .....  | <b>96</b>  |
| <b>CURRICULUM VITAE</b> .....   | <b>110</b> |
| <b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b> .....   | <b>111</b> |
| <b>DANKSAGUNG</b> .....   | <b>114</b> |

## **Einleitung**

### **Ionenkanäle**

Schon für einen Einzeller, also etwa eine Amöbe, gibt es zwei für sein Überleben notwendige prinzipiell gegensätzliche Anforderungen zu erfüllen: Einerseits muß er die „Ordnung dessen, was Leben ausmacht“, gegen die „Unordnung“ der unbelebten Umgebung abschotten, andererseits ist er als - sowohl im thermodynamischen als auch im kommunikativen Sinn – „offenes System“ auf den Austausch von Wärme, Sauerstoff, Nahrungs- und Abfallstoffen sowie von Information mit seiner Umgebung angewiesen. Für das Abschotten sorgt die Zellmembran, deren hydrophobe Eigenschaften die wässrigen Lösungen außerhalb und innerhalb der Zelle vor der tödlichen Vermischung bewahren. Für die „Durchlässigkeit“ der Membranbarriere sorgen in ihr eingebaute Proteinmoleküle; wie die Carrier und Pumpen sowie die Rezeptoren und Ionenkanäle, die dem Empfang und der Weitergabe von Informationen aus der Umwelt dienen. Im Meer oder in einem See bleibt das Umgebungsmilieu des einzelligen Organismus weitgehend stabil, auch wenn er Substanzen aus seiner Umgebung entnimmt oder abgibt wird er damit auf der Grundlage seiner Membran und der integralen Proteine zu einem „autonomen“ Lebewesen.

Diese Autonomie geht im vielzelligen Organismus mit seinen z.T. hochspezialisierten Organen weitgehend verloren. Dadurch wird eine erhöhte Leistungsbereitschaft des Gesamtorganismus gewonnen. Die einzelnen Zellen schwimmen in einem Vielzeller wie dem Menschen nicht in einem Meer, sondern zwischen den Zellen befindet sich die Interstitialflüssigkeit als Grundlage für die Lymphe und zwischen Organen vermittelt das Blut. Aufgrund des relativ geringen Volumens der Interstitialflüssigkeit bei den Vielzellern ist ein erheblicher Aufwand nötig, um das extrazelluläre Milieu weitgehend konstant zu halten. Bei den Vielzellern gelten die gleichen Gesetze von innerer und äußerer Ordnung wie bei den Einzellern. Membranintegrierte Carrier und Pumpen vermitteln Stoffaustausch.

Die Rezeptoren und Ionenkanäle sind ubiquitär in menschlichen Zellen zu finden. Sie erlauben in Säugerzellen vor allem den kontrollierten Austausch der vier wichtigsten Ionen  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  über die Lipidmembran. Damit sind sie unter anderem die Voraussetzung für neuronale Signalleitung, für die Generierung muskulärer Aktionspotentiale und für die Ionenhomöostase des menschlichen Körpers. Ionenkanäle zeichnen sich durch drei Eigenschaften aus:

-Sie ermöglichen den Durchtritt von Ionen, also geladenen Teilchen, durch lipophile, hydrophobe Zellmembranen.

-Sie besitzen meist eine hohe Ionenselektivität.

-Sie können unterschiedliche Konformationen annehmen, von denen einige leitfähig (konduktiv) und andere nicht leitfähig (nicht-konduktiv) sind.

Der Übergang von einer Konformation in eine andere stellt u.a. die Grundlage für die zeitliche Integration von Signalen dar. Die Auslöser, welche zu diesen Konformationsänderungen (*Gating*) führen, sind z.B.

- Spannungsänderungen (spannungsabhängige Kanäle),
- mechanische Reize (ionotrope Mechanorezeptoren),
- Volumenänderungen mit einhergehender Änderung der Ionenstärke (volumenregulierte Kanäle, wie z.B. VRAC),
- Interaktion mit anderen Proteinen
- oder Ligandenbindung (ligandengesteuerte Rezeptoren).

Kombinationen aus unterschiedlichen Reizmodalitäten kommen ebenfalls vor. Hille stellte die These auf, dass alle Kanäle auf ein „Urgen“ zurückgehen (Hille, 1992). Dementsprechend würden evolutive Veränderungen die Kanäle an unterschiedliche Auslöser angepasst haben, wobei die Porenstruktur relativ wenig verändert wurde.

Innerhalb der Familie der Kaliumkanäle gibt es verschiedene Unterfamilien, die sich untereinander in ihren molekularen Strukturen und in ihren physiologischen sowie pharmakologischen Eigenschaften grundsätzlich unterscheiden. Hille stellte 1992 fest, dass die strukturelle Variabilität der Kaliumkanäle weitaus größer ist als die der Natrium-, Kalzium- und Chloridkanäle. Dies unterstreicht die Bedeutung dieser kaliumselektiven Kanäle.

In der vorliegenden Arbeit liegt das Gewicht auf den spannungsabhängigen Kaliumkanälen. Die Hauptfunktion spannungsabhängiger Kaliumkanäle ist die Hyperpolarisation und Repolarisation von Zellmembranpotentialen. Durch spannungsabhängiges Öffnen von Kaliumkanälen treten Kaliumionen dem Kaliumgradienten folgend normalerweise aus der Zelle aus und nähern damit das Membranpotential dem Kaliumgleichgewichtspotential an. Es findet demnach eine Verlagerung von positiven Ionen von innen nach außen statt. Konventionsgemäß wird ein Ausstrom von Kationen als Auswärtsstrom mit positivem Vorzeichen definiert.

Aufgrund der zentralen Rolle von Kaliumkanälen führen mutierte defekte Gene zu ernsthaften Krankheiten. Zu diesen „Ionenkanalerkrankungen“ gehören z.B. Muskelsteifigkeit, Lähmungen, Herzrhythmusstörungen, Ataxie, Migräne oder epileptische Anfälle (Ashcroft, 2000).



## Untersuchung von Kanälen in Oozyten als Expressionssystem

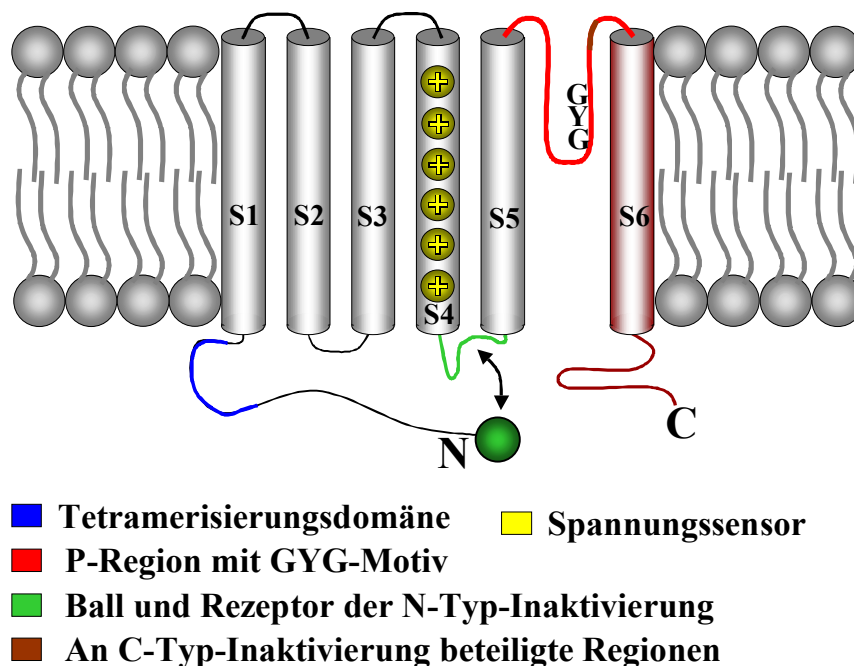
Die *Xenopus*-Oozyte ist als eine undifferenzierte, omnipotente Einzelzelle besonders hilfreich für Untersuchungen von exogenen, Oozyten-fremden Proteinen wie z.B. Ionenkanälen, Membranrezeptoren oder zytoplasmatischen Enzymen. Zur Durchführung dieser Experimente wird die jeweilige *messenger*-RNS in die Oozyte mikroinjiziert und nach 1-8 Tagen werden die entsprechenden Expressionsprodukte der in der lebenden Zelle oder im Zellextrakt detektiert. Das Studium exogener Proteinspezies nach Mikroinjektion von mRNA aus vielen bisher getesteten Organismen bedeutet Untersuchungen über Regulation, Kontrolle und Charakterisierung der Proteinbiosynthese in lebenden Zellen und nicht im *in-vitro*-System. Die große Masse und die Translationskapazität einer einzelnen Oozyte ermöglichen hohe Proteinausbeuten bei sparsamem mRNA Einsatz. Es genügt eine einmalige Injektion von weniger als 1 pg mRNA pro Oozyte, um detektierbare Proteinmengen zu erhalten. Es werden aber meist 5-10 ng mRNA injiziert. Die Oozyte kann posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, N-Glykosylierung, Hydroxylierung, Acetylierung) durchführen und transportiert das Protein in das richtige Kompartiment (protein sorting, Sekretion). Oligomere Proteine werden korrekt zusammengesetzt und Signalsequenzen abgespalten. Diese Eigenschaften sind insbesondere für die funktionelle Expression von Membranproteinen von größter Bedeutung (Sigel, 1990). Der Umgang mit Oozyten erfordert im Gegensatz zur Zellkultur keine strikt sterilen Bedingungen. Die Präparation, Lagerung und Handhabung ist wegen der Größe der Zellen unproblematisch.

Es können mehrere Elektroden oder Mikrokapillaren gleichzeitig in die Oozyte eingestochen werden, um simultan die verschiedenen elektrophysiologischen Parameter ( $E_m$ ,  $R_m$ ,  $C_m$ ) oder Ionenströme zu messen, oder Injektate wie *second messenger* ( $Ca^{2+}$ ,  $InsP_3$ , cAMP, cGMP), cDNS oder Blocker zu verabreichen. Ionenkanäle, Rezeptoren oder Transport-Proteine können exprimiert und ihre Funktion entweder mittels der „Zwei-Mikroelektroden-Technik“ oder „Patch-Clamp-Technik“ analysiert werden. Die Expression von spannungsabhängigen Kaliumkanälen in Oozyten in Kombination mit molekularbiologischen Techniken hat zu einem grundlegenden Verständnis von Kaliumkanälen geführt.

## Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* hat sehr großen Anteil an unserem Verständnis der molekularen Biologie von spannungsabhängigen Kaliumkanälen. Der erste identifizierte  $K^+$ -Kanal wurde durch die Klonierung des *Shaker*-Gens identifiziert, dessen Protein ein „Schütteln“ oder „Schlottern“ der Fliegen bewirkt, wenn sie Äther ausgesetzt werden (Pappazian *et al.*, 1987). Danach wurden weitere Familien von verwandten Kanälen aus der Fruchtfliege kloniert. Diese Kanäle waren *Shab*, *Shaw* und *Shal*. Die entsprechenden Säugerkanalfamilien sind Kv1 (*Shaker*), Kv2 (*Shab*), Kv3 (*Shaw*) und Kv4 (*Shal*) (Dolly and Parcej, 1996). Mittlerweile wurden neun Unterfamilien von Kv-Kanälen beschrieben (Kv1-9). Auf der Ebene der Aminosäuresequenzen besteht 70% Homologie zwischen den unterschiedlichen Unterfamilien der Kv-Kanäle (Ashcroft, 2000). Spannungsabhängige Kaliumkanäle werden aus vier porenformenden  $\alpha$ -Untereinheiten aufgebaut, die mit einer variablen Anzahl von unterschiedlichen  $\beta$ -Untereinheiten assoziieren können. Jede  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus sechs membranspannenden hochkonservierten Segmenten (S1-S6). Intrazellulär sind der C- und der N-Terminus von variabler Länge lokalisiert. Das S4-Segment zeigt hohe Homologie zu den S4-Segmenten der Natriumkanäle: Sie sind amphipatisch und haben in der Regel an jeder dritten Position eine positiv geladene Aminosäure. Es gibt Hinweise darauf, dass das S4-Segment an der spannungsabhängigen Aktivierung der Kv-Kanäle beteiligt ist (Pappazian *et al.*, 1991). Der N-Terminus ist ebenfalls an der spannungsabhängigen Aktivierung und Inaktivierung beteiligt. Die Verbindungsschleife zwischen den Segmenten S5 und S6 wird auch als S5-S6-Linker, P-Region (auch Porenregion) oder H5 bezeichnet. Dieser Bereich soll in die Membran eintauchen und an der Bildung der Kanalpore beteiligt sein (Isacoff *et al.*, 1991). In allen kaliumselektiven Poren ist in diesem Schleifenbereich ein „GYG“ oder „GFG“-Motiv zu finden. Es scheint der engste Teil der Ionenpore zu sein und die molekulare Basis des Selektivitätsfilters darzustellen. An der Basis des N-Terminus liegt die Tetramerisierungsdomäne, die eine nicht-kovalente Bindung der vier  $\alpha$ -Untereinheiten ermöglicht. Am Ende des Aminoendes des Proteins befindet sich eine Struktur, die als Ball bezeichnet wird (Armstrong & Bezanilla, 1977; Rettig *et al.*, 1994). Dieser Ball kann an einen Rezeptor, der durch die S4-S5-Verbindungsschleife gebildet wird, binden (Isacoff *et al.*, 1991). Allerdings ist diese Ball-Rezeptorinteraktion nur im geöffneten Zustand des Kanals möglich. Der geöffnete Kanal kann nach Bindung des Balls an den Rezeptor keine Ionen mehr leiten und ist demnach „geöffnet-inaktiv“. Den Übergang vom geöffneten Kanal in den inaktiven Zustand nennt man Inaktivierung. Diese Inaktivierung durch einen Ball, der über eine Aminosäurekette mit dem Kanal (Armstrong & Bezanilla,

1977) oder einer  $\beta$ -Untereinheit (Rettig *et al.*, 1994) verbunden ist und die Pore von innen „verstopft“, nennt man N-Typ-Inaktivierung. Der Mechanismus wird durch das „Modell des Balls an der Kette“ oder englisch auch „*ball and chain model*“ erklärt. Kanäle können aber auch durch eine Konformationsänderung im äußeren Teil des P-Bereiches nahe des S6-Segmentes (englisch *outer vestibule*) aus dem offenen Zustand in einen inaktivierten Zustand überführt werden. Diese Art der Inaktivierung wird als C-Typ-Inaktivierung bezeichnet. Sie wird von Änderungen der Ionenselektivität begleitet (Lopez-Barneo *et al.*, 1993). Die C-Typ-Inaktivierung ist unter gleichen Aktivierungsbedingungen sehr viel langsamer als N-Typ-Inaktivierung. Häufig kommen beide Inaktivierungstypen in einem Kanal vor, wobei sich die Inaktivierungen gegenseitig beeinflussen (Hoshi *et al.*, 1991). Die folgende Graphik soll dies weiter verdeutlichen.



**Abbildung 1: Darstellung einer Kv-Kanaluntereinheit**

Eine Kv-Kanaluntereinheit besteht aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6). Bei Depolarisation verschiebt sich der positiv geladene S4-Bereich (Spannungssensor) aus dem Membranbereich heraus und bewirkt dadurch eine Konformationsänderung, die den Porenbereich einschließt. Der Selektivitätsfilter wird durch das GYG-Motiv gebildet. N-terminal sind die Tetramerisierungsdomäne und meist eine „Ballstruktur“ lokalisiert. Dieser Ball kann mit der Rezeptorstruktur der S4-S5-Verbindungsschleife interagieren (Isacoff *et al.* 1991, Holmgren *et al.* 1996). C-terminal nach dem GYG-Motiv liegen die an C-Typ Inaktivierung beteiligten Regionen (Hoshi *et al.*, 1991, Liu *et al.*, 1996).

## KCNQ-Kanäle

Das erste klonierte Mitglied der KCNQ-Familie war KCNQ1. Eine Teilsequenz des Gens wurde durch Positionsklonierung gewonnen (Wang *et al.*, 1996). Die gesamte

Aminosäuresequenz wurde davon ausgehend schrittweise erforscht. Aufgrund ihrer Homologie zum KCNQ1 wurden vier weitere Kanäle kloniert (KCNQ2-5), die bei vorliegendem genetischen Defekt fast alle eine Krankheit bewirken. So können Mutationen in KCNQ2 und KCNQ3 eine neuronale Übererregbarkeit erzeugen, die zu Epilepsie führt (Biervert *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Charlier *et al.*, 1998). Diese dominant erbliche Epilepsie wird als *benign familial neonatal convulsions* (BFNC) bezeichnet. Dabei handelt es sich um benigne Neugeborenenkrämpfe. Mutationen in KCNQ4 können bei progredientem Hörverlust eine Zelldegeneration bewirken (Kubisch *et al.*, 1999).

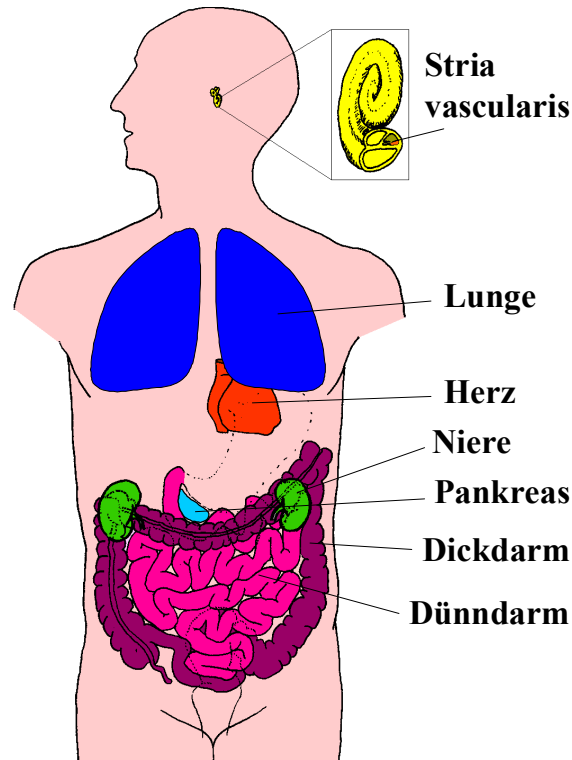
Die Primärstruktur der KCNQ-Kanäle lässt eine Membranstruktur erwarten, die der der Kv-Kanäle ähnelt: sechs Transmembransegmente (S1-S6), eine typische S4-Domäne, eine S5 und S6 verbindende Porenschleife und intrazellulär lokalisierte N- und C-Termini. Die C-Termini der KCNQ-Kanäle sind relativ lang und bei KCNQ 2, 3 und 5 länger als beim KCNQ1. Ein weiterer Unterschied zu den Kv-Kanälen besteht darin, dass die Tetramerisierungsdomäne nicht im N-terminalen Bereich, sondern wie bei Kanälen der eag-Familie, einer weiteren Kaliumkanalfamilie, im C-Terminus liegt (Schmitt *et al.*, 2000). Es ist erwähnenswert, dass KCNQ1 als einzige KCNQ-Kanaluntereinheit mit anderen Mitgliedern der KCNQs keine Heteromeren bilden kann, und dass der KCNQ1 eine vom klassischen C- oder N-Typ abweichende Inaktivierung aufweist (Tristani-Firouzi, M. & Sanguinetti, M. C., 1998; Pusch *et al.*, 1998).

MinK kodiert ein kleines Protein von 126-130 Aminosäuren Länge (Takumi *et al.* 1998), welches zu einer neuen Unterfamilie von  $\beta$ -Untereinheiten gehört und mit KCNQ1 interagiert. Der Genlocus, auf dem MinK liegt, wird auch als KCNE1 bezeichnet. MinK (auch Isk oder KCNE1 genannt, Takumi *et al.*, 1988) verlangsamt das Schaltverhalten (*Gating*), hebt die Inaktivierung auf (oder verdeckt sie) und vergrößert die Stromamplitude des KCNQ1-Kanals. In *Xenopus*-Oozyten induzierte die Expression dieses Proteins einen langsam aktivierenden Kaliumstrom, der dem  $I_{Ks}$  Strom im Herzen sehr ähnlich war. Deshalb wurde früher vermutet, dass MinK allein imstande ist, einen funktionellen Kaliumkanal zu bilden. Später erkannten Sanguinetti *et al.* (1996), dass MinK mit einem endogenen KCNQ1-Kanal in *Xenopus*-Oozyten interagiert und somit der Ionenstrom klar messbare Amplituden erreicht.

## **Verteilung und Funktion von KCNQ1/MinK -Kanälen**

KCNQ1 und MinK wurden im Herzen, Innenohr, Pankreas, Niere, Lunge, Darm und der Plazenta nachgewiesen. In der Lunge, dem Pankreas und der Plazenta ist die Funktion von  $I_{Ks}$

noch nicht verstanden. In der *Stria vascularis* des Innenohres hat  $I_{Ks}$  die wichtige Aufgabe, die Kaliumkonzentration der *Scala media* hoch zu halten. Dazu fließt Kalium durch  $I_{Ks}$ -Kanäle der Marginalzellen der *Stria vascularis* in die *Scala media* hinein und trägt somit zur Bildung der Endolymphe bei. In Kolonkrypten kann durch einen  $I_{Ks}$ -ähnlichen Kanal PKA-abhängig die Chloridsekretion ins Darmlumen gesteuert werden.  $I_{Ks}$ -ähnliche Kanäle (KCNQ1/KCNE2) in Kryptenzellen des Duodenums sind ebenfalls an der Chloridsekretion ins Darmlumen beteiligt (Schroeder *et al.*, 2000).



### Abbildung 2: Verteilung der $I_{Ks}$ -Kanäle im menschlichen Körper

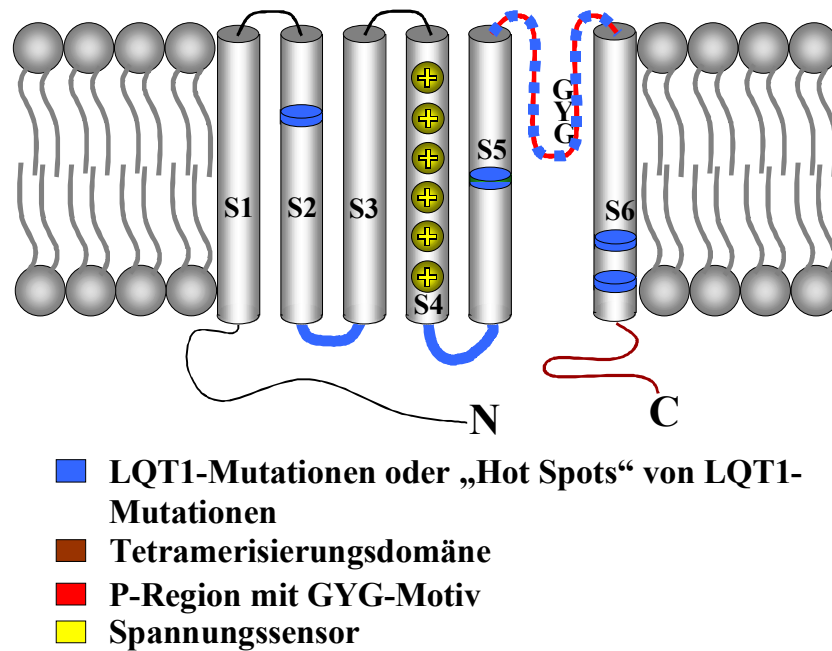
Der  $I_{Ks}$ -Kanal und  $I_{Ks}$ -ähnliche Kanäle kommen im Innenohr, Herz, Niere, Pankreas, Plazenta, Dickdarm und im Dünndarm vor. Sie scheinen in diesen Geweben ganz unterschiedliche Funktionen zu haben, wobei aber noch nicht alle ihrer Aufgaben bekannt sind.

Man geht heute davon aus, dass ein KCNQ1/MinK-Kanal die molekulare Basis für den nativen  $I_{Ks}$ -Strom ist, der beim Menschen zur Repolarisation des atrialen und ventrikulären Herzaktionspotentials beiträgt (Jurkiewicz & Sanguinetti, 1993; Sanguinetti *et al.*, 1996, Barhanin *et al.* 1996). Bei Mutationen in den Genen KCNE1 (MinK-Gen) und KCNQ1 kann es zu Krankheitssymptomen kommen, die durch eine Veränderung des kardialen Repolarisation gekennzeichnet ist, was als Long-QT-Syndrom bezeichnet wird. Die dominant vererbte Form von defizienten KCNQ1/MinK-Kanälen wird nach den Erstbeschreibern auch Romano-Ward-Syndrom genannt (Ward, 1964; Romano, 1965). Die seltenere rezessive Form

wird als Jervell- und Lange-Nielsen-Syndrom (JLN-Syndrom) bezeichnet und geht zusätzlich mit einem Defekt des Innenohrs einher (Jervell & Lange-Nielsen, 1957). Weitere Krankheitssymptome, die auf die fehlende KCNQ1/MinK-Leitfähigkeit insbesondere in anderen Geweben zurückzuführen wären, sind nicht bekannt. Demnach ist die Bedeutung von KCNQ1/MinK-Kanälen hier weniger wichtig und kann möglicherweise kompensiert werden.

### **Long-QT-Syndrom (LQTS)**

Die Manifestationen des LQTS sind sehr unterschiedlich, so dass frühzeitig verschiedene Genmutationen vermutet wurden. Durch Genanalysen der betroffenen Familien konnten bisher sechs Genloki identifiziert werden. Mindestens vier davon kodieren für Ionenkanäle. Die häufigste Form des LQTS basiert auf Mutationen im KCNQ1 (LQT1), welches auf Chromosom 11 liegt. Die selteneren Formen gehen auf Mutationen auf den Chromosomen 3, 4, 7 und 21 zurück (Keating *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1994; Schott *et al.*, 1994; Splawski *et al.*, 1997). Die Mutationen im KCNQ1 (LQT1-Mutationen) scheinen in bestimmten Regionen mit besonders hoher Dichte („Hot Spots“) aufzutreten. Wahrscheinlich sind diese Regionen sehr wichtig für die Kanalfunktion, so dass sich Veränderungen hier besonders drastisch auswirken. Es verwundert nicht sehr, dass Mutationen in dem Bereich der Pore, also dem Teil, der den Ionenleitweg bildet, zu defekten Proteinen führen können. In der sorgfältigen Untersuchung von Franqueza *et al.* (1999) wurden Einflüsse der Mutationen im S4/S5-Verbindungsstück auf die Kanalkinetik (*Gating*) gefunden. Offensichtlich ist diese Region, wie bei Kv-Kanälen auch für die spannungsabhängigen Konformationsänderungen von Bedeutung (Holmgren *et al.*, 1996, Ashcroft, 2000). Die Auswirkungen der Mutationen im S5-Segment, im S6-Segment, im S2/S3-Verbindungsstück und im S2-Bereich sind noch nicht charakterisiert worden. Die bekannten LQT1-Mutationen sind im Anhang A aufgeführt. Die LQT1-Mutationen oder Mutationsregionen sind in die Modellzeichnung des KCNQ-Kanals eingeführt.



### Abbildung 3: Lokalisation von LQT1-Mutationen

In der dargestellten KCNQ1-Untereinheit sind die publizierten LQT1-Mutationen in blau eingezeichnet.

Ein LQT2 wird durch Mutation des HERG-Kanals verursacht (Curran *et al.*, 1995). LQT3 geht auf Mutationen im Natriumkanal SCN5A zurück (Wang *et al.*, 1995). Die Ursache für das sehr seltene LQT4 ist noch unbekannt. Mutationen des Gens KCNE1 konnten als Ursache für das LQT5-Syndrom ausgemacht werden (Splawski *et al.*, 1997). Zusätzlich zu den vererbten LQT-Syndromen treten auch erworbene QT-Syndrome auf, deren Ursachen vielschichtig sind reichen von Elektrolytstörungen (Hypokaliämie, Hypomagnesiämie, Hypokalziämie) über bestimmte Gifte (Arsen, Organophosphate) und einigen Herzkrankheiten (z.B. Myokarditis, Bradykardie) bis hin zu bestimmten Arzneistoffen (Metzger & Friedman, 1993). Hierzu zählen z.B. Antiarrhythmika der Klasse IA (z.B. Chinidin) und Klasse III (z.B. Sotalol, Amiodaron), nicht-sedierende Antihistaminika (Astemizol, Terfenadin), Haloperidol, Phenothiazine und andere. Eine Zusammenfassung hierzu wurde durch Hunt & Stern veröffentlicht (1995). *Torsade de pointes* sind häufig typische und ungewollte Nebenwirkungen von Medikamenten, die die QT-Zeit verlängern (Lazzara, 1996).

Die folgende Tabelle 1 ist eine Zusammenstellung der bekannten LTQ-Syndrome:

| Syndrom         | Chromosomale Lokalisation | Gen       | Protein                                     |
|-----------------|---------------------------|-----------|---|
| LQT1            | 11p15.5                   | KCNQ1     | K <sup>+</sup> -Kanal ( $\alpha$ -UE)       |
| LQT2            | 7p35-36                   | HERG      | K <sup>+</sup> -Kanal ( $\alpha$ -UE)       |
| LQT3            | 3p21-24                   | SCN5A     | Na <sup>+</sup> -Kanal ( $\alpha$ -UE)      |
| LQT4            | 4p25-27                   | ?         | ?   |
| LQT5            | 21q22.1-22.2              | KCNE1     | K <sup>+</sup> -Kanal ( $\beta$ -UE), MinK  |
| LQT6            | 21p22.1                   | KCNE2     | K <sup>+</sup> -Kanal ( $\beta$ -UE), Mirp1 |
| Erworbenes LQTS | z.B. 7p35-36              | z.B. HERG | unterschiedlich                             |

Für das Verständnis der krankheitsverursachenden Wirkungen der Mutationen muss ein Grundverständnis von der physiologischen Bedeutung der betroffenen KCNQ1/MinK-Kanäle im gesunden Zustand vorhanden sein. Zu diesem Zweck schließt sich eine Betrachtung der Kaliumströme im Herzen an.

### Kaliumströme des Herzens

Kaliumkanäle sind in Herzzellen in großer Zahl und Diversität vorhanden. Sie beeinflussen das Membranpotential, die Amplitude, Dauer und Eigenschaften der Refraktion des Aktionspotentials. Die unterschiedliche Länge und Verlaufsform des Aktionspotentials in den verschiedenen funktionellen Abschnitten des Herzens, aber auch innerhalb der Muskelschichten des Myokards, erklärt sich u.a. durch die variable Dichte unterschiedlicher Kaliumkanäle (Barry & Nerbonne, 1996). Die am Aktionspotential beteiligten Kaliumströme lassen sich funktionell in zwei Gruppen unterteilen:

- Kaliumströme, die das Ruhemembranpotential und die generelle Erregbarkeit der Zellen regulieren. Hierzu gehören  $I_{K(Ach)}$ ,  $I_{K(ATP)}$  und  $I_{K1}$ .
- Repolarisierende, meist spannungsgesteuerte Auswärtsströme, welche die Höhe und Dauer des Aktionspotentials bestimmen.

In den Schrittmacherzellen des sinoatrialen und atrioventrikulären Knotens wird die fortschreitende Depolarisation, welche zum Erreichen des Schwellenpotentials der Kalziumkanäle führt, vor allem durch Schrittmacherkanäle der HCN-Familie bewirkt (Snyders, 1999). Zusätzlich findet sich in den Zellen des sinoatrialen Knotens der  $I_{K(Ach)}$ , der



durch den Parasympathikus über  $M_2$ -muskarinische Azetylcholinrezeptoren gesteuert wird (Kurachi *et al.*, 1992).

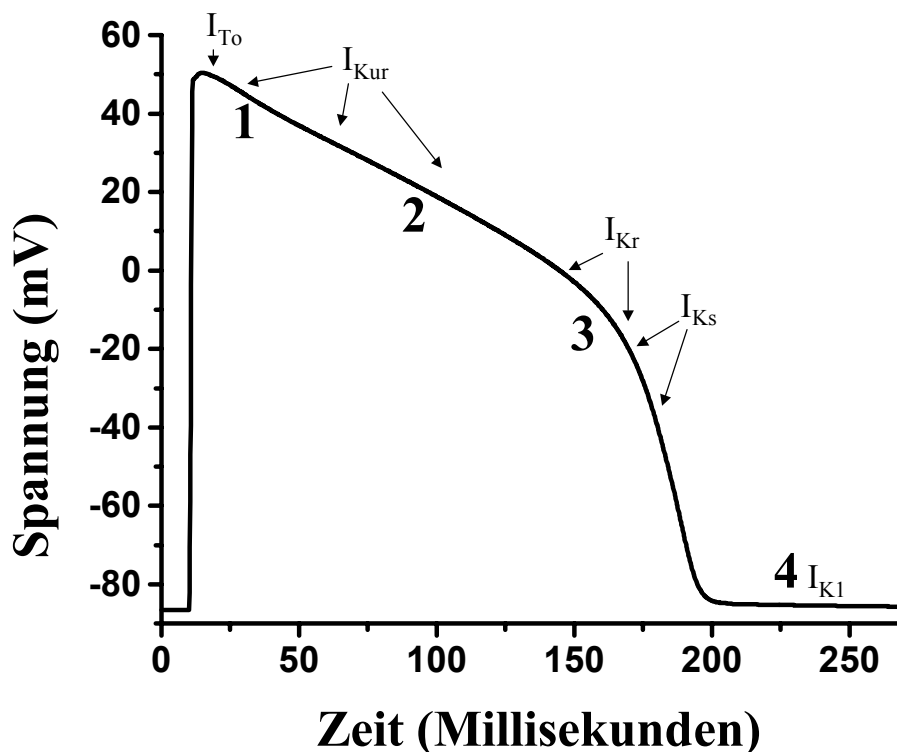
Die stark einwärtsgerichtenden  $I_{K1}$ -Ströme werden beim Menschen sowohl in den Vorhöfen (Heidbüchel *et al.*, 1990) als auch in den Ventrikeln (Varro *et al.*, 1993) gefunden.  $I_{K1}$  kommt große Bedeutung bei der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials in der späten Repolarisationsphase 3 und der Phase 4 des Aktionspotentials zu (siehe Abbildung 4). Der  $I_{K1}$  bestimmt dabei maßgeblich das Ruhemembranpotential in fast allen Kardiomyozyten mit Ausnahme der Zellen des Sinoatrial- und Atrioventrikularknotens (Irisawa *et al.*, 1993). Sehr wahrscheinlich unterliegen dem  $I_{K1}$  die Einwärtsrektifizierer der Kir2.x-Familie. Von diesen Kir-Kanälen sind bisher Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3 und Kir2.4 nachgewiesen worden (Barry und Nerbonne, 1996). Unter Bedingungen mit normalem ATP-Spiegel werden die  $K_{ATP}$ -Kanäle des Herzens inhibiert. Unter pathophysiologischen Bedingungen wie Hypoxie und Ischämie, die mit einem absinkenden ATP-Spiegel einhergehen, zeigt sich eine verstärkte, schwach einwärtsgerichtende  $I_{K(ATP)}$ -Leitfähigkeit, die zur Verkürzung des Aktionspotentials führen kann (Faivre & Findlay, 1990). Spannungsgesteuerte Auswärtsgleichrichter (*delayed rectifier*) öffnen im Gegensatz zu den eben beschriebenen Einwärtsgleichrichtern bei Depolarisation. Die dadurch entstehenden Kaliumauswärtsströme repolarisieren die Zelle und bestimmen somit Höhe und Dauer des Aktionspotentials (AP). Am Herzen lassen sich verschiedene repolarisierende Ströme unterscheiden.

Am Beginn des sich entwickelnden ventrikulären Aktionspotentials stehen die als  $I_{to}$  (transient outward) und  $I_{Kur}$  (ultra rapid) (Boyle & Nerbonne, 1991) bezeichneten Kaliumströme. Die molekulare Basis des  $I_{to}$  sind rasch inaktivierende Kaliumkanäle wie Kv1.4, Kv4.2 und Kv4.3, aber auch eine  $Ca^{2+}$ -aktivierte, nicht-inaktivierende Komponente (BK-Kanal) (Deal *et al.*, 1996, Snyders, 1999). Grundlage des  $I_{Kur}$  sind die Kanäle Kv1.5, möglicherweise auch Kv3.1 und Kv1.2 (Deal *et al.*, 1996, Snyders, 1999).

In den späteren Phasen 2 und 3 des Aktionspotentials wird der Einfluss des  $I_K$  bedeutend. Der  $I_K$  ist der maßgebliche repolarisierende Strom in Herzmuskelzellen. Er terminiert das Aktionspotential und bestimmt somit die Aktionspotentiallänge. In Meerschweinchenvorhofzellen wurden erstmals zwei Hauptkomponenten des  $I_K$  unterschieden (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990 und 1991a). Die erste Komponente ist der  $I_{Kr}$ , die zweite Komponente der  $I_{Ks}$ . Der  $I_{Kr}$ -Kanal wird aus HERG und Mirp1 aufgebaut (Abbott *et al.*, 1999). Von einigen Autoren wird der  $I_{Kur}$  als weitere Komponente des  $I_K$  aufgefasst (Deal *et al.*, 1996). Die beiden Hauptkomponenten  $I_{Ks}$  und  $I_{Kr}$ , aber nicht  $I_{Kur}$ , wurden auch in den Herzen zahlreicher anderer Säuger einschließlich der menschlichen Ventrikelzellen

nachgewiesen (Veldkamp *et al.*, 1995, Li *et al.*, 1996). Der Anteil von  $I_{Kr}$  und  $I_{Ks}$  an der Repolarisation des Aktionspotentials ist aber nicht konstant, sondern abhängig von der Herzfrequenz und der Regulation durch *second messenger*. Während unter Ruhebedingungen beide Ströme ungefähr gleich groß sind, kann der  $I_{Ks}$ -Anteil bei hohen Herzfrequenzen und unter sympathischem Einfluss um das Zehnfache von  $I_{Kr}$  gesteigert werden. Diese Hochregulation liegt zum einen an der langsamen Deaktivierung und der schnellen Reaktivierung der  $I_{Ks}$ -Kanäle, die zusammen bei hohen Frequenzen bewirken, dass zunehmend mehr Kanäle geöffnet bleiben. Zum anderen erfolgt unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation eine Aktivierung durch *second messenger* wie cAMP (Sanguinetti *et al.* 1991b, Jurkiewicz & Sanguinetti, 1993, Tzounopoulos. *et al.*, 1998). Dem gegenüber sollte der Anteil von  $I_{Kr}$  z.B. durch eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration bei Zellschädigung gesteigert werden (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1992). Allgemein ist die Spanne der regulierenden Einflüsse beim  $I_{Ks}$  aber größer als beim  $I_{Kr}$ .

In der vierten Phase des APs wird das Ruhemembranpotential vor allem durch  $I_{K1}$ , also durch Kir2.x stabilisiert.

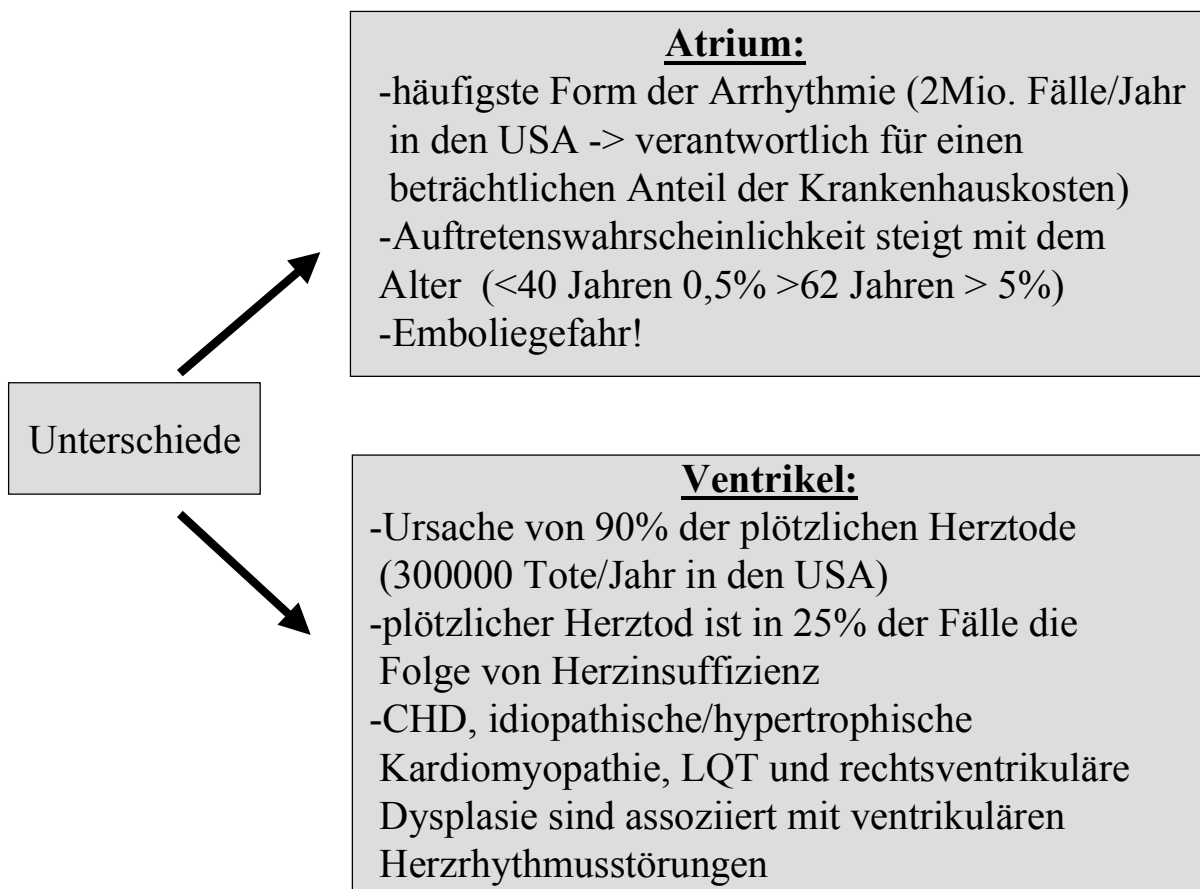


**Abbildung 4: Kaliumströme während des ventrikulären Aktionspotentials**

Die Ionenströme und der Zeitpunkt ihrer Hauptwirkungen sind aufgeführt. Die Kalzium- und Natriumströme sind nicht dargestellt. Das Aktionspotential wurde mit dem Luo-Rudy-Modell erstellt. Das Luo-Rudy-Modell ist ein Computerprogramm, welches auf der Grundlage von elektrophysiologischen Versuchen erstellt wurde. Es ist modular aufgebaut und errechnet das Aktionspotential auf der Grundlage von Einzelströmen. Die wichtigsten Kaliumströme und ihre Hauptwirkung (Pfeile) sind dargestellt.

## Arrhythmien und deren Therapie

Arrhythmien sind charakterisiert durch Veränderungen der Herzaktionspotentiale und des Herzrhythmus. Herzrhythmusstörungen können auf einer gestörten Erregungsbildung, auf einer Störung der Erregungsleitung oder auf einer Kombination beider Phänomene beruhen. Aufgrund ihres Auftretensortes kann eine Einteilung in Vorhof-(Atrien-) und Kammer-(Ventrikel-)arrhythmien erfolgen. Einige Unterschiede zwischen diesen Herzrhythmusstörungen sind in der folgenden Abbildung aufgeführt.



### Abbildung 5: Unterschiede zwischen atrialen und ventrikulären Arrhythmien

Die atriale Arrhythmie tritt häufiger vor allem bei älteren Personen auf. Die ventrikuläre Arrhythmie ist etwas seltener und führt häufig zum plötzlichen Herztod (in Anlehnung an Kraupp, 1983; Nattel *et al.*, 2000; Jalife, 2000).

Die klassische Methode zur Untersuchung der Herzrhythmusstörungen ist das EKG (ElektroKardioGramm). Das EKG gibt dem Arzt die Möglichkeit, das Summenpotential der Einzelerregungen der Herzzellen zu messen. Veränderungen in der Herzerregung können damit sichtbar gemacht werden. Das Q/T-Intervall des EKG spiegelt Ereignisse wider, die sich am Ventrikel abspielen. In den Fällen des LQT1- und des LQT5-Syndroms ist diese Phase verändert. In die Repolarisationsphase des ventrikulären Aktionspotentials fällt die so

genannte vulnerable Phase, also die Rückbildung der Ventrikelerrregung (T-Zacke). Treten in dieser Phase Extrasystolen auf, so können diese zunächst eine kurze Phase von normalem EKG und schließlich Salven oder persistierende arrhythmische und extrem schnelle Erregungen nach sich ziehen (Kammerflattern bis 300 Erregungen/min bzw. Kammerflimmern bis 500 Erregungen/min). Bei derart hohen Frequenzen der Ventrikelerrregung kann kein koordinierter Blutauswurf gewährleistet werden. Die Folge sind Organschäden zunächst an den besonders sensiblen Organen (z.B. Hirn, Herz). In der Klinik fiel auf, dass Patienten, die sehr häufig Arrhythmien haben, auch schlechter zu therapieren sind. Bei diesen Leuten scheint sich die Arrhythmie durch die vorhergehende Arrhythmie zu stabilisieren. Die Grundlage hierfür könnte ein Phänomen sein, das seit kurzem präklinisch intensiv untersucht wird und als „elektrisches Remodelling“ bezeichnet wird (Nattel *et al.*, 2000). Dabei findet man eine Veränderung der Proteindichte von bestimmten Kanälen (z.B. L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, Natriumkanäle, sarkoplasm. retikuläre Kalzium-ATPase,  $\text{Kv}4.3$ ). Elektrisches Remodelling kann experimentell durch hochfrequente Stimulation von Herzen über einen Zeitraum von zwei Wochen induziert werden. Es treten dabei kurzfristige Anpassungen auf, welche z.T. als Resultat von Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen erklärt werden (Nattel *et al.*, 2000, Jalife, 2000). Es sind bei weitem noch nicht alle Details der Entstehung und Aufrechterhaltung von Arrhythmien verstanden (Nattel *et al.*, 2000, Jalife, 2000). Als Dauerbehandlung bei ausgeprägten Arrhythmien/Tachykardien wird bisweilen ein elektrischer Defibrillator eingesetzt. Häufiger findet eine Therapie mit Antiarrhythmika statt. Die Antiarrhythmika können nach ihrer Wirkweise und ihrem Wirkort in vier Klassen (Vaughan-Williams-Klassifizierung) eingeteilt werden. Die folgende Tabelle 2 gibt weitere Informationen zu diesen Medikamenten.

| Klasse                                | Hauptwirkung  | Beispiele  |
|---------------------------------------|---|--|
| Klasse I<br>Natriumkanalblocker       | Abnahme der Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials                            | Ia: Chinidin, Ajmalin, Disopyramid<br>Ib: Lidocain, Phenytoin<br>Ic : Propafenon, Fleckainid |
| Klasse II<br>$\beta$ -Rezeptorblocker | Sympathikolyse  | Propranolol, Metoprolol  |
| Klasse III<br>Kaliumkanalblocker      | Verlängerung des Aktionspotentials durch Blockade von repolarisierenden Kaliumströmen | Sotalol, Amiodaron   |
| Klasse IV-<br>Kalziumkanalblocker     | Hemmung des langsamen Kalziumeinstroms  | Verapamil, Diltiazem   |

**Tabelle 2: Antiarrhythmika: Klassen, Hauptwirkung und Beispiele**

### Wirkweise der Klasse-III-Antiarrhythmika

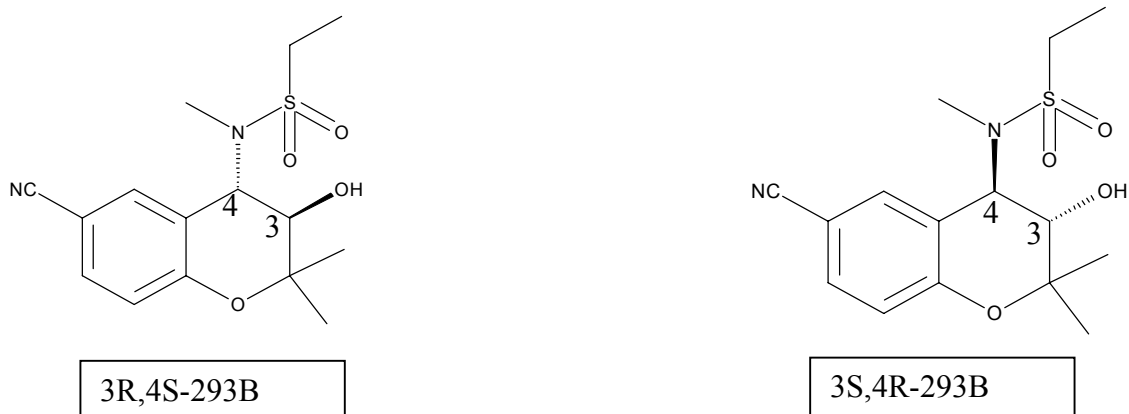
In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem Blocker des  $I_{Ks}$  gearbeitet. Der  $I_{Ks}$ -Strom trägt zum repolarisierenden Kaliumstrom während des Aktionspotentials bei. Blockiert man den repolarisierenden  $I_{Ks}$ , so findet erwartungsgemäß eine Verlängerung des Aktionspotentials statt (Jurkiewicz *et al.*, 1997, Selnick *et al.*, 1997, Bosch *et al.*, 1998, Varro *et al.*, 2000). Bei Tachykardien ist das Aktionspotential sehr kurz (Grundlage für die Tachykardie), die Aktionspotentialdauer kann durch Kaliumkanalblockade wieder erhöht werden. Das entspricht genau der Wirkweise der Klasse-III-Antiarrhythmika. Von  $I_{Kr}$ -Blockern dieser Antiarrhythmika-Klasse (z.B. Dofetilide) ist bekannt, dass ihre blockierende Wirkung gerade bei hohen Herzfrequenzen abnimmt (negative use-dependence). Diese Blocker wirken damit besonders gut bei normaler, aber schlechter bei hoher Herzfrequenz. Die molekulare Grundlage dieser Wirkung ist die Blockade der kardialen HERG/Mirp1-Kanäle (Jurkiewicz & Sanguinetti, 1993, Groh *et al.*, 1997).

Ein ideales Antiarrhythmikum sollte dagegen besonders auf die sehr schnell aufeinander folgenden Aktionspotentiale wirken, dagegen die langsamen APs des „normalen“ Herzrhythmus unbeeinflusst lassen („positive use-dependence“). Für dieses Verständnis ist es von großem Wert, kinetische Blockerstudien in einem geeigneten Meßsystem durchzuführen. Ein sehr robustes und verlässliches Meßsystem stellt die „*Two electrode voltage clamp*“ (TEVC) in Kombination mit Expression des betreffenden Kanals in Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (L.) dar.

## Problembeschreibung und Fragestellung dieser Arbeit

Es sind mittlerweile einige Substanzen bekannt, die den  $I_{Ks}$  blockieren. Hier sind TEA, Linopirdin und XE991 zu nennen. Allerdings zeigen diese Substanzen auch auf andere KCNQ-Kanäle eine inhibierende Wirkung und sind somit unselektiv. Selnick *et al.* (1997) identifizierten eine  $I_{Ks}$ -Blockerklasse (Benzodiazepine), die selektiver zu sein scheint. Salata *et al.* (1998) analysierten die Inhibition des  $I_{Ks}$  durch Benzodiazepine. Sie finden enantiomerspezifische Effekte, wobei das eine Enantiomer aktivierend und nur das andere Enantiomer blockierend wirkt. Insgesamt vermuten die Autoren, dass diese Substanzen auf sehr komplexe allosterische Weise in das „Gating“ des Kanals eingreifen.

Die Firma Aventis Pharma hat ebenfalls  $I_{Ks}$ -Blocker entwickelt. Dabei handelt es sich um Chromanole. Die Leitsubstanz Chromanol 293B (Lohrmann *et al.*, 1995) steht im Fokus dieser Arbeit. Chromanole, die den  $I_{Ks}$  hochpotent blockieren, scheinen relativ selektiv zu sein. Eine Zusammenstellung der Chromanolwirkungen auf unterschiedliche Kanäle findet sich bei Yang *et al.* (2000). Chromanol 293B besitzt ein sterisches Zentrum an Position 3, das zwischen 3R,4S-293B und 3S,4R-293B differenziert. Die Enantiomere kommen in *trans*-Stellung vor.



**Abbildung 6: Strukturformel der Chromanol 293B-Enantiomere**

Die Grundstruktur von Chromanol 293B leitet sich von  $K_{ATP}$ -Öffnern ab. Chromanol 293B blockiert  $I_{Ks}$ -Kanäle (Suessbrich *et al.*, 1996; Busch *et al.*, 1997; Salata *et al.*, 1997). Zu Beginn dieser Arbeit war die Wirkweise des Chromanols 293B noch nicht detailliert bekannt. Ziel war es deshalb, die Blockerwirkung ausführlich zu untersuchen, was eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung als Klasse-III-Antiarrhythmikums darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Wirkungen der Stereoisomere von Chromanol 293B auf den homomeren KCNQ1-Kanal und den heteromeren KCNQ1/MinK-Kanal analysiert werden. Durch Vergleiche der Wirkungen sollten mögliche Einflüsse der  $\beta$ -Untereinheit MinK auf den Kanalkomplex gezeigt werden.

Auch sollte die Frage geklärt werden, ob eines der Enantiomere eine positive use-dependence der  $I_{Ks}$ -Blockade aufweist und damit diese wichtige Anforderung an ein ideales Klasse-III-Antiarrhythmikum erfüllt.

Eine ausführliche elektrophysiologische Kinetikstudie einer LQT1-Mutante sollte das Verständnis um das LQT1-Syndrom erweitern. In diesem Kontext bot sich die Analyse von weiteren Mutationen der KCNQ1- und  $I_{Ks}$ -Kanäle an.

Die geplanten Versuche sollten im Oozytenexpressionssystem erfolgen. Die Funktion der exprimierten Kanalproteine sollten mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode (TEVC) gemessen werden.

$I_{Ks}$ -Kanäle sollten in stabil transfizierten CHO-Zellen auch mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik analysiert werden.

## **Material und Methoden**

Der größte Teil der im Rahmen dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse basiert auf Messungen, die mit Hilfe des Oozytenexpressionssystems erzielt wurden. Weitere Ergebnisse wurden durch Messungen an stabil transfizierten Zellen erhalten. Dabei wurden die folgenden Lösungen verwendet:

### **Lösungen**

Die Lösungen wurden auf die folgende Weise hergestellt. Wurden verschiedene Konzentrationen benötigt, so erfolgte zunächst die Herstellung einer entsprechend höher konzentrierten Stammlösung, so dass Abweichungen der Konzentrationsverhältnisse minimiert wurden. Bei der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel konnten messbare substanzspezifische Effekte bei den elektrophysiologischen Messungen weitgehend ausgeschlossen werden. Im Fall von Chromanol 293B wurde mit einer 100-mM-Stammlösung unter der Löslichkeitsgrenze gearbeitet. Bei den verwendeten Konzentrationen waren osmotische Effekte nicht zu erwarten. Der pH-Wert wurde regelmäßig kontrolliert. Die Lösungen wurden vor den Versuchen frisch angesetzt, und die Stammlösungen wurden entsprechend ihren chemischen Eigenschaften gelagert, um chemische Abbaureaktionen der verwendeten Substanzen zu minimieren. Die Zusammensetzung der Lösungen ist in den nachfolgenden Tabellen zusammengestellt :



**Oozytenlösungen**

| <b>Substanz</b>                      | <b>ND-96</b> | <b>antibiotikahaltige ND-96</b> | <b>OR-2</b> |
|--------------------------------------|--------------|---------------------------------|-------------|
| NaCl                                 | 96 mM        | 96 mM                           | 82,5mM      |
| KCl                                  | 2 mM         | 2 mM                            | 2 mM        |
| CaCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O | 1,8 mM       | 1,8 mM                          | 0 mM        |
| MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O | 1 mM         | 1 mM                            | 1 mM        |
| HEPES                                | 5 mM         | 5 mM                            | 5 mM        |
| Natriumpyruvat                       | 0 mM         | 2.5 mM                          | 0 mM        |
| Theophyllin                          | 0 mM         | 0.5 mM                          | 0 mM        |
| Gentamycin                           | 0 mM         | 50 µg/ml                        | 0 mM        |
| pH-Wert (mit NaOH eingestellt)       | 7,5          | 7,5                             | 7,5         |

HEPES ist N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) und hat Pufferfunktion

Bakterienwachstum wurde mit einem Antibiotikum (Gentamicin) vorgebeugt. Die ND-96-Badlösung und die antibiotikahaltige ND-96-Aufbewahrungslösung wurden bei ca. 17 °C gelagert. Da die gelösten Antibiotika bei dieser Temperatur nach einigen Tagen ihre Wirksamkeit verlieren, mussten diese Medien regelmäßig frisch angesetzt werden. ND-96 wurde durch Verdünnen einer 10 × Stammlösung bereitgestellt.

**Kulturmedium für CHO-KCNQ1/MINK-Zellen**

Vollmedium für CHO-Zellen:

| <b>Substanz</b>         | <b>Endkonzentration /ml Medium</b> | <b>Substanzmenge</b> |
|-------------------------|------------------------------------|----------------------|
| ISCOVE-Medium           | 90 %                               | 500 ml               |
| FCS                     | 10 %                               | 50 ml                |
| L-Glutamin              | 2 mM                               | 5 ml                 |
| Penizillin/Streptomycin | 100 u/ml                           | 100 µg/ml            |
| Gentamicin 500x         | 50 µg/ml                           | 500 µl               |

Auf der Basis des CHO-Vollmediums wurde das CHO-KCNQ1/MINK-Kulturmedium hergestellt:

| <b>Substanz</b>           | <b>Endkonzentration</b><br><b>/ml Medium</b> | <b>Substanzmenge</b> |
|---------------------------|--|----------------------|
| Vollmedium für CHO-Zellen | 99 %   | 560,5 ml             |
| Gentamicin 50 mg/ml       | 4000 µg                                      | 4,5 ml               |
| Zeocin                    | 350 µg                                       | 1,96 ml              |

Zur Messung der KCNQ1/MINK-Kanäle in CHO-KCNQ1/MINK-Zellen wurde die folgende Badlösung verwendet:

#### **NaCl (nach Dunne)**

| <b>Substanz</b>                      | <b>Endkonzentration</b> | <b>Einwaage</b> |
|--------------------------------------|-------------------------|-----------------|
| NaCl                                 | 140,0 mM                | 8,183 g/l       |
| KCl                                  | 4,7 mM                  | 0,350 g/l       |
| CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O | 2,0 mM                  | 0,294 g/l       |
| MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O | 1,1 mM                  | 0,224 g/l       |
| HEPES                                | 10,0 mM                 | 2,383 g/l       |
| pH=7,4 wird mit NaOH eingestellt     |                         |                 |

#### **Intrazellulärlösung:**

Die Intra CHO-Lösung wurde im Verhältnis 10/1 (Vol%) der I<sub>Ks</sub>-Lösung\* beigemischt. Die thermolabile I<sub>Ks</sub>-Lösung wurde regelmäßig frisch angesetzt und bei -20°C gelagert:

#### **Intra CHO**

| <b>Substanz</b>                   | <b>Endkonzentration</b> | <b>Einwaage</b> |
|-----------------------------------|-------------------------|-----------------|
| KCl                               | 100 mM                  | 7,445 g/l       |
| EGTA                              | 10 mM                   | 3,804 g/l       |
| HEPES                             | 10 mM                   | 2,384 g/l       |
| pH mit KOH auf pH 7,2 eingestellt |                         |                 |

1 ml von I<sub>Ks</sub>-Lösung\* in 9 ml normaler Intra-CHO-Lösung

**I<sub>Ks</sub> Lösung\***

| Substanz                    | mM     | mg/10ml    |
|-----------------------------|--------|------------|
| Na-phosphocreatine          | 140 mM | 634 g/l    |
| Na <sub>2</sub> -ATP        | 40 mM  | 342,03 g/l |
| Na <sub>2</sub> GTP         | 3 mM   | 26,86 g/l  |
|                             | U/ml   | Mg/10 ml   |
| Creatine-Phosphokinase      | 500 U  | 20 U       |
| pH: 7,4 mit NaOH einstellen |        |            |

**Gewinnung der Oozyten**

Zur kurzzeitigen Betäubung wurden Exemplaren von *Xenopus laevis* in 18-20 °C temperiertes MS 222 [3-Aminobenzoesäure-Ethylester-Methansulfonat, = Tricain (Firma Sigma, Steinheim), 0.1-0.15 % in Leitungswasser, pH 7.2] für 5-10 Minuten gesetzt. Tricain ist ein Narkotikum für Kaltblüter und wird von Amphibien über die Haut resorbiert. Die Analgesie hält für 20-60 Minuten an (Kaplan, 1969; Bonath, 1977). Sobald das Tier ruhig gestellt war, wurde es auf den Rücken gedreht, das Aussetzen des Umkehrreflexes und des respiratorischen Schluckreflexes durch Berühren der Kehlgasse geprüft. Das betäubte Tier wurde in Rückenlage in einer Operationsschale auf Eis gelagert und die Bauchhaut im Areal des späteren Schnittes durch mehrmaliges trocknendes Auflegen eines Tupfers von der Schleimschicht befreit.

Die abgetrocknete Lederhaut wurde mit einer sterilen Injektionsnadel angehoben und sofort mit einer feinen Schere in den gebildeten Wulst geschnitten. Es resultierte eine in Körperlängsachse gerichtete operative Öffnung von 7-10 mm Länge. Anschließend wurden ebenfalls das Peritoneum und die darunter liegende Muskelschicht durch einen Schnitt durchtrennt, wobei Haut und Muskelschicht von dem darunter liegenden Verdauungstrakt abgehoben wurden. Alle Gerätschaften wurden vor dem Eingriff autoklaviert.

Nach Penetration der Bauchhaut wurde vorsichtig mit einer spitzen Pinzette das Ovar zwischen den abdominalen Organen (Darmschlingen, Leber, Fettkörper und Ovidukt) gesucht und durch die operative Öffnung gezogen. Das gewünschte Stück Mesovar wurde mit einer feinen Schere abgetrennt und in OR-2 zwischengelagert, ohne dass Gewebe an der Oberfläche schwamm. Als Nahtmaterial wurde sich auflösende Seide, die fest mit einer gebogenen Wundnadel verbunden war (Vicryl rapid, Johnson & Johnson Intl, Belgien) benutzt. Zum

Verschließen der Wunde wurden die Muskelschicht und das Peritoneum mit grober abgewinkelter Pinzette zugleich gefasst und vernäht. Anschließend wurde die Haut verschlossen.

Nach dem Wundverschluss wurde das Tier gründlich mit Leitungswasser abgespült und in eine Schale gesetzt, deren Boden maximal mit 1 cm Wasser bedeckt war. Der Kopf des Tieres sollte nicht unter Wasser tauchen, damit es nicht erstickte. Um Austrocknung zu vermeiden, wurde der Rücken des Tieres mit einem wassergetränkten Zelltuch bedeckt, bis der Schluckreflex wieder eingesetzt hatte und der Frosch kräftige Schwimmbewegungen zeigte. Nachdem das Tier vollkommen aus der Narkose erwacht war, wurde es einen Tag in ein Einzelbecken gegeben. Nach 2 Wochen sollte sich als Wundverschluss granuliertes Gewebe gebildet haben. Bei guter Pflege findet eine partielle Regeneration des Ovars innerhalb eines halben Jahres statt. Biopsien am selben Tier sollten nicht in kürzeren Abständen als 3-4 Wochen erfolgen, wobei man die primär gesetzte Inzision und die Stichkanäle der Wundnadel nicht erneut verwenden sollte.

### **Präparation der Oozyten**

Die Ovarialsäcke wurden nun mit Pinzette und Schere mechanisch zerteilt, so dass nur noch zusammenhängende Reste des Sackes mit 5-10 Oozyten entstanden. Diese mechanische Zerteilung sorgt für eine gleichmäßige anschließenden Kollagenaseverdauung. Nach mehrmaligem Waschen mit OR-2-Lösung wurden die Oozyten mit 20 ml Kollagenase-Lösung (20 ml OR-2 mit 40 mg Kollagenase der Firma Worthington Biochemical Corporation, Lakewood USA) versetzt. Die Kollagenasebehandlung erfolgte auf einem Schüttler, der auf 20 Umdrehungen pro Minute eingestellt war, bei 18° C. Es muss  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Lösung verwendet werden, da  $\text{Ca}^{2+}$  die Kollagenase inhibiert. Die Dauer des Kollagenaseverdaues betrug zwischen 120 und 150 Minuten. Nach dieser Zeit waren die meisten der Oozyten vereinzelt und defollikuliert (Kontrolle unter dem Stereomikroskop) und die Kollagenaseverdauung wurde beendet. Danach wurden die Oozyten mit ND-96-Lösung bis zur vollständigen Entfernung der Kollagenase gewaschen.

Aus den so erhaltenen Oozyten aller Wachstums- und Reifestadien wurden jetzt unter dem Stereomikroskop die vollausgewachsenen und unbeschädigten Oozyten des Reifestadiums V aussortiert. Die gewonnenen Oozyten wurden dann in Mengen zu ca. 20 Stück in Kulturschälchen mit antibiotikahaltiger ND-96-Lösung auf einen Schüttler gelegt. Die

Verwendung eines Schüttlers verhinderte ein Aneinanderhaften und/oder eine Deformierung der Oozyten. Zur Begutachtung der Zellen wurde ein Zoom-Stereo-Präparationsmikroskop verwendet, wobei die Beleuchtung durch eine 150-W-Kaltlichtquelle mit 2-armigem Lichtleiter gewährleistet wurde.

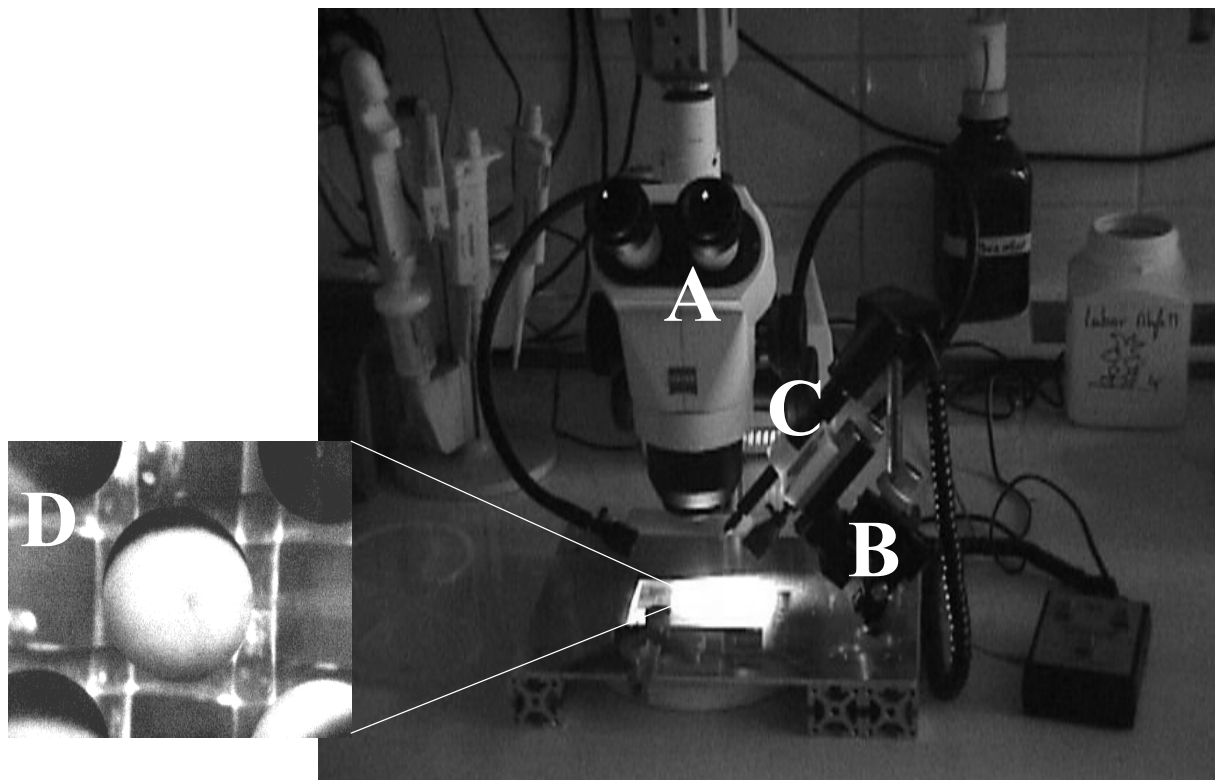
Es wurden, wie erwähnt, Oozyten des Stadiums-V verwendet. Der Durchmesser beträgt 1.2-1.3 mm, das Volumen variiert von 0.9-1.2  $\mu\text{l}$ .

### **Mikroinjektion in Oozyten**

Unter einem Stereomikroskop (Firma Zeiss; Okularvergrößerung 10-fach, Objektivvergrößerung 0.8-4fach) erfolgte noch am Tag der Oozyten-Entnahme die Injektion der mRNA in die Oozyten. Aufgrund der Empfindlichkeit der mRNA gegenüber dem abbauenden Enzym RNase wurde mit Latex-Handschuhen gearbeitet, der Arbeitsplatz und alle Gerätschaften wurden mit Incidur Spray (Firma Braun, Melsungen) desinfiziert und RNase-freie Pipettenspitzen wurden verwendet. Die Herstellung der Injektionskapillaren geschah folgendermaßen: Borosilikatglaskapillaren (Firma World Precision Instruments, Sarasota USA) mit einem Außendurchmesser von 1,2 mm und einem Innendurchmesser von 0,5 mm wurden mit Hilfe eines automatischen Mikroelektrodenpullers (DMZ-Universal-Puller der Firma Zeitz-Instrumente, Augsburg) zu Mikroelektroden mit langer Spitze gezogen. Anschließend wurde ein Teil der Spitze mechanisch abgebrochen, so dass die Elektrodenspitze einen Durchmesser von 10-15  $\mu\text{m}$  hatte. Dieser Durchmesser der Spitze war groß genug, die mRNA aufzusaugen und beim Injizieren wieder abzugeben, aber gleichzeitig auch klein genug, um die Oozytenmembran bei der Injektion nicht übermäßig zu verletzen. Des weiteren wurde unter dem Stereomikroskop ein Teil der Kapillarenspitze mit Hilfe eines Heizdrahtes zu einer spitzen Kanüle ausgezogen, so dass die Penetration der Oozytenmembran stark erleichtert wurde. Mit Hilfe eines vollautomatischen Nanoliterinjektors (Firma World Precision Instruments, Sarasota USA), der in einen Mikromanipulator eingespannt war, erfolgte die mRNA-Injektion. Zunächst wurde die Injektionskapillare mit Mineralöl (Sigma 400-5 heavy white oil,  $\delta = 0.88 \text{ g/ml}$ ) gefüllt und über den Kolben des Nanoliterinjektors gezogen. Mit Hilfe des Mineralöls erreichte man eine luftblasenfreie Füllung der Kapillare und gewährleistete eine exakte Funktionalität der Injektion. Dann wurden ca. 3  $\mu\text{l}$  mRNA-Lösung, die bei  $-70^\circ \text{C}$  gelagert war, aufgetaut und in die Injektionskapillare aufgesaugt. Die Oozyten, die mit der mRNA injiziert werden sollten,

wurden zur Fixierung auf ein Gitternetz in ND-96-Lösung gelegt. Zur Injektion wurde nun die Spitze der Injektionskapillare in einem Winkel von ca.  $45^\circ$  an die Oozyte herangefahren und durch die Oozytenmembran eingestochen. 50 nl mRNA-Lösung wurden in jede Oozyte injiziert, was an einem leichtem Schwellen der Oozyte sichtbar wurde. Bei einer Konzentration der mRNA-Lösung von 200 ng/ $\mu$ l entsprach das der Menge von 10 ng mRNA / Oozyte.

Nach der Injektion wurden die Oozyten in 24-Loch-Gewebekulturplatten (Firma Greiner, Frickenhausen) mit antibiotikahaltiger ND-96-Lösung vereinzelt. Nach 1-4 Tagen waren genügend Proteine der jeweiligen mRNA exprimiert, und die entsprechenden Funktionen konnten analysiert werden. Dazu wurden elektrophysiologische Meßmethoden verwendet. Die folgende Darstellung soll die Beschreibung unterstützen.



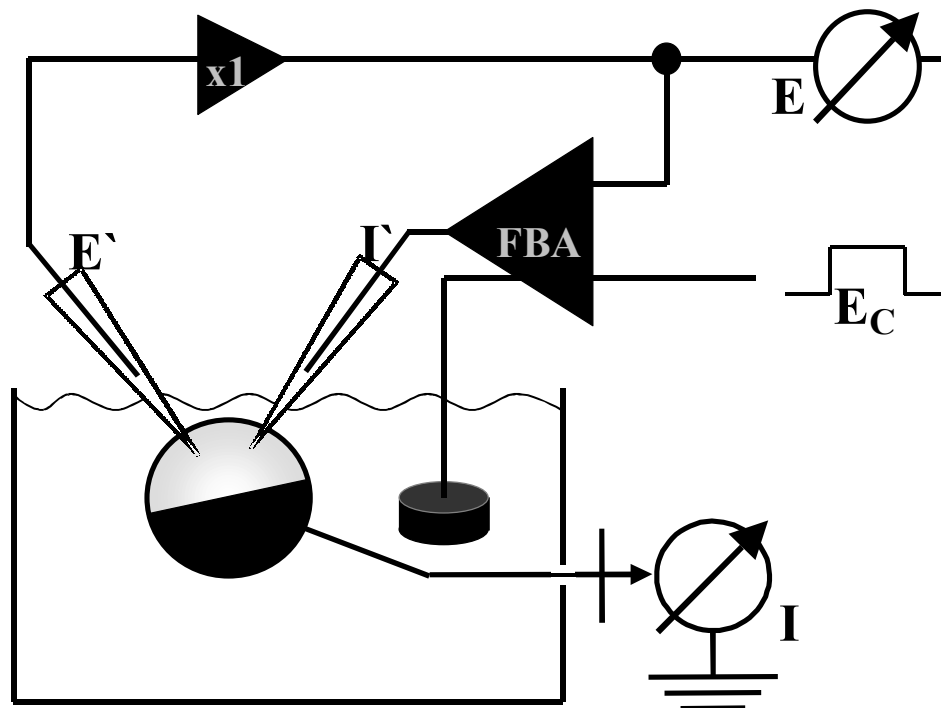
**Abbildung 7: Mikroinjektion von mRNA in Oozyten**

Unter optischer Kontrolle mit dem Stereomikroskop (A) wurde mit Hilfe eines mechanischen Mikromanipulators (B) und mit einer Nanoliterpumpe (C) mRNA in die Oozyten injiziert (D).

## Elektrophysiologische Methoden

### Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode

Um die Ströme einer gesamten Oozyte unter unveränderten intrazellulären Bedingungen zu messen, bietet sich die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode (= *Two-Electrode-Voltage-Clamp-Method* = TEVC-Methode) an. Es ist eine der stabilsten elektrophysiologischen Meßmethoden, bei der es möglich ist, über mehrere Stunden an einer Zelle zu messen.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der TEVC-Methode**

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der Messanordnung für Voltage-Clamp-Messungen an *Xenopus*-Oozyten

Dabei wird mit zwei intrazellulären Mikroelektroden gearbeitet. Die Elektrode E' misst das Membranpotential  $E$  gegen eine Referenzelektrode im Bad (Pellet aus Silberchlorid oder Agarbrücke). Im Rückkopplungsverstärker (FBA) (TEC CX 10, NPI, Deutschland) wird das Membranpotential mit dem gewünschtem Potential  $E_C$  verglichen. Über die Elektrode I' kann dann der Strom  $I$  appliziert werden, um zunächst  $E_C$  zu erreichen und anschließend zu halten. Die Aufgabe dieses Rückkopplungsverstärkers besteht also darin, die Spannungsänderungen, die z.B. von Ionenströmen durch Ionenkanäle hervorgerufen werden können, durch Injektion eines „spiegelbildlichen“ Stroms zu verhindern. Dadurch ist es indirekt möglich, den

Nettostrom, hervorgerufen durch Ein- und Ausströme in bzw. aus der Oozyte, anhand des Stromes, den der Verstärker liefert, zu messen. Da die Stromrichtung konventionsgemäß durch die Richtung des Kationenflusses festgelegt ist, wird ein positiver Strom durch einen Ausstrom von Kationen aus der Zelle und/oder einen Einstrom von Anionen in die Zelle bewirkt. Bei TEVC-Messungen, mit auf einen positiven Wert geklemmter Spannung, besitzt die Zellinnenseite gegenüber der Zellaußenseite ein positives Potential.

Zur Aktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle wird meist ein Spannungssprung vom negativen Haltepotential (ein Großteil der Kanäle ist geschlossen) auf ein positives Testpotential (ein Großteil der Kanäle wird geöffnet) und nach einer definierten Zeit wieder zurück zum Haltepotential durchgeführt.

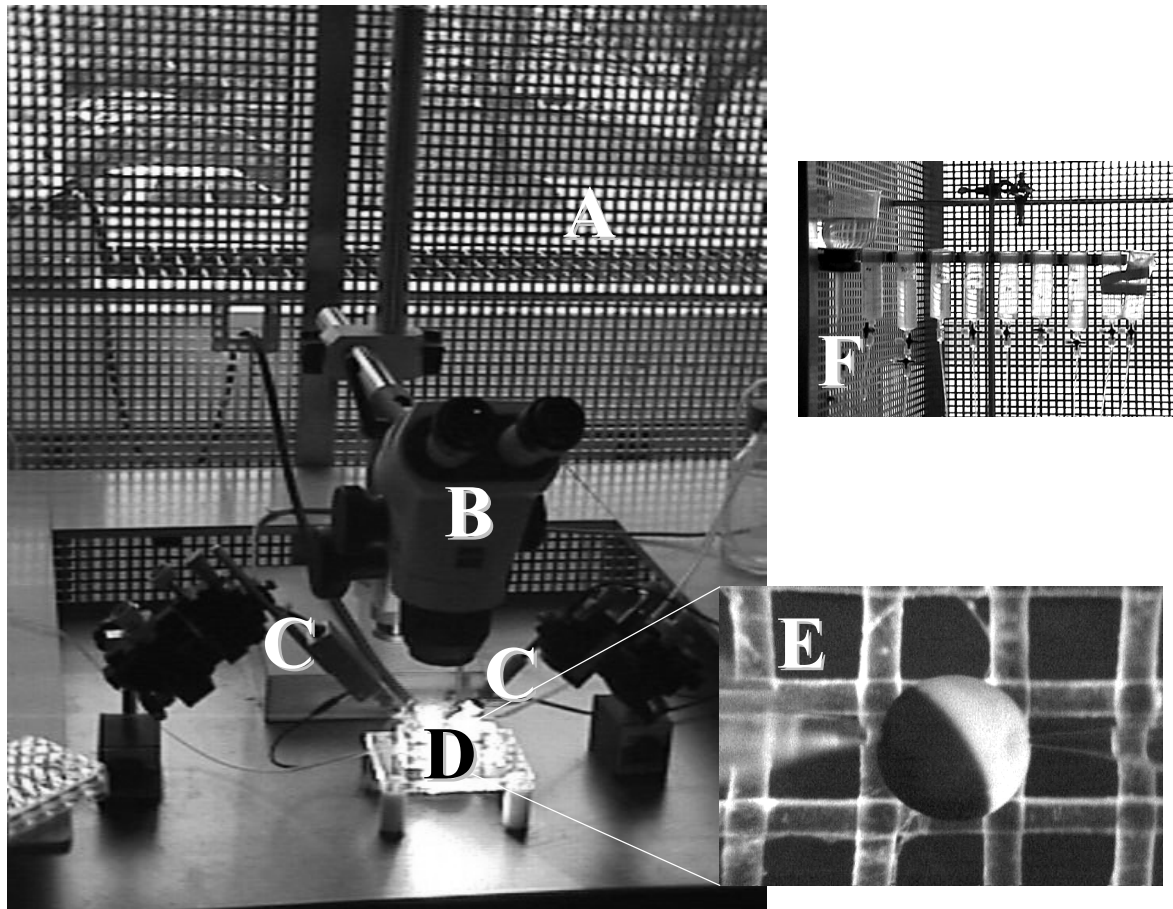
### **Aufbau des TEVC-Messplatzes**

Der TEVC-Messplatz war auf einem schwingungsgedämpften Experimentiertisch (Vibraplane, Kinetic systems, USA) aufgebaut. Eine stählerne Tischplatte ruhte auf einem Untergestell mit luftgefüllten Dämpfungspuffern, um eine Messung ohne Störungen durch mechanische Erschütterungen und Schwingungen zu ermöglichen. Ein Faradayscher Käfig (bei Aventis Pharma gefertigt), der den kompletten Messstand umgab, minimierte elektrische Störungen während der Messung. Geräte und Apparaturen aus Metall, die innerhalb des Messstandes waren, wurden mit Kabeln geerdet. In der Mitte des Experimentiertisches befand sich eine speziell angefertigte Messkammer, die 1,5 ml Badlösung fasste und in der die Oozyte während der Messung ständig mit der jeweiligen Badlösung umspült wurde. Der Zulauf der Lösungen erfolgte über einen Tygonschlauch mit Durchflusseinstellung in die Messkammer. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde auf etwa 4 ml/min eingestellt, so dass die im Bad befindliche Lösung nach etwa 10 Sekunden ausgetauscht war. Mit Hilfe einer elektrischen Pumpe (Firma Neuberger, Deutschland) und eines Tygonschlauchs mit zwischengeschalteter Waschflasche, die auch der elektrischen Trennung diente, wurde die Badlösung abgesaugt. Auf beiden Seiten der Messkammer war jeweils ein manueller Mikromanipulator (Firma World Precision Instruments, Berlin) angebracht, der mittels Magnetstativen auf der Stahltischplatte fixiert war. An jedem Mikromanipulator war ein Vorverstärker (NPI electronic GmbH, Germany) mit Elektrodenhalter und Ag/AgCl-Elektrodendraht befestigt. Die Elektroden aus Borosilikatglas (GC 150TF-15, 1.5mm Außendurchmesser, 1.17mm Innendurchmesser, mit Innenfilament, Firma Clark



Elektromedical Instruments, Pangbourne GB) wurden mit einem DMZ-Universal-Puller (Firma Zeitz, Augsburg) gezogen. Ihr Widerstandswert lag bei allen Messungen zwischen 0.5 und 1.3 M $\Omega$ . Die Mikroelektroden wurden mit 3 M KCl-Lösung gefüllt. Zwei Ag/AgCl-Pellets klemmten das Potential der Badlösung. Über der Messkammer diente ein Stereomikroskop (Firma Zeiss, Okularvergrößerung 10fach, Objektivvergrößerung 0.8 bis 5fach) dazu, das Einstechen in die Oozyte zu kontrollieren. Beleuchtet wurde die Messkammer mit Hilfe einer gleichstrombetriebenen Halogenlampe (Firma Schott, Deutschland). Sämtliche Daten wurden über den Rückkopplungsverstärker und über ein ITC-16-Interface (HEKA electronics, Germany) in einem IBM-kompatiblen-Computer mit der Software Pulse&PulseFit (HEKA, Deutschland) aufgenommen und ausgewertet. Die letztgenannten Geräte standen außerhalb des Faradayschen Käfigs.

Alle Experimente wurden bei einer konstanten Zimmertemperatur von 22°C (klimatisierter Raum) durchgeführt. Die folgenden Fotos stellen den Aufbau dar.



### Abbildung 9: Aufbau des TEVC-Messplatzes

In einem Faradaykäfig (A) wurden unter optischer Kontrolle mit einer Stereolupe (B) in die in einer Durchflussmesskammer (D) gelagerte Oozyte zwei Glaspipetten eingestochen (E). Die mit 3M KCl gefüllten Pipetten waren über Halter mit den Vorverstärkern (C) verbunden, die über mechanisch gesteuerte Mikromanipulatoren positioniert werden konnten. Der Zufluss der Badkammer erfolgte gravitationsgetrieben aus Vorratsgefäßen (F), zwischen denen durch Drei-Wege-Hähne umgeschaltet werden konnte.

Die Messung der Kanäle erfolgte bei Perfusion von ND96, falls nicht davon abweichende Angaben gemacht sind.

Die Stromspuren der elektrischen Oozytenmessungen wurden mit 500 Hz gefiltert (Besselfilter). Die Abtastraten waren besonders bei den elektrischen Messungen zur kinetischen Analyse schneller Ereignisse ausreichend hoch und der softwareeigene Filterfaktor lag drei bis vier. Die Spannungsklemme mit dem Verstärker wurde so schnell gewählt, dass kapazitive Artefakte nie länger als zwei Millisekunden lang waren. Da der TEVC-Verstärker ursprünglich auch zur Messung von schnellen Natriumkanälen konzipiert worden ist, wurde unter anderem besondere Sorgfalt auf die Klemmgeschwindigkeit gelegt. Somit wären auch weitaus schnellere Ereignisse als die hier gemessenen aufzulösen gewesen.

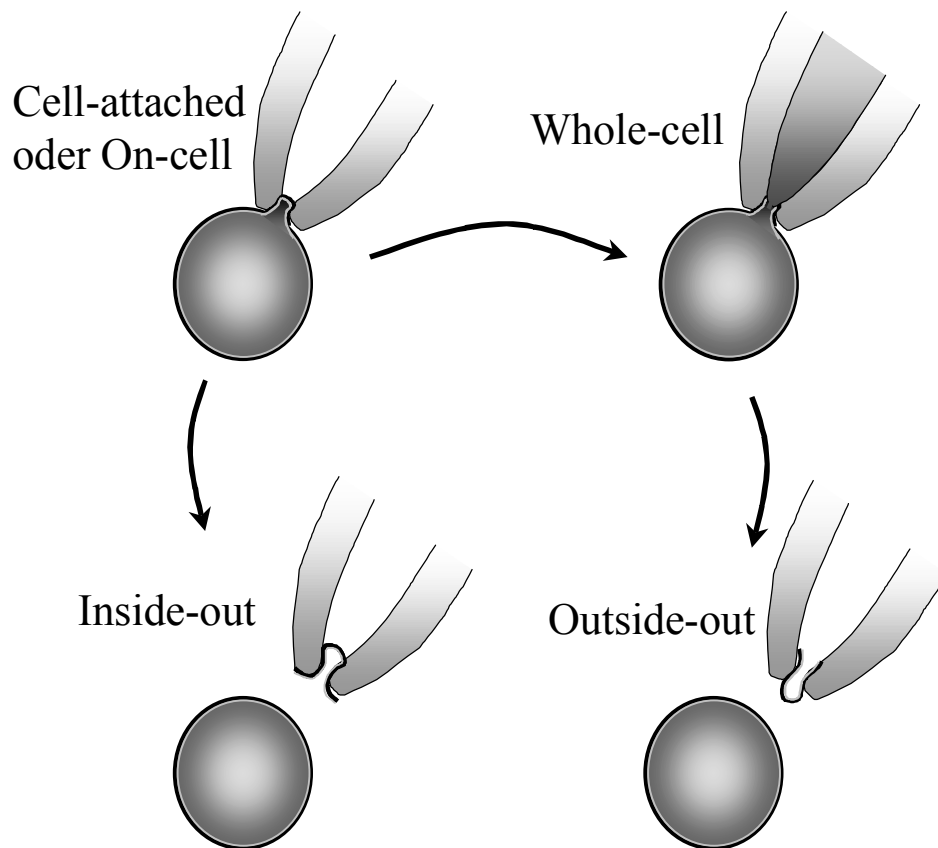
### **Stabil transfizierte Zellen**

In dieser Arbeit wurde mit CHO-(chinese hamster ovary-)Zellen gearbeitet, in die die Gene KCNE1 und KCNQ1 stabil transfiziert wurden. Zusätzlich enthielt das Konstrukt zur stabilen Transfektion Resistenzen gegen Neomycin (G418) und Zeocin. Die Zellen wurden laborintern *CHO-KCNQ1/MINK-Zellen* genannt. Sie wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. Dem unten aufgeführten Medium wurden Gentamicin und Streptomycin zugesetzt, um nur die Zellen, die das Konstrukt mit den Resistenzen und damit den Kanal enthielten, wachsen zu lassen. Zur Erhaltung der Zellen war es wichtig, dass die Zellen nicht zu dicht wuchsen und sie jeden zweiten bis dritten Tag frisches Medium erhielten. Von Zeit zu Zeit mussten neue Zellkulturstammlösungen aufgetaut werden, da die Zellen nach einigen Passagen ihre Qualität (Verlust der Ionenkanäle und Eintreten von „rundown“, einer Abnahme der Stromamplitude mit der Zeit) verloren. Die Stammlösungen wurden in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **Die Patch-Clamp-Methode**

Die verwendete Methode ist an die von Neher *et al.* (1978) angelehnt. Die *Patch-Clamp*-Methode erlaubt es, sowohl makroskopische Ströme von einigen nA als auch mikroskopische Einzelkanalströme von wenigen pA zu messen. Da die Membran an sich weitestgehend für Ionen impermeabel ist, kommen die gemessenen Ionenflüsse durch Ionenkanäle, Pumpen oder Transporter zustande. Die Stromamplituden hängen von der Dichte der Ladung leitenden bzw. transportierenden Proteine und deren Art ab. Zur Messung von kleinen Ionenströmen ist ein geringes Rauschen, da bei der Auflösung eines Signals das Rausch-Signalverhältnis entscheidend ist. Ein sehr geringes Rauschen wird durch eine elektrisch sehr dichte Verbindung (*seal*) zwischen einer mit Salzlösung gefüllten Glaspipette und der Plasmamembran einer intakten Zelle erreicht. Der so isolierte kleine Membranfleck wird auch „*patch*“ benannt. Das Rauschen hängt maßgeblich von dem Widerstand zwischen Pipette und Plasmamembran ( $R_s$ ) ab, der immer über 1 G $\Omega$  liegen sollte (*Gigaseal*). Dieser hohe elektrische Widerstand gewährleistet, dass der Strom fast ausschließlich durch die Transporter, *Carrier* oder Kanäle des isolierten Membranflecks fließen kann. Diese Messkonfiguration wird „*cell-attached*“-Konfiguration genannt. Zieht man nun ruckartig die Pipette ein Stück zurück, so reißt man das isolierte Membranstück aus der Membran, wobei die Innenseite des Membranflecks (in Abbildung 10 hellgrau dargestellt) nun nach außen

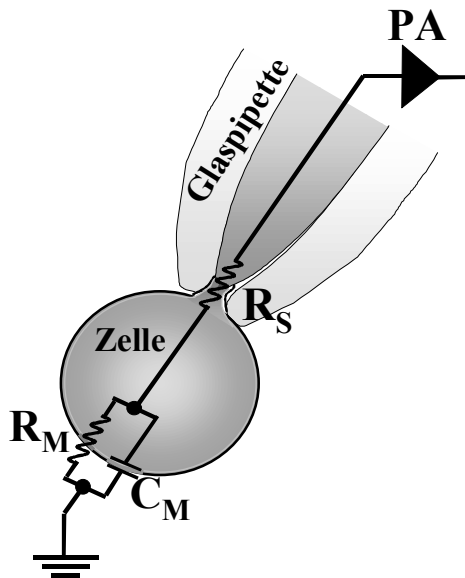
zeigt. Es ergibt sich die „*inside-out*“-Konfiguration. Legt man aber von der „*cell-attached*“-Konfiguration ausgehend einen dosierten Unterdruck an die Pipette an, so zerreißt man den Membranfleck und erreicht einen Zugang zum Zellinneren. Damit hat man die am meisten verwendete „*whole-cell*“-Konfiguration erreicht. Zieht man von der „*whole-cell*“-Konfiguration ausgehend vorsichtig die Pipette zurück, so wird die Membran zunächst etwas schlauchartig ausgezogen. Wenn dieser Schlauch abreißt, verbinden sich seine Enden so, dass sich eine Art kleine Blase bildet. In dieser „*outside-out*“-Konfiguration liegt die Membranaußenseite (schwarz dargestellt) außen.



**Abbildung 10: Konfigurationen der *Patch-Clamp*-Technik (Abbildung modifiziert nach Hille, 1992, S. 89)**

Der Ausgangspunkt aller Konfigurationen ist eine saubere Pipette, die unter leichtem Unterdruck auf die Membran aufgesetzt wird. Es bildet sich eine Verbindung zwischen Pipette und Membran aus, die mehrere Gigaohm elektrischen Widerstand haben kann. Ionenströme ausreichender Amplitude können in dieser *cell-attached*-Konfiguration gemessen werden. Durch Unterdruck kann der kleine Membranfleck unter der Pipette zerrissen werden, und man erreicht in dieser *whole-cell*-Konfiguration Zugang zum Cytoplasma unter Auswaschen des Cytoplasmas. Durch Wegführen der Pipette von der Zelle werden aus den beschriebenen Konfigurationen die beiden verbliebenen Konfigurationen erreicht, bei denen die Innenseite eines kleinen Membranflecks nach innen oder außen orientiert ist.

Bei Messungen in der „*whole-cell*“-Konfiguration liegt die Kapazität in CHO-Zellen bei 5-15 pF und der Serienwiderstand ( $R_S$ ) sollte nicht über 10 M $\Omega$  liegen. Bei einer spezifischen Membrankapazität von ca. 1  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  ergibt sich eine Membranfläche von ca.  $5^{-6}$ - $15^{-6}$   $\text{cm}^2$ .



**Abbildung 11: Schematische Darstellung einer Messung in der *whole-cell*-Konfiguration.**

In dem elektrischen Ersatzschaltbild stellt  $R_S$  den Serienwiderstand (engl. *serial resistance*),  $C_M$  die Membrankapazität (engl. *membrane capacity*),  $R_M$  den Membranwiderstand (engl. *membrane resistance*) und PA den Vorverstärker (engl. *preamplifier*) dar.

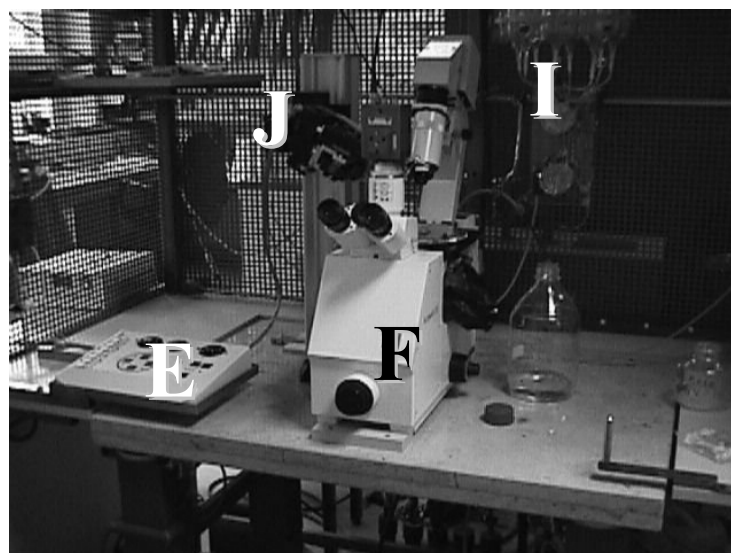
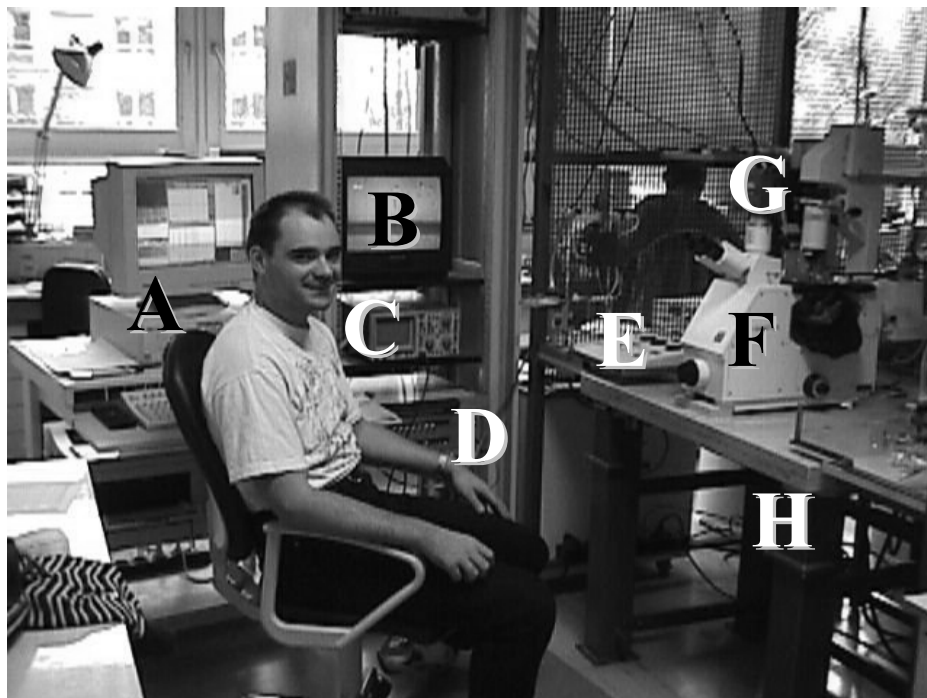
In dieser Arbeit werden Ergebnisse vorgestellt, die auf Messungen in den Konfigurationen *cell-attached* und *whole-cell* beruhen. Der EPC9-Verstärker bietet die Auswahl zwischen drei Rückkopplungswiderständen mit denen der Empfindlichkeitsbereich gewählt wird. Die Kapazitäten der Pipette und der Membran führen bei Spannungssprüngen zu kapazitiven Strömen, die mit Pulsesoftware teilweise ausgeglichen werden können. Zusätzlich kann die schnelle Kapazität der Pipette durch eine schnelle Kompensation und die langsamen Kapazitäten über eine langsame Kompensation des Verstärkers ausgeglichen werden. Zusätzlich bietet das System eine Serienwiderstandskompensation, eine Offsetkompensation und eine Kompensation zum Ausgleich des „*liquid-junction*“-Potentials, das immer dann im Grenzbereich zweier Lösungen auftritt, die unterschiedlich mobile Ionen enthalten. Entsprechende Filtermöglichkeiten sind wählbar.

Gerade die verwendeten Messkonfigurationen *cell-attached* und *whole-cell* erfordern einen mechanisch störungsfreien Messaufbau, der in der Regel durch luftgelagerte Messtische realisiert wird.

### **Aufbau des *Patch-Clamp*-Meßplatzes**

Der Vorverstärker, die sogenannte „headstage“, war über einen Halter mit einem Mikromanipulator mit Präzisionsschrittmachermotoren (Luigs & Neumann, Deutschland) verbunden. Dieser Manipulator war an einer mit dem luftgelagerten Messplatz verschraubten Säule angebracht. Die beheizbare Messkammer (im Hause gefertigt) war über einen Gleittisch fest mit dem inversen Mikroskop (Zeiss, Deutschland) verbunden. Die Badlösung wurde mit einer Geschwindigkeit von etwa 3 ml pro Minute ausgetauscht. Der Zulauf von Lösungen wurde aus acht alternativ wählbaren Vorratsgefäßen gewährleistet. Der Zulauf war beheizbar, wobei die Temperatur durch eine Rückkopplungsschaltung der Kontrolleinheit über einen Thermofühler in der Badkammer regulierbar war (im Haus konstruiert und gebaut). Die Absaugung der Badlösung erfolgte über das im Haus vorhandene Unterdrucksystem. Zur Videoüberwachung wurde ein Videosignal von einer Kamera (Panasonic, USA) durch einen Videorekorder auf einen Fernseher übertragen. Auf einem Oszilloskop konnten Signale vom Verstärker angezeigt werden. Nur die Perfusionsanlage, der luftgelagerte Messtisch mit seinen Aufbauten und die Manipulatorsteuerung befanden sich in dem Faradaykäfig. Nur die Teile und Geräte waren geerdet, deren Erdung eine deutliche Verringerung des Rauschens, verursacht durch elektromagnetischen Einstreu durch die Hausstromversorgung, mit sich brachten. Somit wurden Schwingschleifen vermieden und ein geringes Rauschen erreicht.

Als beste Intrazellulärlösung zur Messung von CHO-KCNQ1/MINK-Zellen hat sich die „Intra-CHO“- Lösung herausgestellt. Dabei wurden die Intra CHO-Lösung im Verhältnis 10/1 (vol%) der  $I_{K_S}$ -Lösung\* beigemischt. Diese Lösung wurde jeden Tag frisch angesetzt. Die Patchpipetten wurden aus Borosilikat-Kapillaren (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,87 mm-ohne Filament) der Firma Hilgenberg (Deutschland) mit einem automatischen Ziehgerät (*Puller*) (Firma LIST-MEDICAL, Darmstadt) in drei Zügen gezogen und anschließend deren Spitzen feuerpoliert. Die Pipetten hatten Widerstände von 2 bis 3 M $\Omega$  für *whole-cell* Messungen und 1,5 bis 2 M $\Omega$  für *cell-attached* Messungen. Form und Herstellung von Patchpipetten und Pipetten für TEVC-Messungen unterscheiden sich im Detail. Eine sehr ausführliche Beschreibung findet sich im Buch von Bert Sackmann und Erwin Neher „Single-Channel Recording“ (1992).



### Abbildung 12: Aufbau des *Patch-Clamp* Meßplatzes

Die Messwertaufnahme und Auswertung erfolgte computergestützt (A), wobei zusätzlich die aktuellen Ereignisse auf einem Oszilloskop (C), über eine Videoanlage (B, G) und ein inverses Mikroskop (F) verfolgt werden konnten. Gemessen wurde mit einem computergesteuerten *Patch-Clamp* Verstärker (D). Die Patchpipette war am Vorverstärker gehalten, der wiederum über einen motorgetriebenen Mikromanipulator (J) ferngesteuert (E) positioniert wurde. Der Messtisch (H) befand sich in einem Faradaykäfig und war luftgelagert.

## Datenanalyse

Beschreibung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen

Zur Datenauswertung wurden die auf den Referenzstrom normierten Spitzenströme gegen die logarithmisch skalierte Blockerkonzentration aufgetragen. Der Kurvenfit (Anlegen einer Kurve an die Messkurve) erfolgte nach diesem einfachen Adsorptionsmodell (Hille, 1992).

$$I/I_{\max} = 1 / (1 + [IC_{50}/c]^H)$$

|           |   |   |
|-----------|---|---|
| I         | = | Stromamplitude bzw. $I_{\max}$ = maximale Stromamplitude      |
| c         | = | Blockerkonzentration  |
| H         | = | Hillkoeffizient   |
| $IC_{50}$ | = | Konzentration, bei der ein halbmaximaler Blockeffekt eintritt |
| C         | = | gegebene Substratkonzentration                                |

## Kurvendiskussion

Im elektrophysiologischen Teil wurden zahlreiche Stromspuren kinetisch analysiert. Amplitudenvergleiche konnten schnell und komfortabel mit dem Programm PulseFit durchgeführt werden. Für die Kurvenanalyse wurden Kurven mit ein bzw. zwei Komponenten mit Exponentialfunktionen folgender Form verwendet:

Kurven mit einer Komponente:

$$Y = A_0 + A_1 * \exp(t_1/\tau_1)$$

Kurven mit zwei Komponenten:

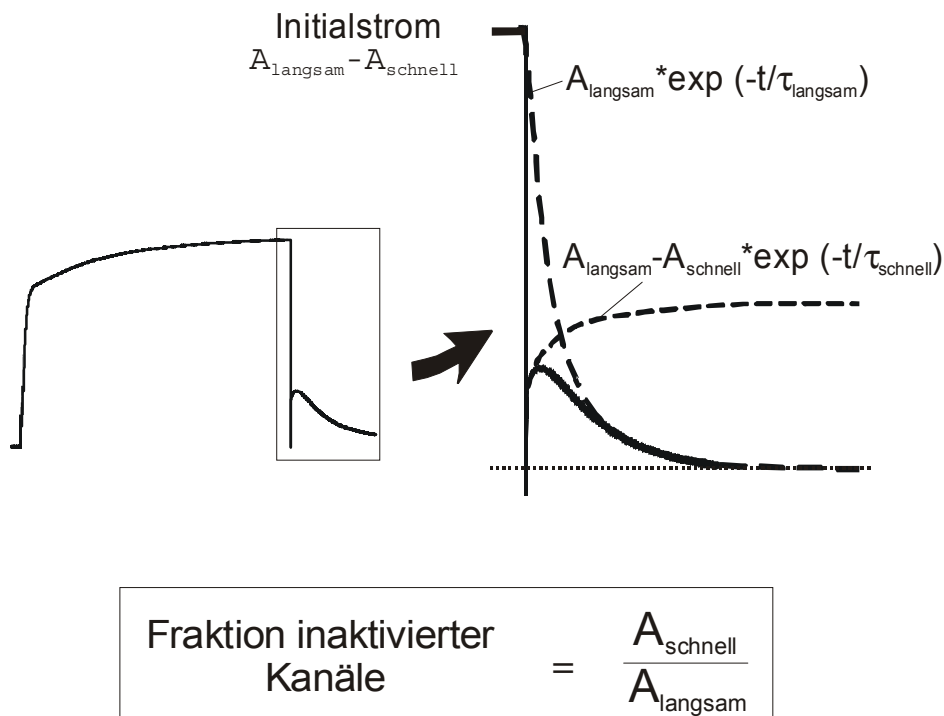
$$Y = A_0 + A_1 * \exp(t_1/\tau_1) + A_2 * \exp(t_2/\tau_2)$$

Die Exponentialfits wurden mit den Programmen PulseFit und Origin in den Versionen 5.0 und 6.0 durchgeführt. Die Programme benutzen für die Kurvenfits den Simplexalgorithmus und gaben für gleiche Kurven identische Ergebnisse.



### Berechnung der Fraktion inaktivierter Kanäle aus den Schwanzströmen

Aus den Schwanzströmen von Kaliumkanälen kann man häufig die Fraktion der inaktivierten Kanäle errechnen. Am Beispiel von KCNQ1 wurde dies von Pusch et al. (1998) und Tristani-Firouzi, M. & Sanguinetti, M. C. (1998) gezeigt. Die Methode ist in der Abbildung 17 zusammengefasst:



### Abbildung 13: Berechnung der Fraktion inaktivierter Kanäle aus den Schwanzströmen des KCNQ1 (modifiziert nach Pusch et al., 1998)

Der Schwanzstrom des KCNQ1 bei  $-60$  mV weist nach einem 2 Sekunden dauernden 40-mV-Puls einen „Haken“ auf. Dieser Haken deutet auf die Erholung von der Inaktivierung und die nachfolgende Deaktivierung an. Aus den Amplituden eines Zwei-exponentiellen Kurvenfits lässt sich die Fraktion der inaktivierten Kanäle -wie in dem Kasten dargestellt- bestimmen.

### Analyse der Stöchiometrie der KCNQ1-Inaktivierung

Allgemein gilt für die stöchiometrische Verteilung von vier Untereinheiten:

$p$  ist die Fraktion der WT-RNA.  $i$  ist die Anzahl an WT-UE im tetrameren Kanalkomplex und  $f_i$  ist die Fraktion der inaktivierten Kanäle bei hohen positiven Spannungen (50 mV) des Tetramers. Dabei ist die Anordnung der UE zueinander für die Inaktivierung unbedeutend. Ausgehend von gleicher Proteinprozessierung und freier Mischung der UE ergibt sich:

$$f = \sum_{i=0}^4 \binom{4}{i} p^i (1-p)^{4-i} f_i \quad (\text{Gleichung 1})$$

(f = Summe von i=0 bis 4 von  $\{ \binom{4}{i} p^i (1-p)^{4-i} f_i \}$ )

Man kann zwei Modelltypen unterscheiden:

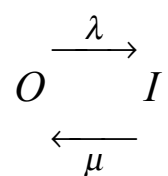
Modell Typ 1: Eine bestimmte Anzahl unabhängiger *gates* (1-4) muß simultan geschlossen werden, um Inaktivierung herbeizuführen ("HH-Modell"). Nur "kompetente" UE können ein *gate* aufbauen.

Modell Typ 2: Inaktivierung ist eine kooperative, koordinierte Interaktion aller vier UE. Jede "kompetente" UE verringert die freie Energie des inaktivierten Zustandes im Vergleich zum Offenzustand um eine bestimmte Energiemenge.

### Berechnung zum Modell 1:

Alle HH-Modelle basieren auf  $\lambda_0$ ,  $\mu_0$  des *onsets* und der *recovery* der Inaktivierung (Inaktivierung ist unabhängig von der Spannung) und  $\alpha_0 = \mu_0 / \lambda_0$ .

Fall a) 1 *gate* ist ausreichend:

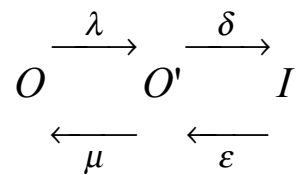


mit  $\lambda = i \cdot \lambda_0$  und  $\mu = \mu_0$ , wobei  $i$  der Anzahl der kompetenten UE entspricht. Also,

$$f_i = 1 / (1 + \alpha_0 / i) \quad (\text{Gleichung 2})$$

Von der gemessenen Fraktion der inaktivierten Kanäle,  $f_4=1/(1+\alpha_0/4)$ , ist der Wert  $\alpha_0=4*(1/f_4-1)$  zu bestimmen und für jede Fraktion von WT-Kanälen,  $p$ , wird in dem Koexpressionsexperiment die resultierende effektive Fraktion von inaktivierten Kanälen nach den Gleichungen 1 und 2 bestimmt

Fall b) 2 *gates* sind ausreichend und notwendig:



Die Werte von  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\varepsilon$ ,  $\delta$  sind von der Anzahl der kompetenten UE,  $i$ , abhängig.

Mit 0 oder 1 UE können die Kanäle nicht inaktivieren.

$$f_0=f_1=0 \quad (\text{Gleichung 3})$$

Mit 2 kompetenten UE:

$$\lambda=2\lambda_0; \mu = \mu_0; \delta = \lambda_0; \varepsilon = 2\mu_0, \text{ i.e.}$$

$$f_2 = 1/(1+\alpha_0)^2 \quad (\text{Gleichung 4})$$

Mit 3 kompetenten UE:

$$\lambda=3\lambda_0; \mu = \mu_0; \delta = 2\lambda_0; \varepsilon = 2\mu_0, \text{ i.e.}$$

$$f_3 = 1/(1+\alpha_0+1/3\alpha_0^2) \quad (\text{Gleichung 5})$$

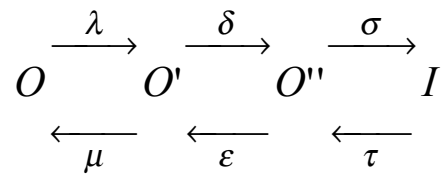
Mit 4 kompetenten UE:

$$\lambda=4\lambda_0; \mu = \mu_0; \delta = 3\lambda_0; \varepsilon = 2\mu_0, \text{ i.e.}$$

$$f_4 = 1/(1+2/3\alpha_0+1/6\alpha_0^2) \quad (\text{Gleichung 6})$$

Von der Fraktion der inaktivierten WT-Kanäle,  $f_4$ , wird der Wert  $\alpha_0$  aus der Gleichung 6 berechnet und für jede WT-Kanalfraktion,  $p$ , im Koexpressionsexperiment wird aus den Gleichungen 1 und 3-6 die resultierende effektive Fraktion der inaktivierten Kanäle berechnet.

Fall c) 3 *gates* sind ausreichend und notwendig:



Die Werte von  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\varepsilon$ ,  $\delta$ ,  $\sigma$ ,  $\tau$  hängen von der Anzahl der kompetenten UE,  $i$ , ab.

Mit 0, 1, 2 kompetenten UE können die Kanäle nicht inaktivieren.

$$f_0=f_1=f_2=0 \quad (\text{Gleichung 7})$$

Mit 3 kompetenten UE:

$$\lambda=3\lambda_0; \mu = \mu_0; \delta = 2\lambda_0; \varepsilon = 2\mu_0, \sigma = \lambda_0; \tau = 3\mu_0, \text{ i.e.}$$

$$f_3 = 1/(1+\alpha_0)^3 \quad (\text{Gleichung 8})$$

Mit 4 kompetenten UE:

$$\lambda=4\lambda_0; \mu = \mu_0; \delta = 3\lambda_0; \varepsilon = 2\mu_0, \sigma = 2\lambda_0; \tau = 3\mu_0, \text{ i.e.}$$

$$f_4 = 1/(1+3/2\alpha_0+\alpha_0^2+1/4\alpha_0^3) \quad (\text{Gleichung 9})$$

Aus der Fraktion der inaktivierten WT-Kanäle,  $f_4$ , wird der Wert von  $\alpha_0$  aus der Gleichung 10 berechnet und für jede Fraktion von WT-Kanälen,  $p$ , des Koexpressionsexperimentes wird die resultierende effektive Fraktion inaktivierender Kanäle nach den Gleichungen 1, 7-9 berechnet.

Fall d) 4 *gates* sind notwendig:

Nur WT-Kanäle können inaktivieren.

$$f_0=f_1=f_2=f_3=0 \quad (\text{Gleichung 10})$$

wobei  $f_4$  dem experimentell ermittelten Wert entspricht. Für jede Fraktion von WT-Kanälen,  $p$ , im Koexpressionsexperiment wird die resultierende effektive Fraktion inaktivierender Kanäle nach den Gleichungen 1 und 10 über  $f_4$  berechnet.

### Berechnungen des Modells vom Typ 2:

Jede "kompetente" UE verringert die freie Energie des inaktivierten Zustandes im Vergleich zum Offenzustand um eine bestimmte Energiemenge.

$$\mu/\lambda = \exp((- \Delta G_0 + -i \cdot \Delta G)/RT) = r_0 \cdot \exp(i \cdot x) \quad (\text{Gleichung 11})$$

Dabei ist  $\Delta G$  die Abnahme der freien Energie, wenn eine mutierte UE durch eine WT-UE,  $r_0$ , ersetzt wird, ist  $r_0$  die ratio von  $\mu/\lambda$  ohne WT-UE,  $i$  ist die Anzahl der kompetenten (= WT) UE und  $x$  ist die Abnahme der freien Energie in Einheiten von RT.

Somit entspricht die Fraktion der inaktivierten Kanäle im Komplex mit  $i$  kompetenten UE:

$$f_i = 1/(1 + r_0 \cdot \exp(-i \cdot x)) \quad (\text{Gleichung 12})$$

Vom gemessenen  $f_4 = 1/(1 + r_0 \cdot \exp(-4 \cdot x))$  kann  $r_0$  als

$$r_0 = (1/f_4 - 1) \exp(4x) \quad (\text{Gleichung 13})$$

ausgedrückt werden und damit gilt:

$$f_i = \frac{1}{1 + \left(\frac{1}{f_4} - 1\right) \exp((4 - i)x)} \quad (\text{Gleichung 14})$$

Diese Gleichung enthält die Unbekannte  $x$ . Diese kann durch einen passenden Fit mit der Gleichung 14 ermittelt werden.

### Statistik

Die Versuchsergebnisse wurden als Mittelwerte und dem Standardfehler des Mittelwerts angegeben (SEM). Die Anzahl der Experimente ist mit „n“ angegeben. Der Wert für den Standardfehler wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{SEM} = \sqrt{((\sum \underline{x}_i^2) - n(\underline{x})^2) / (n-1)} / (\sqrt{n})$$

SEM = **Standard Error of the Mean**

$\underline{x}_i$  = Einzelwerte

n = Anzahl der Einzelwerte

$\underline{x}$  = Mittelwert

Die Analyse auf signifikante Unterschiede wurde in der Regel mit dem Zwei-Populationen-t-Test bei zwei unabhängigen oder zwei abhängigen Datensätzen durchgeführt. Voraussetzungen für diese Tests sind Normalverteilung und konstante Varianz. Für den t-Test mit zwei unabhängigen Datensätzen galt:

$$T = (\underline{X}_1 - \underline{X}_2) / \sqrt{S^2(1/n_1 + 1/n_2)}, \text{ wobei gilt } S^2 = [(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2] / (n_1 + n_2 - 2)$$

Die Nullhypothese  $H_0 = \mu_1 = \mu_2$  wurde bei einem zu großen  $|t|$  oder bei zu kleinem p-Wert zurückgewiesen.

Für den t-Test mit zwei abhängigen Datensätzen galt:

$$T = \underline{D} / S_D, \text{ wobei } S_D^2 = 1 / (n - 1) \sum_{j=1}^n (D_j - \underline{D})^2$$

Die Nullhypothese ist hierbei auch  $H_0 = \mu_1 = \mu_2$  und  $D = X1j - X2j$  bei  $j=1, \dots, n$  und  $\underline{D} = 1/n \sum_{j=1}^n D_j$

Bei einem p-Wert von 0,05 (Signifikanzgrenze  $\alpha$ ) wurde die Nullhypothese zurückgewiesen, und wurde als signifikanter Unterschied gedeutet.

Die beiden t-Tests wurden mit Hilfe von Origin 5.0 durchgeführt. Origin bietet komfortable Bedienbarkeit und liefert die Parameter Mittelwert ( $\underline{X}$ ), Varianz (Standard-Abweichung)<sup>2</sup>,

Größe der Datensätze, t-Werte und p-Werte. Wurden signifikante Unterschiede auf der Ebene von einem  $p=0,05$  gefunden, sind diese Unterschiede durch ein \* angezeigt.

## Versuche und Ergebnisse

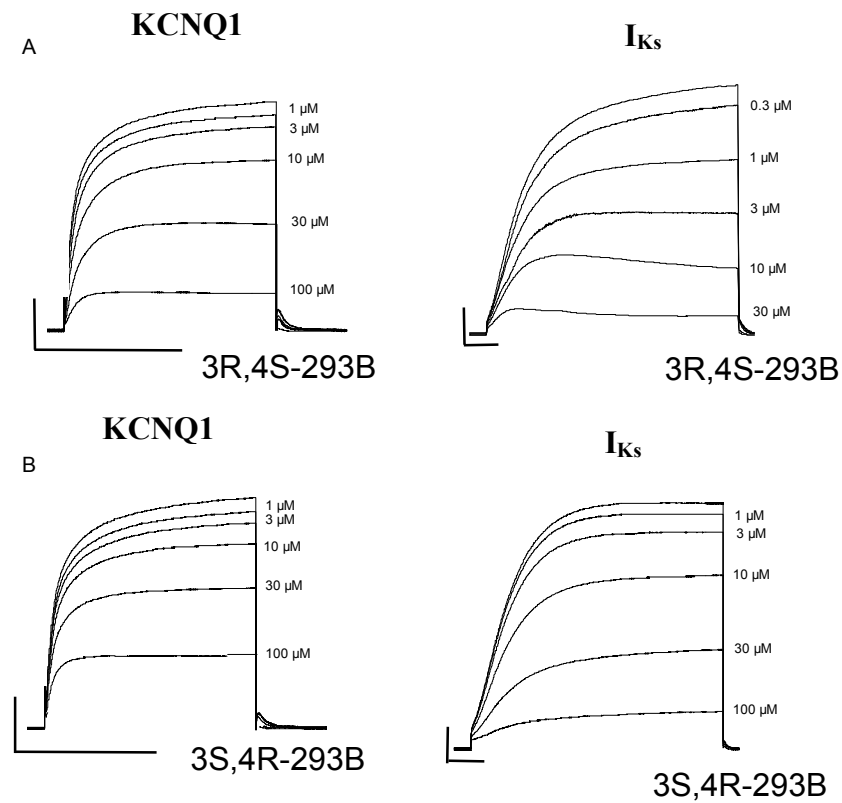
Die Expression von homomeren humanen KCNQ1- (hKCNQ1-)Kanälen in *Xenopus*-Oozyten ermöglichte die Messung der charakteristischen, schnell aktivierenden und spannungsabhängigen Kaliumströme. Koinjektion von hKCNQ1- und hMinK-RNS in Oozyten führte zur Expression eines Kaliumstroms der als  $I_{K_S}$  bezeichnet wird.

Zunächst wurden allgemeine Parameter wie Dosis-Wirkungsbeziehungen, Abhängigkeit vom Testprotokoll und Spannungsabhängigkeit des Blocks der beiden Chromanolenantiomere getestet. Durch diese Parameter wird die Wirkung der Chromanolenantiomere auf den Kanal verständlich. Die Versuche wurden so angelegt, dass sie die Bedingungen im Herzen nachahmen. Somit wurde die Grundlage für das Verständnis von  $I_{K_S}$ -Blockade durch die Chromanolenantiomere im komplexeren System Herz geschaffen.

### **Wirkung der Chromanol-293B-Enantiomere auf den KCNQ1- und KCNQ1/MinK-Komplex**

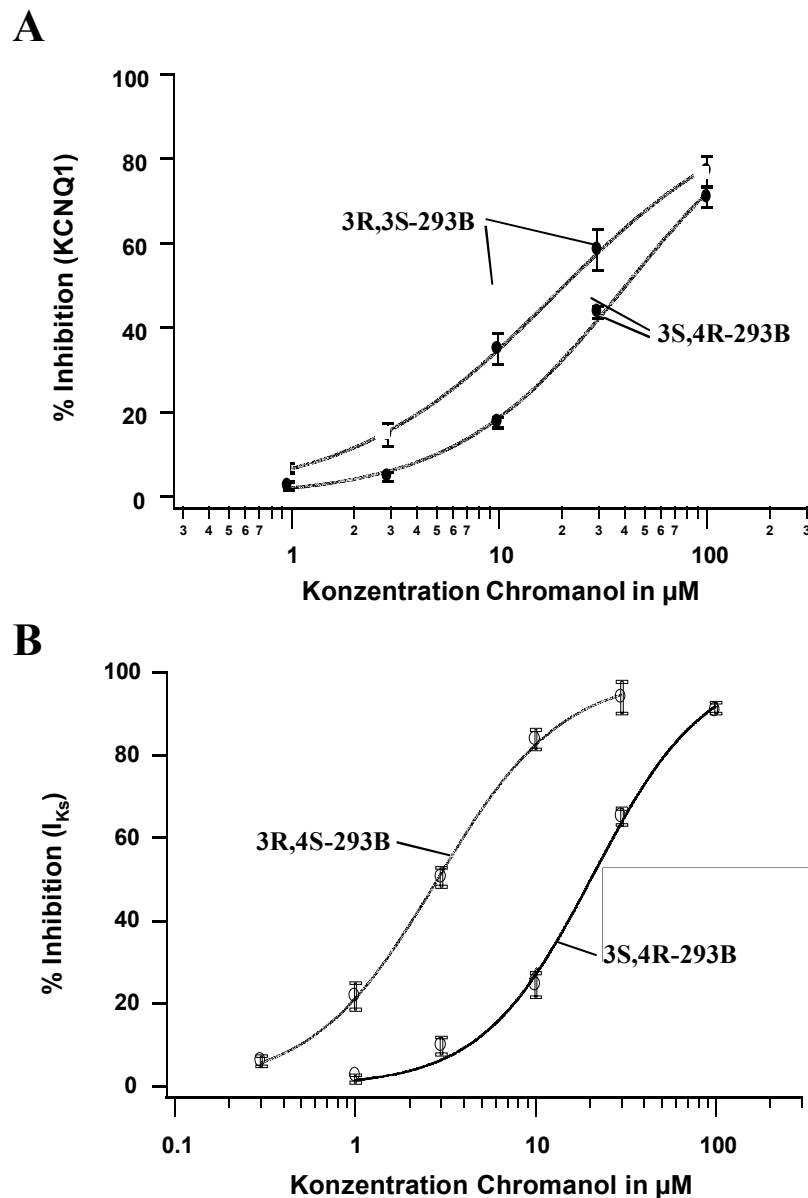
Bereits Busch *et al.* (1997) konnten zeigen, dass in *Xenopus*-Oozyten homomere KCNQ1-Kanäle und heteromere  $I_{K_S}$ -Kanäle durch Chromanol 293B mit jeweils unterschiedlichen  $IC_{50}$ -Werten inhibiert werden. Daraufhin konnten etwas später Suessbrich *et al.* (1996) eine stereospezifische Inhibition der beiden Enantiomere von 293B am heterolog in *Xenopus*-Oozyten exprimierten  $I_{K_S}$ -Kanal nachweisen. Allerdings war die genaue Ursache der stereospezifischen Inhibition noch nicht bekannt. Um die Befunde zu bestätigen, wurden zunächst die Konzentration der halbmaximalen Blockade ( $IC_{50}$ ) für beide Enantiomere auf den heterolog in *Xenopus-laevis*-Oozyten exprimierten hKCNQ1 und den h $I_{K_S}$  bestimmt. Die KCNQ1-Kanäle wurden bei einem Membranpotential von -100 mV gehalten und alle 10 s auf 0 mV für 3 s gepulst. h $I_{K_S}$ -Kanäle wurden bei einem Membranpotential von -80 mV gehalten und alle 60 s für 15 s auf 0 mV gepulst. Die Stromamplituden wurden am Ende des Testpulses nach 5-minütigem Einwaschen, also bei sich nicht mehr verändernder Inhibition, der jeweiligen Substanz bestimmt und gegen die logarithmisch dargestellte Konzentrationen aufgetragen. Die Potenz eines Blockers ist ein wichtiges Kriterium für seine Eignung als Medikament.





**Abbildung 14: Dosis-Wirkungsbeziehung der Chromanol-293B-Enantiomere auf hKCNQ1 und hI<sub>Ks</sub> in *Xenopus*-Oozyten**

Die Oozyten wurden 5 Minuten mit der entsprechenden Konzentration von Chromanol 293B umspült und dann die Stromspuren aufgezeichnet. Getestet wurden die Enantiomere 3S,4R-293B und 3R,4S-293B auf ihre Inhibition der Ströme der Kanäle hKCNQ1 und hI<sub>Ks</sub>. Die Stromspuren sind übereinander gelegt dargestellt.



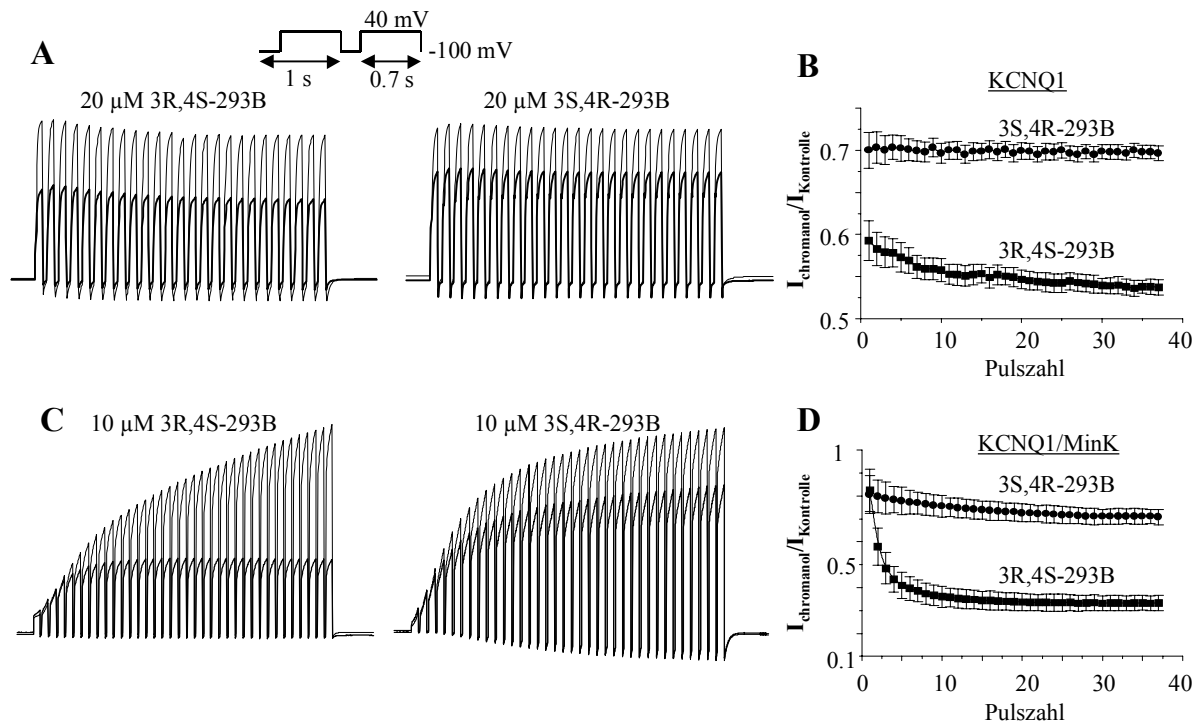
**Abbildung 15: Dosis-Wirkungskurven der Chromanol-293B-Enantiomere**

Die Chromanolenantiomere wurden an den humanen KCNQ1-Kanal ohne (A) und mit  $\beta$ -UE MinK (B) in Oozyten ( $n=5-8$ ) appliziert. Die Amplitude wurde am Ende der Pulse bei 0 mV ermittelt

Die  $IC_{50}$ -Werte von 3R,4S-293B sind mit und ohne MinK deutlich kleiner als die Werte des anderen Enantiomers im entsprechenden Kanal. Unter dem Einfluss von MinK nahm die Sensitivität des Kanals für beide Blockerenantiomere zu. Die Hill-Koeffizienten lagen bei diesen Messungen um 1, was auf eine fehlende Kooperativität der Blockermoleküle hinweist.

### „Use-Dependence“ des Chromanolblocks

Die Messung der „Use-Dependence“ (Benutzungsabhängigkeit) des Chromanolblocks gibt an, ob bei repetitiven Pulsen die blockierende Wirkung zunimmt. Sie wurde bei einer Pulsfrequenz von 1 Hz bei beiden Kanälen gemessen. Diese Experimente zeigen, wie sich die blockierende Wirkung bei gleicher Schlagfrequenz im Herzen entwickeln sollte.



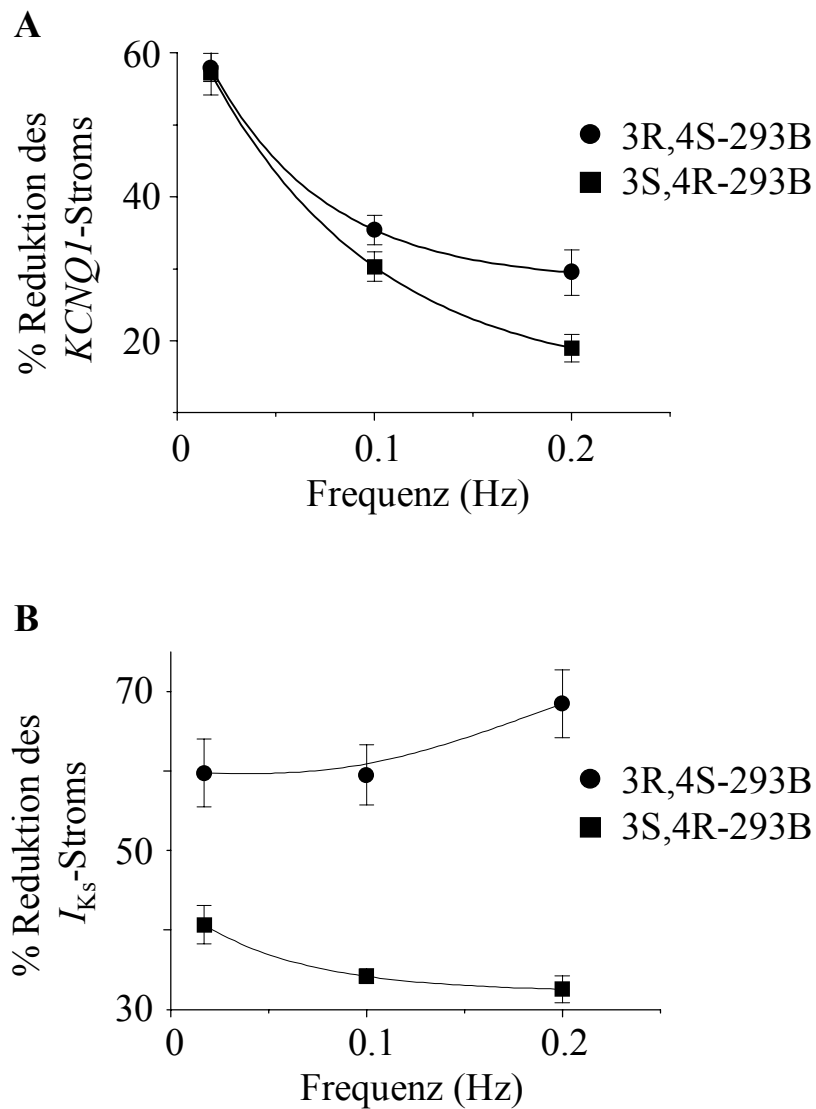
#### Abbildung 16: Use-dependence des Chromanolblocks

Die KCNQ1- und die KCNQ1/MinK-Kanäle wurden mit 700 msec-Pulsen bei 1 Hz aktiviert. Die KCNQ1-Ströme wurden mit 20  $\mu\text{M}$  Chromanolenantiomeren blockiert und die Stromspuren sind übereinander gelegt gezeigt (A). Die relativen Stromamplituden des geblockten Stroms  $I_{\text{Chromanol}}/I_{\text{Kontrolle}}$  wurde gegen die Pulszahl aufgetragen (B). Ebenso wurde mit dem durch 10  $\mu\text{M}$  geblockten KCNQ1/MinK verfahren. Die entsprechenden Stromspuren sind in C und die relativen Stromamplituden des geblockten KCNQ1/MinK-Stroms  $I_{\text{Chromanol}}/I_{\text{Kontrolle}}$  sind in D dargestellt. Die Amplituden wurde am Ende der Rechteckpulse bei 40 mV gemessen. (n=4-5).

## Frequenzabhängigkeit des Chromanolblocks

Die Dosis-Wirkungskurven aus den vorhergehenden Experimenten wurden bei repetitiven Pulsen erstellt. Häufig findet man bei einer Blockade, die von dem Kanalzustand abhängt („*State-dependent block*“), eine deutliche Abhängigkeit des Blocks von den verwendeten Pulsprotokollen. Um die mögliche Abhängigkeit der gemessenen Blockeffekte der Chromanole von der Pulsfrequenz zu untersuchen, wurden unterschiedliche Pulsprotokolle verwendet. Durch unterschiedliches repetitives Pulsieren bei gleicher Pulsdauer wurde die Pulsfrequenz variiert. Dieser Ansatz sollte verdeutlichen, wie sich der Kanalblock bei unterschiedlichen Schlagfrequenzen im Herzen auswirkt.

Bei repetitiven depolarisierenden Spannungspulsen mit hoher Frequenz war 3R,4S-293B ein potenterer KCNQ1-Blocker als 3S,4R-293B (Abbildung 17). Seine höhere Affinität zeigte sich an dem Unterschied im *steady-state*-Block. Offensichtlich hat 3R,4S-293B eine höhere Affinität zu geschlossenen als zu geöffneten KCNQ1-Kanälen. 3S,4R-293B scheint dagegen fast ausschließlich Affinität zu geschlossenen Kanälen zu haben. 3S,4R-293B wirkt an KCNQ1/MinK ähnlich wie an KCNQ1, die Inhibition ist lediglich etwas stärker. Das Enantiomer 3R,4S-293B zeigt dagegen eine erhöhte Inhibition bei höherer Testpulsfrequenz. Man kann die Abnahme der Inhibition von 3S,4R-293B auf beide Kanäle bei höheren Pulsfrequenzen als frequenzabhängiges entblocken bezeichnen. 3R,4S-293B blockiert dagegen den KCNQ1/MinK-Kanal bei höheren Frequenzen verstärkt, was als frequenzabhängiges blocken zu bezeichnen ist (Wang *et al.*, 1995)

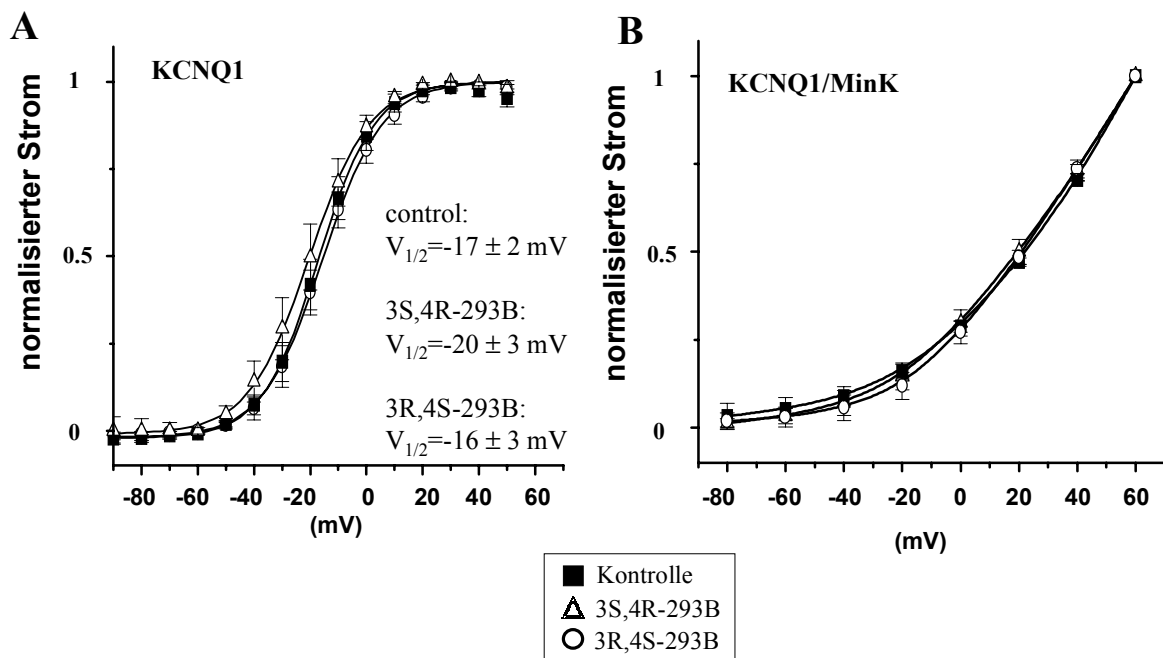


**Abbildung 17: Frequenzabhängigkeit des Chromanolblocks**

Die  $KCNQ1$ - und die  $KCNQ1/MinK$ -Amplituden wurden am Ende von 3-Sekunden-Rechteckpulsen auf 40 mV gemessen. Es wurden ein Puls, sechs oder zwölf Pulse pro Minute appliziert, was Pulsfrequenzen von 0,017 Hz, 0,1 Hz und 0,2 Hz entspricht. Die Ergebnisse für  $KCNQ1$  sind in A und die für  $KCNQ1/MinK$  in B dargestellt (n=4-6).

### Spannungsabhängigkeit der Chromanol-293B-Wirkung

Häufig findet man bei Kanalblockern eine Abhängigkeit der Aktivität von der Testspannung. Diese Spannungsabhängigkeit ist ein wichtiges Charakteristikum von Blockerwirkungen, das auch die Wirkung eines Klasse-III-Antiarrhythmikums charakterisiert. Sie kann durch eine unterschiedliche Affinität zu Offenzuständen des Kanalproteins entstehen. Um eine mögliche Spannungsabhängigkeit der 293B-Blockade zu untersuchen, wurden partielle Blockaden des KCNQ1-Stroms mit 20  $\mu\text{M}$  und des KCNQ1/MinK-Stroms mit 10  $\mu\text{M}$  der Chromanolenantiomere herbeigeführt. Würde sich nun bei Rechteckpulsen unterschiedlicher Spannung eine verschieden starke Blockerwirkung ergeben, so läge eine Spannungsabhängigkeit vor.

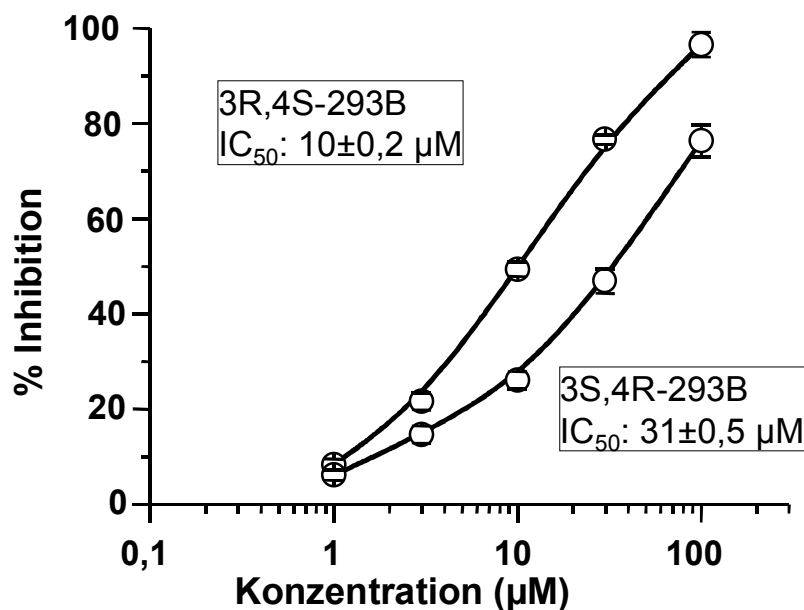


#### Abbildung 18: Spannungsabhängigkeit des 293B-Blocks

Der KCNQ1-Strom wurde mit 20  $\mu\text{M}$  und der  $I_{Ks}$ -Strom mit 10  $\mu\text{M}$  der Chromanolenantiomere partiell geblockt und die Stromamplitude im Schwanzstrom nach 2-Sekunden-Rechteckpulsen unterschiedlicher Spannung gemessen. Die Stromamplituden der Schwanzströme sind gegen die Spannung aufgetragen ( $n=5$ ). Die halbmaximale Aktivierung  $V_{1/2}$  wurde durch einen Boltzmann-fit bestimmt.

## Abhängigkeit des Chromanolblocks von der extrazellulären Kaliumkonzentration

Da die KCNQ1-Kanalkinetik unabhängig von der extrazellulären Kaliumionenkonzentration ist (Pusch *et al.*, 1998), sollten sich mögliche Effekte auf die Kanalblockade bei Erhöhung der extrazellulären Kaliumionenkonzentration aus der Interaktion von Blocker und Kanal ergeben. Da Chromanol 293B auch in der *Cell-attached*-Konfiguration der *Patch-Clamp*-Technik wirkt (Loussouarne *et al.*, 1997), nimmt man an, daß es von innen oder seitlich von der Membran aus wirkt. Weil für das 293B-Razemat eine Offenkanalaktivität berichtet wurde (Fujisawa *et al.*, 2000), wurde die Abhängigkeit der Blockeffizienz unter erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentration getestet. Ein Blocker, der die geöffnete Pore nahe der Kaliumdurchtrittsstelle blockiert, sollte bei einem relativ großen Kaliumeinstrom aus der Pore gedrückt werden. Seine Potenz sollte demnach abnehmen. Da bei ischämischen Ereignissen die extrazelluläre Kaliumkonzentration stark ansteigen kann, ist es wichtig zu wissen, ob unter diesen Bedingungen ein Chromanol den  $I_{Ks}$  blockieren kann.



**Abbildung 19: Dosis-Wirkungsbeziehung von Chromanol 293B auf KCNQ1 unter der Einwirkung von einer erhöhten extrazellulären Kaliumionenkonzentrationen**

Die KCNQ1-Amplitude wurde am Ende eines 3-Sekunden-Pulses auf 40 mV (Standardprotokoll, siehe Abbildung 18) ermittelt.

Die KCNQ1-Ströme wurden wie in Abbildung 15A angegeben gemessen. Die Hemmung von KCNQ1 durch 3S,4R-293B wurde durch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumionenkonzentration nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 15A in ND-96:  $36,5 \pm 3 \mu\text{M}$ ; in KD-96:  $31 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ). Die Hemmung von 3R,4S-293B nahm dagegen von  $18,6 \pm 9 \mu\text{M}$  in ND96 (Abbildung 15A) bei Kaliumerhöhung signifikant auf  $10 \pm 0,2 \mu\text{M}$  ab. Dies

unterstützt nicht die These von einer Blockade der offenen Pore nahe des Selektivitätsfilters durch ein Enantiomer von Chromanol 293B.

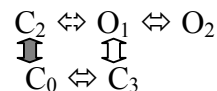
### Analyse der Blockkinetik

Nachdem die Standardparameter für die Blockade durch die Chromanolenantiomeren bestimmt wurden, wurde eine detaillierte kinetische Analyse durchgeführt. Sie sollte weiterführende Einsichten in den offensichtlich zustandsabhängigen (*engl. state-dependent*) Block eröffnen.

Durch die Applikation eines Blockers in einer Konzentration, die lediglich eine partielle Blockade bewirkt, werden häufig kinetische Veränderungen sichtbar, die mit der Wirkung des Blockers verbunden sind. Diese Veränderungen können bei sorgfältiger Analyse dazu genutzt werden, Hinweise auf die Vorgänge während der Blockade zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden die Enantiomere des Chromanols 293B in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  im Oozytenexpressionssystem appliziert.

Tristani-Firouzi *et al.* (1998) und Pusch *et al.* (1998) zeigten, dass die Kinetik von KCNQ1 durch das folgende Gatingmodell beschrieben werden kann:  $C_1 \leftrightarrow C_2 \leftrightarrow O_1 \leftrightarrow O_2 \leftrightarrow I$ .

Für  $I_{Ks}$  schlägt J. Maylie ein Modell mit alternativen Öffnungswegen vor. Dies entspricht folgendem Gatingmodell:



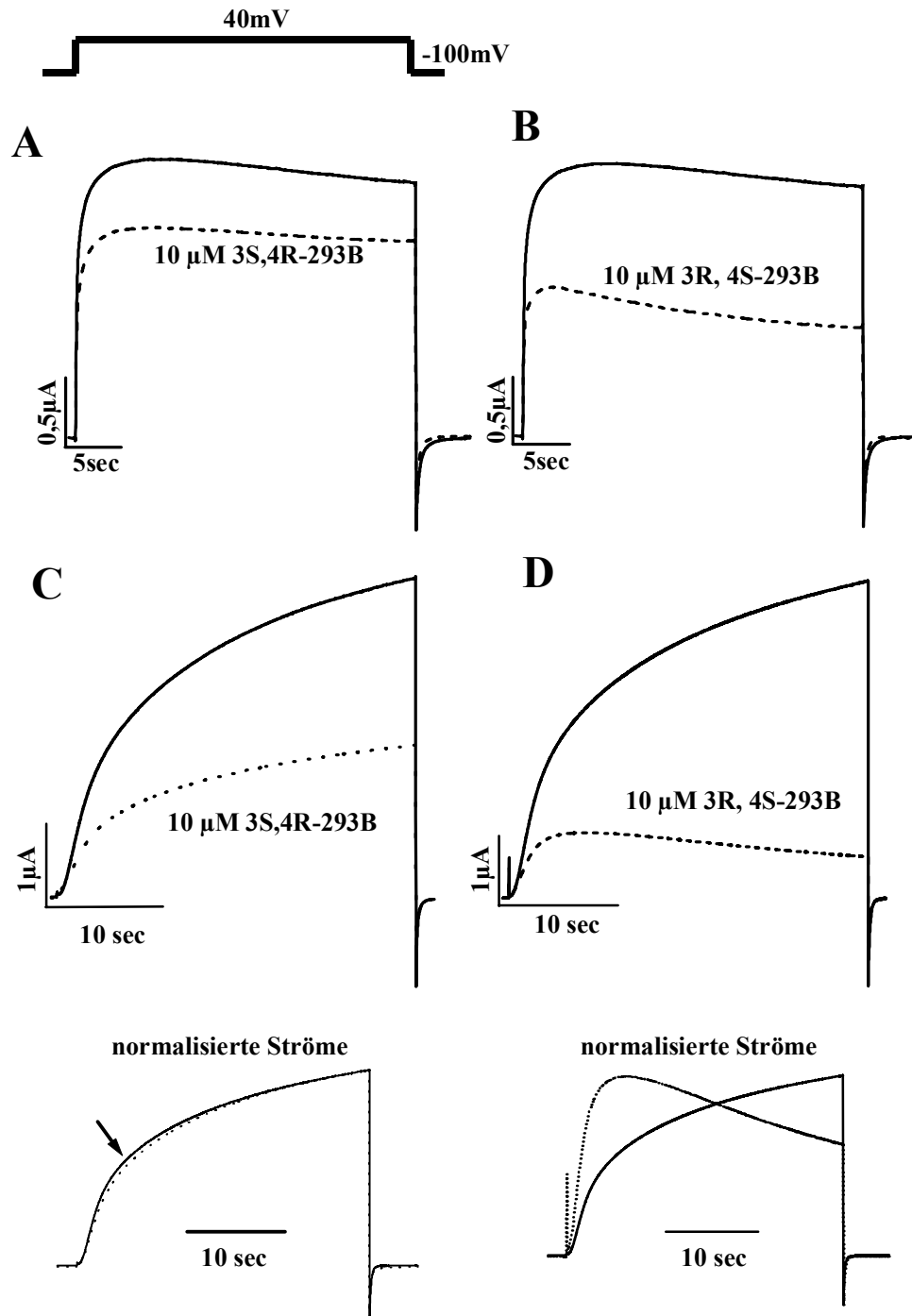
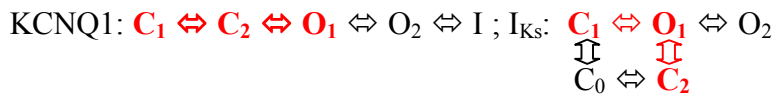
In den Modellen beschreiben  $C_0$ ,  $C_1$ ,  $C_2$  alternative geschlossene Zustände,  $O_1$ ,  $O_2$  offene Zustände und  $I$  den inaktivierten Zustand. Der graue Pfeil entspricht einem vorpulsabhängigen Schritt.

Aus diesen kinetischen Analysen der Ströme war bekannt, dass sie besondere Gatingcharakteristika aufweisen. Deshalb wurde die Wirkung der Blockerenantiomere in diesem Kontext untersucht, um die hochstaffinen Zustände zu identifizieren. Dazu war es notwendig, die Pulsprotokolle für jede Fragestellung festzulegen. Zur Übersichtlichkeit sind die Pulsprotokolle dazu als Liniendiagramme den Stromspuren beigelegt. In der Beschreibung der folgenden Versuche sind in den bekannten Gatingmodellen die untersuchten Übergänge rot markiert.



**Aktivierungskinetiken**

Zunächst wurde die Aktivierung der Kanäle untersucht. In den Gatingmodellen sind dies folgende Zustände:



**Abbildung 20: Block von  $hI_{Ks}$  und  $hKCNQ1$  durch Chromanol 293B**

Aktivierung von  $hKCNQ1$  (A, B) und  $hI_{Ks}$  (C, D) ungeblockt und partiell geblockt (gestrichelte Stromspuren) durch die Chromanol-293B-Enantiomere. Die  $I_{Ks}$ -Ionenstromspuren sind zusätzlich als normalisierte Ströme dargestellt.

Die gemessenen Ionenströme wurden analysiert. An die aufsteigenden Phasen der Stromspuren wurden Kurven mit zwei Exponenten angelegt (zwei-Exponenten-Fits) (Tristani-Firouzi *et al.*, 1998; Tzounopoulos *et al.*, 1998; Pusch *et al.*, 1998). Die benutzte Funktion findet sich im Material- und Methodenteil der Arbeit (siehe Statistik). Dabei ergaben sich Unterschiede, die in der folgenden Tabelle zusammengefasst sind:

|                   | $I_{Ks}$                |                          | KCNQ1                   |                          |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                   | $\tau_{\text{schnell}}$ | $\tau_{\text{langsam}}$  | $\tau_{\text{schnell}}$ | $\tau_{\text{langsam}}$  |
| <b>Kontrolle</b>  | 1.34s ±0.05s<br>(n=18)  | 37.5s ±5.6s<br>(n=9)     | 103ms ±2 ms<br>(n=15)   | 1.65s ±0.3s<br>(n=15)    |
| <b>3S,4R-293B</b> | 2s ±0.0009s*<br>(n=14)  | 31.6s ±2.7s<br>(n=7)     | 97 ms ±0.6 ms<br>(n=13) | 1.45s ±0.33s<br>(n=13)   |
| <b>3R,4S-293B</b> | 1.1s ±0.07s*<br>(n=14)  | Analyse nicht<br>möglich | 82 ms ±3 ms *<br>(n=13) | Analyse nicht<br>möglich |

Signifikante Veränderungen sind durch \* (p = 0,05) angezeigt, Fehlerangaben sind SEM und die Anzahl der zugrunde liegenden Experimente ist in Klammern angegeben.

Es zeigte sich, dass unter dem Einfluss von 3S,4R-293B die schnell aktivierende Komponente von  $I_{Ks}$  verlangsamt wird. 3R,4S-293B beschleunigte bei beiden Kanälen die schnelle Aktivierung. Alle anderen Veränderungen waren nicht signifikant. Offensichtlich besitzt 3R,4S-293B eine Offenkanalaffinität, die sich auch unter diesen Bedingungen zeigt.

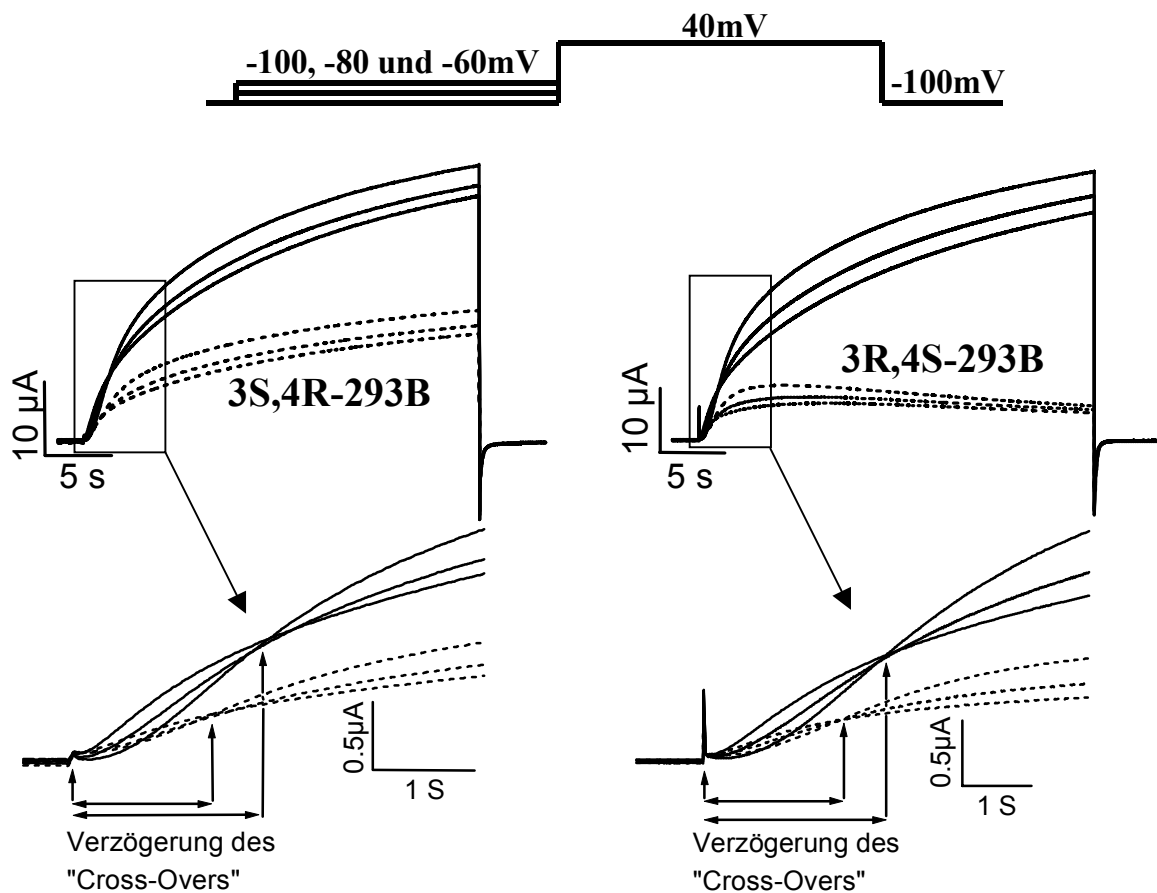
### Vorpulsabhängigkeit

Der  $I_{Ks}$ -Kanal zeigte eine Vorpulsabhängigkeit, die bei KCNQ1 nicht zu finden war. Dabei führte ein negatives Vorpulspotential initial zu einer Verzögerung der Aktivierung, an die sich eine beschleunigte Aktivierung anschloss. Daraus resultierte ein Kreuzen oder „Cross-Over“ der Stromspuren. Diese Kinetik stellt eine Besonderheit dar, die in dieser ausgeprägten Form sehr selten ist. Es wurde im Folgenden der Einfluss der partiellen Blockade auf diese Effekte untersucht. In dem  $I_{Ks}$ -Gatingschema ist dieser Kinetik durch die alternativen Öffnungswege und den vorpulsabhängigen Übergang (orangefarbener Pfeil) Rechnung getragen. Die untersuchten Schritte sind farbig gekennzeichnet:



Durch Variation der Vorpulsspannung konnte zwischen den Öffnungswegen  $C_1 \leftrightarrow O_1$  und

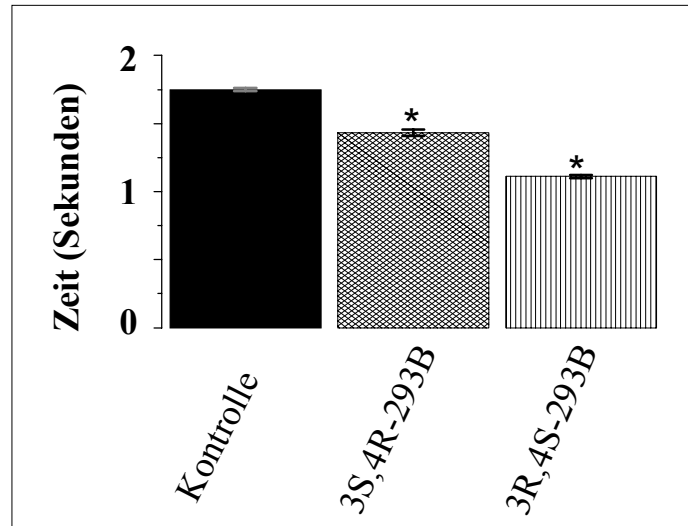
$C_0 \Leftrightarrow C_2 \Leftrightarrow O_1$  „umgeschaltet“ werden. Sofern einer der Öffnungswege eine erhöhte Affinität für den Blocker aufweist, sollte dies durch die folgenden Versuche deutlich werden. Bei niedrigen Herzfrequenzen kann es zu langemr Hyperpolarisationsphasen kommen. Dies bedeutet, dass ein erniedrigtes (hyperpolarisiertes) Potential erreicht wird. Die Auswirkung von Vorpulsen unterschiedlicher Spannung auf geblockte und partiell geblockte Kanäle wurde untersucht.



**Abbildung 21: Blockeffekt der Chromanolenantiomere in Abhängigkeit von der Vorpulsspannung.**

Nach Vorpulsen auf unterschiedliche Potentiale zeigt der  $I_{Ks}$ -Kanal unterschiedliche Aktivierungskurven, die sich in einem Punkt schneiden. Dieser „*Cross-Over*“ wird unter Einfluss beider Enantiomere nach links verschoben.

Die Verzögerung bis zum Auftreten des „*Cross-Overs*“ ist demnach verringert. Um diese *Cross-Over*-Ereignisse nach Blockade mit der Kontrolle vergleichen zu können, wurde die Zeit vom Beginn des depolarisierenden Pulses bis zum Kreuzen der Stromspuren gemessen. Dieser Bereich ist in der Abbildung 21 durch die Pfeile angedeutet. Das Ergebnis der Auswertung dieser „*Verzögerung des Cross-Overs*“ ist in der Abbildung 22 graphisch dargestellt.



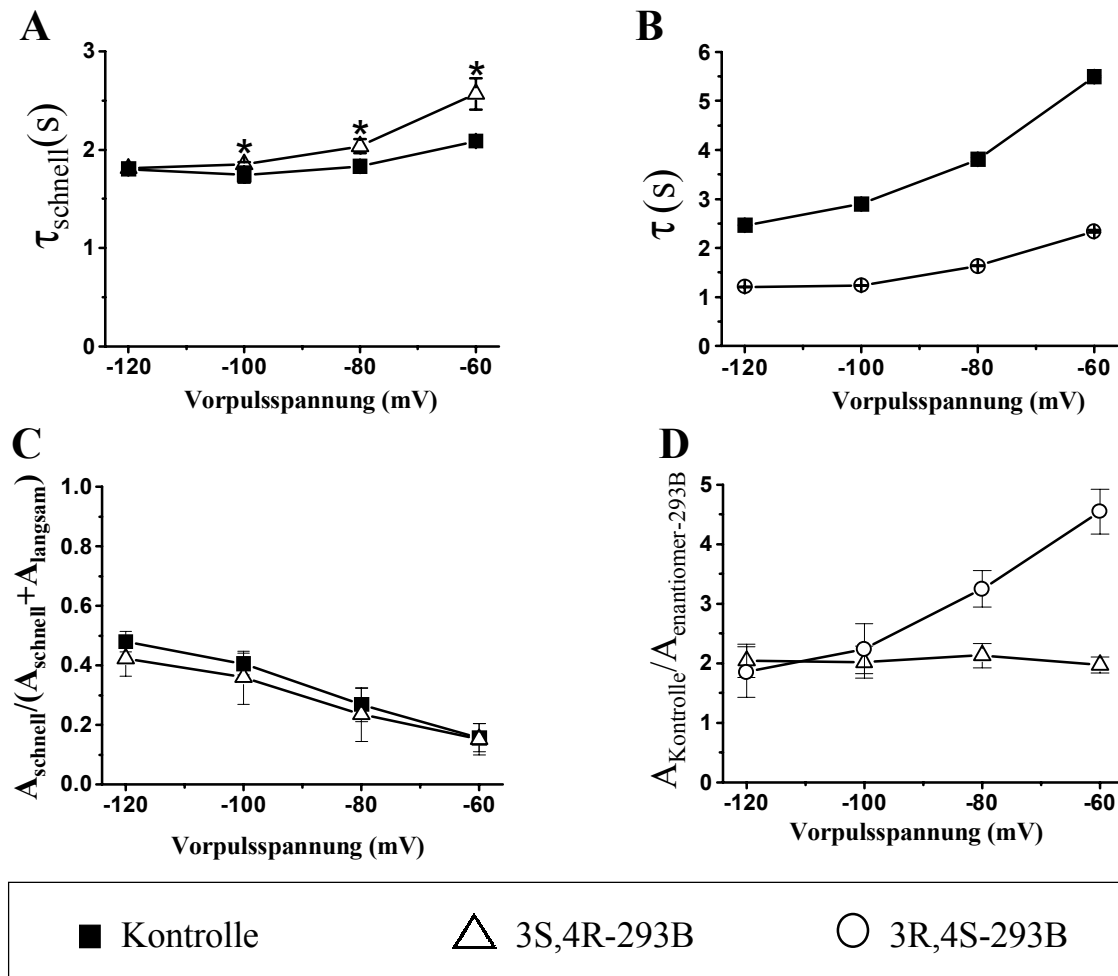
**Abbildung 22: Verzögerung des Cross-Overs**

Der *Cross-Over* wird durch die Chromanolenantiomere verschoben. Dargestellt ist die Zeit vom Beginn des aktivierenden Spannungspulses bis zum Auftreten des *Cross-Overs* in Sekunden (n=8-18).

Genauere Analysen der Abhängigkeit von der Vorpulsspannung und den Einflüssen der Blocker wurden durchgeführt, um die Verschiebung der „*Cross-Over*“ zu erklären. Hierfür wurden die Ergebnisse aus den zwei-Exponenten-Fits benutzt. Vergleiche der Zeitkonstanten und Amplituden der geblockten Ströme nach unterschiedlichen Vorpulsen sollten die Veränderungen des *Cross-Over*-Ereignisses erklären.

Unter dem Einfluß von 3S,4R-293B wurde die schnelle Komponente der Aktivierung ( $\tau_{\text{schnell}}$ ) des  $I_{Ks}$  abhängig von der Vorpulsspannung verlangsamt. Dabei wurde der Anteil der schnellen Komponente am Gesamtstrom nicht signifikant verändert. Offensichtlich wurden die  $I_{Ks}$ -Kanäle durch weniger negative Vorpulse in Zustände mit höherer Affinität für 3S,4R-293B versetzt. Dementsprechend wurde nach positiveren Vorpulsen der verlangsamende Effekt auf die schnelle Komponente der Aktivierung in der Zeitkonstante ausgeprägter. Diese Aktivierungsrate wurde unter dem Einfluss von 3S,4R-293B bei Depolarisation kleiner und damit stabilisierte 3S,4R-293B bei Depolarisation die Geschlossenkanalkonformation.

Durch 3R,4S-293B wurde die Zeitkonstante der schnellen Komponente unabhängig vom Vorpuls auf die Hälfte reduziert. Durch positivere Vorpulse wurde die Amplitude der schnellen Komponente durch 3R,4S-293B stärker reduziert als durch negativere Vorpulse. Hierbei wurde die Verschiebung des *Cross-Overs* von Veränderungen der Amplitude der schnellen Aktivierungskomponente begleitet.



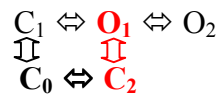
**Abbildung 23: Analyse der Linksverschiebung des „Cross-Overs“.**

Die schnelle Komponente ( $\tau_{\text{schnell}}$ ) des  $I_{Ks}$  wird unter dem Einfluss von 3S,4R-293B mit positiverer Vorpulsspannung verlangsamt (A), wobei die relative Fraktion der schnellen Komponente am Gesamtstrom nicht signifikant verändert ist (C). Durch 3R,4S-293B wird die Zeitkonstante der schnellen Komponente unabhängig vom Vorpuls auf die Hälfte reduziert (B). Mit positiveren Vorpulsen wird die Amplitude der schnellen Komponente durch 3R,4S-293B stärker reduziert als durch negativere Vorpulse (D) (n=8-18).

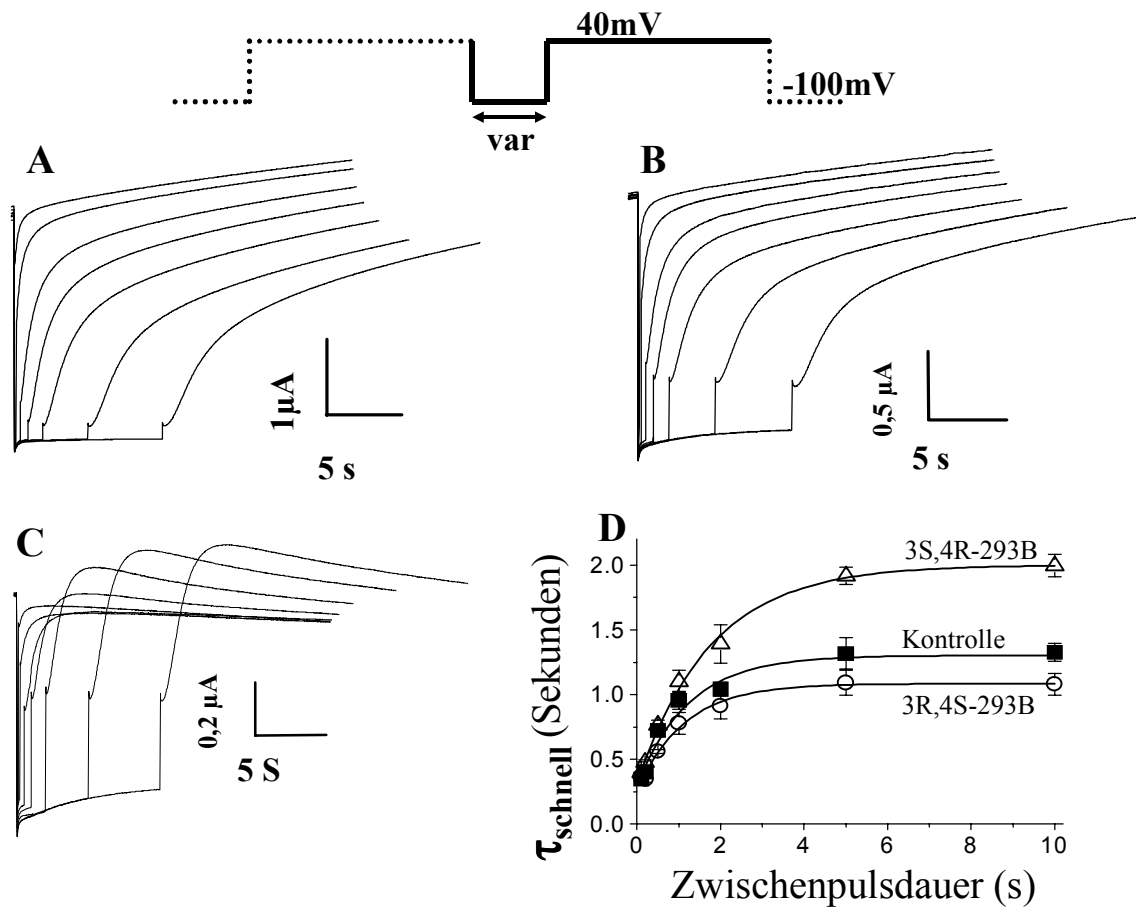
### Schnelle Reaktivierung des $I_{Ks}$ -Kanals

Der  $I_{Ks}$ -Kanal in Oozyten zeigt, wie auch der  $I_{Ks}$ -Kanal in Herzzellen, eine schnelle Reaktivierung (Tristani-Firouzi *et al.*, 1998; Tzounopoulos *et al.*, 1998; Groh *et al.*, 1997). Das heißt, dass die Kanäle, nachdem sie einmal geöffnet (aktiviert) waren, nach kurzer Zeit des Schliessens schneller zu aktivieren sind als, wenn sie eine längere Zeit sich in geschlossenen Zuständen befinden. Dieses Verhalten kann beim KCNQ1 allein nicht beobachtet werden, da eine schnelle Reaktivierung sich zeitlich mit der Inaktivierung überlagert. Die Eigenschaft der schnellen Reaktivierung kann besonders bei Tachykardien, denen der  $I_{Ks}$  aufgrund dieser Eigenschaft entgegenwirken kann, von großer Bedeutung sein

(Tzounopoulos *et al.*, 1998). Diese Ereignisse können durch den rotmarkierten Übergang in dem Gatingschema des  $I_{K_S}$  erklärt werden:



Der Übergang von  $C_1 \rightleftharpoons O_1$  weist dabei eine größere Zeitkonstante auf als der Übergang von  $C_2 \rightleftharpoons O_1$ . Die folgende Abbildung zeigt die Effekte der Enantiomere auf die schnelle Reaktivierung des  $I_{K_S}$ .



**Abbildung 24: Schnelle Reaktivierung**

Wird das Intervall zwischen zwei aktivierenden Pulsen variiert, ergibt sich eine Kurvenschar wie in A. Unter Wirkung von 3S,4R-293B ergibt sich eine Kurvenschar wie in B und bei 3R,4S-293B wie in C. Analysiert man die schnelle Aktivierungskomponente und trägt sie gegen die Zwischenpulslänge auf, so ergibt sich der Graph in D. Bei kurzen Zwischenpulsen ist die Reaktivierung schneller als bei längeren Zwischenpulsen (n=8-16).

Es wird ersichtlich, dass signifikante Unterschiede durch Blockerwirkung erst bei Zwischenpulsdauern länger als 0,5 Sekunden auftreten. Das heißt, dass bei kurzen Zwischenpulsdauern die schnelle Reaktivierung durch beide Enantiomere nicht signifikant beeinflusst wird. Erst bei längeren Zwischenpulsdauern, also unter Bedingungen, die denen

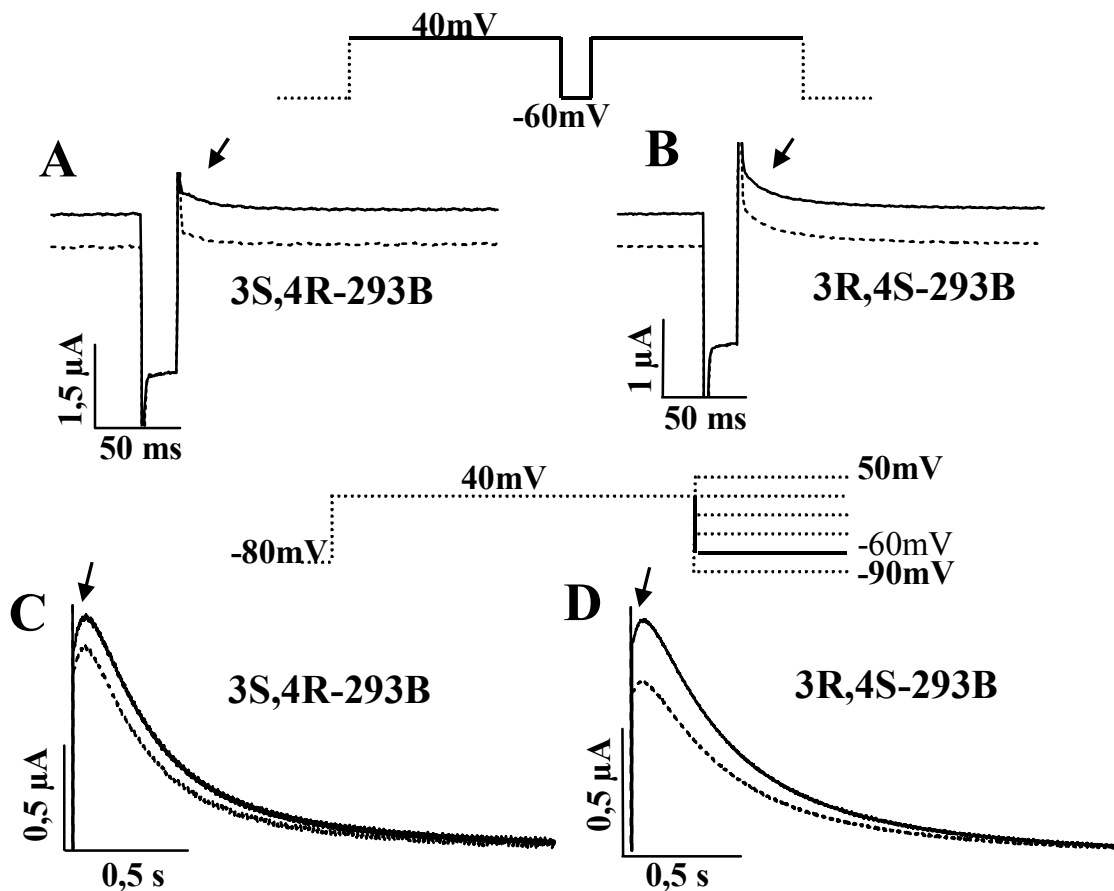
der Aktivierung nach Ruhebedingungen nahe kommen, werden signifikante Unterschiede deutlich. Demnach sollte Chromanol 293B diese wichtige kinetische Eigenschaft der schnellen Reaktivierung des kardialen  $I_{Ks}$  nicht zusätzlich verhindern.

### Inaktivierung

Die Inaktivierung vom KCNQ1 wird durch MinK-Interaktion im  $I_{Ks}$ -Kanalkomplex aufgehoben oder verdeckt (Sanguinetti *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998). Aus diesem Grund kann die Inaktivierung auch nur beim KCNQ1 und nicht beim  $I_{Ks}$  studiert werden. Da eine Inaktivierung aber im  $I_{Ks}$ -Kanal nicht ausgeschlossen werden kann, könnte sie dennoch physiologisch im Herzen wichtig sein. Demnach ist auch die Wirkung der Chromanole in diesem Kontext wichtig.

Für die Analyse der Inaktivierung bieten sich vor allem zwei Pulsprotokolle an. Das erste ist ein Doppelpulsprotokoll. Dabei werden Kanäle während des ersten Pulses über geöffnete in inaktivierte Zustände gebracht. Durch den Zwischenpuls wird die Inaktivierung aufgelöst und durch den zweiten Puls können die aktivierten Kanäle dann erneut ohne zusätzliche aktivierte Zustände in die Inaktivierung übergehen (Tristani-Firouzi *et al.*, 1998). Dieses relativ aufwendige Verfahren ist nötig, da die Inaktivierung des KCNQ1 eine verzögerte Inaktivierung ist. Es ist anzunehmen, dass mehrere aktivierte Zwischenzustände durchlaufen werden müssen, um den oder die inaktivierten Zustände zu erreichen. Der die Inaktivierung beschreibende Übergang ist:  $C_1 \Leftrightarrow C_2 \Leftrightarrow O_1 \Leftrightarrow O_2 \Leftrightarrow I$ . Dieser Übergang wird durch das erste Pulsprotokoll in Richtung  $O_2 \Rightarrow I$  nachvollzogen und somit kann ein Chromanoleffekt auf das Einsetzen der Inaktivierung (*onset of inactivation*) überprüft werden. Das zweite Pulsprotokoll zeigt die Erholung von der Inaktivierung (*recovery from inactivation*) nach:  $C_2 \Leftarrow O_1 \Leftarrow O_2 \Leftarrow I$ . Dies beinhaltet über die eigentliche *Erholung von der Inaktivierung* hinaus weiterhin den Übergang von einem offenen ( $O_2$ ) in einen weiteren offenen Zustand ( $O_1$ ) und die anschließende Deaktivierung der Kanäle.

Das zweite Protokoll besteht aus einfachen Rechteckpulsen mit ansteigenden Spannungen. Aus der Analyse der Schwanzströme (Ströme, die nach Beendigung des Rechteckpulses zu beobachten sind) gewinnt man Informationen über die *Erholung von der Inaktivierung* und die Deaktivierung (Pusch *et al.*, 1998; Tristani-Firouzi *et al.*, 1998).



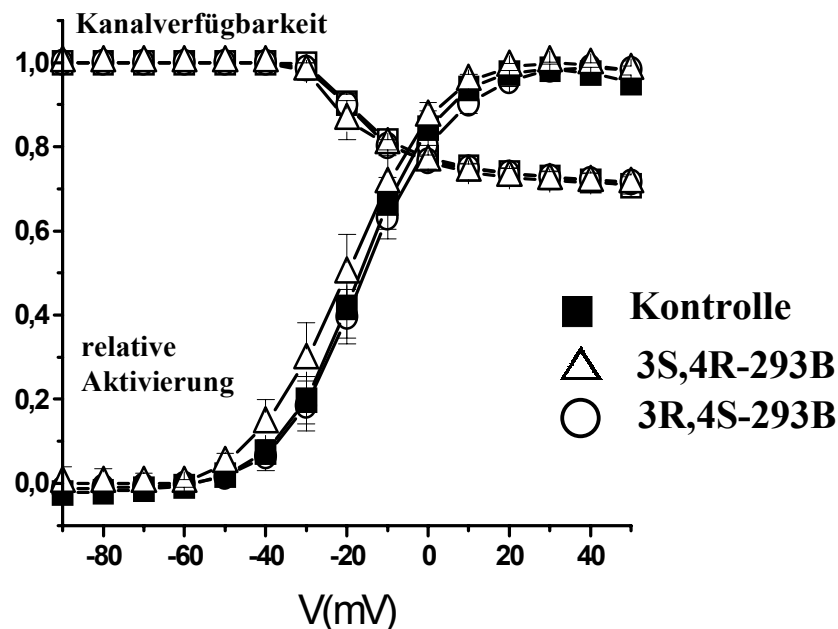
### Abbildung 25: Inaktivierung und Deaktivierung von KCNQ1

Durch ein Doppelpulsprotokoll wird die Inaktivierung sichtbar (Pfeil). Durch die Chromanol-293B-Enantiomere wird die Inaktivierungskinetik nicht beeinflusst (A, B). Die Erholung von der Inaktivierung (Pfeile) und die Deaktivierung nach einem depolarisierenden Puls sind in C und D dargestellt. Die Auflösung der Deaktivierung (Zeitverlauf) wird durch die Chromanolenantiomere nicht beeinflusst. In der Deaktivierung treten leichte Veränderungen auf. Die gestrichelten Stromspuren stellen die Ströme unter partieller Blockade dar.

Es stellte sich die Frage, ob vielleicht eine größere Fraktion von Kanälen unter der Wirkung der Chromanole in den inaktivierten Zustand übergehen, ob also eine Stabilisierung der inaktivierten Kanalkonformation durch die Chromanole herbeigeführt wird. Dazu kann man Exponentialkurven an die Stromkurven der Deaktivierung und der Erholung von der Inaktivierung anlegen und erhält daraus neben den Zeitkonstanten  $\tau$  die Amplituden der Kurven. Aus dem relativen Anteil der Amplituden dieser Kurven lässt sich die Kanalverfügbarkeit errechnen (Pusch *et al.*, 1998). Die Kanalverfügbarkeit ist demnach ein Maß für die aktivierten leitenden Kanäle im Verhältnis zu allen aktivierten Kanälen (leitende



sowie nicht leitende inaktivierte Kanäle). Die Amplitude der Deaktivierungskurve gibt darüber hinaus die relative Aktivierung an.



**Abbildung 26: Relative Aktivierung und relative Kanalverfügbarkeit von KCNQ1**  
Die relative Aktivierung und die Kanalverfügbarkeit sind dargestellt (n=8-16).

Die relative Aktivierung und die Kanalverfügbarkeit werden durch die Chromanole nicht beeinflusst. Die aus diesen Messungen ermittelten Werte für die Inaktivierung sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst. Die Werte für die Deaktivierung werden auf [Seite 66](#) zusammen mit den  $I_{Ks}$ -Werten gezeigt. Aus dieser Analyse der Schwanzströme wurde keine Spannungsabhängigkeit des Blocks ersichtlich.

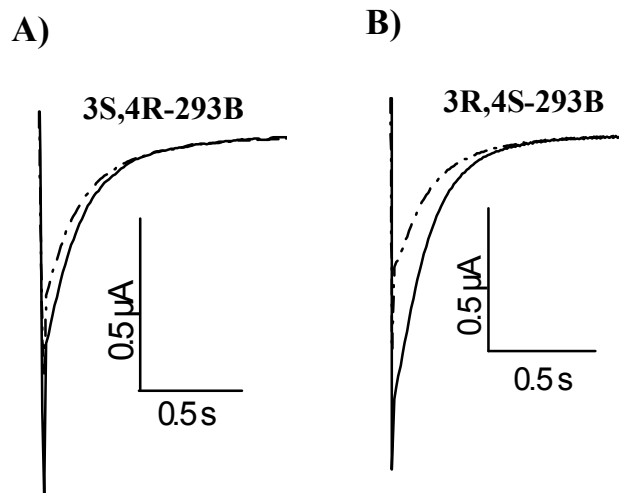
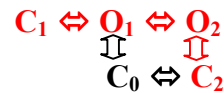
### Inaktivierungskinetiken

|            | Einsetzen der Inaktivierung | Erholung von der Inaktivierung |
|------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Kontrolle  | 15ms +/-3 ms<br>(n=5)       | 29ms +/-3 ms<br>(n=5)          |
| 3S,4R-293B | 13ms +/-0.8 ms<br>(n=5)     | 29ms +/-5 ms<br>(n=5)          |
| 3R,4S-293B | 15ms +/-3 ms<br>(n=5)       | 27ms +/-2 ms<br>(n=5)          |

Signifikante Veränderungen sind durch \* ( $p = 0,05$ ) angezeigt, Fehlerangaben sind SEM und die Anzahl der zugrunde liegenden Experimente ist in Klammern angegeben.

### Deaktivierung des I<sub>Ks</sub>-Kanals

Das Schließen des I<sub>Ks</sub> nach einem depolarisierenden Puls wurde analysiert, da es im Kontext von Tachykardien von Bedeutung sein könnte. Die Deaktivierung des Kanals kann durch Anlegen einer Exponentialfunktion mit zwei Exponenten beschrieben werden (Tristani-Firouzi *et al.*, 1998; Tzounopoulos *et al.*, 1998; Pusch *et al.*, 1998). In dem kinetischen Kanalschema entspricht die Deaktivierung des I<sub>Ks</sub>-Kanals:



**Abbildung 27: Deaktivierung von I<sub>Ks</sub>**

Unter Einwirkung der Enantiomere von Chomanol 293B (gestrichelte Stromspur) werden die schnellen Deaktivierungskomponenten durch beide Enantiomere leicht beschleunigt.

Die Werte aus zwei-Exponenten-Fits der Deaktivierungen des I<sub>Ks</sub>-Kanals sowie des KCNQ1-Kanals sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

### Deaktivierungskinetiken

|            | I <sub>Ks</sub>           |                        | KCNQ1                     |                           |
|------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
|            | τ <sub>fast</sub>         | τ <sub>slow</sub>      | τ <sub>fast</sub>         | τ <sub>slow</sub>         |
| Kontrolle  | 170ms +/-0.6 ms<br>(n=18) | 3.2s +/-0.5 s<br>(n=8) | 222ms +/-2 ms<br>(n=19)   | 1.7s +/-0.4 s<br>(n=19)   |
| 3S,4R-293B | 150ms +/-4 ms<br>(n=14)   | 3.7s +/-1.6 s<br>(n=9) | 210ms +/-1 ms<br>(n=14)   | 1.643s +/-0.7 s<br>(n=14) |
| 3R,4S-293B | 120ms +/-3 ms *<br>(n=14) | 5.5s +/-2.6 s<br>(n=9) | 193ms +/-1 ms *<br>(n=13) | 1.434s +/-0.7 s<br>(n=13) |

Signifikante Veränderungen sind durch \* (p = 0,05) angezeigt, Fehlerangaben sind SEM, und die Anzahl der zugrunde liegenden Experimente ist in Klammern angegeben.

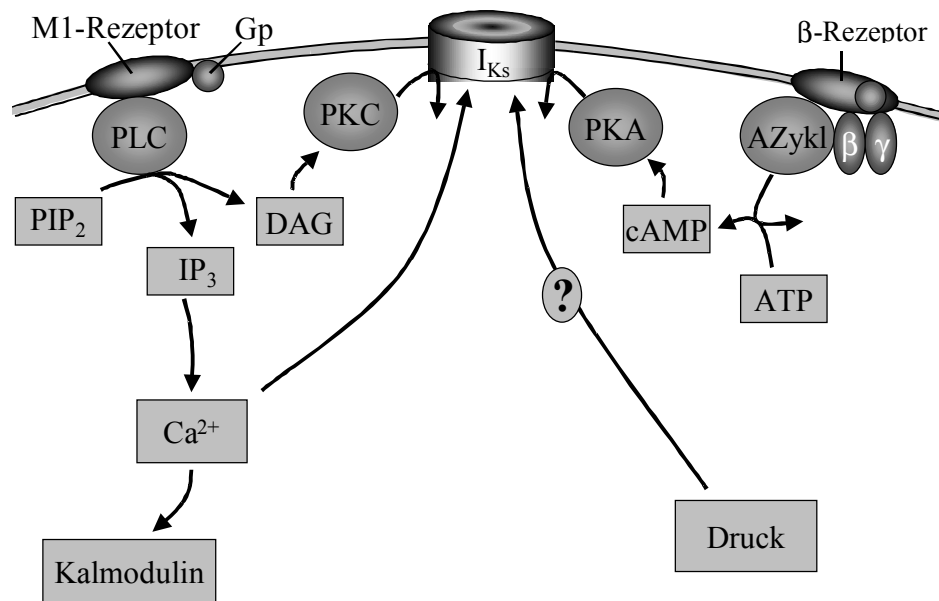
3R,4S-293B beschleunigt die schnelle Deaktivierung signifikant. Diese Effekte sind jedoch so klein, dass sie durch eine effizientere Spannungsklemme bei kleineren, d.h. partiell geblockten Strömen erklärt werden können.

Nach Abschluss der Untersuchungen über den Einfluss der Chromanolenantiomere auf die Kanalzustände wurde im Folgenden die Modulation des durch die Chromanole hervorgerufenen Blocks durch PKA-vermittelte Phosphorylierung und pharmakologische Kanalöffnung untersucht.

### **Einfluss von Proteinkinase A auf $I_{Ks}$ und die 293B-Interaktion**

$I_{Ks}$ -Kanäle werden durch zahlreiche *second messenger* reguliert. Aktivierung durch Proteinkinase A hat einen ähnlichen Effekt (Blumenthal & Kaczmarek, 1992). Aktivierung der PKA und eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration finden z.B. im Herzen unter dem Einfluss des sympathischen Nervensystems ( $\beta$ -adrenerge Stimulation) statt, was unter diesen Bedingungen zur Erhöhung der  $I_{Ks}$ -Amplitude führt.  $\beta$ -adrenerge Stimulation bewirkt die Aktivierung der Adenylatzyklase (AZykl), welche ATP zu cAMP umwandelt und für die Stimulation der PKA (Proteinkinase A)-katalytischen Untereinheit sorgt.

KCNQ1 kann darüber hinaus auch durch den  $M_1$ -Rezeptor moduliert werden. Deshalb werden KCNQ1- und  $I_{Ks}$ -Ströme auch als M-Strom-ähnlich bezeichnet (Selyanko *et al.*, 1999). Stimulation des  $M_1$ -Rezeptors durch Azetylcholin aktiviert die PLC (Phospholipase C), welche  $PIP_2$  (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) zu DAG (Diazylglyzerin) und  $IP_3$  (Inositol-1,4,5-Trisphosphat) spaltet. DAG stimuliert die Proteinkinase C, die den  $I_{Ks}$ -Kanal an der  $\beta$ -UE MinK der Ratte und der Maus am Serin 103 phosphoryliert und damit den  $I_{Ks}$  herunterreguliert (Busch *et al.*, 1992a, Busch *et al.*, 1992b).  $IP_3$  kann ebenso wie Kalmodulin den intrazellulären Kalziumspiegel modulieren, der wiederum die  $I_{Ks}$ -Amplitude beeinflusst: Bei Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration steigt die Stromamplitude an (Busch & Lang, 1993). Wird der intrazelluläre Druck einer gepatchten Zelle über die Pipette variiert so beeinflusst dies zusätzlich den  $I_{Ks}$ . Der Grund hierfür ist jedoch noch nicht verstanden.



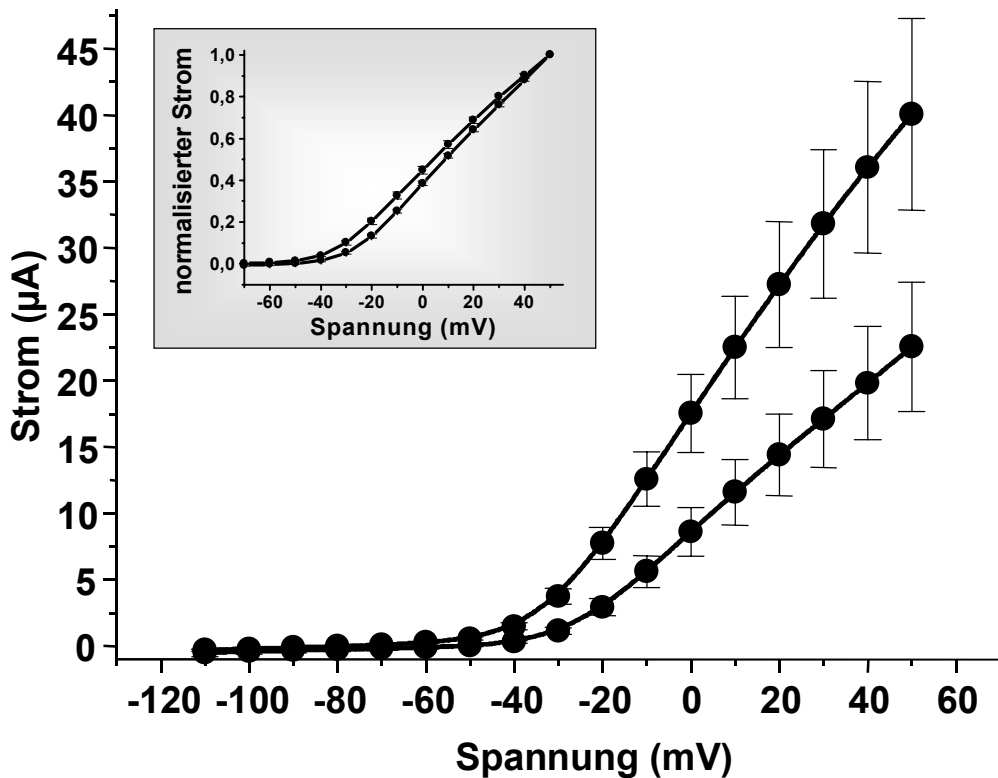
### Abbildung 28: Regulation des $I_{Ks}$

Der  $I_{Ks}$  wird durch Stimulation von muskarinischen und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren, durch intrazelluläres Kalzium und Druck reguliert.

Die PKA-Effekte finden *in vivo* unter psychischen und körperlichen Belastungen als Stressreaktionen statt. Sie sind wahrscheinlich die bedeutendsten regulativen Einflüsse auf den  $I_{Ks}$ -Kanal und sollten deshalb genauer untersucht werden. Im Anschluss daran sollten die Auswirkungen der PKA-abhängigen Phosphorylierung des  $I_{Ks}$ -Kanals auf seine Pharmakologie evaluiert werden.

### Der Einfluss der PKA-abhängigen Phosphorylierung des $I_{Ks}$ -Kanals auf die Kanaleigenschaften

Um die PKA zu aktivieren, wurde der intrazelluläre cAMP-Spiegel durch Hemmung der cAMP-Abbauprozesse erhöht. Dazu wurden  $hI_{Ks}$ -exprimierende Oozyten in Theophyllin inkubiert, welches die cAMP-Phosphodiesterase hemmt. Als Folge davon wird die katalytische UE von den regulatorischen UE abgespalten und die Kinase aktiviert.



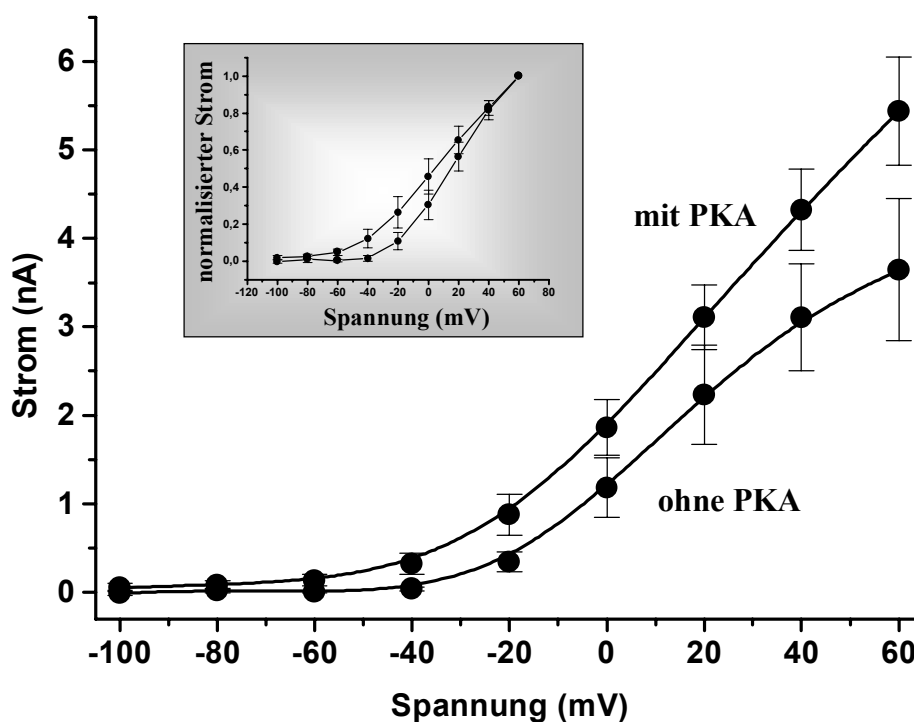
**Abbildung 29:  $I_{K_S}$ -Strom-Spannungskurve mit und ohne erhöhten cAMP-Spiegel in Oozyten**

Die  $I_{K_S}$ -Amplitude wurde am Ende eines 3-Sekunden-Pulses auf 40 mV (Standardprotokoll, siehe Abbildung 15) gemessen. Die Strom-Spannungskurve ist unter dem Einfluss von Theophyllin um etwa 15 mV nach links verschoben (siehe auch die normalisierte Strom-Spannungskurve im Kasten) (n=9-10).

Die durch Aktivierung der PKA hervorgerufene Linksverschiebung der  $I_{K_S}$ -Aktivierung bedeutet, dass jetzt mehr Kanäle bereits bei niedrigeren Spannungen öffnen. Zusätzlich wird die Stromamplitude durch PKA erhöht. Leider hat man bei diesem Ansatz keine genaue Kenntnis der Konzentration der regulatorischen UE von PKA in den Oozyten. Da bei diesen Versuchen die PKA-Aktivierung indirekt erfolgte, sollten Versuche mit definierter Konzentration der PKA-katalytischen UE in Säugerzellen die in Oozyten gefundenen Resultate bestätigen.

### Versuche mit PKA in CHO-KCNQ1/MINK-Zellen

Die cAMP-Abhängigkeit der PKA wird durch die katalytische Untereinheit vermittelt. Die Phosphorylierung kann allerdings auch ohne die regulatorische Untereinheit von PKA erfolgen, und die katalytische Untereinheit ist dann cAMP-unabhängig. Die *Patch-Clamp*-Methode bietet den Vorteil, dass der Experimentator das intrazelluläre Milieu durch die Zusammensetzung der Pipettenlösung bestimmen kann. Dieser Vorteil wurde ausgenutzt und die katalytische Untereinheit von PKA (100 U/ml) wurde der Patchpipettenlösung zugesetzt, um die Effekte der PKA-abhängigen Phosphorylierung zu messen. Somit konnte mit PKA-freier und PKA-haltiger (100 U/ml) Pipettenlösung gearbeitet werden.

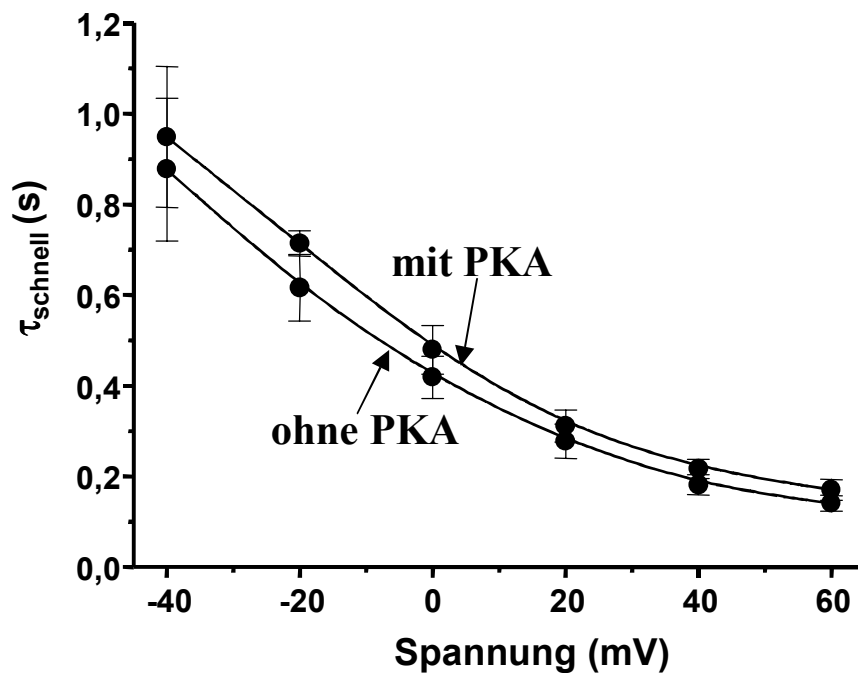


**Abbildung 30:  $I_{K_S}$ -Strom-Spannungskurve mit und ohne PKA in CHO-KCNQ1/MINK-Zellen**

Die  $I_{K_S}$ -Amplitude wurde am Ende eines 1-Sekunden-Pulses variabler Spannung bestimmt. Die Strom-Spannungskurve ist unter dem Einfluss von PKA um etwa 20 mV nach links verschoben (siehe auch die normalisierte Strom-Spannungskurve im Kasten) (n=8-11).

Auch in den CHO-KCNQ1/MINK-Zellen war die Strom-Spannungskurve nach links verschoben, d.h. auch hier waren mehr Kanäle bereits bei niedrigeren Spannungen geöffnet. Zusätzlich wurde wiederum die Stromamplitude erhöht. Die Effekte waren in *Xenopus*-Oozyten und CHO-KCNQ1/MINK-(CHO)-Zellen identisch.

Da Chromanol 293B durch einen „*State-dependent*“-Block charakterisiert ist, wurde der Einfluss von PKA auf die Aktivierungskinetik untersucht:



**Abbildung 31: Einfluss von PKA auf die Aktivierung in CHO-KCNQ1/MINK-Zellen**

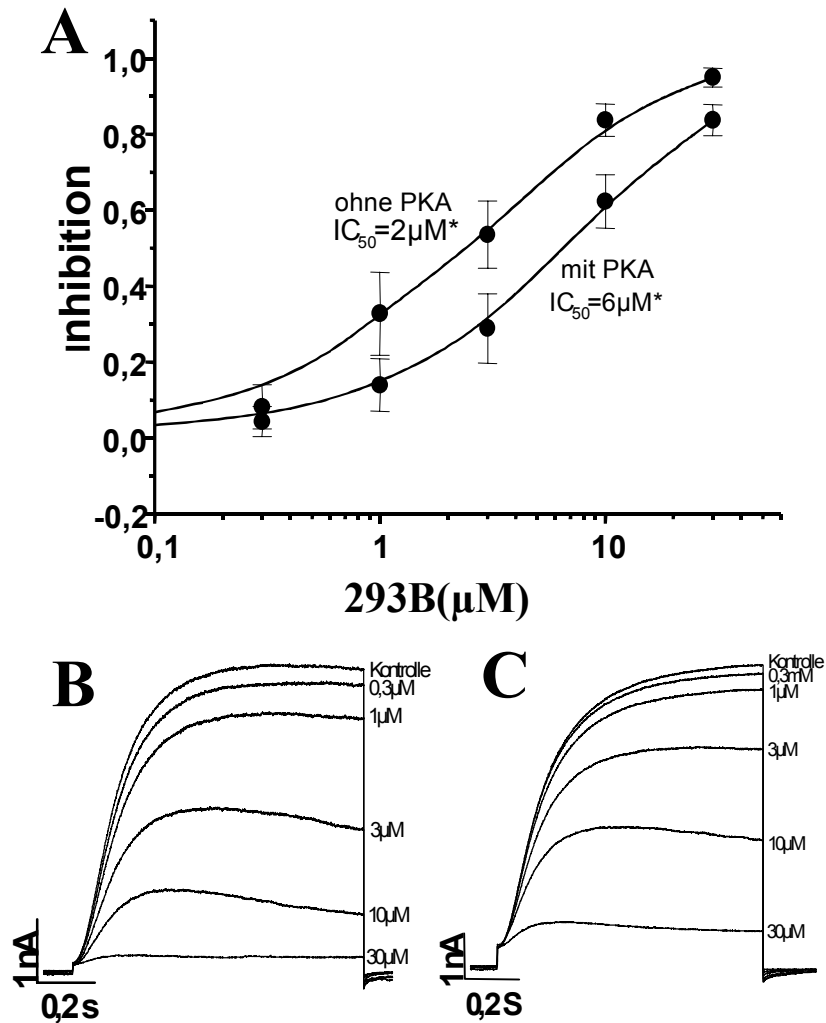
An die schnelle Komponente der Aktivierung wurde eine ein-exponentielle Kurve angelegt, und die entsprechenden Zeitkonstanten wurden gegen die Spannungen der Pulse aufgetragen (n=8-10).

Die schnelle Aktivierungskomponente wurde unter der Wirkung von PKA leicht beschleunigt. Dies zeigte sich im gepaarten t-Test: Vergleich man die 28 Einzelwerte der gleichen Spannungen im gepaarten t-Test miteinander, so erhielt man mit einem Wert  $p=0,0004$  eine hohe Signifikanz.

Die langsame Aktivierungskomponente, die in Oozyten immer zu finden ist, war in CHO-KCNQ1/MINK-Zellen unter den gewählten Bedingungen nur gelegentlich aufzulösen und konnte deshalb nicht ausgewertet werden.

### **Einfluss von PKA-Aktivierung auf den Block durch Chromanol 293B**

Die Veränderungen unter PKA-Einwirkung könnten sich auch auf die Pharmakologie auswirken. Deshalb wurden in CHO-KCNQ1/MINK-Zellen mit und ohne PKA in der Pipettenlösung Dosis-Wirkungsbeziehungen untersucht. Diese Experimente wurden mit dem Razemat von 293B durchgeführt:



### Abbildung 32: PKA-Abhängigkeit der 293B-Wirkung in CHO-KCNQ1/MinK-Zellen

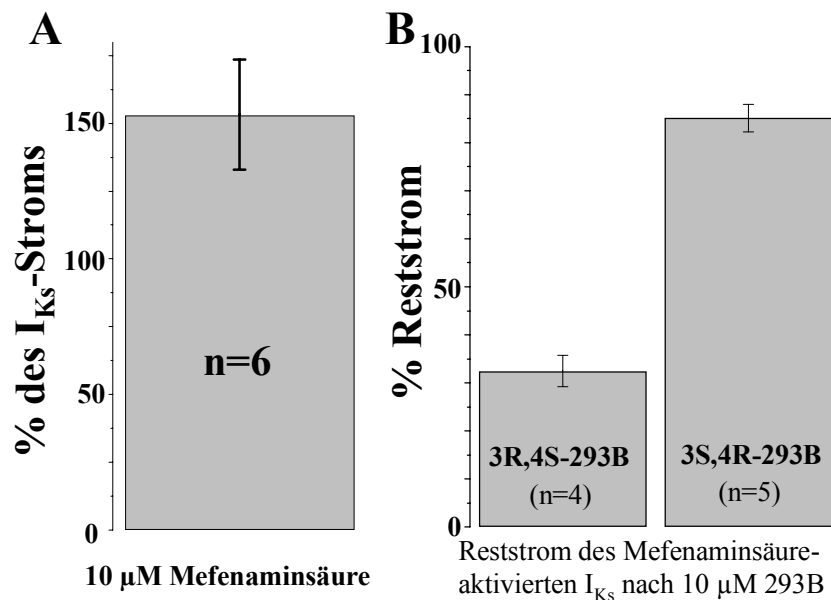
Unter PKA-Einfluss nimmt die Wirkung von Chromanol 293B ab (A). Die  $I_{K_S}$ -Amplitude wurde am Ende eines 1-Sekunden-Pulses auf 40 mV bestimmt. Die Stromkurven teilweise blockierter Kanäle ohne PKA (B) und unter Einfluss von PKA (C) sind dargestellt (n=5-6).

Die Dosis-Wirkungskurve von Chromanol 293B wurde durch PKA um 4  $\mu\text{M}$  nach rechts verschoben. Dies Ergebnis legt nahe, dass die Aktivierung durch PKA Kanalzustände von niedriger Affinität stabilisiert. Dadurch, dass beide Enantiomere eine erhöhte Aktivität auf geschlossene Kanäle haben und PKA durch Phosphorylierung des Kanals offene Zustände stabilisiert, wird diese Erklärung gestützt. Um diese Hypothese der erhöhten Aktivität auf geschlossene Kanäle weiterhin zu unterstützen wurden die Kanäle im folgenden pharmakologisch stimuliert.



## Einfluss von Kanalöffnung durch Mefenaminsäure auf die blockierende Wirkung der Chromanole

Mefenaminsäure ist ein Chloridkanalblocker, der interessanterweise auf den  $I_{Ks}$ -Kanal als Kanalöffner wirkt (Busch *et al.*, 1997). Es stellte sich die Frage, ob derart pharmakologisch geöffnete Kanäle durch die Chromanole besser oder schlechter zu blockieren sind. Allerdings können diese Ergebnisse nur unter der Annahme genutzt werden, dass Mefenaminsäure und die Chromanole nicht um dieselbe Bindestelle konkurrieren. Da Mefenaminsäure als geladene Substanz nicht ohne Weiteres durch die Membran treten kann, sollte es von außen wirken. Von Chromanol 293B ist bekannt, dass es nicht von außen wirkt (Loussouarn *et al.*, 1997), so dass die beiden Substanzen nicht um dieselbe Bindestelle konkurrieren sollten.



### Abbildung 33: Block des $I_{Ks}$ durch 10 µM Chromanol 293B nach Mefenaminsäureaktivierung in Oozyten

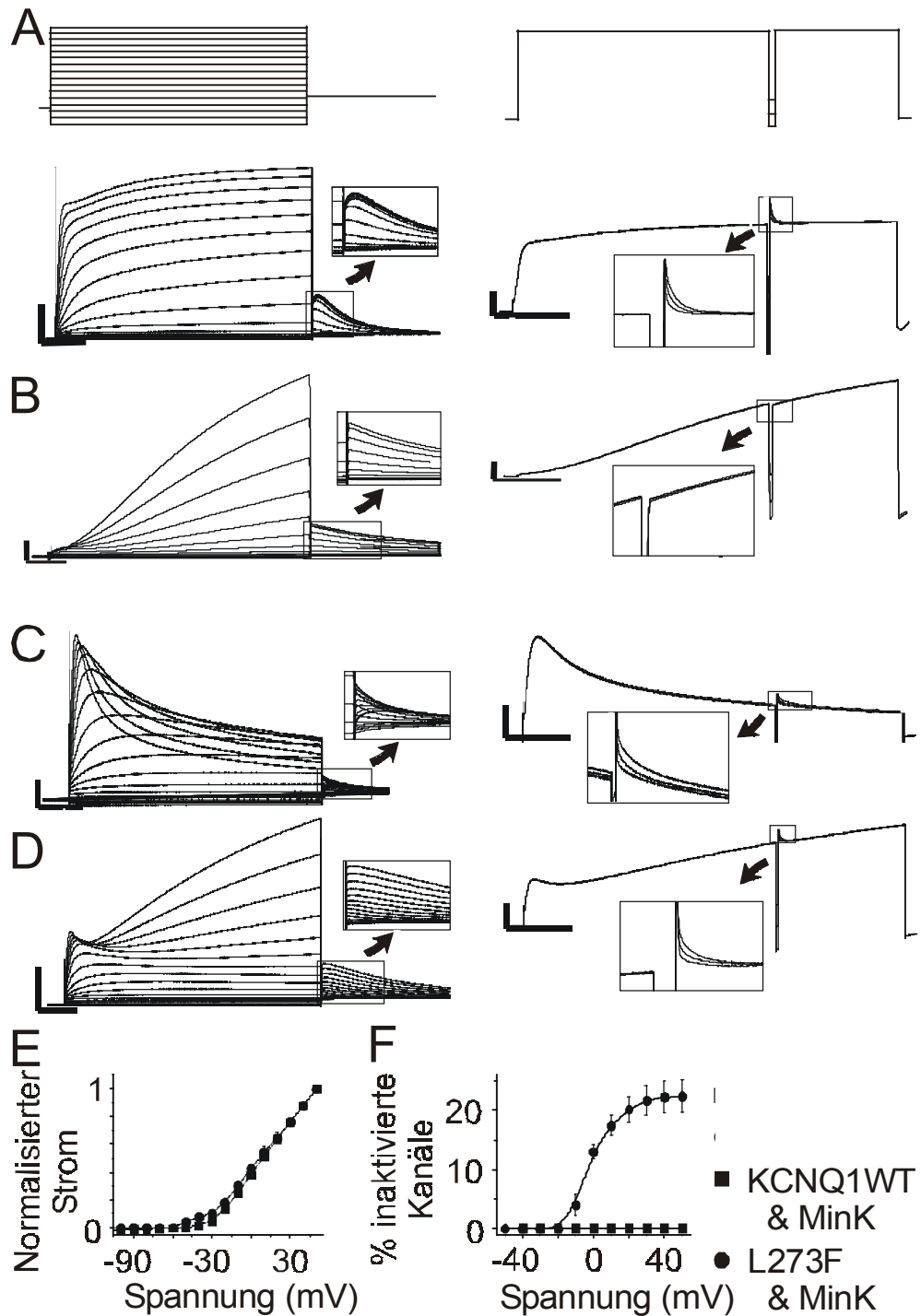
Der  $I_{Ks}$  wurde am Ende eines 3-Sekunden-Pulses auf 40 mV (Standardprotokoll wie in Abbildung 15) gemessen, nachdem er durch 10 µM Mefenaminsäure um 50% aktiviert war (A). Dieser aktivierte  $I_{Ks}$  wurde durch 10 µM der Chromanol 293B-Enantiomere geblockt (B) (n=4-6).

Interessanterweise war der  $I_{Ks}$  nach Mefenaminsäureaktivierung weniger sensitiv auf 3S,4R-293B, während die 3R,4S-293B-Sensitivität nicht signifikant verändert war. Diese Experimente unterstreichen die Aktivität von 3S,4R-293B auf geschlossene Kanäle.

## **Mutationen im KCNQ1 verursachen Long-QT1-Syndrom**

Der Begriff Long-QT-Syndrom beschreibt ein klinisches Bild, das bei den Betroffenen von Bradykardien über Synkopen und Krampfanfällen bis zu schweren Herzrhythmusstörungen und plötzlichem Herztod reicht. Oft werden die Symptome durch Stress, Sport oder allgemein durch erhöhten Sympathikustonus verstärkt oder ausgelöst (Russel & MacDonald, 1996). Dabei können charakteristischerweise *torsades de pointes* auftreten, polymorphe ventrikuläre Tachykardien, bei denen die Kammerkomplexe spindelförmig um die isoelektrische Grundlinie schwingen und die auffallend mit verlängerten TU-Wellen einhergehen (Surawicz, 1989).

Long-QT-Patienten mit defizienten  $I_{Ks}$ -Kanälen weisen ein LQT1- oder LQT5-Syndrom auf. Die Defekte der  $I_{Ks}$ -Kanäle gehen meist auf nicht-funktionelle Kanäle zurück. Einige mutierte Kanäle weisen aber eine Restleitfähigkeit auf (siehe Einleitung). Die KCNQ1-Mutante L273F zeigt bei homomerer Expression in *Xenopus*-Oozyten eine sehr starke Inaktivierung (Wang *et al.*, 1996; Shalaby *et al.*, 1997). Die Autoren wiesen jedoch keine Inaktivierung nach, wenn die mutierte  $\alpha$ -UE mit MinK in Oozyten koexprimiert wurde. Um die Bedeutung der Inaktivierung in dem Kanal L273F/MinK zu testen, wurde der Kanal ebenfalls in Oozyten exprimiert, und Standardmessprotokolle wurden benutzt, um Inaktivierung nachzuweisen (Smith, P. L. *et al.*, 1996; Schönherr, R., 1996; Tristani-Firouzi, M. & Sanguinetti, M. C., 1998; Pusch *et al.*, 1998). Die gleichen Protokolle wurden ebenfalls am KCNQ1/MinK als Vergleich angewendet.



**Abbildung 34: Analyse von KCNQ1-L273F im Vergleich mit dem WT**

Im KCNQ1-WT ist in den Schwanzströmen nach Rechteckpulsen die Erholung von der Inaktivierung (*recovery*) erkennbar. Im Doppelpulsprotokoll mit Interpuls auf -120, -90 und -60 mV wird das Einsetzen der Inaktivierung im KCNQ1 (*onset*) nachweisbar (A). Die gleichen Protokolle wurden auf KCNQ1-WT in Assoziation mit MinK (B) und auf den mutierten Kanal (L273F) und mit MinK (L273F/MinK, D) angewendet. Aus den Stromamplituden nach 3 Sekunden wurden die Strom-Spannungskurven (E) und aus den Schwanzströmen die Fraktionen der inaktivierten Kanäle der MinK-assoziierten Kanäle errechnet (F) (n=8-12) (zur Methode siehe Abbildung 13). Horizontale Balken an den Stromspuren entsprechen 0,5 Sekunden und vertikale Balken 2  $\mu$ A.

Die Mutante L273F wies, wie beschrieben, eine verstärkte Inaktivierung im Vergleich mit KCNQ1-WT auf (340A, C) (Shalaby *et al.*, 1997). In Assoziation mit MinK war im KCNQ1-WT/MinK-Kanal weder die Erholung (*Recovery*) noch das Einsetzen der Inaktivierung (*Onset*) messbar (34 B). Im L273F/MinK-Kanal waren dagegen sowohl die *Recovery* als auch der *Onset* der Inaktivierung nachweisbar. Offensichtlich inaktivierte eine Fraktion der Kanäle, obwohl MinK koexprimiert wurde. Inaktivierte Kanäle sind nicht leitend. Dementsprechend sollten auch inaktivierte L273F/MinK-Kanäle nicht konduktiv sein und damit den  $I_{Ks}$  in den Kardiomyozyten der LQT1-Patienten reduzieren.

Die Zeitkonstanten der Inaktivierung wurden durch Exponentialfits analysiert (Formel siehe Material und Methoden).

|                   | $\tau_{\text{onset}}$          | $\tau_{\text{recovery}}$ | Inaktivierte Kanäle bei 50 mV |
|-------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| WT-KCNQ1          | 15 ± 1 ms (n = 12)             | 45 ± 3 ms (n = 13)       | 31 ± 1% (n = 12)              |
| KCNQ1(L273F)      | 60 ± 6 ms* (n = 6)             | 98 ± 5 ms* (n = 6)       | 86 ± 3 %* (n = 6)             |
| WT-KCNQ1/MinK     | -                              | -                        | 0                             |
| KCNQ1(L273F)/MinK | 26 ± 2 ms <sup>§</sup> (n = 8) | 111 ± 3 ms (n = 8)       | 24 ± 5% <sup>§</sup> (n = 12) |

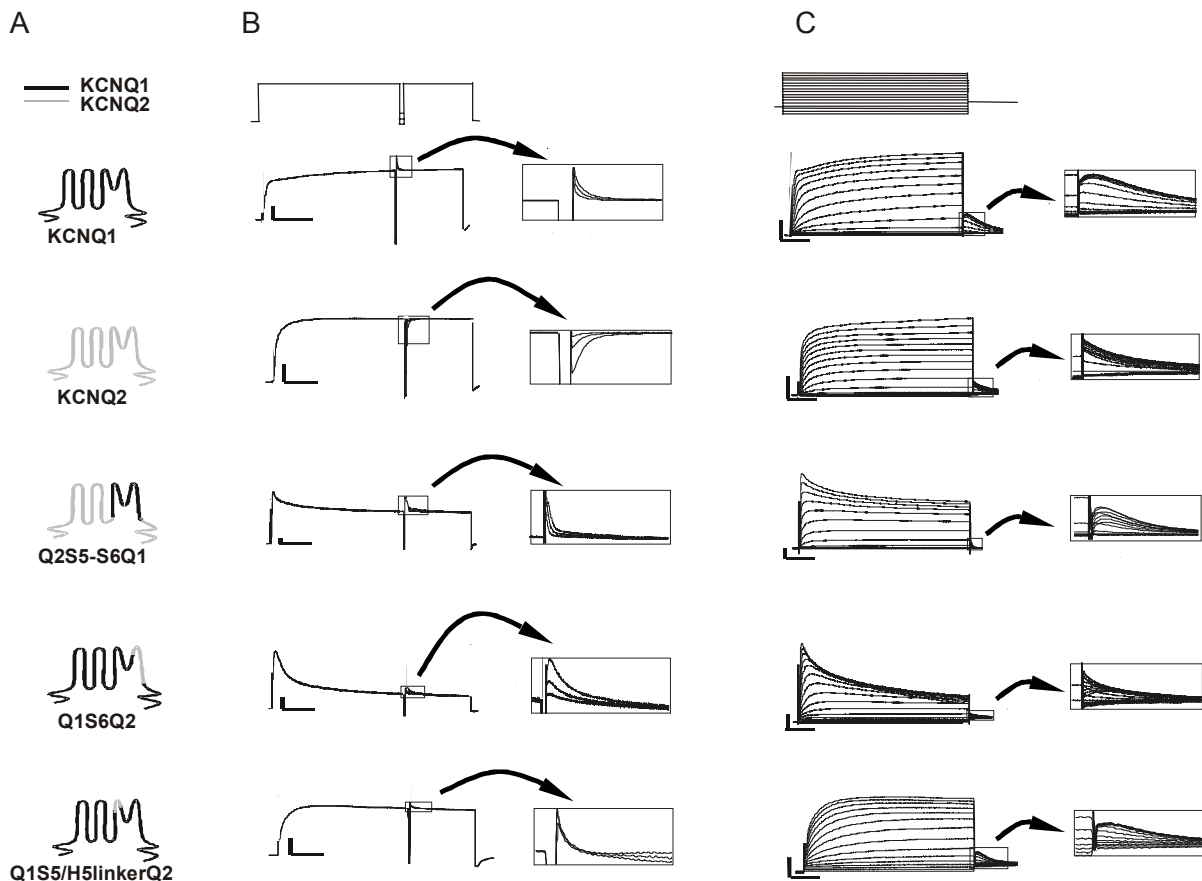
Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der Versuche an. \* deutet auf signifikante Unterschiede zwischen WT-KCNQ1 und der Mutante hin. Signifikante Unterschiede zwischen L273F und L273F/MinK sind durch <sup>§</sup> angezeigt.

Die verstärkte Inaktivierung von L273F zeigte sich in der errechneten Fraktion inaktivierter Kanäle. Nach MinK-Koinjektion inaktivierten noch 24 % der L273F/MinK-Kanäle, wobei das Einsetzen der Inaktivierung im Vergleich zum homomeren L273F-Kanal signifikant beschleunigt war.

## Molekulare Basis der KCNQ1-Inaktivierung

### Mutagenesestudie

Um weitere Hinweise auf die Inaktivierung des KCNQ1-Kanals zu bekommen, wurde versucht, die Regionen, die für die Inaktivierung wichtig sind, einzugrenzen. Dazu wurden Chimären aus dem KCNQ1 und dem KCNQ2 hergestellt. Da der KCNQ2 nicht inaktiviert, wurde versucht, die Inaktivierungseigenschaften von KCNQ1 auf KCNQ2 zu übertragen.



**Abbildung 35: Chimären zwischen den Kanälen KCNQ1 und KCNQ2**

Die Konstrukte sind symbolisch links neben den Stromspuren dargestellt (A). Im Doppelpulsprotokoll (B) und mit Rechteckpulsen variabler Spannung auf  $-60$  mV (C) wurden *Onset* und *Recovery* der Konstrukte getestet.

Der KCNQ1 zeigte Inaktivierung in beiden Testprotokollen, wogegen der KCNQ2 keine Inaktivierung erkennen liess. Tauscht man den KCNQ1-Porenbereich gegen den entsprechenden Bereich im KCNQ2 aus, so erhält das KCNQ2-Konstrukt die Fähigkeit zu inaktivieren. Substitution des S5/H5 Linkers oder der Region vom H5-/S6-Linker bis zum S6-Segment brachte keine inaktivierenden Kanäle hervor. Da die Aktivierungskurven nicht deutlich verschoben waren, müssen die für die Inaktivierung erforderlichen Regionen im  $\alpha$ -helikalen Teil von H5 und im S5-Bereich liegen. Die folgende Graphik zeigt einen



Die Mutation der Aminosäure Glycin in Position 272 zu Cystein oder Threonin hob die Inaktivierung auf. Substitution des Valins 307 mit Leucin hob ebenfalls die Inaktivierung im KCNQ1 auf. Austausch der analogen Aminosäuren des Glyzins 272 oder des Valins 307 mit Cystein und Leucin verhinderten auch in den Konstrukten die Inaktivierungen. Offensichtlich sind diese beiden Stellen für die KCNQ1-Inaktivierung essentiell. Dabei wurden die Strom-Spannungskurven nie um mehr als 10 mV verschoben. Somit kann dies das Fehlen der Inaktivierung nicht erklären.

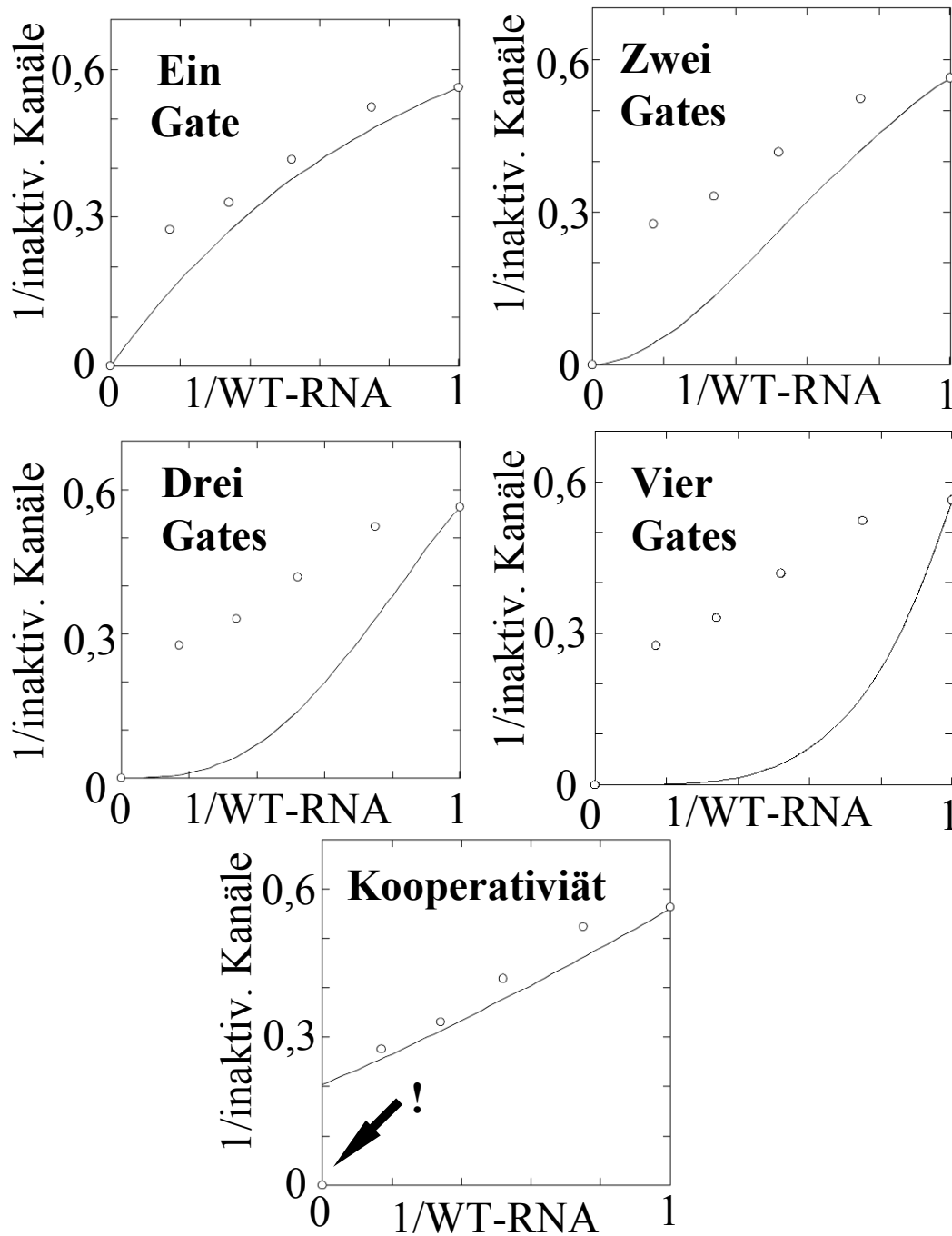
Die Aktivierung und Deaktivierung des KCNQ1-WT und der Punktmutanten wurde durch Exponentialfits analysiert (Formel im Material- und Methodenteil). Die Ergebnisse finden sich in der folgenden Tabelle.

| Konstanten                             | WT-KCNQ1              | KCNQ1(G272C)          | KCNQ1(G272T)          | KCNQ1(V307L)          |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Aktivierung, $\tau_{\text{schnell}}$   | $33 \pm 3$ ms (9)     | $103 \pm 7$ ms (9)    | $41 \pm 2$ ms (8)     | $76 \pm 4$ ms (9)     |
| Aktivierung, $\tau_{\text{langsam}}$   | $0.85 \pm 0.09$ s (9) | $0.68 \pm 0.05$ s (9) | $0.27 \pm 0.0$ s (8)  | $0.67 \pm 0.06$ s (9) |
| Deaktivierung, $\tau_{\text{schnell}}$ | $222 \pm 2$ ms (9)    | $267 \pm 18$ ms (9)   | $238 \pm 4$ ms (8)    | $420 \pm 30$ ms (9)   |
| Deaktivierung, $\tau_{\text{langsam}}$ | $1.7 \pm 0.4$ s (9)   | -                     | $[6.5 \pm 0.3$ s (8)] | -                     |

Die Zahlen in runden Klammern geben die Anzahl der Experimente an, die den Werten zugrunde liegen. Die eckige Klammer weist auf ein Ergebnis hin, das aufgrund einer sehr kleinen Amplitude an der Nachweisgrenze lag. Es ist auffällig, dass die langsame Deaktivierungskomponente  $\tau_{\text{langsam}}$  entweder sehr klein ist oder komplett wegfällt. Die Bedeutung dieser Beobachtung (s.u.) wird im Diskussionsteil weiter ausgeführt werden.

### Stöchiometrie

Da die KCNQ1-Inaktivierung sich in elektrophysiologischen Studien nicht wie klassische N-Typ- oder C-Typ-Inaktivierung verhielt, und auch die dafür wichtigen Regionen untypisch waren, sollte die *Stöchiometrie* der Inaktivierung als weiteres Charakteristikum analysiert werden. Bei N-Typ-Inaktivierung kann ein Tor (*Gate*) pro Kanal und Zeitpunkt geschlossen werden. Bei der C-Typ-Inaktivierung wird ein *Gate* aus allen vier UE durch einen kooperativen Mechanismus geschlossen. Um dieses Charakteristikum der KCNQ1-Inaktivierung zu analysieren, wurde die cRNA der Mutante G272C mit cRNA von KCNQ1-WT in unterschiedlichen Verhältnissen koinjiziert. Aus der Analyse der Schwanzströme wurde dann die Fraktion der inaktivierten Kanäle nach der Methode von Pusch *et al.* (1998) berechnet (siehe Abbildung 13). Die Ergebnisse wurden mit theoretischen Kurven verglichen (siehe Seite 40-44):



**Abbildung 38: Stöchiometrie der KCNQ1-Inaktivierung**

Die Fraktionen der inaktivierten Kanäle (1/inaktiv. Kanäle) bei 50 mV wurden gegen die Fraktionen der WT-RNA (1/WT-RNA) aufgetragen (n=5-15). Theoretische Kurven für unterschiedliche Anzahlen von *Gates* und für Kooperativität sind in die Graphen eingeführt.

Die theoretischen Kurven wurden für die folgenden Fälle errechnet:

1 *Gate*:  $O \rightleftharpoons I$ ; 2 *Gates*:  $O \rightleftharpoons O \rightleftharpoons I$ ; 3 *Gates*:  $O \rightleftharpoons O \rightleftharpoons O \rightleftharpoons I$ ; 4 *Gates*:  $O \rightleftharpoons O \rightleftharpoons O \rightleftharpoons O \rightleftharpoons I$  und für Kooperativität, wie sie bei C-Typ-Inaktivierung in Kv-Kanälen zu finden ist. Die



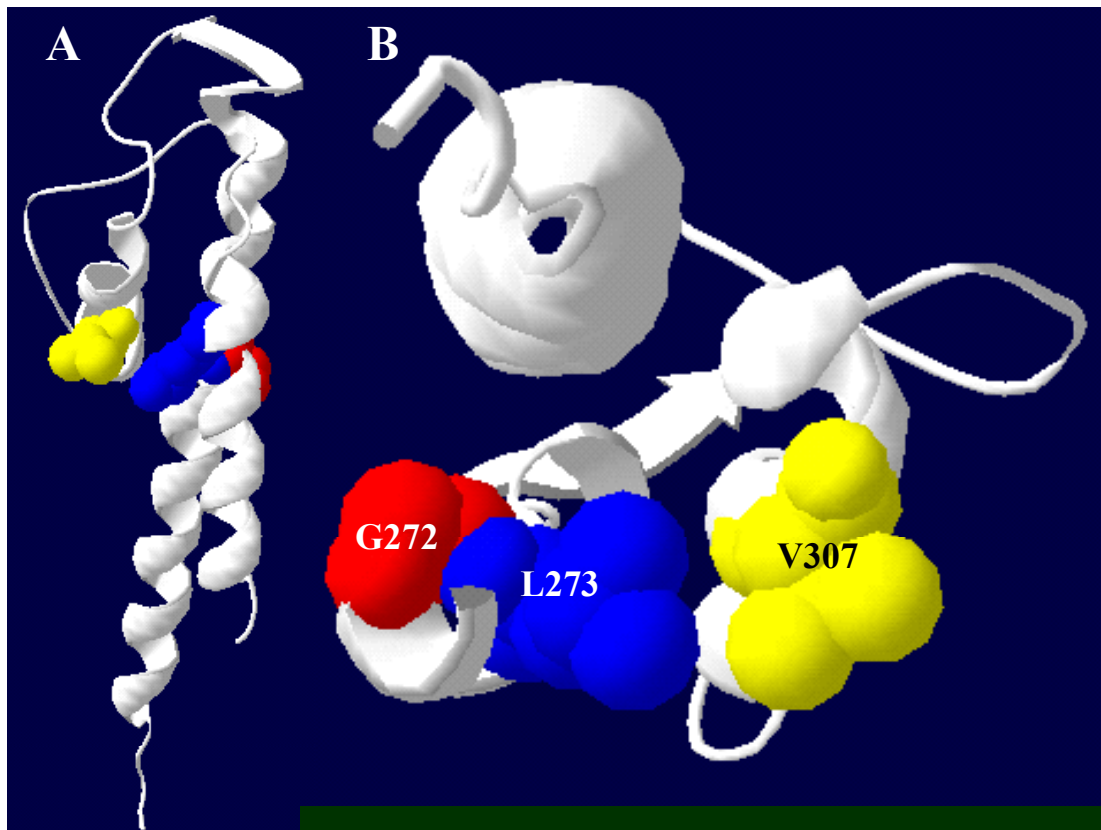
unterliegenden mathematischen Formeln sind im Material- und Methodenteil dieser Arbeit aufgeführt.

Die gemessenen Werte entsprechen am ehesten den Erwartungen bei einem *Gate*. Da die Inaktivierung der Mutante vollständig aufgehoben werden kann, kommt Kooperativität nicht in Frage. Dieses Ergebnis deutet auf einen Mechanismus hin, der sich von den klassischen Inaktivierungstypen unterscheidet.

### **Homologiemodell**

Aufgrund der gezeigten funktionellen Rolle der Aminosäuren G272, L273 und V307 bei der KCNQ1-Inaktivierung stellte sich die Frage, ob diese Aminosäuren in räumlicher Nähe zueinander liegen. Zunächst wurden die Abstände der Aminosäuren zueinander im KcsA-Modell untersucht. Der KcsA ist der einzige Kaliumkanal, dessen kristalline Struktur zur Zeit vorliegt (Doyle *et al.* (1998), Adresse: ruettgers/1bl8). Interessanterweise liegen die Aminosäuren L40 und V70, die L273 und V307 im KCNQ1-Kanal entsprechen, mit etwa 4 Å Abstand in unmittelbarer Nähe. Der KCNQ1 teilt im S5/H5/S6-Bereich 36 % Identität und 46 % Homologie zum KcsA. Mit diesen Werten ist ein sinnvoller Strukturvergleich durchaus möglich. Deshalb sollte die Porenstruktur von KCNQ1 ausgehend von der Kristallstruktur des KcsA-Kanals modelliert werden. Zu diesem Zweck wurde ein Alignment des KCNQ1- und des KcsA-Kanals via Internet an Swiss Prot geschickt. Hier wurde automatisiert ein Strukturmodell für den KCNQ1 auf der Grundlage der bekannten kristallisierten Struktur des KcsA-Kanals erstellt. Die so erstellten Modelle weisen mitunter kleinere Fehler bei der Stellung der Seitenketten auf. Dies trifft besonders für die extrazellulären Schleifen (S5/H5- und H5/S6-Verbindungsschleifen) zu. Im Bereich, in dem die betrachteten Positionen lokalisiert sind, sollten die Fehler geringer sein.

Das erstellte Modell wurde mit der Software Swiss PDB Viewer, Version 3.6b3 visualisiert. Das Programm ist als Freeware im Internet frei zugänglich und wird von Glaxo Wellcome zur Verfügung gestellt und gepflegt. Die folgende Darstellung zeigt einen Ausschnitt vom S5-S6-Bereich des modellierten Kanals.



**Abbildung 39: Darstellung der 3D-Struktur einer UE von KCNQ1**

Es ist je ein Teil (S5-S6) einer UE des KCNQ1-Kanals dargestellt. Die drei wichtigen Aminosäuren sind farblich mit ihren Atomradien dargestellt. Die UE ist in horizontaler Sichtweise (A) und von intrazellulär dargestellt (B). In B sind Teile der S5-Helix zur besseren Ansicht nicht dargestellt.

In dem Modell ist gut ersichtlich, dass im KCNQ1 V307 und L273 mit etwa 3 Å noch näher beieinander liegen als beim KcsA. Mithilfe des Homologiemodells konnte somit gezeigt werden, dass die für die KCNQ1-Inaktivierung wichtigen Aminosäuren räumlich eng beieinander liegen und möglicherweise interagieren. .

## **Diskussion**

Die nachfolgende Diskussion ist nach folgenden Aspekten gegliedert: Blockkinetik von Chromanol 293B, physiologische Relevanz der ungewöhnlichen  $I_{Ks}$ -Kinetik, pathophysiologische Relevanz von  $I_{Ks}$  und Chromanol als Klasse-III-Antiarrhythmikum. Im letzten Teil werden die verschiedenen Teilaspekte zusammenfassend diskutiert.

### **Blockkinetik von Chromanol 293B**

Der  $I_{Ks}$  trägt zum repolarisierenden Kaliumstrom während des kardialen Aktionspotentials bei.  $I_{Ks}$  wird aus der porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheit KCNQ1 und der  $\beta$ -Untereinheit MinK gebildet. Die  $\beta$ -Untereinheit MinK hat großen Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften von KCNQ1: Die Aktivierungskinetik wird verlangsamt und die  $I_{Ks}$ -Kanäle werden erst bei stärker depolarisierten Potentialen als KCNQ1-Kanäle allein aktiviert. Die Stromamplitude steigt und Yang *et al.* (1998) und Pusch (1998) zeigten, dass  $I_{Ks}$ -Kanäle eine ca. dreifach erhöhte Einzelkanalleitfähigkeit besitzen verglichen mit KCNQ1 Kanälen. Neben der Kinetik werden durch MinK-Interaktion auch die pharmakologischen Eigenschaften verändert. Allgemein versucht man kinetische Ereignisse bei spannungsabhängigen Kanälen durch Schemata zu beschreiben. Für einen Kanal, der die drei Zustände geschlossen oder deaktiviert (C, *closed*), geöffnet (O, *open*, aktiviert) und inaktiviert (I, *inactivated*) annehmen kann, gilt in der Regel folgendes *Gating*-Modell:



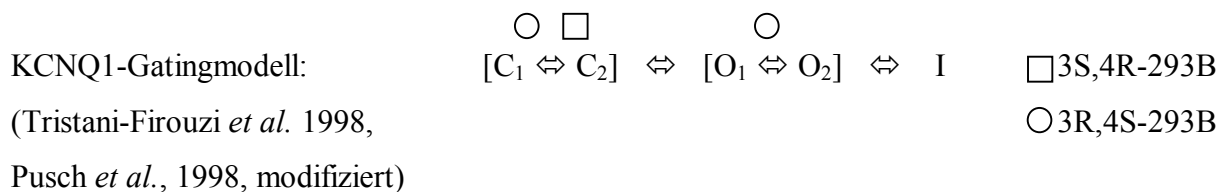
Beim KCNQ1-Kanal deuten die zwei Komponenten der Deaktivierung sowie das verzögerte Einsetzen der Inaktivierung auf mindestens zwei aktivierte Zustände hin, in welchen die Kanäle vorliegen können. Das verzögerte Einsetzen der Aktivierung nach hyperpolarisierenden Vorpulsen deutet gemäß der Cole-und-Moore-Vorhersage (1960) auf mehrere geschlossene Zustände hin. Cole und More sagten vorher, dass bei einer verzögerten Aktivierung auf einen depolarisierenden Spannungspuls hin mehrere geschlossene Zustände durchlaufen werden. Tristani-Firouzi *et al.* (1998) und Pusch *et al.* (1998) stellten basierend

auf diesen Daten und Überlegungen Gating-Schemata für den KCNQ1 auf. Diese beinhalten zwei geschlossene Zustände, zwei offene Zustände und einen inaktivierten Zustand:



Wird der KCNQ1 mit MinK in *Xenopus-laevis*-Oozyten koexprimiert, so lässt sich bei den Stromspuren der KCNQ1/MinK-Kanal keine Inaktivierung nachweisen. Die  $\beta$ -Untereinheit MinK kann demnach die Inaktivierung aufheben oder verdecken (Sanguinetti et al, 1997). Ein Modell vom KCNQ1/MinK-Kanal beinhaltet demnach wahrscheinlich keinen inaktivierten Zustand. Der KCNQ1/MinK-Kanal zeigt weiterhin drei unterscheidbare aktivierende Komponenten. In dieser Arbeit wurden sie als langsame Aktivierung, schnelle Aktivierung sowie als schnelle Reaktivierung bezeichnet. In einem KCNQ1/MinK-Gatingmodell müssen dementsprechend mindestens drei geschlossene Zustände enthalten sein, um diese Ereignisse ausreichend beschreiben zu können. Nach Vorpulsen unterschiedlicher Spannungen kommt es zum Kreuzen der Stromspuren, wenn man die Stromkurven übereinander legt. Diese ungewöhnliche kinetische Eigenschaft versuchen Tzounopoulos *et al.* (1998) durch alternative Öffnungswege zu erklären. In dieser Arbeit wurden für die Beschreibung dieser KCNQ1/MinK-Kinetik Modelle erstellt. Das bekannte KCNQ1-Gatingmodell sollte ebenso wie die neu erstellten KCNQ1/MinK-Modelle um die Information der Chromanol-293B-Wirkorte erweitert werden:

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch unterschiedliche Experimente gezeigt werden, dass 3S,4R-293B nur auf deaktivierte Kanäle wirkt. Dagegen beeinflusst das 3R,4S-Enantiomer auch geöffnete (aktivierte) Kanäle. Es liegt also eine enantiomerspezifische Wirkung vor. Diese Informationen können wie folgt in das bekannte Gatingmodell eingefügt werden:



Der KCNQ1/MinK-Kanal wurde ebenfalls analysiert:

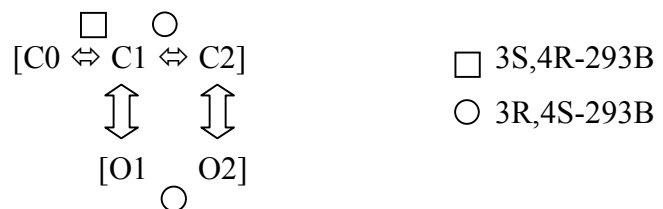
In dieser Arbeit konnte keine Inaktivierung bei Strömen des  $I_{Ks}$ -Kanals gefunden werden. Damit wurden die veröffentlichten Befunde bestätigt (Sanguinetti et al, 1997). Es konnten ebenfalls zwei Aktivierungskomponenten, zwei Deaktivierungskomponenten sowie durch zwei schnell aufeinander folgende Spannungspulse eine schnelle Reaktivierung nachgewiesen

werden (Sanguinetti et al, 1997; Tzounopoulos *et al.*, 1998). Aus diesen Informationen wurde ein Modell mit drei deaktivierten und zwei aktivierten Zuständen entwickelt. Mit einem Modell, das aus hintereinanderliegenden Zuständen (lineares Modell) aufgebaut ist, konnte die Aktivierung und die schnelle Reaktivierung erklärt werden.

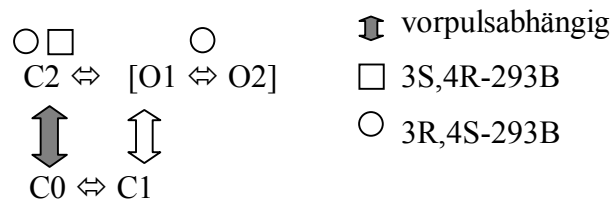
Der  $I_{Ks}$ -Kanal zeigte eine Vorpulsabhängigkeit. Dabei führte ein negatives Vorpulspotential initial zu einer Verzögerung der Aktivierung, an die sich eine beschleunigte Aktivierung anschloss. Daraus resultierte ein Kreuzen oder „Cross-Over“ der Stromspuren. Das Kreuzen der Stromspuren nach unterschiedlichen Vorpulsen, welches nach ungefähr 1,7 Sekunden auftrat, kann aber nicht durch ein lineares Modell nach der *Hypothese von Cole und Moore* (1960) erklärt werden. Dagegen kann dieses „Cross-Over“ durch einen alternativen Öffnungsweg erklärt werden (Tzounopoulos *et al.*, 1998). Allerdings ist bisher kein Gatingmodell veröffentlicht worden, das die Eigenschaften des KCNQ1/MinK-Kanals ausreichend beschreibt.

Fasst man nun die in der vorliegenden Arbeit enthaltenen Resultate zusammen, so ergeben sich die drei unten gezeigten Modelle. Sie sollen im Folgenden um die putativen Chromanol-293B-Wirkungsstellen ergänzt werden:

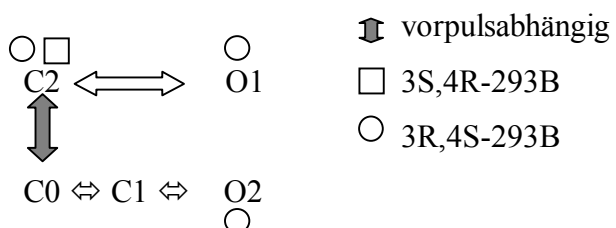
**Modell 1** in Anlehnung an Cui *et al.* (1994):



**Modell 2** in Anlehnung an Maylie und Tzounopoulos (persönliche Kommunikation 1999):



**Modell 3** diese Arbeit:



Alle drei Modelle enthalten einen alternativen Öffnungsweg, der ausreicht, das Kreuzen der Stromspuren (*Cross-Over*) zu erklären.

Die Ergebnisse, die zu dem Modell 1 führten, wurden durch die Injektion von unterschiedlichen Konzentrationen von MinK in Oozyten gewonnen. Dabei assoziiert MinK mit dem endogenen KCNQ1 der Oozyten. Abhängig von der Menge der injizierten MinK-RNS wird der Strom weniger KCNQ1-artig und nimmt immer deutlicher die Form eines  $I_{K_S}$ -Stroms an. Legt man die Stromspuren eines definierten depolarisierenden Spannungspulses bei geringer und hoher Menge injizierter MinK-RNS übereinander, so kreuzen sich auch diese Stromspuren. Dieses Modell beinhaltet keinen Erklärungsansatz für die Vorpulsabhängigkeit. Nimmt man aber den Übergang von C1 zu C2 als vorpulsabhängig an, so kann mit dem Modell das *Cross-Over* erklärt werden. Möglicherweise wird durch negatives Vorpulsen der MinK-Einfluss im  $I_{K_S}$ -Kanal reduziert. Demnach könnte die geringe MinK-Menge, welche einen geringeren Einfluss im  $I_{K_S}$ -Kanal bewirkt, durch einen negativen Vorpuls nachgeahmt werden.

Die grauen Pfeile in den Modellen 2) und 3) stellen die Übergänge dar, die durch unterschiedliches Vorpulsen beeinflusst werden. In diesen beiden Modellen entsprechen die Übergänge von C2 zu O1 der schnellen Aktivierung. Der Weg von C0 über C2 und O1 in die aktivierten Zustände ergeben zusammen die langsame Komponente der Aktivierung. Die schnelle Reaktivierung ergibt sich aus den Übergängen von C1 in die aktivierten Zustände.

Interessanterweise ähnelt das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Modell 3 sehr dem Schema, welches für den neuronalen M-Strom aufgrund von Einzelkanalanalysen erstellt wurde. Der M-Strom ist ein Kaliumstrom, der durch die Aktivierung des muscarinischen Acetylcholinrezeptors  $M_1$ , gehemmt wird (Wang *et al.*, 1998; Shapiro *et al.*, 2000; Selyanko *et al.*, 2000). Mit größter Wahrscheinlichkeit setzt sich der neuronale M-Kanal durch die verwandten Kanäle KCNQ2 und KCNQ3, und, wie kürzlich durch Lerche *et al.* (2000) beschrieben wurde, auch durch KCNQ3 und KCNQ 5 zusammen. Die Kanäle aus KCNQ2 und KCNQ3 können durch den  $M_1$ -Rezeptor moduliert werden (Selyanko *et al.*, 1999). In den Einzelkanalanalysen des neuronalen M-Stromes können zwei leitende Zustände unterschieden werden. Zwischen diesen zwei Zuständen kann der Kanal durch Phosphorylierung hin und her geschaltet werden (Marrion, N. V., 1996). Die „Flickerrate“ der  $I_{K_S}$ -Kanäle ist viel höher als die der M-Stromkanäle. Leider ist es wegen dieser hohen „Flickerrate“ technisch nicht möglich, unterschiedliche leitende Zustände in Einzelkanalmessungen des  $I_{K_S}$ -Kanals aufzulösen. Aufgrund der Verwandtschaft von KCNQ1 zu den M-Stromuntereinheiten sind auch beim KCNQ1/MinK-Kanalkomplex mindestens

zwei aktivierte Zustände wahrscheinlich, die möglicherweise auch unterschiedliche Leitfähigkeiten besitzen. Die Phosphorylierung des  $I_{Ks}$ -Kanals durch PKA bewirkt in Säugerzellen und Oozyten, dass die Stromamplitude stark vergrößert wird (im Ergebnisteil gezeigt). Es ist deshalb möglich, dass beim  $I_{Ks}$ -Kanal, wie beim neuronalen M-Kanal, zwischen unterschiedlich leitenden aktivierten Zuständen durch Phosphorylierung hin und her geschaltet wird.

Um zu testen, ob Phosphorylierung durch PKA den  $I_{Ks}$ -Block durch Chromanol 293B beeinflusst, wurden Experimente an CHO-Zellen, die stabil mit hKCNQ1/hMinK transfiziert waren, durchgeführt. In diesen Zellen wurde für Chromanol 293B ein  $IC_{50}$ -Wert von 2  $\mu\text{M}$  gefunden, was mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 6  $\mu\text{M}$  in Oozyten vereinbar ist. Durch die PKA abhängige Phosphorylierung wurde die Chromanol-293B-Sensitivität des  $I_{Ks}$ -Kanals nur leicht beeinflusst.

Die PKA-vermittelte Phosphorylierung nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation während einer Stressreaktion des menschlichen Körpers führt zur Verkürzung kardialer Aktionspotentiale und zu höheren Herzschlagfrequenzen. Diese Veränderungen sind bedeutsam für die Auslösung und Aufrechterhaltung von Fibrillationen des Herzmuskels. Würde ein Chromanol von der Wirkweise des Chromanols 293B angewendet werden, um das Aktionspotential durch  $I_{Ks}$ -Blockade zu verlängern und die Herzschlagfrequenz zu senken, sollte es auch unter körperlichen und psychischen Stressbedingungen, also während  $\beta$ -adrenerger Stimulation, wirksam sein.

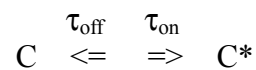
Einige Benzodiazepine wurden als selektive  $I_{Ks}$ -Blocker beschrieben. Interessanterweise wurde die Sensitivität gegen das Benzodiazepin L364,373 nicht durch Phosphorylierung beeinflusst (Salata, 1998). Das Benzodiazepin L364,373 ist ein Razemat und die Enantiomere wirken spezifisch. Das 3S-Enantiomer von L364,373 wirkt in allen Konzentrationen auf den  $I_{Ks}$ -Strom. Dagegen vergrößert 3R-L364,373 die Rate der Aktivierung und verschiebt die halbmaximale Aktivierung des  $I_{Ks}$  um -16 mV bei 0,1  $\mu\text{M}$  und um -24 mV bei 1  $\mu\text{M}$ . Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Assoziation von MinK mit KCNQ1 mit der Bindung des 3R-Enantiomers von L364,373 interferiert (Salata, 1998).

Vergleicht man die in dieser Arbeit ermittelten Blockerwirkungen des Chromanols 293B mit den Ergebnissen der Benzodiazepine, so ergeben sich einige Übereinstimmungen, aber auch einige Abweichungen. In dieser Arbeit wurden ebenfalls enantiomerspezifische Effekte des Blockers gezeigt. Das 3S,4R-293B wirkt ebenfalls bei allen Konzentrationen blockierend. Während Salata *et al.* (1998) für das 3R-Enantiomer ihres Blockers aktivierende Effekte

beschrieben, finden wir für das 3R,4S-Enantiomer des Chromanols sowohl eine leicht aktivierende, als auch blockierende Wirkung. Ähnlich wie die Versuche von Salata *et al.* sind wohl auch die Chromanol-293B-Experimente zu deuten. Es ist zu vermuten, dass die Assoziation von MinK mit KCNQ1 die Bindung des 3R,4S-Enantiomers beeinflusst oder dass umgekehrt das gebundene 3R,4S-Enantiomer die Interaktion zwischen MinK und KCNQ1 verändert.

Vom molekularen Standpunkt aus betrachtet scheinen beide Chromanol-293B-Enantiomere den geschlossenen Zustand des KCNQ1 zu stabilisieren. Lässt man die Kanäle während der Blocker einwirkt über längere Zeit geschlossen, so verschwindet der Unterschied in der Hemmpotenz zwischen beiden Enantiomeren. Es ist deshalb anzunehmen, dass beide Enantiomere an die gleiche Bindestelle binden, die im geschlossenen Zustand des KCNQ1-Kanals zugänglich ist. Dabei tritt aber die Sättigung des Blocks durch 3R,4S-293B schneller ein, und somit dürfte die gemeinsame Bindestelle für dieses Enantiomer leichter zugänglich sein.

Das folgende Diagramm stellt schematisch die Assoziation und Dissoziation an den geschlossenen Kanal dar:



Dabei symbolisiert C den geschlossenen Zustand und C\* den geschlossenen Kanal, an den der Blocker gebunden ist.

Die mögliche leichtere Zugänglichkeit der Bindestelle für 3R,4S-293B kann durch unterschiedliche Assoziationskonstanten (engl. *on-rates*,  $1/\tau_{\text{on}}$ ) beschrieben werden. Da das Auswaschen der Chromanole sehr lange dauert (30 bis 60 Minuten), ist anzunehmen, dass die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation (engl. *off-rate*,  $1/\tau_{\text{off}}$ ) sehr groß ist. Geht man davon aus, dass beide Enantiomere an dieselbe Stelle binden und sie im Gleichgewichtszustand (engl. *steady state*), also unter Bedingungen, die geschlossene Kanäle favorisieren, gleiche Potenz besitzen, so müssen die Unterschiede der Assoziationskonstanten beider Enantiomere im Vergleich zur Dissoziationskonstanten sehr klein sein, oder die Dissoziationskonstanten sind für die Enantiomere unterschiedlich.

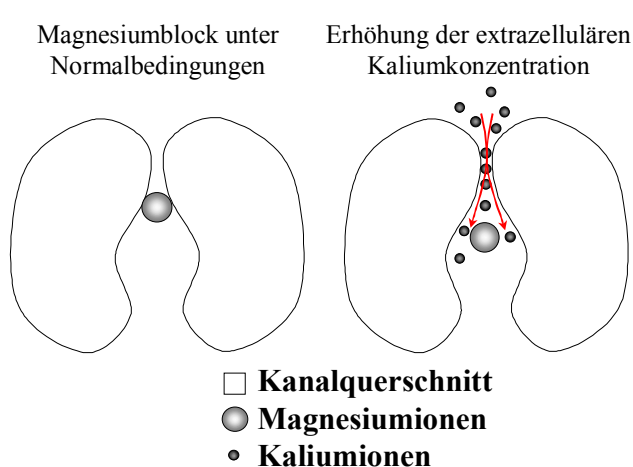
Mit elektrophysiologischen Methoden ist diese Frage nicht zu beantworten, da die Dissoziation makroskopisch zu langsam erfolgt und die Messungen damit mit einem zu großen Fehler behaftet wären. Nötige Einzelkanalanalysen sind beim  $I_{Ks}$  aber nicht ohne weiteres möglich. Eine endgültige Klärung könnte durch Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Chromanol-293B-Enantiomeren erfolgen. Durch diese Technik können reale



Werte für Bindung, also  $k_D$ -Werte, gemessen werden. Die in den elektrophysiologischen Messungen ermittelten  $IC_{50}$ -Werte geben dagegen das Produkt aus der Affinität für die Bindestelle und der dadurch bewirkten Veränderung des Ionenstroms wider.

Da 3R,4S-293B an geöffneten Kanäle aktiv ist, kann es durch Öffnung der Kanäle eine höhere Potenz erreichen als das andere Enantiomer. Das 3S,4R-293B hat dagegen eine Aktivität bei geschlossenen Kanälen. Dieses Ergebnis konnte auch pharmakologisch nach Aktivierung der Kanäle durch Mefenaminsäure erhärtet werden. Hierbei war die 3S,4R-293B-Hemmung im Vergleich zum anderen Enantiomer viel schwächer. Der Kanal muss bei der Aktivierung dreidimensionale Veränderungen durchmachen, welche zur Öffnung des Kanals führen. Diese Veränderungen beeinflussen offensichtlich auch die Chromanolbindestelle. Sie muss in der Offenkanalkonformation entweder schlechter zugänglich oder sogar im Bindestellenbereich verändert sein. Die Offenkonformation erlaubt nur 3R,4S-293B zu binden. Beide Enantiomere weisen eine höhere Hemmung beim geschlossenen KCNQ1-Kanal auf. Durch die Interaktion mit MinK nimmt die Offenkanalaktivität von 3R,4S-293B derart zu, dass es eine starke „Use-dependence“ und ein frequenzabhängige Blockade des KCNQ1/MinK-Kanals erreicht. Offensichtlich stabilisiert MinK den durch das 3R,4S-Enantiomer blockierbaren Offenzustand oder es macht ihn zugänglicher.

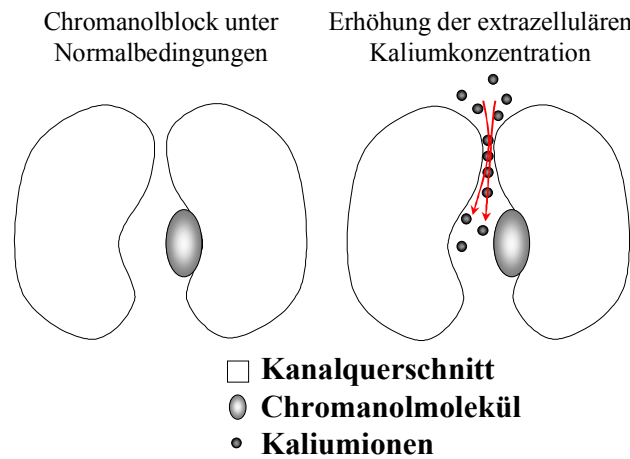
Das Fehlen einer klaren Spannungsabhängigkeit, die Änderung in der Aktivierungskinetik und die erhöhte Potenz bei höheren extrazellulären Kaliumionenkonzentrationen zeigen, dass das 3R,4S-293B kein klassischer Offenenporenblocker mit Wirkort nahe dem Selektivitätsfilter ist. Echte Porenblocker, wie z.B. Magnesiumionen bei



einwärtsrektifizierenden Kaliumkanälen, die von innen nahe dem Selektivitätsfilter wirken, sollten eine Blockabhängigkeit von der extrazellulären Kaliumionenkonzentration aufweisen (Horie *et al.*, 1987, Matsuda *et al.*, 1987, Vandenberg *et al.*, 1987). Die nebenstehende Abbildung zeigt die Wirkung des Magnesiumblocks, der sich durch die Kaliumabhängigkeit

vom Chromanolblock des KCNQ1 unterscheidet. Da Chromanol sowohl im *cell-attached* als auch im *inside-out-Patch* wirkt, sollte es von intrazellulär oder seitlich von der Membran her

wirken (Loussouarn *et al.*, 1997). Beide Enantiomere scheinen demnach mit einem

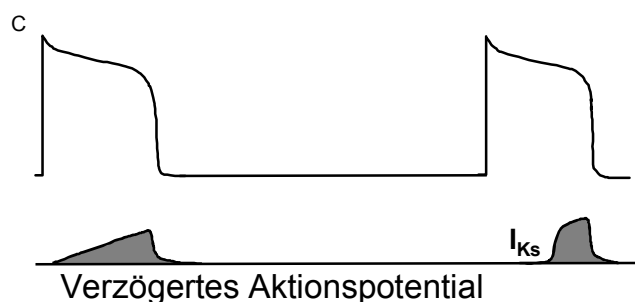
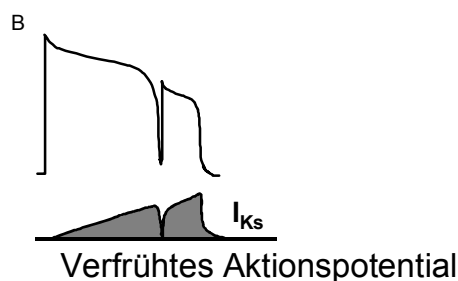
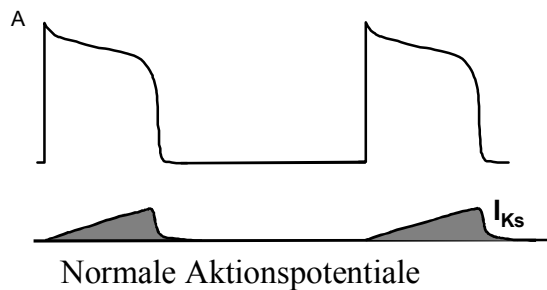


komplexen allosterischen Mechanismus zu binden. Das wird verständlich, wenn man sich vor Augen hält, dass der Bereich der Bindestelle während der Kanalöffnung Veränderungen unterworfen ist, die sicherlich durch einen gebundenen Blocker beeinflusst werden. In einer Mutagenese-studie konnten Teile der Pore im H5-Bereich und der angrenzenden

Transmembrandomäne S6 als mögliche Bindestellen für Chromanole am KCNQ1 identifiziert werden (Lerche *et al.*, 2000). Demnach würden Chromanole in der Pore etwas von dem Selektivitätsfilter entfernt gebunden werden, wie in der nebenstehende Abbildung veranschaulicht wird.

### Physiologische Relevanz der ungewöhnlichen $I_{Ks}$ -Kinetik

Das in Oozyten gezeigte auffällige Gating des  $I_{Ks}$ -Kanals scheint physiologisch relevant zu



sein. Die vermutete Rolle des  $I_{Ks}$ -Kanals beim Aktionspotential ist in der nachfolgenden Grafik erklärt. In dieser sind zwei aufeinander folgende Aktionspotentiale und der ihnen zugehörige  $I_{Ks}$ -Strom (grau) dargestellt.

In Herzmuskelzellen sind die  $I_{Ks}$ -Kanäle in der späten Phase des Aktionspotentials aktiviert. Der resultierende Kaliumstrom trägt dadurch zur Repolarisation des Aktionspotentials bei. Manche Arrhythmieformen werden durch verfrühte oder verzögerte Aktionspotentiale hervorgerufen. Aktionspotentiale bei „normalem“

gleichmäßigen Rhythmus (A) sind sich ähnlich und die zugrundeliegenden Einzelströme haben immer die gleiche Kinetik.

Die besondere Eigenschaft von  $I_{K_S}$ -Kanälen, schnell reaktivieren zu können, macht es möglich, dass gerade geschlossene Kanäle nahezu sofort vorzeitigen Aktionspotentialen entgegenwirken können (Tzounopoulos *et al.* 1998). Tatsächlich wurde die schnelle Reaktivierung bereits in Kardiomyozyten des Meerschweinchens gezeigt (Groh *et al.*, 1997). Zusätzlich sind beim Einsetzen des verfrühten Aktionspotentials einige  $I_{K_S}$ -Kanäle noch aktiviert und der  $I_{K_S}$  kann sofort den einwärtsgerichteten depolarisierenden Strömen entgegenwirken (B).

Bei verzögerten Aktionspotentialen (C) sind die Herzmuskelzellen für eine längere Zeitdauer hyperpolarisiert, was es den  $I_{K_S}$ -Kanälen ermöglicht, den „hyperpolarisiertesten“ Geschlossenenzustand C0 zu erreichen. Da  $I_{K_S}$ -Kanäle dann aus dem C0-Zustand erst mit einer gewissen Verzögerung aktivieren, wird neu entstehenden Aktionspotentialen nicht sofort entgegengewirkt. Die nachfolgende beschleunigte Aktivierungskinetik der  $I_{K_S}$ -Kanäle (in den Modellen 2 und 3 durch  $C1 \Leftrightarrow O$  dargestellt) würde dann eine schnelle Repolarisation durch  $I_{K_S}$ -Kanäle ermöglichen.

### **Pathophysiologische Relevanz des $I_{K_S}$**

Durch LQT1-Mutationen wird das QT-Intervall des EKG verlängert. In den Fällen des LQT1- und des LQT5-Syndroms ist der  $I_{K_S}$ -Strom betroffen. Die meisten LQT1-Mutationen sind dominant-negative Mutationen. Dies führt zum Verlust des repolarisierenden  $I_{K_S}$ -Stroms. Die Mutation L273F zerstört die Kanalaktivität nicht, bewirkt aber eine verstärkte Inaktivierung des homomeren KCNQ1-Kanals, die teilweise auch im KCNQ1(L273F)/MinK-Kanalkomplex persistiert. Nach einer Depolarisation (40 mV) wurden die Schwanzströme bei einem Potential von -60 mV analysiert. Unter diesen Bedingungen wurden  $24 \pm 5$  % inaktivierende Kanäle gefunden. Dies ist nur etwas weniger als die  $31 \pm 1$  % inaktivierter KCNQ1-WT-Kanäle. Allerdings kann die tatsächliche Kanalfraktion inaktivierter Kanäle deutlich höher liegen. Pusch *et al.* (1998) errechneten, dass die Fraktion der inaktivierten Kanäle beim KCNQ1-WT sogar um etwa 70 % liegen sollte. Wahrscheinlich wird mit der gewählten Analysenmethode nicht der gesamte Anteil der inaktivierten Kanäle erfasst (Pusch *et al.*, 1998).

Um den Mechanismus dieser Inaktivierung besser zu verstehen und deren pathophysiologische Relevanz zu zeigen, wurde versucht, die molekulare Grundlage der Inaktivierung aufzudecken. Dazu wurde in einem Chimärenansatz aus den Kanälen KCNQ1 und KCNQ2 die Porenregion von KCNQ1 als Mediatorregion für die Inaktivierung identifiziert. Durch gezielte Punktmutationen in diesem Bereich wurden die Aminosäurepositionen 272 und 307 als kritische Bereiche gefunden. Interessanterweise liegt eine kritische Position direkt neben der LQT1-Mutation L273F. Dieser Befund legt nahe, dass die Aminosäuren L273 und V307 im KCNQ1-Kanalprotein in räumlicher Nähe liegen. Diese Frage wurde im KCNQ1-Porenstrukturmodell nachgegangen. Das KCNQ1-Porenstrukturmodell wurde ausgehend von der KcsA-Röntgenstruktur (Doyle *et al.*, 1998) modelliert. In diesem KCNQ1-Modell lagen die Aminosäuren V307 und L273 mit etwa 3 Å räumlich sehr nahe zusammen. Dieser Befund legt Interaktion der Aminosäuren nahe.

Da der verwandte KCNQ2-Kanal keine Inaktivierung besitzt, wurden auch in diesem Kanal die Abstände der Aminosäuren zueinander überprüft. Über SwissProt war ein optimiertes KCNQ2-Modell erhältlich (Adresse: Swiss Prot/AAAa02\_00.pdb filenameAAAa02\_00). In diesem Modell liegen die Aminosäuren C242 und L272, die L273 und V307 im KCNQ1 entsprechen, mit etwa 6 Å deutlich weiter auseinander. Beim KCNQ2 ist damit eine Interaktion der betrachteten Aminosäuren weitaus unwahrscheinlicher. Es liegt nahe, dass eine Interaktion der Aminosäuren V307 mit L273 für die KCNQ1-Inaktivierung bedeutsam ist, und dass diese Interaktion im KCNQ2, der nicht inaktiviert, nicht stattfindet.

Im KCNQ2-Homologiemodell wurde ein etwas grösserer Abstand zwischen den entsprechenden Aminosäuren gefunden. Damit wird eine Interaktion der S5- $\alpha$ -Helix mit dem  $\alpha$ -helikalen Teil der H5-Schleife im KCNQ1 wahrscheinlich, im KCNQ2 aber eher unwahrscheinlich, was die unterschiedlichen Inaktivierungseigenschaften erklärt. Durch die Konformationsänderungen der Pore während des Öffnens könnten diese Regionen beim KCNQ1 angenähert werden und den Kanal in eine inaktivierte Form überführen oder diese stabilisieren.

Sehr interessant ist, dass die KCNQ1-Kanäle, in denen die Inaktivierung verhindert wird, ihre zweite langsame Deaktivierungskomponente weitestgehend verloren haben (G272C, G272T, V307L). Möglicherweise kommt diese langsame Deaktivierungskomponente aber durch eine zeitliche Überlagerung der Deaktivierung mit einer zweiten langsameren *recovery* der Inaktivierung zustande. Da auch der  $I_{Ks}$  eine schnelle und eine langsamere deaktivierende Komponente aufweist, könnte auch in ihm eine Inaktivierung vorliegen, die jedoch elektrophysiologisch nicht aufzulösen ist. Der Einfluss der Mutationen, welche die

Inaktivierung verhindern, deuten auf diese Möglichkeit hin. Demnach hätte Inaktivierung auch beim nativen  $I_{Ks}$  eine Bedeutung.

Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, dass neben dem vollständigen Verlust des  $I_{Ks}$ -Stroms auch eine veränderte Kanalkinetik ein LQT-Syndrom bewirken kann.

### **Chromanol als Klasse-III-Antiarrhythmikum**

$I_{Ks}$ -Blocker wurden schon früh (Sanguinetti und Jurkiewicz, 1990; Jurkiewicz und Sanguinetti, 1993) als potentielle Klasse-III-Antiarrhythmika diskutiert. Da demnach  $I_{Ks}$  ein mögliches „Target“ als Klasse III-Antiarrhythmikum darstellt, bietet es sich an, die gemessenen kinetischen Effekte auf die Aktionspotentiale zu übertragen: Durch  $I_{Ks}$ -Blockade sollten die Aktionspotentiale immer entsprechend der Chromanolkonzentration verlängert werden. Im EKG würde also eine QT-Zeitverlängerung ähnlich wie beim genetisch bedingten LQT1/5-Syndrom zu sehen sein.

Bei den Long-QT-Syndromen 1 und 5 treten Arrhythmien in der Regel bei körperlichem und psychischem Stress, also bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation auf. Die Stimulation der  $\beta$ -Rezeptoren führt über eine Kaskade zur Phosphorylierung von L-Typ Kalziumkanälen auf der einen Seite und  $I_{Ks}$ -Kanälen auf der anderen Seite. Sowohl der  $I_{Ca}$  als auch der  $I_{Ks}$  werden dadurch sehr stark stimuliert. Damit nimmt auch die Bedeutung der Blockade des Repolarisationsstroms zu (Schreieck *et al.*, 1997). Der  $I_{Ks}$  wird durch die Erhöhung des intrazellulären Kalziums zusätzlich stimuliert. Somit wird gleichzeitig ein Kationeneinstrom und ein Kationenausstrom beeinflusst (siehe auch Seiten 67 und 68). Man vermutet, dass Arrhythmien meist mit einer Überladung der Zellen mit Kalziumionen zusammenhängen (Nattel *et al.*, 2000, Jalife, 2000). Durch einen defizienten  $I_{Ks}$  beim LQTS 1/5 fehlt der repolarisierende Strom, die Zelle ist dadurch länger depolarisiert, die Kalziumkanäle sind länger geöffnet und noch mehr Kalzium kann einströmen. Das gleiche Problem könnte sich auch bei einer vollständigen pharmakologischen Blockade des  $I_{Ks}$  ergeben. Als Ausweg bietet sich die gleichzeitige Verabreichung von  $\beta$ -Blockern an, die häufig bei LQTS wirksam sind. Durch die Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren würde die Stimulation der L-Typ Kalziumkanäle verhindert und die Gefahr der Kalziumakkumulation in den Myozyten verringert werden.

Besonders bei akuten ventrikulären Fibrillationen könnte ein  $I_{Ks}$ -Blocker/ $\beta$ -Blocker eingesetzt werden. Durch die daraus resultierende Verlängerung des Aktionspotentials sollte die Herzschlagfrequenz abnehmen. Da ein solches Medikament gerade bei hoher Schlagfrequenz

wirken sollte, um das Entstehen von Fibrillationen zu verhindern, wäre ein Offenkanaalblocker vorzuziehen. Die Offenkanaalaktivität von 3R,4S-293B spiegelt sich in der positiven use-dependence und der frequenzabhängigen Blockade wieder. Durch die Wirkung des  $\beta$ -Blockers würde die  $\beta$ -adrenerge Stimulation als arrhythmische Ereignisse triggerndes Element ausgeschaltet werden, und darüber hinaus könnte durch 3R,4S-Chromanol atrialen Fibrillationen anderer Genese entgegen gewirkt werden (siehe Einleitung Seiten 17ff.). Unter diesem Gesichtspunkt kommt für ein derartiges Medikament nur ein 3R,4S-Chromanol mit seiner teilweisen Offenkanaalaktivität in Betracht. Das 3R,4S-293B ist demnach eine gute Testsubstanz, um in Modellsystemen die Theorie einer antiarrhythmischen Wirkung der  $I_{Ks}$ -Blockade zu überprüfen. Für eine Anwendung am Menschen ist die inhibitorische Potenz von 3R,4S-293B allerdings zu gering. Aufgrund der weiten Gewebsverbreitung des  $I_{Ks}$  und seiner noch nicht vollständig bekannten Funktionen müssen durch sorgfältige toxikologische Studien ferner mögliche Nebenwirkungen ausgeschlossen werden. Die Entwicklung eines hochaffinen  $I_{Ks}$ -Blockers mit den positiven Eigenschaften der 3R,4S-Substanz wäre demzufolge ein sinnvoller und vielversprechender Ansatz.

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften des Kaliumkanals KCNQ1 und des KCNQ1/MinK ( $I_{Ks}$ ) untersucht. Hierzu wurden die Kanäle in *Xenopus-laevis*-Oozyten und der KCNQ1/MinK ( $I_{Ks}$ ) in CHO-Zellen exprimiert und in *Voltage-Clamp*-Experimenten untersucht.

Die Blockwirkung des Chromanol-293B-Razemates und die der beiden Enantiomere wurden am KCNQ1- und KCNQ1/MinK-Kanal untersucht. Eine Enantiomerelektivität der Chromanol 293B-Enantiomere wurde nachgewiesen. Beide Enantiomere wirken abhängig vom Zustand der KCNQ1- und  $I_{Ks}$ -Kanäle. Das 3S,4R-293B blockierte nur geschlossene Kanäle, während das andere Enantiomer 3R,4S-293B auf geschlossene und auf geöffnete Kanäle wirkte. Als Grundlage dieser Aussagen wurden kinetische Analysen der Kanalkinetiken ohne Blocker und bei partieller Blockade der Kanäle durchgeführt.

Die Inhibition des  $I_{Ks}$ -Kanals durch Chromanol 293B konnte durch die Wirkung von Proteinkinase A leicht verringert werden. Eine Aktivierung des  $I_{Ks}$ -Kanals durch Mefenaminsäure verringert ebenfalls die inhibitorische Wirkung des 3S,4R-Enantiomers. Die Modulation der Chromanolwirkung kann zumindest im Fall der Mefenaminsäure nicht auf überlappende Bindungsstellen zurückgeführt werden.

Bei der kinetischen Analyse fiel die besondere Kinetik des  $I_{Ks}$  in Oozyten auf. Aufgrund der auffälligen  $I_{Ks}$ -Kinetik kann vermutet werden, dass der  $I_{Ks}$  eine Herzrhythmus-stabilisierende Funktion hat.

Patienten mit angeborenem LQT1-Syndrom weisen Mutationen im KCNQ1 auf, die zu lebensgefährlichen Arrhythmien (Torsaden und plötzlichem Herztod) führen können. Die bisher analysierten LQT1-Mutanten weisen immer eine reduzierte Leitfähigkeit auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die LQT1-Mutante KCNQ1(L273F) elektrophysiologisch untersucht. Sie wies eine verstärkte Inaktivierung auf, die auch nach Koexpression von KCNQ1(L273F) mit MinK persistierte. In WT- $I_{Ks}$ -Kanälen ist dagegen keine Inaktivierung nachzuweisen. Die inaktivierten KCNQ1(L273F)/MinK-Kanäle reduzieren im Vergleich zum Wildtypkanal den kardialen  $I_{Ks}$ -Strom. Diese Stromreduktion kann für das LQT1-Syndrom verantwortlich gemacht werden. Damit konnte zum ersten Mal ein LQT1-Syndrom durch eine

stabilisierte Inaktivierung erklärt werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die große Bedeutung des  $I_{Ks}$  im Herzen. Da diese Inaktivierung für die betreffenden LQT1-Patienten und möglicherweise auch für gesunde Patienten von Bedeutung ist, wurden in einer Mutagenesestudie die für die Inaktivierung essentiellen Aminosäuren gesucht. Mit Hilfe der Mutanten L273F und V307L konnte bestätigt werden, dass die KCNQ1-Inaktivierung keine klassische N-Typ- oder C-Typ-Inaktivierung darstellt und dass möglicherweise die Inaktivierung im KCNQ1/MinK-Kanalkomplex nicht verhindert, sondern nur verdeckt wird.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so wird die wichtige Bedeutung des  $I_{Ks}$  für das Aktionspotential des Herzens besonders aus der Kinetik und der Studie mit LQT1-Mutanten deutlich. Da dem  $I_{Ks}$  besondere Bedeutung als Gegenspieler des  $I_{Ca}$  unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation zukommt, besteht bei Blockade des  $I_{Ks}$  die Gefahr einer Kalziumakkumulation, welche mit Arrhythmien in Verbindung gebracht wird. Durch gleichzeitige Blockade von  $I_{Ks}$ -Kanälen und  $\beta$ -Rezeptoren könnte diesem Problem vorgebeugt werden. Die Entwicklung eines derartigen Klasse- II / Klasse- III-Antiarrhythmikums in einer Substanz oder als Kombinationspräparat kann sinnvoll sein.

Aufgrund des frequenzabhängigen Blocks durch 3R,4S-293B ist gerade bei Tachykardie eine stärkere Wirkung zu erwarten. Damit eignet sich dieses Enantiomer besonders gut, um  $I_{Ks}$  als Klasse-III-Target weiter zu evaluieren.



## **Literatur**

Abbott, G. W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, E., Lehmann, M. H., Timothy, K. W., Keating, M. T. & Goldstein, S. A. N. (1999). *Mirp1 forms I<sub>Kr</sub> potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. Cell* **97**, 175-187.

Aidley, D.J. & Stanfield P.R. (1998). *Ion channels - Molecules in action*. Cambridge University Press, UK.

Armstrong, C.M. & Bezanilla, F. (1977). Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J. Gen. Physiol.* **70**, 567-590.

Ashcroft, F.M. (2000). *Ion channels and disease*. Academic Press, San Diego, California, USA.

Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M. & Romey, G. (1996). KCNQ1 and I<sub>Ks</sub> (MinK) proteins associate to form the I<sub>Ks</sub> cardiac potassium channel. *Nature* **384**, 78-80.

Barry, D.M. & Nerbonne, J.M. (1996). Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 363-394.

Blumenthal, E.M. & Kaczmarek, L. (1992). Modulation by cAMP of a slowly activating potassium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* **12**, 290-295.

Boyle, W.A. & Nerbonne, J.M. (1991). A novel type of depolarization-activated K<sup>+</sup> current in adult rat atrial myocytes. *Am. J. Physiol.* **260**, 1236-1247.

Brueggemann, A., Pardo, L.A., Stühmer, W. & Pongs, O. (1993). Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> and modulated by cAMP. *Nature* **365**, 445-448.

- Busch, A.E., Kavanaugh, M.P., Varnum, M.D., Adelman, J.P. & North, R.A. (1992a). Regulation by second messengers of the slowly activating, voltage-dependent potassium current expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **450**, 491-502.
- Busch, A.E., Varnum, M.D., North, R.A. & Adelman, J.P. (1992b). An amino acid mutation in a potassium channel that prevents inhibition by protein kinase C. *Science* **255**, 1704-1707.
- Busch, A.E. & Lang, F. (1993). Effects of  $[Ca^{2+}]$  and temperature on MinK channels expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* **334**, 221-224.
- Busch, A. E., Busch, G. L., Ford, E., Suessbrich, H., Lang, H. J., Greger, R., Kunzelmann, K., Attali, B. & Stuhmer, W. (1997). The role of the  $I_{Ks}$  protein in the specific pharmacological properties of the  $I_{Ks}$  channel complex. *Br. J. Pharmacol.* **122**(2), 187-189.
- Bosch, R.F., Gaspo, R., Busch, A.E., Lang, H.J., Li, G.R., Nattel, S. (1998). Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier  $K^+$  current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* **38**(2), 441-450.
- Chen, G.Q., Cui, C., Mayer, M.L. & Gouaux, E. (1999). Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature* **402**, 817-821.
- Chow, R.H. (1991). Cadmium block of squid calcium currents. Macroscopic data and a kinetic model. *J. Gen. Physiol.* **98**(4), 751-770.
- Cole, K. S. & Moore, J. W. (1960). Potassium ion current in the squid giant axon. *Biophys. J.* **1**, 161-202.
- Cui, J., Kline, R. P., Pennefather, P. & Cohen, I. S. (1994). Gating of  $I_{Ks}$  expressed in *Xenopus* oocytes depends on the amount of mRNA injected. *J. Gen. Physiol.* **104**, 87-105.
- Curran, M.E., Splawski, I., Timothy, K.W., Vincent, G.M., Green, E.D. & Keating, M.T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* **80**, 795-803.

Deal, K., England, S.K. & Tamkun, M.M. (1996). Molecular physiology of cardiac potassium channels. *Physiol. Rev.* **76**, 49-67.

Doyle *et al.* (1998) Dolly, J.O. & Parcej, D.N. (1996). Molecular properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels.

*J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 231-253.

Drysdale, R., Warmke, J., Kreber, R. & Ganetzky, B. (1991). Molecular characterization of *eag*: a gene affecting potassium channels in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **127**, 497-505.

Duggal, P., Vesley, M.R., Wattanasirichaigoon, D., Villafane, J., Kaushik, V. & Beggs, A.H. (1998). Mutations of the gene for I<sub>Ks</sub> associated with both Jervell and Lange-Nielsen and Romano-Ward forms of the Long-QT syndrome. *Circulation* **97**, 142-146.

Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., Lazdunski, M. (1997). TASK, a human background K<sup>+</sup> channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO-J.* **16(17)**, 5464-5471.

Faivre, J.F. & Findlay, I. (1990). Action potential duration and activation of ATP-sensitive potassium current in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Biochem. Biophys. Acta* **1029**, 167-172.

Fatt, P. & Katz, B. (1951). An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J. Physiol.* **115**, 320-369.

Folander, K., Smith, J.S., Antanavage J., Bennett C., Stein R.B. & Swanson R. (1990). Cloning and expression of the delayed-rectifier I<sub>Ks</sub> channel from neonatal rat heart and diethylstilbestrol-primed rat uterus. *PNAS.* **87(8)**, 2975-2979

Franqueza, L., Lin, M., Shen, J., Splawski, I., Keating, M.T., Sanguinetti, M.C. (1999). Long QT syndrome-associated mutations in the S4-S5 linker of KvLQT1 potassium channels modify gating and interaction with MinK subunits. *J Biol. Chem.* **274(30)**, 21063-21070.

- Fujisawa, S., Ono, K., & Iijima T. (2000). Time-dependent block of the slowly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current by chromanol 293B in guinea-pig ventricular cells. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 1007-1013.
- Goldstein, S.A., Wang, K.W., Ilan, N. & Pausch, M.H. (1997). Sequence and function of the two P domain potassium channels: implications of an emerging superfamily. *J. Mol. Med.* **76**, 13-20.
- Groh, W.J., Gibson, K. J. & Maylie, J. G. (1997). Comparison of the rate-dependent properties of the class III antiarrhythmic agents azimilide (NE-10064) and E-4031: considerations on the mechanism of reverse rate-dependent action potential prolongation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **8**, 529-536.
- Heidbüchel, H. Vereecke, J. & Carmeliet, C. (1990). Three different potassium channels in human atria: contribution to the basal potassium conduction. *Circ. Res.* **66**, 1277-1286.
- Hille, B. (1992). *Ionic channels of excitable membranes* (1992). Second edition. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Hodkin, A.L. & Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of the membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500-544.
- Hodkin, A.L. & Keynes, R.D. (1955). The potassium permeability of a giant nerve fibre. *J. Physiol.* **128**, 61-88.
- Holmgren, M., Jurman, M.E. & Yellen, G. (1996). N-type inactivation and the S4-S5 linker region of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol.* **108**, 195-206.
- Horie, M. Irisawa, H. & Noma, A. (1987). Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol.* **387**, 251-272.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N. & Aldrich, R.W. (1991). Two types of inactivation in *Shaker* K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* **7**, 547-556.

Hunt, N. & Stern, T.A. (1995). The association between intravenous haloperidol and torsades de pointes. Three cases and a literature review. *Psychosomatics* **36**, 541-549.

Irisawa, H., Brown, H.F. & Giles, W. (1993). Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev.* **73**, 197-227.

Isacoff, E.Y., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1991). Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Nature* **353**, 86-90.

Jalife, J. (2000). Ventricular Fibrillation: Mechanisms of initiation and maintenance. *Annu. Rev. Physiol.* **62**, 25-50.

Jarolimek, W., Brown, A.M. & Ficker, E. (1997). Inward rectification in HERG mutants with reduced C-type inactivation. *Pflügers Arch.* **434(A)**, R100.

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

Jiang, C., Atkinson, D., Towbin, J.A., Splawski, I., Lehmann, M.H., Li, H., Timothy, K., Taggart, R.T., Schwarz, P.J., Vincent, G.M., Moss, A.J. & Keating, M.T. (1994). Two long QT syndrome loci map to chromosome 3 and 7 with evidence for further heterogeneity. *Nature Genet.* **8**, 141-147.

Jurkiewicz, N. K. & Sanguinetti, M. (1993). Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent: specific block of rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current by dofetilide. *Circ. Res.* **72(1)**, 75-83.

Keating, M.T., Atkinson, D., Dunn, C., Timothy, K., Vincent, G.M. & Leppert, M. (1991). Linkage of cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras-1 gene. *Science* **252**, 704-706.

- Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., Goldstein, S.A.N. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in a tandem. *Nature* **376**, 690-695.
- Koepsell, H., Gorboulev, V & Arndt, P. (1997). Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *J. Membrane Biol.* **167**, 103-117.
- Kraupp, O. (1983). Pharmakologische Beeinflussung der Rhythmik, Dynamik und Durchblutung des Herzens. In Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Forth, W., Henschler, D. und Rummel, W. (1983). B.I.-Wissenschaftsverlag.
- Kubisch, C., Schroeder, B.C., Friedrich, T., Lutjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C. & Jentsch, T.J. (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* **96**(3), 437-446.
- Kurachi, Y., Tung, R.T., Ito, H. & Nakajima, T. (1992). G-protein activation of the cardiac muscarinic K<sup>+</sup> channels. *Prog. Neurobiol.* **39**, 229-246.
- Lazarra, R. (1996). From first class to third class: recent upheaval in antiarrhythmic therapy-lessons from clinical trials. *Am. J. Cardiol.* **78**(A), 28-33.
- Lerche, C., Seebohm, G., Wagner, C.I., Gerlach, U., Brueggemann, A., Attali, B., Busch, A.E. (2000). Mapping the binding site of the chromanol 293B on the I<sub>Ks</sub>-channel. *Biophys. J.* **78**(1), 1199-Pos.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. & Barhanin, J. (1996). TWIK-1, an ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *EMBO J.* **15**, 1004-1011.
- Li, G.R., Feng, J., Yue, L., Carrier, M. & Nattel, S. (1996). Evidence for two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human ventricular myocytes. *Circ. Res.* **78**, 689-696.
- Liu, Y., Jurman, M.E. & Yellen, G. (1996). Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K<sup>+</sup> channel during gating. *Neuron* **16**, 859-867.

Lopez-Barneo, J., Hoshi, T., Heineman, S.H. & Aldrich, R.W. (1993). Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type

Lohrmann, E., Burhoff, I., Nitschke, R.B., Lang, H.J., Mania, D., Englert, H.C., Hropot, M., Warth, R., Rohm, W., Bleich, M. (1995). A new class of inhibitors of cAMP-mediated Cl<sup>-</sup> secretion in rabbit colon, acting by the reduction of cAMP-activated K<sup>+</sup> conductance. *Pflugers-Arch.* **429**(4), 517-530.

Loussouarn, G., Charpentier, F., Mohammad-Panah, R., Kunzelmann, K., Baro, I. & Escande, D. (1997). KCNQ1 potassium channel but not I<sub>Ks</sub> is the molecular target for trans-6-cyano-4-(N-ethylsulfonyl-N-methylamino)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-chromane. *Mol. Pharmacol.* **52**, 1131-1136.

Marrion, N. M. (1997). Control of M-current. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 483-504.

Matsuda, H., Saigusa, A. & Irisawa H. (1987). Ohmic conductance through the inward rectifying K channel and blocking by internal Mg<sup>2+</sup>. *Nature* **325**, 156-159.

Metzger, E. & Friedman, R. (1993). Prolongation of the corrected QT and torsades de pointes cardiac arrhythmia associated with intravenous haloperidol in the medically ill. *J. Clin. Psychopharmacol.* **13**, 128-132.

Nattel, S., Li, D. & Yue, L. (2000). Basic mechanisms of atrial fibrillation - Very new insights into very old ideas. *Annu. Rev. Physiol.* **62**, 51-77.

Neher, E. & Sackmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802.

Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Faure, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C., Schwartz, K. & Guicheney, P. (1997). A novel mutation in the potassium channel KCNQ1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nature Genetics* **15**, 186-189.

- Parpazian, D.M., Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from *Shaker*, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* **237**, 749-753.
- Papazian, D.M., Timpe, L.C., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1991). Alteration of voltage-dependence of *Shaker* potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* **349**, 305-310.
- Pusch, M., Magrassi, R., Wollnik, B. & Conti, F. (1998). Activation and inactivation of homomeric KCNQ1 potassium channels. *Biophys. J.* **75**, 785-792.
- Rettig, J., Heinemann, S.H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D.N., Dolly, J.O. & Pongs, O. (1994). Inactivation properties of the voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of  $\beta$ -subunit. *Nature* **369**, 289-294.
- Romano, C. (1965). Congenital cardiac arrhythmia. *Lancet* **1**, 658-659.
- Romey, G., Attali, B., Chouabe, C., Abitbol, I., Guillamare, E., Barhanin, J. & Lazdunski, M. (1997). Molecular mechanism and functional significance of the MinK control of the KCNQ1 channel activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 16713-16716.
- Russel, M.W. & MacDonald, D II (1996). The molecular genetics of the congenital long QT syndromes. *Curr. Opin. Cardiol.* **11**, 45-51.
- Salata, J.J., Jurkiewicz, N.K., Wang, J., Evans, B.E., Orme, H.T., Sanguinetti, M.C. (1998). A novel Benzodiazepine that activates cardiac slow delayed rectifier K<sup>+</sup> currents. *Mol. Pharmacol.* **54**(1), 220-230
- Sanguinetti, M. C. & Jurkiewicz, N.K. (1990). Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *J. Gen. Physiol.* **96**, 195-215.
- Sanguinetti, M. C. & Jurkiewicz, N.K. (1991a). Delayed rectifier outward K<sup>+</sup> current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am. J. Physiol.* **260**, 393-399.



Sanguinetti, M.C., Jurkiewicz, N.C., Scott, A. and Siegel, P.K.S. (1991b). Isoproterenol antagonizes prolongation of refractory period by the class III antiarrhythmic agent E-4031 in guinea-pig myocytes: mechanism of action. *Circ. Res.* **68**, 77-84.

Sanguinetti, M.C. & Jurkiewicz, N.C. (1992). Role of external  $Ca^{2+}$  and  $K^{+}$  in gating of cardiac rectifier currents. *Pflügers Arch.* **420**, 180-186.

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

Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L. & Keating, M. T. (1996). Coassembly of KCNQ1 and MinK ( $I_{Ks}$ ) to form cardiac  $I_{Ks}$  potassium channel. *Nature* **384**, 80-83.

Schott, J.J., Peltier, S., Foley, P., Drouin, E., Bounour, J.B., Donneley, P., Vergnaud, G., Moisan, J.P., Le Marec, H. & Pascal, O. (1994). Mapping of a new gene for the long QT syndrome. *Circulation* **90**, 601-605.

Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O. (2000). A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J* **19**(3), 332-340.

Schönherr, R. & Heinemann, S.H. (1996). Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *J. Physiol.* **493**, 601-605.

Schreieck, J., Wang, Y., Gjini, V., Korth, M., Zrenner, B., Schomig, A., Schmitt, C. (1997). Differential effect of beta-adrenergic stimulation on the frequency-dependent electrophysiologic actions of the new class III antiarrhythmics dofetilide, ambasilide, and chromanol 293B. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **8**(12): 1420-1430.

Schroeder, B.C., Waldegger, S., Fehr, S.; Bleich, M., Warth, R.; Greger, R.; Jentsch, T.J. (2000). A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* **403**, 196-199.

Schulze-Bahr, E., Heverkamp, W., Wedekind, H., Rubie, C., Hordt, M., Borggrefe, M., Assmann, G., Breithardt, G. & Funke, H. (1997). Autosomal recessive long-QT syndrome (Jervell Lange-Nielsen syndrome) is genetically heterogeneous. *Hum. Gen.* **100**, 573-576.

Selnick, H.G., Liverton, N.J., Baldwin, J.J., Butcher, J.W., Claremon, D.A., Elliott, J.M., Freidinger, R.M., King, S.A., Libby, B.E., McIntyre, C.J., Pribush, D.A., Remy, D.C., Smith, G.R., Tebben, A.J., Jurkiewicz, N.K., Lynch, J.J., Salata, J.J., Sanguinetti, M.C., Siegl, P.K., Slaughter D.E. & Vyas, K. (1997). Class III antiarrhythmic activity in vivo by selective blockade of the slowly activating cardiac delayed rectifier potassium current IKs by (R)-2-(2,4-trifluoromethyl)-N-[2-oxo-5-phenyl-1-(2,2,2-trifluoroethyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-3-yl]acetamide. *J. Med. Chem.* **40**(24): 3865-3868.

Selyanko, A.A., Hadley, J.K., Wood, I.C., Abogadie, F.C., Delmas, P. Buckley, N.J., London, B. & Brown, D.A. (1999). Two types of K(+) channel subunit, Erg1 and KCNQ2/3, contribute to the M-like current in a mammalian neuronal cell. *J. Neurosci.* **19**(18), 7742-7756.

Shalaby, F.Y., Levesque, P.C., Yang, W.P., Little, W.A., Conder, M.L., Jenkins, West, T. & Blannar, -M.A. (1997). Dominant-negative KvLQT1 mutations underlie the LQT1 form of long QT syndrome. *Circulation.* **96**(6), 1733-1736

Shapiro, M.S., Roche, J.P., Kaftan, E.J., Cruzblanca, H., Mackie, K. & Hille, B. (2000). Reconstitution of muscarinic modulation of the KCNQ2/KCNQ3 K(+) channels that underlie the neuronal M current. *J. Neurosci.* **20**(5), 1710-1721

Shi, W., Wymore, R.S., Wang, H.S., Pan, Z., Cohen, I.S., McKinnon, D. & Dixon, J.E. (1997). Identification of two nervous-specific members of the erg potassium channel gene family. *J. Neurosci.* **17**, 9423-9432.

Silbernagel, S & Despopoulos, A (1991), Taschenatlas der Physiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 4.Auflage.

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

Snyders, D.J.(1999). Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc. Res.* **42**, 377-390.

Splawski, I., Tristani-Firouzi, M., Lehmann, M.H., Sanguinetti, M.C. & Keating, M.T. (1997). Mutations in the *hMinK* gene cause long QT syndrome and suppress  $I_{Ks}$  function. *Nat. Genet.* **17**, 338-340.

Suessbrich, H., Bleich, M., Ecke, D., Rizzo, M., Waldegger, S., Lang, F., Szabo, I., Lang, H.J., Kunzelmann, K., Greger, R. & Busch, A.E. (1996). Specific blockade of slowly activating  $I(sK)$  channels by chromanols – impact on the role of  $I(sK)$  channels in epithelia. *FEBS Lett.* **396**(2-3), 271-275.

Surawicz, B. (1989). Electrophysiologic substrate of torsade de pointes: dispersion of repolarization or early afterdepolarization? *Am. Coll. Cardiol.* **14**, 172-184.

Tai, K. K. & Goldstein, S. A. N. (1998). The conduction pore of a cardiac potassium channel. *Nature* **391**, 605-608.

Takumi, T., Ohkubo, H. & Nakanishi, S. (1988). Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* **242**(4881), 1042-1045.

Tristani-Firouzi, M. & Sanguinetti, M. C. (1998). Voltage-dependent inactivation of human  $K^+$  channel KCNQ1 is eliminated by association with minimal  $K^+$  channel (MinK) subunits. *J. Physiol.* **510**(1), 37-45.

Trudeau, M. C., Warmke, J. W., Ganetzki, B. & Robertson, G. A. (1995). HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* **269**, 92-95.

Tzounopoulos, T., Maylie, J. & Adelman, J. P. (1998). Gating of  $I_{Ks}$  channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* **74**, 2299-2305.

Vandenberg, C.A. (1987). Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **84**, 2560-2564.

Varnum, M. D., Maylie, J., Busch, A. E. & Adelman, J. P. (1995). Persistent activation of MinK channels by chemical cross-linking. *Neuron* **14**, 407-412.

Varro, A., Nanasi, P.P. & Lathrop, D.A. (1993). Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiomyocytes. *Acta Physiol. Scand.* **149**, 133-142.

Varro, A., Balati, B., Iost, N., Takacs, J., Virag, L., Lathrop, D.A., Csaba, L., Talosi, L., Papp, J.G. (2000). The role of the delayed rectifier component  $I_{Ks}$  in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *J. Gen. Physiol.* **523**, 67-81.

Veldkamp, M.W., van Ginneken, A.C., Opthof, T. & Bouman, L.N. (1995). Delayed rectifier channels in human ventricular myocytes. *Circulation* **65**, 886-894.

Warmke, J.E., Drysdale, R. & Ganetzky, B. (1991). A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila eag* locus. *Science* **252**, 1560-1564.

Warmke, J.E. & Ganetzky, B. (1994). A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3438-3442.

Washizuka, T., Horie, M., Watanuki, M. & Sasayama, S. (1997). Endothelin-1 inhibits the slow component of cardiac delayed rectifier  $K^+$  currents via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Circ. Res.* **81**, 211-218.

Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J.L., Moss, A.J., Towbin, J.A. & Keating, M.T. (1995). SCNA5 mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* **80**, 805-811.

Wang, Q., Curran, M. E., Splawski, I., Burn, T. C., Millholland, J. M., Van Raay, T. J., Shen, J., Timothy, K. W., Vincent, G. M., De Jager, T., Schwarz, P. J., Towbin, J. A., Moss, A. J., Atkinson, D. L., Landes, G. M., Connors, T. D. & Keating, M. T. (1996). Positional cloning

of a novel potassium channel gene: KCNQ1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Genetics* **12**, 17-23.

Wang, W., Xia, J. & Kass, R. (1998). MinK-KCNQ1 fusion proteins, evidence for multiple *Stoichiometries* of the assembled  $I_{Ks}$  channel. *J. Biol. Chem.* **273** (51), 34069-34074.

Wang, Z., Fermini, B. & Nattel, S. (1995). Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **272**(1), 184-196.

Ward, O.C., (1964). A new familial cardiac syndrome in children. *J. Ir. Med. Ass.* **54**, 103-106.

Wei, A., Jegla, T. and Salkow, L. (1996). Eight potassium channel families revealed by *C. elegans* genome project. *Neuropharmacol.* **35**, 805-829.

Wollnik, B., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Esperer, H.D., Wieacker, P., Jentsch, T.J. (1997). Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive KVLQT1  $K^+$  channel mutations found in inherited cardiac arrhythmias. *Hum. Mol. Genet.* **6**(11), 1943-1949.

Wymore, R.S., Gintant, G.A., Wymore, R.T., Dixon, J.E., McKinnon, D. & Cohen, I.S. (1997). Tissue and species distribution of mRNA for the  $I_{Kr}$ -like  $K^+$  channel, *erg.* *Circ. Res.* **80**, 261-268.

Yang, I.C.H., Scherz, M.W., Bahinski, A., Bennett, P.B. & Murray, K.T. (2000). Stereoselective interactions of the enantiomers of chromanol 293B with human voltage-gated potassium channels. *J Pharm Exp Ther.* **294**(3), 955-962.

Yang, T., Snyders, D.J. & Roden, D.M. (1997). Rapid inactivation determines the rectification and potassium dependence of the rapid component of the delayed rectifier  $K^+$  current in cardiac cells. *Circ. Res.* **80**, 782-789.

Yang, Y. & Sigworth, F.J. (1998). Single-channel properties of  $I_{Ks}$  potassium channels. (1998). *J. Gen. Physiol.* **112**(6), 665-678.

## Anhang A:

In der folgenden Tabelle sind die bekannten LQT1-Mutationen im KCNQ1-Kanal aufgeführt. In der Veröffentlichung von Wang *et al.* (1996) war die Aminosäuresequenz des KCNQ1 noch nicht vollständig bekannt, so dass eine Nomenklatur entstand, die den N-Terminus ausklammerte (Wang-Mutationen mit Angaben in eckigen Klammern). Diese veraltete Nomenklatur wurde an die aktuelle Nomenklatur angepasst.

| <b>Mutation</b>      | <b>Region</b> | <b>Autoren</b>  | <b>Eigenschaft der Mutante</b>   |
|----------------------|---------------|---|--|
| F166W/G167[F38W/G39] | S2            | Wang <i>et al.</i> (1996)                                     | Deletion   |
| A177P [A49P]         | S2-S3         | Wang <i>et al.</i> (1996);<br>Shalaby <i>et al.</i><br>(1997) | dominant-negativ   |
| G188R [G60R]         | S2-S3         | Wang <i>et al.</i> (1996)                                     |  |
| R189Q [R61Q]         | S2-S3         | Wang <i>et al.</i> (1996)                                     |  |
| V253M [V125M]        | S4-S5         | Wang <i>et al.</i> (1996)                                     |  |
| R243C                | S4-S5         | Franqueza <i>et al.</i> (1999)                                | verlangsamte Aktivierung und Inaktivierung, mit MinK nicht funktionell |
| W248R                | S4-S5         | Franqueza <i>et al.</i> (1999)                                | verlangsamte Aktivierung und Inaktivierung, mit MinK nicht funktionell |
| E261K                | S4-S5         | Franqueza <i>et al.</i> (1999)                                | nicht funktionell  |
| L273F [L144F]        | S5            | Wang <i>et al.</i> (1996);<br>Shalaby <i>et al.</i><br>(1997) | dominant-negativ, starke Inaktivierung                                 |
| G305R [G177R]        | Pore          | Wang <i>et al.</i> (1996)                                     | (dominant-negativ bei Shaker)  |
| T311I [T183I]        | Pore          | Wang <i>et al.</i> (1996);<br>Shalaby <i>et al.</i><br>(1997) | dominant-negativ   |
| G211R                | Pore          | Wollnik <i>et al.</i><br>(1997)                               | dominant-negativ   |
| T217I                | Pore          | Wollnik <i>et al.</i><br>(1997)                               | dominant-negativ   |
| G219S                | Pore          | Wollnik <i>et al.</i><br>(1997)                               | dominant-negativ   |
| D222N                | Pore          | Wollnik <i>et al.</i><br>(1997)                               | dominant-negativ   |
| A340E [A212E]        | S6            | Wang <i>et al.</i> (1996)                                     |  |
| A340V [A212V]        | S6            | Wang <i>et al.</i> (1996)                                     |  |
| G344E [G216E]        | S6            | Wang <i>et al.</i> (1996)                                     |  |

## **Curriculum Vitae**

### **Persönliche Daten:**

Familienname: Seebohm  
Vornamen: Guiscard Friedrich Aldous  
Geboren am/in: 29.05.1970/Braunschweig

### **Schulbildung:**

1977-1978 Grundschule Meinersen  
1978-1980 Grundschule Polle  
1981-1983 Orientierungsstufe Holzminden  
1983-1990 Gymnasium Wilhelmstraße Holzminden

### **Zivildienst:**

1990-1991 Zivildienst in der Kinderpsychiatrie Holzminden

### **Berufliche Ausbildung:**

1991-1997 Studium der Biologie und des Sports für Gymnasiale Oberstufe  
1997-1998 Studienarbeit im Labor Stühmer (Göttingen)  
1998-2000 Doktorarbeit bei Aventis Pharma AG, Deutschland, unter Betreuung von Prof. Dr. A. E. Busch und Dr. A. Brüggemann sowie Prof. Dr. Dr. E. Mutschler an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

## Veröffentlichungen

### Artikel in internationalen Zeitschriften:

**Seebohm, G.**, Scherer, C. R., Busch, A.E. & Lerche, C. Identification of Specific Pore Residues Mediating KCNQ1-Inactivation. A Novel Mechanism for LOT-Syndrome? *J. Biol. Chem.* im Druck.

Liu, G.X., Derst, C., Schlichthörl, G., Heinen, S., **Seebohm, G.**, Brüggemann, A., Kummer, W., Veh, R.W., Daut, J. & Preisig-Müller, R.. Comparison of cloned Kir 2 channels with the native inward rectifier K<sup>+</sup>-channels from guinea-pig cardiomyocytes. *J. Physiol.*

Lerche, C., Scherer C.R., **Seebohm G.**, Derst C., Wei A.D., Busch A.E., Steinmeyer K. (2000). Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J. Biol. Chem.* **275**(29), 22395-22400.

Lerche, C., **Seebohm, G.**, Wagner, C.I., Scherer, C.R., Dehmelt, L., Abitbol, I., Gerlach, U., Brendel, J., Attali, B. & Busch, A.E.. Molecular impact of MinK on the specific block of I<sub>Ks</sub> by chromanols. *Brit. J. Pharmacol.* im Druck.

**Seebohm, G.**, Lerche, C., Pusch, M., Steinmeyer, K., Brüeggemann, A. and Busch, A. E.. Stereospecific Blockade of KCNQ1 and I<sub>Ks</sub> by Chromanol 293B Enantiomers. Revidiertes Manuskript eingereicht bei *Brit. J. Pharmacol.*.

**Seebohm, G.**, Lerche, C., Busch, A.E. & Bachmann, A.. An endogenous I<sub>Ks</sub> interacting Factor in Cardiac Myocytes and in *Xenopus* Oocytes? Eingereicht bei *Pflügers Arch.* letters.



**Kongreßbeiträge:**

**G. Seebohm**, C. Lerche, B. Kelety, U. Gerlach, J.J. Lang, H. Gögelein, A.E. Busch and A. Brueggemann (1999) State, frequency and enantiomer dependent block of the potassium channel  $I_{Ks}$  by the chromanol 293B. *Biophys. J.* **76**(1), M.Pos199.

C. Lerche, A. Brueggemann, **G. Seebohm**, A.D. Wei, C.L. Wagner, U. Gerlach, H.J. Lang, B. Attali, A.E. Busch (1999) Block of KCNQ1 related potassium channels by the chromanol 293B. *Biophys. J.* **76**(1), Su-Pos335.

**G. Seebohm**, C. Lerche, B. Kelety, A. Burgard, U. Gerlach, H.-J. Lang, H. Gögelein, A. E. Busch and A. Brueggemann. (1999) Chromanol 293B acts on KCNQ1 and  $I_{Ks}$  channels in an enantiomere specific manner. *Pflügers Archiv, Europ. J. Physiol.* **437**(5), P5-9.

M. Ott, A.E. Busch, **G. Seebohm**, F. Lang and C.A. Wagner. (1999) Positive regulation of the  $I_{Ks}$ -channel (KCNQ1/ $I_{Ks}$ ) expressed in *Xenopus* oocytes by modulators of tyrosine phosphorylation. *Pflügers Archiv, Europ. J. Physiol.* **437**(5), P1-11.

C. Lerche, **G. Seebohm**, C.I. Wagner, A.D. Wei, U. Gerlach, H.J. Lang, B. Attali, A. Brueggemann and A.E. Busch. (1999) Different block of closely related potassium channels by the chromanol 293B, *Naunyn-Schmiedeberg's-Arch. Pharmacol.* **359**(3), 289.

**G. Seebohm**, C. Lerche, B. Kelety, A. Burgard, U. Gerlach, H.-J. Lang, H. Gögelein, A.E. Busch and A. Brueggemann. (1999) Specific  $I_{Ks}$  potassium channel blocker chromanol 293B shows enantiomer specific blocking mechanisms. *Naunyn-Schmiedeberg's-Arch. Pharmacol.* **359**(3), 290.

**G. Seebohm**, C. Lerche, A. Burgard, U. Gerlach, A.E. Busch and A. Brueggemann. (1999) New Insights in  $I_{Ks}$  and KCNQ1 Gating by Blockade of 293B Enantiomers. *Research conference on ion channels and transporters, Bad Soden.*

C. Lerche, **G. Seebohm**, C.I. Wagner, U. Gerlach, A. Brueggemann, B. Attali, A.E. Busch. (1999) Mapping the binding site of the chromanol 293B on the  $I_{Ks}$ -channel, *Research conference on ion channels and transporters, Bad Soden*.

**G. Seebohm**, C. Lerche, A. Brueggemann and A. E. Busch. (2000) Identification of a novel region involved in KCNQ1 inactivation, *Biophys. Journal* **78**(1), 1205-Pos.

C. Lerche, **G. Seebohm**, C.I. Wagner, U. Gerlach, A. Brueggemann, B. Attali, A.E. Busch. (2000) Mapping the binding site of the chromanol 293B on the  $I_{Ks}$ -channel, *Biophys. Journal* **78**(1), 1199-Pos.

A. Bachmann, P. Engel, **G. Seebohm**, U. Russ, J.E. Schultz and U. Quast. (2000) Coexpression of CFTR and a guanylyl cyclase domain from *Paramecium tetraurelia* in *Xenopus* oocytes. 12<sup>th</sup> protein kinase symposium, P37, Bad Brückenau.

#### Vorträge

**Beide Vorträge wurden auf der Tagung der deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie in Mainz gehalten:**

**G. Seebohm**, C. Lerche, U. Gerlach, A. E. Busch and A. Brueggemann (2000) A pharmacological way to discriminate different gating states of KCNQ1 and  $I_{Ks}$ . *Naunyn-Schmiedeberg's-Arch. Pharmacol.* **361**(4), 288

C. Lerche, **G. Seebohm**, C.I. Wagner, U. Gerlach, P. Arndt, A.E. Busch. (2000) The chromanol 293B is acting within the inner pore region of the  $I_{Ks}$ -channel. *Naunyn-Schmiedeberg's-Arch. Pharmacol.* **361**(4), 296

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde als externe Doktorarbeit bei der Firma Aventis Pharma Deutschland GmbH in der Disease Group Cardiovascular Diseases angefertigt. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. A. E. Busch für die Bereitstellung des Themas der Arbeit und sein herausragendes förderndes Interesse, welches die Verwirklichung aller meiner Ideen ermöglichte.

Prof. Dr. Dr. Mutschler von der Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt für die Betreuung der Arbeit von seiten der Universität, durch die diese Arbeit ermöglicht wurde.

Dr. Andrea Brüggemann für die persönliche wissenschaftliche Betreuung im Labor.

Christian Lerche für die freundschaftliche und sehr fruchtbare Zusammenarbeit und die Freundschaft, die mir immer viel bedeutet und der Arbeit Schwung verliehen hat.

PD Dr. Klaus Steinmeyer sein andauerndes Interesse für meine wissenschaftlichen Ergebnisse und die wissenschaftliche Diskussion sowie die Hilfe beim Verfassen von Veröffentlichungen.

Alexander Bachmann, Karin Kopp, Bela Kelety, Niels Decher, Stefan Müller, Andreas Hertler, Constanze Scherer, Petra Arndt, Hans-Willi Jansen, Simone Stengelin, Martin Stephan danke ich für die Unterstützung und die kollegiale Atmosphäre im Labor.

Den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Jungermann in Göttingen, Prof. Dr. Stühmer in Göttingen und Prof. Dr. Koepsel in Würzburg für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Für die Diskussion und fruchtbare Zusammenarbeit mit Michael Pusch, James Maylie, Michael Sanguinetti und Aguan Wei möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, die noch nicht genannt wurden, für ihre wissenschaftliche und kollegiale Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für die entgegengebrachte Zuneigung und das Verständnis sowie die unermüdliche Unterstützung während meiner beruflichen Ausbildung bedanken.

Meiner lieben Freundin Nathalie Strutz möchte ich für die stete persönliche Unterstützung und die wissenschaftlichen Diskussionen danken.