

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Physiologie  
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann

Die Bedeutung der Hüllschichten der Xenopus-Oozyte für den Effekt der  
Antiarrhythmika Propafenon, Flecainid und Verapamil auf den klonierten  
Kaliumkanal Kv2.1

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur  
Erlangung des doctor medicinae dentium  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Claudius Middelberg  
aus Greven  
2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. D. Moskopp

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. M. Madeja

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Physiologie  
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann  
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. D. Moskopp  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. M. Madeja

## ZUSAMMENFASSUNG

### **Die Bedeutung der Hüllschichten der *Xenopus*-Oozyte für den Effekt der Antiarrhythmika Propafenon, Flecainid und Verapamil auf den klonierten Kaliumkanal Kv2.1**

Claudius Middelberg

Bei der antiarrhythmischen Wirkung der Substanzen Propafenon, Flecainid und Verapamil wird auch eine Blockierung von Ionenkanälen diskutiert. Untersuchungen zur Wirksamkeit dieser Substanzen an Ionenkanälen werden häufig am Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyte durchgeführt. Es war Ziel dieser Arbeit, den Einfluss der Hüllschichten der Oozyte auf die Wirkung der Antiarrhythmika zu untersuchen. Vor dem Hintergrund der klinischen Relevanz sollte ferner geprüft werden, ob Ergebnisse aus Versuchen an Oozyten geeignet sind, Angaben zu therapeutisch wirksamen Substanzkonzentrationen zu erarbeiten.

Als Referenz wurde der Kaliumkanal Kv2.1 in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) exprimiert. Die Wirkung der Antiarrhythmika auf diesen Kanal wurde in Oozyten dreier Präparationszustände untersucht: Mit Hüllen, nur mit den inneren Hüllschichten und ohne Hüllschichten. Dazu wurden mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik die durch die Kv2.1-Kaliumkanäle fließenden Ionenströme registriert und die Abnahme der Ionenströme bei Applikation der Substanzen gemessen.

Die mittleren Konzentrationen der halbmaximalen Hemmung der Kaliumströme waren bei zunehmender Entfernung der Hüllschichten für Propafenon in den drei Präparationszuständen 216 µmol/l (n = 12), 151 µmol/l (n = 14) und 91 µmol/l (n = 11), für Flecainid 215 µmol/l (n = 17), 162 µmol/l (n = 16) und 384 µmol/l (n = 12) und für Verapamil 80 µmol/l (n = 8), 56 µmol/l (n = 11) und 55 µmol/l (n = 8). Durch die Entfernung der Hüllschichten lässt sich damit für Propafenon und Verapamil eine ansteigende Zunahme der Empfindlichkeit der Oozyte bis etwa um den Faktor 2 erreichen, während für Flecainid in dieser Arbeit eine Abnahme bei Oozyten ohne Hüllen gemessen wurde.

Aus den Ergebnissen der Arbeit und dem Vergleich mit Literaturbefunden lässt sich ableiten, dass

1. die Entfernung der Hüllschichten der *Xenopus*-Oozyte zu einer Zunahme der Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Antiarrhythmika führt,
2. im Vergleich zu anderen Expressionssystemen selbst in Oozyten ohne Hüllen höhere Substanzkonzentrationen nötig sind, um denselben blockierenden Effekt zu erreichen,
3. die in der Literatur angegebenen therapeutischen Plasmakonzentrationen im Bereich der Werte anderer Expressionssysteme liegen, jedoch von denen der *Xenopus*-Oozyte abweichen.

Die Arbeit zeigt, dass es nicht möglich ist, auf der Basis von Ergebnissen, die im Expressionssystem der Oozyte gewonnen wurden, Angaben zu therapeutisch wirksamen Substanzkonzentrationen von Antiarrhythmika zu erarbeiten.

Für konzentrationsunabhängige Versuche, wie z.B. für grundsätzliche Wirkmechanismen, sollten vorzugsweise Oozyten mit allen Hüllen herangezogen werden, da sie mechanisch unempfindlicher sind.

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2004

Die Tierversuche wurden vom Regierungspräsidenten Münster genehmigt (AZ 23.0835.1.0 (G 32/97) vom 23.10.1997).

Für meine Mutter, Gerda Middelberg, in tiefer Dankbarkeit.

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Methodik	9
2.1	Gewinnung und Kultivierung der Oozyten von <i>Xenopus laevis</i>	9
2.2	Morphologie und Histologie der Oozyte von <i>Xenopus laevis</i>	10
2.3	Präparation der Hüllschichten	11
2.4	Das Expressionssystem der Oozyte	11
2.5	Molekulare Struktur der Kaliumkanäle	12
2.6	Gewinnung und Injektion der RNA in die Oozyten	14
2.6.1	Gewinnung der cRNA	15
2.6.2	Injektion der cRNA in die Oozyten	15
2.7	Elektrophysiologische Untersuchung	16
2.8	Extrazelluläre Substanzapplikation	18
2.9	Verwendete Lösungen	19
2.10	Datenauswertung	20
3.	Ergebnisse	22
3.1	Propafenon	22
3.1.1	Oozyten mit allen Hüllen	23
3.1.2	Defollikulierte Oozyten	23
3.1.3	Oozyten ohne Hüllen	24
3.1.4	Vergleichende Auswertung	31
3.2	Flecainid	32
3.2.1	Oozyten mit allen Hüllen	32
3.2.2	Defollikulierte Oozyten	33
3.2.3	Oozyten ohne Hüllen	34
3.2.4	Vergleichende Auswertung	41
3.3	Verapamil	42
3.3.1	Oozyten mit allen Hüllen	42
3.3.2	Defollikulierte Oozyten	43
3.3.3	Oozyten ohne Hüllen	43
3.3.4	Vergleichende Auswertung	51

4.	Diskussion	53
5.	Zusammenfassung	64
6.	Literatur	66
7.	Danksagung	73
8.	Lebenslauf	74
9.	Anhang	75

# 1. Einleitung

Erkrankungen des Herzens sind in Deutschland weit verbreitet. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes starben im Jahr 2000 57.007 Personen an den Folgen einer Herzinsuffizienz (Männer: 17.626, Frauen: 39.381), welche somit die dritthäufigste aller Todesursachen darstellte. Bei Männern waren im Jahr 1999 Herzrhythmusstörungen der vierthäufigste Anlass für eine vollstationäre Behandlung (137.511 Personen). Bei Frauen stellte diese Erkrankung den sechsthäufigsten Anlass für eine stationäre Behandlung dar (144.452 Personen).

Zum Verständnis der Ursachen von Herzinsuffizienz und Arrhythmien ist eine genaue Kenntnis der elektrophysiologischen Vorgänge an der gesunden Herzmuskelzelle hilfreich. Voraussetzung für die Erregbarkeit von Herzmuskelzellen ist das Vorhandensein eines Ruhemembranpotentials (RMP), bei dem zwischen der Innenseite der Zellmembran und der Außenseite eine elektrische Potentialdifferenz von 60-80mV besteht. Ursache hierfür ist die ungleiche Verteilung von Ionen, insbesondere von Natrium- und Kaliumionen. Für eine genauere Betrachtung des Ruhemembranpotentials sei auf entsprechende Kapitel in Lehrbüchern der Physiologie verwiesen.

Im Rahmen eines Aktionspotentials (AP) kommt es zu umfangreichen und differenzierten Umverteilungsprozessen von Ladungen, bei denen spannungsgesteuerte Ionenkanäle eine entscheidende Rolle spielen. Bei der elektrophysiologischen Aufzeichnung dieses Prozesses erhält man einen charakteristischen Verlauf des Membranpotentials über die Zeit. Hierbei lassen sich drei Phasen abgrenzen: 1. initiale Aufstrichphase, 2. Plateauphase und 3. schnelle Repolarisation.

1. Nach einer schwellenwertigen Depolarisation der Herzmuskelzelle öffnen sich spezifische  $\text{Na}^+$ -Kanäle, was einen schnellen Natriumeinstrom bewirkt. Im Folgenden kommt es zu einer Umladung des Membranpotentials in den positiven Bereich („over-shoot“). Diese initiale Aufstrichphase folgt im Wesentlichen den an der Nervenfasern vom Tintenfisch beobachteten Prozessen (Draper und Weidmann, 1951).

2. Durch den initialen Aufstrich wird der langsame  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aktiviert. Dieser setzt den  $\text{Na}^+$ -Einstrom fort, der aufgrund des spontanen Schlusses der  $\text{Na}^+$ -Kanäle nur sehr kurz ist. Somit kommt es zu einer Aufrechterhaltung der Depolarisation.
3. Die zeitabhängige Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit – gefördert durch den Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  – begünstigt die Repolarisation. Entscheidend für die Repolarisation ist aber die Aktivierung von Kaliumkanälen, wodurch ein Auswärtsstrom von Kaliumionen erzeugt wird.

Kardiale spannungsgesteuerte Kaliumströme lassen sich nach ihrem Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten in zwei Gruppen einteilen: In den schnell aktivierenden und inaktivierenden Kaliumstrom (transient outward current,  $I_{\text{TO}}$ ) und den langsam aktivierenden und nicht oder nur langsam inaktivierenden Kaliumstrom (delayed rectifier potassium current,  $I_{\text{K}}$ ). Die zweite Gruppe kann nach ihrer Aktivierungsgeschwindigkeit noch weiter unterteilt werden in den sehr schnell aktivierenden (ultrarapid delayed rectifier potassium current,  $I_{\text{kur}}$ ), den schnell aktivierenden (rapid delayed rectifier potassium current,  $I_{\text{kr}}$ ) und den langsam aktivierenden Kaliumstrom (slow delayed rectifier potassium current,  $I_{\text{ks}}$ ) (Snyders, 1999). In den vergangenen Jahren ist es teilweise gelungen, diese Ströme einzelnen Kaliumkanälen zuzuordnen.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Antiarrhythmika auf Kv2.1-Kaliumkanäle untersucht. Dieser Kanaltyp findet sich beim Menschen im Gewebe von Gehirn, Niere, Retina, Skelettmuskel und insbesondere vom Herzen (Vorhof- und Kammermyokard), weshalb er für diese Arbeit gewählt wurde (Grupe et al., 1990; Hwang et al., 1992; Dixon und McKinnon, 1994). Es wird vermutet, dass er zumindest zum Teil Träger des  $I_{\text{kur}}$  ist. Unter pathologischen Bedingungen im Sinne einer Arrhythmie kann der Besatz von Kv2.1-Kaliumkanälen an Herzmuskelzellen verändert sein (Madeja et al., 2003). Verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen wurden dazu durchgeführt. So konnte an Herzmuskelzellen aus dem linken Ventrikel der Ratte gezeigt werden, dass bei bestehendem Hyperthyreoidismus die Konzentration der für diesen Kaliumkanal kodierenden mRNA deutlich reduziert ist (Nishiyama et al., 1998). An diesen Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass es bei einer durch Streptozotocin induzierten diabetischen Kardiomyopathie zu einer Verringerung des Besatzes mit Kv2.1-Kanälen kommt (Qin et al., 2001). Eine Hypertrophie der Herzmuskelzellen führt bei Ratten zu einem vermehrten Besatz mit Kv2.1-

Kaliumkanälen (Walsh et al., 2001). Bei Ratten, die einen Infarkt erlitten, können sowohl verlängerte Aktionspotentiale als auch eine verringerte Konzentration von Kv2.1-Spiegeln festgestellt werden (Huang et al., 2000).

Zur Therapie von Herzinsuffizienz und Arrhythmien finden eine Reihe von Substanzen Anwendung. Dabei unterscheidet man nach Vaughan und Williams folgende Gruppen (Vaughan und Williams, 1975; Lewalter und Lüderitz, 2000):

1. Klasse-IA-Antiarrhythmika: Die Hauptwirkung dieser Substanzen liegt in der Repolarisationsverzögerung. Vertreter dieser Substanzgruppe sind Chinidin, Disopyramid und Ajmalin, wobei zur Therapie ventrikulärer Arrhythmien Chinidin und Disopyramid heute praktisch nicht mehr eingesetzt werden. Auch im Bereich der Rezidivprophylaxe bei Vorhofflimmern und Vorhofflattern sind sie nur noch Mittel der 2. und 3. Wahl. Dagegen findet i.v. Ajmalin zur Terminierung supra- sowie ventrikulärer Tachykardien weiterhin Anwendung (Manz et al., 1992).
2. Klasse-IB-Antiarrhythmika: Vertreter dieser Gruppe sind Lidocain, Mexiletin und Phenytoin. Insbesondere bei erniedrigtem Ruhemembranpotential und angehobener Frequenz können sie den schnellen  $\text{Na}^+$ -Einstrom blockieren und den repolarisierenden  $\text{K}^+$ -Ausstrom aktivieren. Hierdurch kommt es insgesamt zu einer Verkürzung der Dauer des Aktionspotentials. Die wesentliche Wirkung besteht in einer Terminierung ventrikulärer Kreiserregungen durch Überführung eines unidirektionalen in einen bidirektionalen Block in vorgeschädigtem Gewebe unter tachykarden Bedingungen. Somit kommt beispielsweise Lidocain bei ventrikulären Tachyarrhythmien im akuten Ischämiesyndrom zur Anwendung.
3. Klasse-IC-Antiarrhythmika: Zu dieser Gruppe zählen Flecainid und Propafenon, unter deren Einfluss es zu einer ausgeprägten Blockade des schnellen  $\text{Na}^+$ -Einstroms bei gleichzeitig diskreter Blockade des repolarisierenden  $\text{K}^+$ -Einstroms kommt. Dies hat insgesamt eine deutliche Leitungsverzögerung zur Folge, weshalb Flecainid und Propafenon Mittel der ersten Wahl bei der Konversion und Rezidivprophylaxe von idiopathischem und hypertensiv bedingtem Vorhofflimmern sind.

4. Klasse-II-Antiarrhythmika: Die Gabe von Substanzen dieser Gruppe hat eine kompetitive Hemmung von  $\beta$ -Rezeptoren sowie eine Verstärkung des basalen  $K^+$ -Ausstroms zur Folge. Durch die Antagonisierung der elektrophysiologischen Effekte endogener Katecholamine kommt es insgesamt zu einer Abnahme der Sinusfrequenz, einer Suppression von Arrhythmien vom Automatie-Typ und einer erhöhten „Siebwirkung“ im AV-Knoten. Ein wesentlicher klinischer Effekt liegt in einer Reduktion der Gesamtmortalität, der Reinfarktrate und des plötzlichen Herztodes. Substanzen wie Atenolol, Bisoprolol, Betaxolol und Metoprolol gehören daher zur Standardtherapie nach Myokardinfarkt.
  
5. Klasse-III-Antiarrhythmika: Vertreter dieser Gruppe sind Amiodaron und Sotalol. Sie bewirken eine ausgeprägte Hemmung des frühen  $K^+$ -Ausstroms. Hohe Dosen führen zu einer diskreten Blockade des schnellen  $Na^+$ -Einstroms. Insgesamt kommt es zu einer Verlängerung der Dauer des Aktionspotentials, was eine Verlängerung der Refraktärstrecke bedingt und zum Abbruch von Kreiserregungen führen kann. Da es zu keiner nennenswerten Beeinflussung der Leitungsgeschwindigkeit kommt, muss nicht mit einer gleichzeitigen Auslösung oder Beförderung von kreisenden Erregungen im Sinne einer Proarrhythmie gerechnet werden. Insbesondere Amiodaron verfügt über eine vielschichtige Membranwirkung und weist die antiarrhythmischen Eigenschaften aller 4 Klassen auf. Wichtige klinische Vorzüge dieser Substanz sind die hohe antiarrhythmische Wirkung bei geringer Proarrhythmie und fehlender negativer Inotropie. Aufgrund der extrakardialen Nebenwirkungen besteht für Amiodaron eine strenge Indikation zur Dauertherapie.
  
6. Klasse-IV-Antiarrhythmika: Substanzen dieser Gruppe, zu der Verapamil, Gallopamil und Diltiazem gehören, entfalten ihre Wirkung durch eine Hemmung des langsamen  $Ca^{2+}$ -Einstroms und des langsamen  $Na^+$ -Einstroms im Bereich des Sinusknotens, des AV-Knotens und des Arbeitsmyokards aus. Dadurch wirken sie insgesamt negativ inotrop und chronotrop. Der klinisch wichtigste Effekt ist die negative Dromotropie im AV-Knoten.

In dieser Arbeit wurden drei Substanzen untersucht:

1. Propafenon (1-[2-[Hydroxy-3-(propylamino)propoxy]phenyl]-3-phenyl-1-propafenon) ist ein Klasse-IC-Antiarrhythmikum und wird seit 1978 in der BRD vermarktet. Es wird nach oraler Gabe rasch resorbiert, wobei Plasmaspitzenkonzentrationen nach etwa 2h gemessen werden. Die Bioverfügbarkeit liegt dabei bei 50%. Die therapeutische Plasmakonzentration beträgt 0,25-1µg/ml. Propafenon wird in Tagesdosen von 1-2mg/kg KG i.v. (Aktutherapie) bzw. 450-900mg p.o (Rezidivprophylaxe) – aufgeteilt in drei Einzeldosen – verabreicht. Propafenon ist Mittel der ersten Wahl bei der Konversion und Rezidivprophylaxe von idiopathischem und hypertensiv bedingtem Vorhofflimmern (Lewalter und Lüderitz, 2000). Zudem wird es bei der Behandlung von ventrikulären Extrasystolen und Tachykardien eingesetzt (Kalusche, 1996; Beck und Hochrein, 1978; Arias et al., 2003). Präparate wie Cuxafenon<sup>®</sup> oder Rytmonorm<sup>®</sup> enthalten Propafenon und sind auf dem deutschen Markt erhältlich.
2. Flecainid (*N*-(2-Piperidinylmethyl)-2,5-bis(2,2,2-trifluoroethoxy)benzamid) wird seit 1982 vermarktet und ist – wie Propafenon – ein Klasse-IC-Antiarrhythmikum. Die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe beträgt fast 100%. Die Tagesdosis beträgt 1-2mg/kg KG i.v. (Aktutherapie) bzw. 100-200mg p.o. (Rezidivprophylaxe; aufgeteilt in 2 Einzeldosen), wobei Plasmakonzentrationen von 0,2-1µg/ml erreicht werden. Wie Propafenon ist es Mittel der ersten Wahl bei der Konversion und Rezidivprophylaxe von idiopathischem und hypertensiv bedingtem Vorhofflimmern (Lewalter und Lüderitz, 2000). Auch bei der Therapie von ventrikulären Extrasystolen und paroxysmalen supraventrikulären Herzrhythmusstörungen kommt Flecainid zum Einsatz. Aufgrund seines großen Indikationsbereiches wird es als „Breitspektrumantiarrhythmikum“ bezeichnet (Kalusche, 1996; Roden und Woosley, 1986). Das Produkt Tambocor<sup>®</sup> ist das Einzige auf dem deutschen Markt, welches als Wirkstoff Flecainid enthält.
3. Verapamil ( $\alpha$ -[3-[[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethyl]methylamino]propyl]-3,4-dimethoxy- $\alpha$ -(1-methylethyl)benzeneacetonitrile) ist ein Klasse-IV-Antiarrhythmikum. Die Tagesdosis beträgt 5-10mg/kg KG i.v. (Aktutherapie) bzw. 240-360mg p.o.

(Rezidivprophylaxe; aufgeteilt in drei Einzeldosen) (Lewalter und Lüderitz, 2000). Aufgrund seines hohen First-pass-Effektes liegt die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe lediglich bei 30%. Als Hauptindikationen gelten supraventrikuläre Reentrytachykardien sowie Vorhofflattern und -flimmern. Des Weiteren wird es zur Behandlung verschiedener Formen der koronaren Herzkrankheit (chronisch stabile, instabile und vasospastische Angina pectoris) sowie bei leichter bis mittelschwerer Hypertonie und hypertensiver Krise angewendet (Kalusche, 1996; Waters et al., 1981; Singh et al., 1983). Azupamil<sup>®</sup> und Isoptin<sup>®</sup> sind nur zwei von über 30 verschiedenen Produkten, die Verapamil als Wirkstoff enthalten und in Deutschland erhältlich sind.

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Zellen aus verschiedenen Regionen des Herzens einen unterschiedlichen Besatz an spannungsgesteuerten Kaliumkanälen aufweisen (Tristani-Firouzi et al., 2001; Bou-Abboud et al., 2000). Zudem hat das Wissen über unterschiedliche Kaliumströme am Herzen rapide zugenommen, und es ist heute nicht nur möglich, diese Ströme einzelnen Kaliumkanaltypen zuzuordnen (Bou-Abboud et al., 2000), sondern es lassen sich auch dezidierte Aussagen darüber treffen, welche Rolle den einzelnen Strömen bei der Ausbildung des kardialen Aktionspotentials zukommt (Snyders, 1999). Weiterhin sind die für derartige Ionenkanäle kodierenden Gene bekannt (Roden und Kupersmidt, 1999). Diese Fortschritte haben dazu geführt, dass mit Hilfe des Expressionssystems der Oozyte und anderen heterologen Expressionssystemen die Wirkung von Antiarrhythmika an einzelnen Kaliumkanaltypen untersucht werden kann, was im Wesentlichen folgende Vorteile hat:

1. Entwicklung neuer und spezifischer Antiarrhythmika. Die Untersuchung der Pharmakonwirkung auf einen einzelnen Kaliumkanal bietet den Vorteil, die jeweilige Substratspezifität zu untersuchen. In der Folge können Antiarrhythmika entwickelt werden, die ihre Wirkung selektiv an bestimmten Ionenkanälen entfalten. Zudem können unerwünschte Effekte an anderen Ionenkanälen im Sinne von Nebenwirkungen vermieden werden (Members of the Sicilian Gambit, 2001).
2. Charakterisierung der Wirkung vorhandener Antiarrhythmika. Eine gezielte Exprimierung von Ionenkanälen bietet den Vorteil, den Wirkmechanismus von Substanzen, die sich bereits in der klinischen Anwendung befinden, näher zu charakterisieren. Ergebnisse derartiger Versuche könnten die Frage beantworten,

ob die eingesetzte Substanz ihre Wirkung nur an einem Ionenkanal entfaltet, oder ob es zur Modulation verschiedener Kanäle kommt.

3. Testung der Bedeutung zusätzlicher, zellulärer Faktoren. In der Herzmuskelzelle lassen sich eine Reihe von biochemischen Vorgängen nachweisen, die die Funktion von Ionenkanälen modulieren können. Ein Beispiel hierfür ist das Vorhandensein zusätzlicher  $\beta$ -Untereinheiten an spannungsgesteuerten kardialen Kaliumkanälen (England et al., 1995). Durch eine gezielte Veränderung der genetischen Information ist es möglich, ihre elektrophysiologische Bedeutung für den einzelnen Kanal zu identifizieren und Konsequenzen für die Therapie von Arrhythmien zu ziehen.

Die Wirkung der Antiarrhythmika auf Kv2.1-Kaliumkanäle wurde im Expressionssystem der Xenopus-Oozyte untersucht. Dieses bietet im Wesentlichen drei Vorteile gegenüber anderen Expressionssystemen: 1. Xenopus-Oozyten weisen einen relativ großen Durchmesser auf, was einen Vorteil bei der praktischen Handhabung darstellt. 2. Sie sind mechanisch relativ unempfindlich. Diese Eigenschaft ist vor allem bei Versuchen von Nutzen, bei denen mehrere Elektroden in die Zelle eingestochen werden müssen (Madeja und Mußhoff, 1992). 3. Über die Injizierung von Boten-RNA (messenger-RNA, mRNA) kann der Besatz an Ionenkanälen gesteuert werden (Snutch, 1988; Wang et al., 1991). Hierdurch ist es möglich, die Eigenschaften nur eines Kanaltyps zu untersuchen. Als entscheidender Nachteil ist zu nennen, dass Oozyten im Vergleich zu anderen Zelllinien eine deutlich geringere Empfindlichkeit gegenüber Substanzen zeigen, die eine blockierende Wirkung an Kaliumkanälen entfalten (Madeja et al., 1997; Rolf et al., 2000).

Neben der Xenopus-Oozyte wurden in der Vergangenheit auch andere Expressionssysteme für elektrophysiologische Untersuchungen an Kaliumkanälen herangezogen. Ein häufig beschriebenes Expressionssystem stellen Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (Chinese hamster ovary, CHO) dar (Zhu et al., 1999; Madeja et al., 2003; Petersen und Nerbonne, 1999). Sie sind im Gegensatz zu Xenopus-Oozyten nicht von Hüllschichten umgeben und daher mechanisch wesentlich empfindlicher. Zudem weisen sie einen kleineren Durchmesser auf, weshalb sie sich für Versuche mit der Zwei-Elektroden-Voltage-clamp-Technik nur eingeschränkt eignen. In der Regel werden elektrophysiologische Untersuchungen im

CHO-Expressionssystem nur an isolierten Membranabschnitten (Patch-clamp-Technik) durchgeführt, sodass das intrazelluläre Milieu verändert oder zerstört ist.

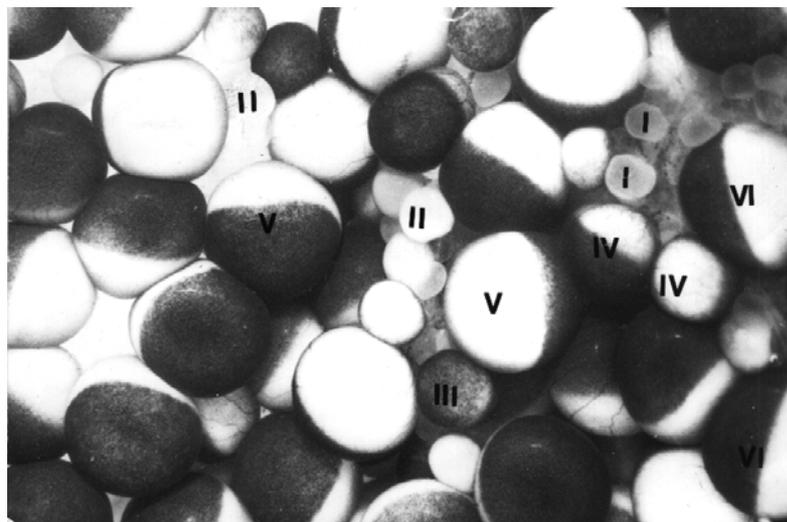
Prinzipiell besteht die Möglichkeit, elektrophysiologische Untersuchungen mit der Zwei-Elektroden-Voltage-clamp-Technik an Oozyten unterschiedlicher Präparationsart durchzuführen. So können neben Oozyten mit allen Hüllen auch defollikulierte Oozyten und Oozyten ohne Hüllen für derartige Versuche verwendet werden. Um eine Blockierung von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen zu erreichen, sind im Vergleich zur therapeutischen Plasmakonzentration im Oozyten-Expressionssystem etwa 100-fach höhere Konzentrationen der blockierenden Substanz notwendig. Madeja et al. fanden heraus, dass durch die Entfernung der Hüllschichten der Oozyte ihre Sensitivität gegenüber einigen Substanzen gesteigert werden kann (Madeja et al., 1997). Daraus wurde gefolgert, dass die Hüllschichten der Oozyte signifikante Fehler bei elektrophysiologischen Untersuchungen induzieren können. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Hüllschichten der Oozyte auf die Wirksamkeit der antiarrhythmisch wirksamen Substanzen Propafenon, Flecainid und Verapamil zu untersuchen. Ferner sollte damit geprüft werden, ob und in welcher Form das Expressionssystem der Oozyte geeignet ist, Angaben zu therapeutisch wirksamen Substanzkonzentrationen zu erarbeiten.

## 2. Methodik

### 2.1 Gewinnung und Kultivierung der Oozyten von *Xenopus laevis*

Für die Experimente wurden Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) verwandt. Dazu wurde ein Weibchen für 10 Minuten in ein mit einem Narkotikum (MS-222, 5 mmol/l, Sandoz) versehenes Tauchbad gelegt. Anschließend wurde ihm nach Eröffnung der Bauchhöhle ein kleines Stück vom Ovar entnommen (Madeja und Mußhoff, 1992). Mit wenigen Einzelknopfnähten wurden anschließend die Bauchhöhle und die Haut wieder verschlossen. Demselben Weibchen konnte nach einer Ruhephase von mindestens 2 Monaten erneut ein Teil des Ovars entnommen werden. Die tierexperimentellen Arbeiten wurden im Rahmen des Versuchsvorhabens „Experimentelle Epilepsieforschung“ vom Regierungspräsidenten Münster genehmigt (AZ 23.0835.1.0 (G 32/97) vom 23.10.1997).

Im Weiteren wurden nur die Oozyten herangezogen, die sich im Reifestadium V oder VI befanden, da sie sich wegen ihrer Größe leicht handhaben lassen und außerdem eine gute Expression injizierter RNA festzustellen ist. Zu erkennen war das Reifestadium sowohl am Durchmesser der Oocyte (etwa 1mm), als auch an der charakteristischen Pigmentierung ihrer beiden Zellpole (Goldin, 1992). Solche Oozyten wurden aus dem entnommenen Ovaranteil manuell vereinzelt (Dumont, 1972; Abb. 1).

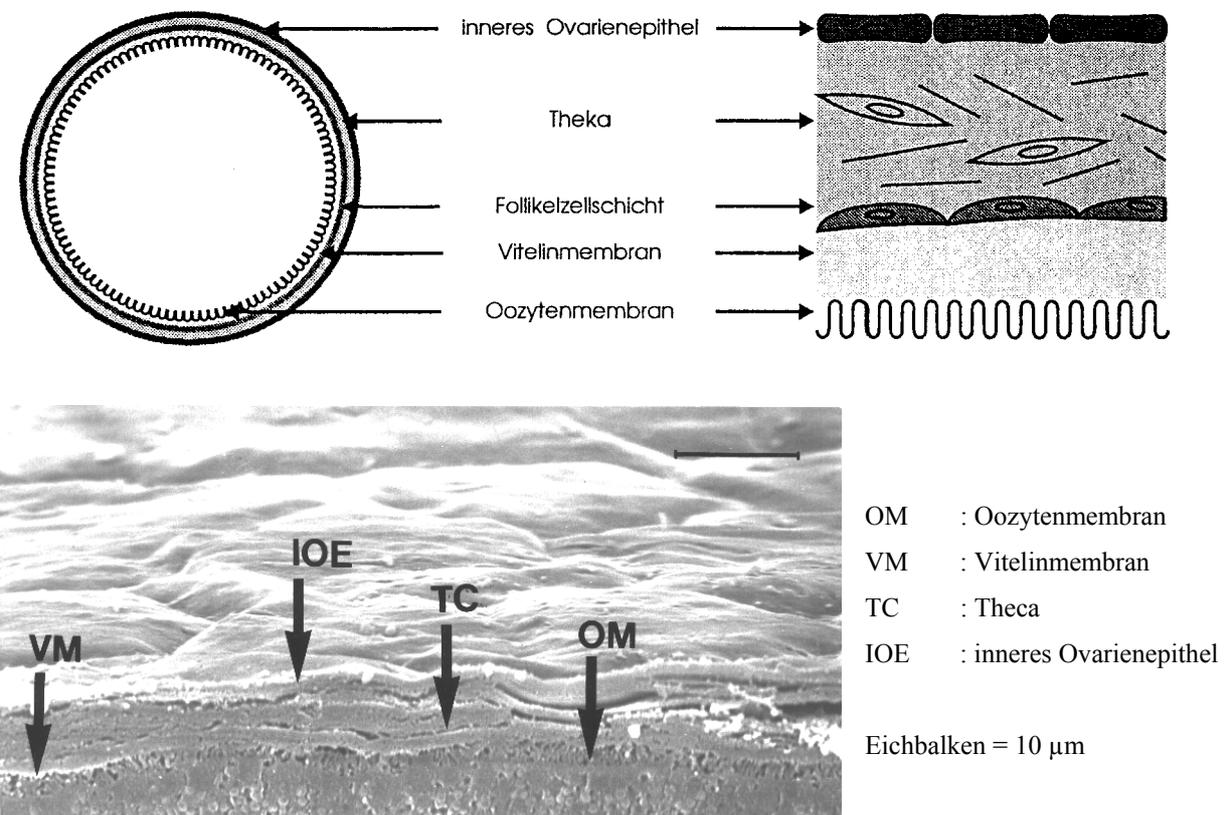


**Abb. 1:** Foto isolierter Oozyten unterschiedlicher Reifestadien von *Xenopus laevis*. Deutlich zu erkennen ist die Pigmentierung der beiden Zellpole im Reifestadium V und VI.

Bis zum Zeitpunkt der Untersuchung wurden die so gewonnenen Oozyten in mit einem Kulturmedium gefüllten Glasschälchen bei 20°C aufbewahrt (Stühmer, 1992).

## 2.2 Morphologie und Histologie der Oozyte von *Xenopus laevis*

Die Oozyten des Krallenfrosches sind von mehreren Hüllschichten umgeben (Dumont und Brummett, 1978), deren Einfluss auf den transmembranösen Kaliumstrom weiter unten diskutiert werden soll. Rein histologisch lassen sich vier zelluläre und azelluläre Schichten identifizieren (Abb. 2). Die äußerste Schicht bildet das sogenannte innere Ovarienepithel, ein einlagiges Plattenepithel. Unter dieser Schicht liegt die Theka, die vor allem aus Fibroblasten und Kollagenfasern besteht. An diese Schicht schließt sich nach innen wiederum ein einschichtiges Plattenepithel an, welches auch als Follikelzellschicht bezeichnet wird. Schließlich findet sich als innerste Hüllschicht die Vitelinmembran, eine der eigentlichen Zellmembran der Oozyte direkt aufliegende Hüllschicht.



**Abb. 2:** Hüllschichten der Oozyte. Schematische Querschnitte einer ganzen Oozyte (oben links) und eines Abschnittes der Hüllschichten (oben rechts). Unten: REM-Aufnahme der Hüllen.

## **2.3 Präparation der Hüllschichten**

Ein wichtiger methodischer Ansatz bei den Untersuchungen war die Präparation der einzelnen Hüllschichten. In einer ersten Versuchsreihe wurden alle Hüllschichten belassen. In einer zweiten Reihe wurden einige Stunden vor der Messung die äußeren Schichten (inneres Ovariene epithel, Theka und Teile der Follikelzellschicht) mit feinen Uhrmacherpinzetten abgezogen (Miledi und Woodward, 1989), so dass nur die Vitelinmembran und Teile der Follikelzellschicht auf der Oozyte verblieben. Schließlich wurden in einer dritten Versuchsreihe die direkt der Zellmembran aufliegende Vitelinmembran und eventuelle Reste der Follikelzellschicht entfernt. Um dieses zu erreichen, wurde die Oozyte kurz vor der Untersuchung in eine Kalium-Aspartat-Lösung gegeben und danach die Präparation mit Pinzetten durchgeführt. Somit erhielt man eine Oozyte, deren Membran frei lag.

## **2.4 Das Expressionssystem der Oozyte**

Neben den oben genannten Eigenschaften (Durchmesser, deutliche Pigmentierung), die die Oozyten des Krallenfrosches bezüglich ihrer praktischen Handhabung für elektrophysiologische Untersuchungen aufweisen, sind sie außerdem mechanisch wesentlich unempfindlicher als Nervenzellen, was vor allem bei Versuchen von Nutzen ist, bei denen mehrere oder größere Elektroden in die Zelle eingestochen werden müssen (Soreq, 1985; Dascal, 1987; Madeja und Mußhoff, 1992). Der entscheidende Vorteil der Xenopus-Oozyte besteht jedoch darin, dass über die Injizierung von Boten-RNA (messenger-RNA, m-RNA) der Besatz an Ionenkanälen gesteuert werden kann (Snutch, 1988; Wang et al., 1991).

Die genetische Information für entsprechende Ionenkanäle liegt im Zellkern von Neuronen als Desoxyribonukleinsäure (DNA) gespeichert vor. Über die mRNA für Ionenkanäle, die eine exakte Kopie der DNA darstellt, wird die Information aus dem Zellkern herausgeschleust und gelangt zum Proteinbiosyntheseapparat der Zelle. In diesem wird die genetische Information in Aminosäureketten umgesetzt, die nach weiterer Modifikation als Kanalmoleküle in die Zellmembran eingebaut werden.

Übertragen auf das Modell der Xenopus-Oozyte bietet sich nun folgendes Verfahren an:

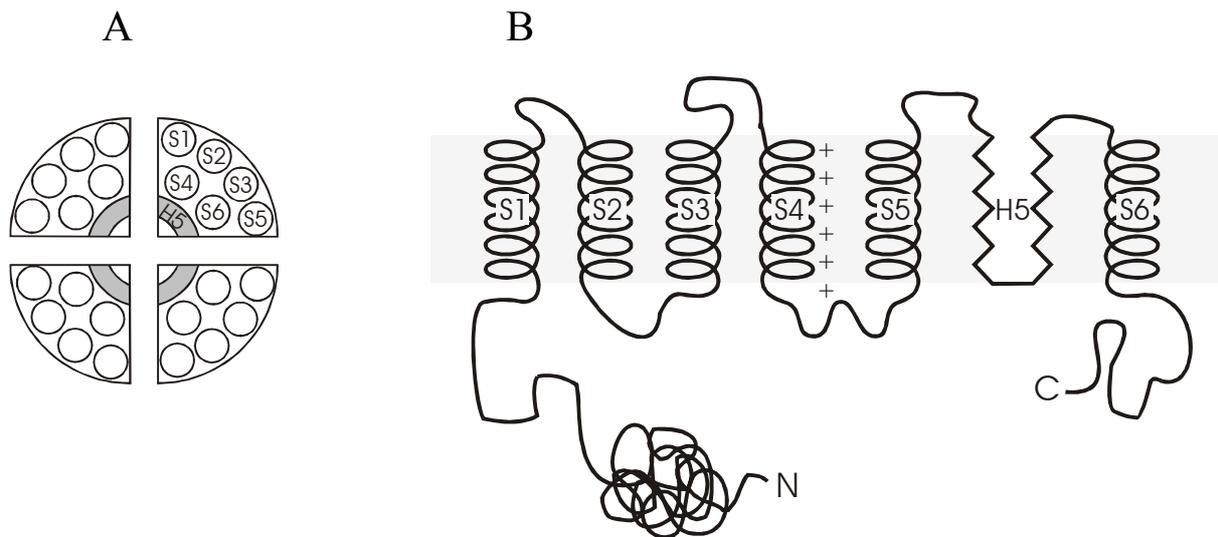
Isoliert man aus Nervenzellen entsprechende mRNA oder vervielfältigt sie durch Klonierungsstrategien, und injiziert man anschließend diese mRNA in die Oozyte, so werden mit Hilfe ihres Syntheseapparates Ionenkanäle auf- und diese letztendlich in ihre Zellmembran eingebaut. Mit dieser Methode kann im Extremfall nur ein einziger Typ eines Ionenkanals in der Membran der Oozyte exprimiert werden, was für die Auswertung und Interpretation der Versuche von großem Vorteil ist, da somit z.B. Reaktionen auf Pharmaka einzelnen Ionenkanaltypen zugeschrieben werden können.

## **2.5 Molekulare Struktur der Kaliumkanäle**

Aufgrund molekularbiologischer Untersuchungsmethoden ist mittlerweile nicht nur die genetische Sequenz, sondern auch die Struktur von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen bekannt. Allein bei Säugetieren kodieren mindestens 22 verschiedene Gene die Information dieser Kanäle, wobei durch genetische Rekombinationsmöglichkeiten eine zusätzliche Vielfalt erreicht werden kann (Yellen, 2002).

Die Erkenntnisse aus elektrophysiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen haben zur Entwicklung eines Modells über den Aufbau spannungsgesteuerter Kaliumkanäle geführt (Miller, 1991; Li et al., 1992; Pongs, 1992), welches in Abbildung 3 dargestellt ist und im Weiteren näher erläutert werden soll.

Diesem Modell zufolge ist der Kaliumkanal aus Polypeptid-Untereinheiten aufgebaut, die aus mehreren hundert Aminosäuren zusammengesetzt sind (Pongs, 1992). Aufgrund der Tatsache, dass jedes dieser Polypeptide in etwa ein Viertel der Größe der Proteine für spannungsgesteuerte Natrium- oder Kalziumkanäle besitzt, vermutet man, dass vier identische Polypeptide die eigentliche Pore des Kaliumkanals bilden (Noda et al., 1986; Mori et al., 1991; Covarrubias et al., 1991). Möglicherweise stammen sie aber auch von verschiedenen Genen und bilden dann heteromere Kaliumkanäle mit neuartigen Eigenschaften (Ruppersberg et al., 1990).



**Abb. 3:** Modell zur molekularen Struktur der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle. A: Aufbau des Kaliumkanals aus vier Untereinheiten mit jeweils sechs transmembranösen Regionen. Die grau gerasterten Bereiche stellen die H5 Region dar. B: Aufbau einer Untereinheit aus einer Polypeptidkette, die in die Zellmembran eingelagert ist. S1 bis S6: transmembranöse Regionen. H5: Bereich der Polypeptidkette, der die eigentliche Wand der Pore bildet. C und N: Carboxyl- und Amino-Ende der Aminosäurekette.

Jede Polypeptid-Untereinheit stellt eine Aminosäurekette dar, die an sechs Stellen die Zellmembran durchquert (Abb. 3-B). Anhand von Hydrophobie-Profilen konnte gezeigt werden, dass an jeder Aminosäurekette sechs hydrophobe Bereiche existieren. Diese Bereiche besitzen Vermutungen zufolge aufgrund ihrer Hydrophobie und Länge eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur und sind wahrscheinlich in die Zellmembran eingelagert (Miller, 1991; Li et al., 1992; Pongs, 1992). Diese so angeordneten sechs hydrophoben Bereiche der Polypeptidkette werden als transmembranöse Regionen S1 bis S6 bezeichnet.

Daneben existiert in der Aminosäurekette ein Bereich, der aufgrund seiner Länge und schwach hydrophoben Eigenschaft z.B. als  $\beta$ -Faltblattstruktur vorliegen könnte. Vermutlich ist dieser Bereich aber helikal im äußeren Abschnitt in die Zellmembran eingelagert (Miller, 1991). Darauf deuten zumindest Röntgenstrukturanalysen eines verwandten Kanals hin (Doyle et al., 1998). Dieses Segment wird als H5-Region bezeichnet und liegt zwischen der S5 und S6-Region. Wahrscheinlich bildet die H5-Region einen Teil der eigentlichen Wand der Pore des Kaliumkanals, da durch einen gezielten Austausch von Aminosäuren in diesem Bereich sowohl die Leitfähigkeit des Ionenkanals als auch die Blockierbarkeit durch Substanzen, die an der Pore selbst angreifen, verändert werden kann (MacKinnon und Yellen, 1990).

Des Weiteren wird der Spannungssensor der Kaliumkanäle im Bereich des transmembranösen Segmentes S4 vermutet (Jan und Jan, 1992), da die Polypeptidkette dort aus positiv geladenen Aminosäuren an jeder dritten oder vierten Stelle aufgebaut ist. Diese charakteristische Sequenz wurde bisher ausschließlich an spannungsgesteuerten Ionenkanälen gefunden (Noda et al., 1986; Tanabe et al., 1987). Außerdem führen Mutationen der S4-Region zu Veränderungen der Spannungsabhängigkeit des Kanals (Papazian et al., 1991).

Die Enden der Polypeptidkette liegen vermutlich beide intrazellulär (Li et al., 1992; Pongs, 1992). Das N-terminale Ende ist bei Kaliumkanälen, die nach Öffnung des Kanals sehr schnell wieder inaktivieren, lang und zu einer ballartigen Struktur zusammengelagert. Diesem N-Terminus scheint die entscheidende Rolle bei der Inaktivierung zuzukommen. Versuche, bei denen diese ballartige Struktur abgetrennt wurde, führten dazu, dass die schnelle Inaktivierung des Kanals aufgehoben wurde. Außerdem verfügen die langsam inaktivierenden Kaliumkanäle nicht über eine derartige Struktur, was ebenfalls diese Vermutung unterstützt (Hoshi et al., 1990; Zagotta und Aldrich, 1990). Öffnet sich nun der Kanal, so werden vermutlich Bindungsstellen für diese ballartige Struktur frei. Nach dem Ball-and-Chain-Modell, welches von Bezanilla und Armstrong bereits 1977 formuliert wurde, lagert sich die o.g. Struktur innerhalb von Millisekunden in die Pore ein, was zum Verschluss des Kanals führt (Bezanilla und Armstrong, 1977).

## **2.6 Gewinnung und Injektion der RNA in die Oozyten**

Grundsätzlich bestehen zwei verschiedene Möglichkeiten zur Expression von Membranproteinen in Oozyten von *Xenopus laevis*. Die erste Möglichkeit besteht darin, die für einen Membrankanal kodierende genetische Information in Form von DNA direkt in den Zellkern der Oozyte zu injizieren. Über den Weg der Transkription in mRNA und Translation kann es nach posttranslationaler Modifikation zum Einbau der gebildeten Kanalmoleküle in die Biomembran kommen. Der zweite Weg besteht in der Umgehung der Transkription durch Injektion der mRNA in den Zellkern. Translation und posttranslationale Modifikation bleiben in ihrem Ablauf unverändert. Die benötigte mRNA wird als Copy-RNA (cRNA) aus klonierter DNA (cDNA) gewonnen (s. 2.6.1). Aus Gründen der Einfachheit wurde bei Versuchen dieser Arbeit das letztgenannte Verfahren angewendet.

### **2.6.1 Gewinnung der cRNA**

Durch das Verfahren der in-vitro-Transkription besteht die Möglichkeit, eine für ein bestimmtes Protein kodierende cDNA in eine komplementäre cRNA-Sequenz umzuschreiben (Melton et al., 1984; Krieg und Melton, 1987; Sigel, 1990). Dieses Verfahren soll im Folgenden kurz beschrieben werden:

Bei einer Temperatur von 37°C wird die für den Kaliumkanaltyp Kv2.1 kodierende cDNA mit den Nukleotiden ATP, GTP, CTP und UTP, der Startsequenz m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (McCaman et al., 1988), dem Ribonukleaseinhibitor Rnasin und dem Enzym SP6 RNA-Polymerase inkubiert. Zur Beendigung der cRNA-Synthese wird das Enzym DNase I zugegeben, welches die Hydrolyse der cDNA herbeiführt. Die gewonnene cRNA wird mit Ethanol ausgefällt und zur Vermeidung der Paarung komplementärer Sequenzen kurz hitzedenaturiert. Zur Verkürzung des Expressionsvorgangs kann die posttranslationale Modifikation durch Anheftung der Kopfgruppe 7-Methylguanosin an die cRNA und Polyadenylierung ihres 3'OH-Endes umgangen werden. Dieses Vorgehen bewirkt eine Stabilisierung der RNA und steigert zudem den Expressionsgrad in der Oozyte (Sippel, 1973; Littauer und Soreq, 1982; Galili et al., 1988; Swanson et al., 1990). Die gewonnene cRNA kann bis zu ihrer Verwendung bei -20°C aufbewahrt werden.

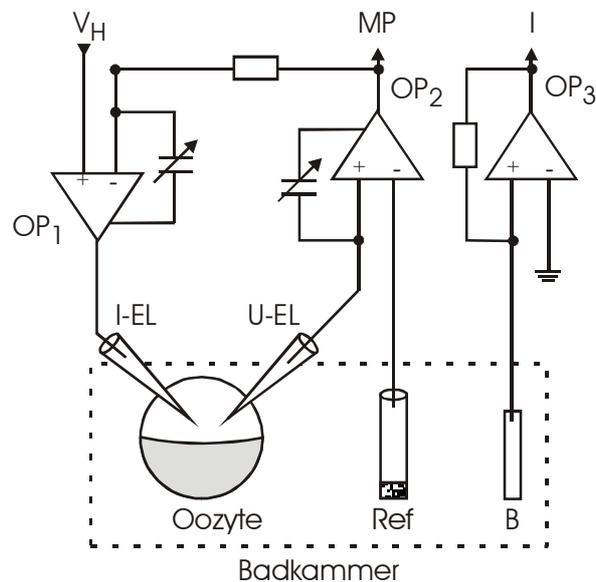
### **2.6.2 Injektion der cRNA in die Oozyten**

Mit einem Elektrodenziehgerät werden Mikrokapillaren mit einem Spitzendurchmesser von 1µm aus Borosilikatglasröhrchen gezogen. Nach Zurückbrechen der Kapillarenspitze auf einen Durchmesser von etwa 8-12µm wird die Kapillare mit der cRNA-Lösung gefüllt und an eine Druckluftleitung angeschlossen. Die zu injizierende Oozyte wird zur besseren Fixierung in die Mulde eines Plexiglasblocks gelegt und anschließend mit der Mikrokapillare angestochen. Unter Sichtkontrolle kann nun bei bekanntem Innendurchmesser der Kapillare anhand der Beobachtung der Absenkung des Flüssigkeitsmeniskus mit Hilfe eines Druckpulses von 0,5-2bar eine definierte Menge der cRNA-Lösung injiziert werden. Für die Versuche dieser Arbeit wurde eine Menge von 0,01ng cRNA pro Oozyte eingebracht.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen nach der Voltage-Clamp-Methode wurden jeweils 4 Tage nach der Injektion durchgeführt, um die ausreichende Expressierung von Kaliumkanälen zu gewährleisten. Außerdem wurden so die Bedingungen innerhalb einer Versuchsreihe gleich gehalten, um Effekte des Zeitverlaufs der Expression zu vermeiden.

## 2.7 Elektrophysiologische Untersuchung

Um die Funktion der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle zu analysieren, wurden die transmembranösen Ionenströme gemessen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Ionenströme an der gesamten Zelle untersucht. Das Verfahren ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt.



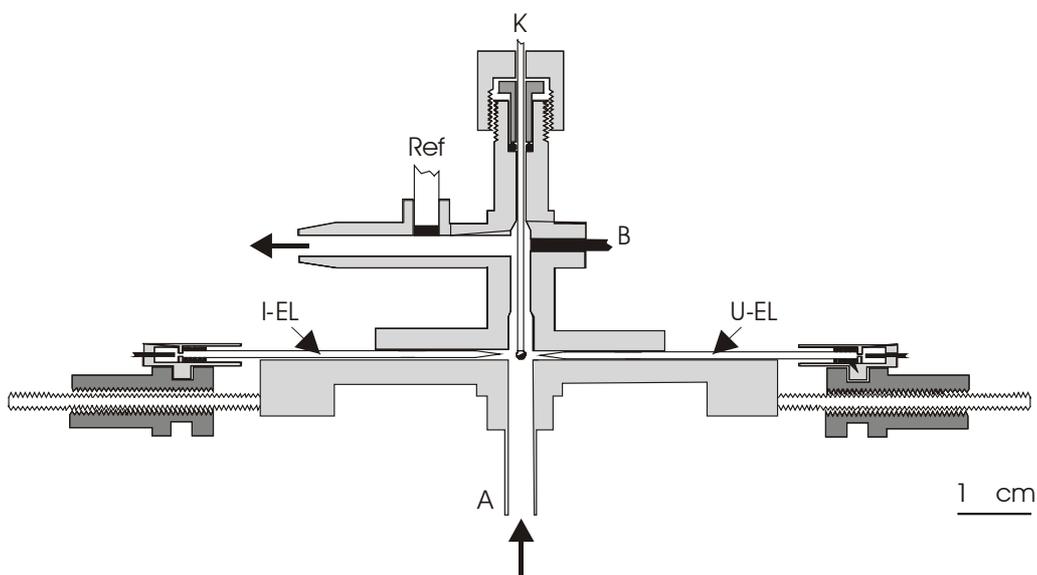
**Abb. 4:** Blockschaltbild zum elektrophysiologischen Versuchsaufbau der Voltage-Clamp-Technik. I-EL: Stromelektrode. U-EL: Spannungselektrode. B: virtuelle Baderde. Ref.: extrazelluläre Referenzelektrode. OP<sub>1</sub>: Operationsverstärker zur Einstellung des Haltepotentials ( $V_h$ ). OP<sub>2</sub>: Operationsverstärker zur Messung des Membranpotentials (MP). OP<sub>3</sub>: Operationsverstärker zur Messung des injizierten Stromes (I).

Um eine wechselseitige Beeinflussung von Membranpotential und transmembranösen Ionenströmen zu vermeiden, wurde die Messung der Ionenströme bei konstant gehaltenem Membranpotential durchgeführt. Diese Versuchsanordnung wird auch als Voltage-Clamp-Methode bezeichnet, da ihr das Prinzip der Spannungsklemme zugrunde liegt (Hodgkin et al., 1952). Für die Voltage-Clamp-Technik wurden Elektroden mit einem Spitzendurchmesser unter  $1\mu\text{m}$

verwendet. Hierzu wurden Borosilikatglas-Kapillaren mit einem Außendurchmesser von 1,5mm und einem Innendurchmesser von 0,9mm mit Hilfe eines Elektrodenziehgerätes ausgezogen. Die so gewonnenen Mikroelektroden wurden mit einer 2mol/l KCl-Lösung gefüllt.

Als Spannungselektroden wurden Elektroden mit einem Widerstand von 1,3-2M $\Omega$  verwendet, die Stromelektroden hatten einen Widerstand von 0,5-0,7M $\Omega$ . Die Spannungs- und die Stromelektrode (I-EL, U-EL, s. Abb. 4) konnten nun über Silberdrähte mit dem Eingang des Verstärkers verbunden werden.

Zur sicheren Fixierung der Elektroden und der zu untersuchenden Oozyte diente eine Plexiglashalterung, welche schematisch in Abbildung 5 dargestellt ist. Die Oozyte wurde an der Öffnung einer Kapillare mit leichtem Unterdruck fixiert und zwischen den beiden Messelektroden platziert. Über einen Schraubenmechanismus bestand so die Möglichkeit, die Elektroden kontrolliert in die Oozyte einzustechen.



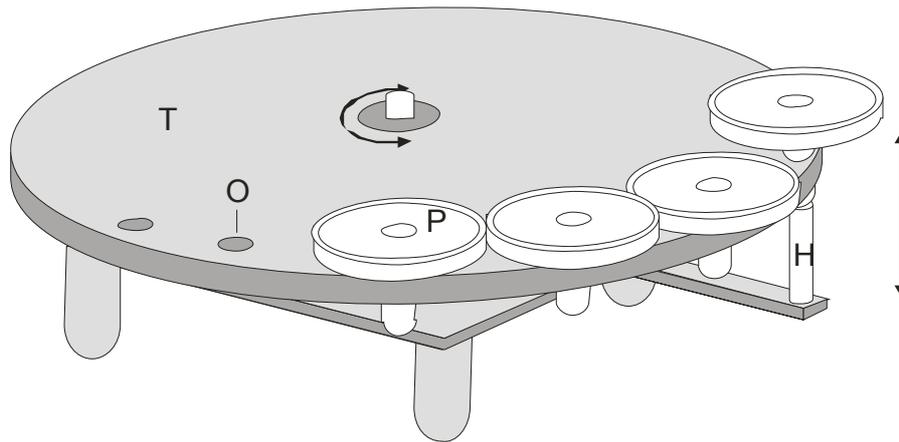
**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Plexiglashalterung zur sicheren Fixierung der Elektroden und der zu untersuchenden Oozyten. I-EL: Stromelektrode; U-EL: Spannungselektrode; Ref.: extrazelluläre Referenzelektrode; B: virtuelle Baderde; K: Kapillare; A: Ansaugröhrchen. Erläuterungen im Text.

Das Ruhemembranpotential wurde als Potentialdifferenz zwischen dem Intrazellulärraum und einer extrazellulären Referenzelektrode (Ref.) über die Spannungselektrode (U-EL) abgegriffen und mit Hilfe des 1. Operationsverstärkers (OP-1) verstärkt. Zu diesem Zeitpunkt kam es vom Betrag her nicht zu einem Ionenfluss über die Membran, d.h. der transmembranöse Ionenstrom war konstant null. Dieser Modus wird auch als Current-Clamp-Modus bezeichnet. Beim Umschalten in den Voltage-Clamp-Modus wurde über die Stromelektrode so viel Strom in die Zelle injiziert, um diese konstant auf einem Membranpotential von  $-80\text{mV}$  zu halten (Haltepotential,  $V_h$ ). Um dieses zu erreichen, ist eine Kopplung beider Elektroden nötig, die über die Verbindung des Verstärkers der Spannungselektrode (OP-1) und des Verstärkers der Stromelektrode (OP-2) erreicht wird. Dadurch war es nun möglich, eventuell auftretende Abweichungen des Membranpotentials vom Haltepotential ( $-80\text{mV}$ ) durch eine entsprechende Injektion von Strom auszugleichen. Der Betrag an Strom, der zur Aufrechterhaltung des vorgegebenen Potentials in die Zelle injiziert werden muss, ist der aufgezeichnete Parameter, der dem transmembranösen Ionenfluss entspricht.

Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten, den injizierten Strom zu messen. Der erste Weg besteht darin, den Stromfluss mithilfe der Stromelektrode zu registrieren. Eine andere Möglichkeit stellt die Verwendung einer virtuellen Baderde dar, welche an einen Operationsverstärker angeschlossen ist (Stühmer, 1992). Das letztgenannte Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit angewendet (Abb. 4).

## **2.8 Extrazelluläre Substanzapplikation**

Die Versuchsapparatur bestand aus zwei Elementen. Die Plexiglashalterung, mit der die Oozyte fixiert und angestochen werden konnte, wurde bereits oben beschrieben. Das zweite Element ist in Abbildung 6 wiedergegeben. Die Probenschälchen (P) mit den Lösungen unterschiedlicher Konzentration waren in Bohrungen (O) innerhalb des Kunststoffellers (T) angebracht und konnten mit dessen Hilfe in Richtung Oozyte bewegt werden. Die Besonderheit des Kunststoffellers lag darin, dass er sich mit einem Elektromotor drehen ließ und die am Rande des Drehtellers platzierten Probenschälchen über einen Hebelmechanismus (H) einzeln anzuheben waren.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur extrazellulären Substanzapplikation. H: Hebelmechanismus zum Anheben eines Probenschälchens (P); T: Kunststoffteller; O: Öffnung im Kunststoffteller zur sicheren Fixierung des Probenschälchens.

Beim Anheben eines Schälchens tauchte nun die senkrechte Röhre der Plexiglashalterung (A in Abb. 5) in die Probenlösung ein. Ein Computerprogramm sorgte anschließend durch das Öffnen eines Magnetventils für das Ansaugen der Lösung mit einem Unterdruck von etwa 10kPa. Die in der Plexiglashalterung fixierte und mit Spannungs- und Stromelektrode angestochene Oozyte konnte dadurch mit verschiedenen Lösungen umspült werden.

Auf dem Kunststoffteller befanden sich insgesamt fünf Schälchen, wobei das erste mit einer Oozyten-Ringer-Lösung (Kontrolllösung, Zusammensetzung s. Tabelle 1), die nachfolgenden mit einer 1 $\mu$ mol/l, 10 $\mu$ mol/l, 100 $\mu$ mol/l und 1000 $\mu$ mol/l-Lösung der jeweils zu untersuchenden Substanz (Propafenon, Flecainid oder Verapamil) gefüllt waren.

## 2.9 Verwendete Lösungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl an Oozyten mit allen Hüllen, an defollikulierten Oozyten sowie an Oozyten ohne Hüllen elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt (siehe 2.3). Der hemmende Einfluss antiarrhythmisch wirksamer Pharmaka auf Kv2.1-Kaliumkanäle von Oozyten unterschiedlicher Präparationsart wurde anhand der Substanzen Propafenon, Flecainid und Verapamil exemplarisch untersucht.

Zur Kultivierung der Oozyten wurde ein modifiziertes Barth-Medium verwendet (Barth und Barth, 1959). Die Zusammensetzung dieses Mediums kann aus der untenstehenden Tabelle entnommen werden. Um eine bakterielle Infektion während der Kultivierung zu vermeiden, wurden der Basislösung die antimikrobiellen Substanzen Penicillin (100 IE/l) und Streptomycin (100µg/ml) zugesetzt.

Wie schon erwähnt, wurden bei den elektrophysiologischen Untersuchungen die Mikroelektroden mit 2 mol/l KCl gefüllt. Als Kontrolllösung diente eine Oozyten-Ringer-Lösung, deren genaue Zusammensetzung ebenfalls in der Tabelle zusammengestellt ist. Die Substanzen Propafenon, Flecainid und Verapamil wurden der Lösung in Mengen zugesetzt, dass 1µmolare, 10µmolare, 100µmolare oder 1000µmolare Lösungen entstanden.

**Tabelle1:** Zusammensetzung des modifizierten Barth-Mediums und der Ringer-Kontrolllösung in mmol/l.

	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Hepes	pH
<b>Barth</b>	88	1	0,7	0,8	89,9		0,6	0,8		5	7,4
<b>Ringer</b>	117,4	2	2		121	2,4				5	7,4

## 2.10 Datenauswertung

Vor der Applikation des eigentlichen Kommandopotentials (+40mV) wurde eine Leckstromkorrektur durchgeführt. Hierzu wurde die sogenannte P/4-Methode angewendet. Bei diesem Verfahren werden vier kleine Hyperpolarisationen auf -90mV erzeugt. Diese Hyperpolarisation entspricht etwa einem Zwölftel der Spannungsdifferenz, die in umgekehrter Richtung beim Sprung auf das Potential von +40mV appliziert wird. Die bei der Hyperpolarisation resultierenden Stromantworten werden mit Hilfe eines Computerprogramms (TL-1-125 Interface und pCLAMP Programm, Axon Instruments) gemittelt, invertiert und mit dem Faktor zwölf multipliziert. Anschließend wird dieser Wert als Ausdruck der passiven Antwort der Membran (Leckstrom) von der Gesamtstromamplitude subtrahiert, so dass die eigentlich aktive Antwort, d.h. der Ionenstrom durch Öffnung der Kaliumkanäle, übrig bleibt (Bezanilla und Armstrong, 1977; Numberger und Draguhn, 1996).

Die Ionenströme durch die Kaliumkanäle wurden mit einem Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Verstärker registriert und mit einer oberen Grenzfrequenz von 1 kHz gefiltert (Turbo TEC 01C Clamp System, NPI Electronic).

Nach der grafischen Aufzeichnung des transmembranösen Kaliumstromes für jede Konzentration (Kontrolle, 1µmol/l, 10µmol/l, 100µmol/l, 1000µmol/l) konnte mit demselben Computerprogramm u.a. der Spitzenwert für den transmembranösen Strom (maximale Stromamplitude,  $I_{max}$  (in µA)) abgegriffen werden.

Mit Hilfe eines zweiten Computerprogramms (Sigma Plot, Jandel Scientific) wurde für jede Substanz die Konzentration der halbmaximalen Hemmung ( $IC_{50}$ ) beim Kanal Kv.2.1 bestimmt. Dazu wurde die modifizierte Hill-Gleichung  $y = (IC_{50}/[D])^n / (1 + (IC_{50}/[D])^n)$  benutzt, wobei  $y$  den Anteil der Amplitude des maximalen Ionenstromes unter Kontrollbedingungen darstellt,  $[D]$  die Konzentration der Substanz und  $n$  den Hill-Koeffizienten, der hier auf 1 gesetzt wurde, da davon ausgegangen wurde, dass an jedem Kanalprotein genau eine Bindungsstelle für das entsprechende Pharmakon existiert. Bei den Berechnungen wurde im ersten Ansatz für jeden Versuch der  $IC_{50}$ -Wert bestimmt und daraus für jede Kanal- und Substanzkombination der Mittelwert der  $IC_{50}$ -Werte berechnet. Im zweiten Ansatz wurde aus den relativen Werten der Stromamplituden für jede Konzentration der Mittelwert gebildet und dann die Mittelwerte mit der modifizierten Hill-Gleichung gefittet. Somit wurde im ersten Ansatz der Mittelwert der  $IC_{50}$ -Werte und im zweiten der  $IC_{50}$ -Wert der Mittelwerte berechnet. Zur Klärung, ob zwischen den Mittelwerten zweier Versuchsreihen eine statistische Signifikanz vorliegt, wurde der t-Test mit Hilfe des Computerprogramms InStat (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt.

### **3. Ergebnisse**

Der Ergebnisteil stellt die Wirkung der drei antiarrhythmisch wirksamen Substanzen Propafenon, Flecainid und Verapamil auf Kv2.1-Kaliumkanäle im Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyte dar. Dabei wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Substanzwirkungen anhand der reduzierenden Wirkung auf die Ionenströme in Oozyten dreier unterschiedlicher Präparationen (mit allen Hüllschichten, defollikuliert, ohne alle Hüllschichten) untersucht. Anhand der Stromabnahmen unter den verschiedenen Substanzkonzentrationen wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt, die die Konzentration der halbmaximalen Hemmung ( $IC_{50}$ ) ergaben.

In diesem Teil der Arbeit werden die Untersuchungen zu jeder Substanz nacheinander abgehandelt. Jeder Abschnitt über die Wirkung des Antiarrhythmikums beginnt mit der Darstellung von individuellen Versuchen mit Originalabbildungen und den zugehörigen Dosis-Wirkungs-Kurven bei den drei verschiedenen Präparationszuständen der Oozyte. Danach folgt eine Darstellung der Mittelwertsergebnisse anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve der Mittelwerte der Stromabnahmen aller Versuche jeweils wieder für Oozyten mit allen Hüllen, defollikulierte Zellen und Oozyten ohne alle Hüllen. Der Abschnitt wird abgeschlossen durch eine zusammenfassende Tabelle und mit der Darstellung der statistischen Signifikanz der Unterschiede zwischen den Ergebnissen der drei Präparationsformen der Oozyten.

#### **3.1 Propafenon**

Mit dem als Antiarrhythmikum eingesetzten Pharmakon Propafenon wurden insgesamt 37 Versuche an Oozyten durchgeführt, wobei in 12 Versuchen Oozyten mit allen Follikelzellschichten herangezogen wurden. Weitere 14 Versuche entfielen auf Oozyten, denen die äußeren Schichten (inneres Ovarieneithel, Theka und Teile der Follikelzellschicht) entfernt wurden. An 11 Oozyten gelang nach Entfernung der Vitelinmembran die elektrophysiologische Untersuchung.

### 3.1.1 Oozyten mit allen Hüllen

Abbildung 7 gibt drei exemplarische elektrophysiologische Untersuchungen (A-C) mit Propafenon wieder. Ausgehend von einem Haltepotential von  $-80\text{mV}$  wurden Spannungssprünge auf jeweils  $+40\text{mV}$  vorgenommen. Dies wurde zunächst so lange wiederholt, bis das Stromniveau konstant blieb. Danach wurde die Propafenonkonzentration von  $1$  auf  $1000\mu\text{mol/l}$  gesteigert. Die jeweils linke Spalte zeigt dabei die Originalregistrierung, die rechte die aus dieser Registrierung erstellte Dosis-Wirkungs-Kurve. Da es in verschiedenen Oozyten trotz konstanter Menge an injizierter cRNA ( $0,01\text{ng}$  pro Zelle) zu unterschiedlich starker Expressierung der Kaliumkanäle kommen kann, und diese Tatsache direkten Einfluss auf die Größe des transmembranösen Kaliumstroms hat, wurden die Stromwerte jeweils auf den Wert unter Kontrollbedingungen normiert.

Man erkennt, dass der hemmende Effekt des Propafenons erst bei einer Konzentration von  $100\mu\text{mol/l}$  und  $1000\mu\text{mol/l}$  deutlich zutage tritt. Die Stromkurven der Kontrolllösung und der für Propafenon bei einer Konzentration von  $1\mu\text{mol/l}$  überlagern sich häufig, der hemmende Effekt ist bei  $10\mu\text{mol/l}$  nur schwach ausgeprägt.

Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte betragen bei diesen drei Versuchen  $199\mu\text{mol/l}$  (A),  $170\mu\text{mol/l}$  (B) und  $169\mu\text{mol/l}$  (C). Der Mittelwert der  $\text{IC}_{50}$ -Werte aller 12 Versuche betrug  $216 \pm 107\mu\text{mol/l}$ . Bei den 12 Oozyten ergab die Propafenonkonzentration von  $1\mu\text{mol/l}$  relativ zum Kontrollwert eine Stromamplitude von  $0,99 \pm 0,02$ , für  $10\mu\text{mol/l}$   $0,95 \pm 0,03$ , für  $100\mu\text{mol/l}$   $0,63 \pm 0,10$  und für  $1000\mu\text{mol/l}$   $0,21 \pm 0,06$  (siehe auch Tabelle 2). Die Dosis-Wirkungs-Kurve, die anhand dieser Mittelwerte errechnet wurde, ist in Abbildung 8 dargestellt. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert dieser Dosis-Wirkungs-Kurve der Mittelwerte betrug  $194\mu\text{mol/l}$ .

### 3.1.2 Defollikulierte Oozyten

Analog zu Abbildung 7 gibt Abbildung 9 wiederum drei ausgewählte elektrophysiologische Untersuchungen (A-C) wieder, bei denen der Einfluss von Propafenon an defollikulierten Oozyten geprüft wurde. Die Durchführung der Versuche erfolgte auf die bereits unter 3.1.1 beschriebene Weise. Die Konzentration des Pharmakons ( $1 - 1000\mu\text{mol/l}$ ) wurde ebenfalls beibehalten.

Der hemmende Effekt des Propafenons tritt deutlich bei Konzentrationen von 100 und 1000 $\mu\text{mol/l}$  auf, während er bei 10 $\mu\text{mol/l}$  schwach ausgeprägt ist. Die Stromkurven der Kontrolllösung und für Propafenon bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$  überlagern sich nahezu.

Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der dargestellten Versuche betragen 152 $\mu\text{mol/l}$  (A), 118 $\mu\text{mol/l}$  (B) und 143 $\mu\text{mol/l}$  (C). Die Berechnung des Mittelwertes der  $\text{IC}_{50}$ -Werte aller 14 Versuche ergab  $151 \pm 17\mu\text{mol/l}$ . Bei diesen 14 Versuchen wurde wiederum die relative Stromamplitude - bezogen auf den Kontrollwert - berechnet. Sie betrug für 1 $\mu\text{mol/l}$   $0,99 \pm 0,05$ , für 10 $\mu\text{mol/l}$   $0,92 \pm 0,06$ , für 100 $\mu\text{mol/l}$   $0,54 \pm 0,10$  und für 1000 $\mu\text{mol/l}$   $0,21 \pm 0,06$  (siehe auch Tabelle 2). Abbildung 10 zeigt die anhand dieser Werte errechnete Dosis-Wirkungs-Kurve. Bei dieser Versuchsreihe betrug der  $\text{IC}_{50}$ -Wert der Mittelwerte 136 $\mu\text{mol/l}$ .

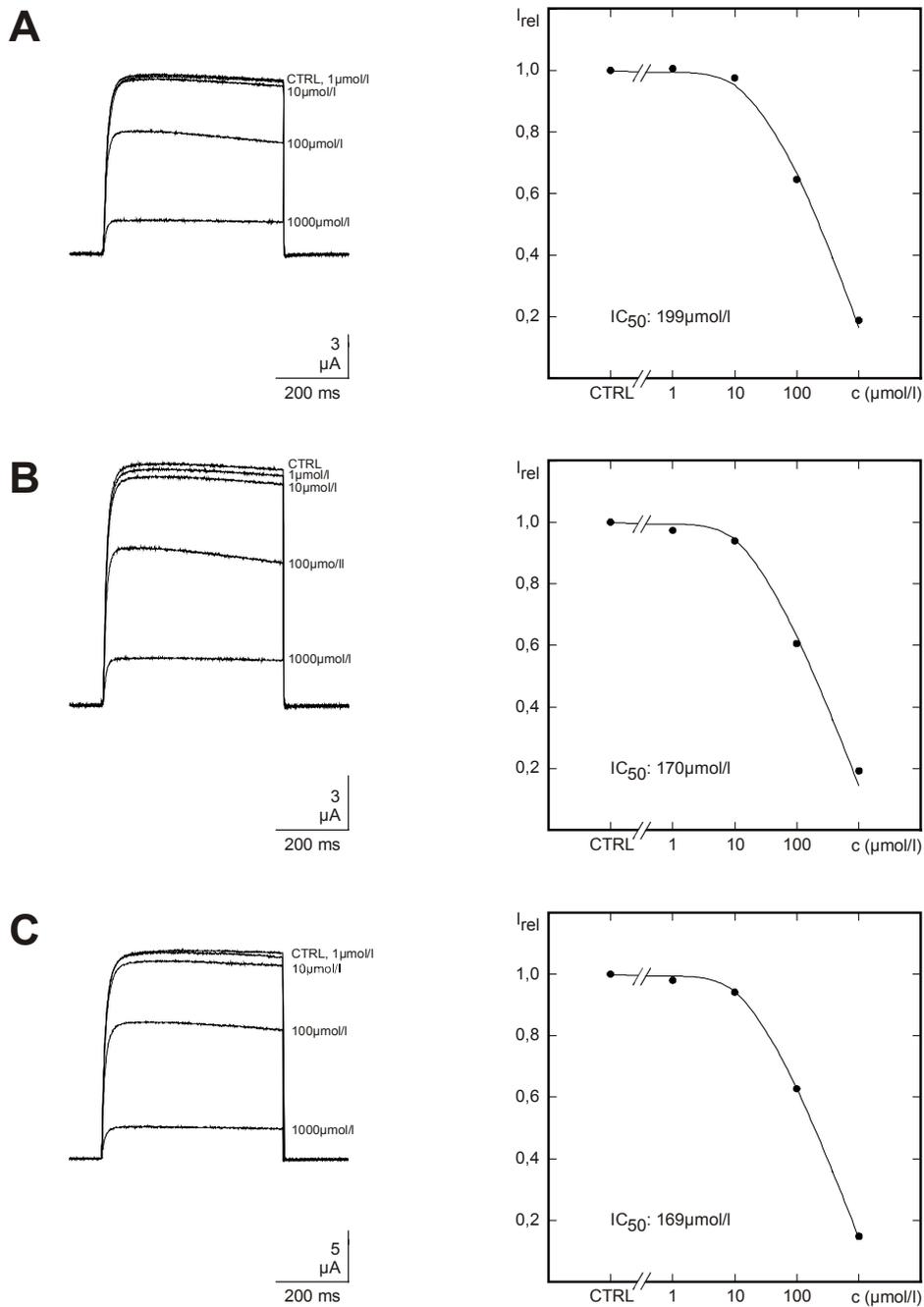
### 3.1.3 Oozyten ohne Hüllen

Abbildung 11 zeigt exemplarisch drei Originalregistrierungen einer Versuchsreihe, der Oozyten ohne Hüllen zugrunde liegen. Insgesamt konnten an 11 derart präparierten Oozyten elektrophysiologische Untersuchungen mit Propafenon durchgeführt werden. Die Durchführung der Versuche folgte dem unter 3.1.1 beschriebenen Schema.

Auch in dieser Versuchsreihe liegen die Stromkurven der Kontrolllösung und für 1 $\mu\text{mol/l}$  übereinander. Der hemmende Effekt des Propafenons zeigt sich wieder deutlich bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$  und 1000 $\mu\text{mol/l}$ . Bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$  ist dieser Effekt schwächer ausgeprägt. Im Vergleich zur Kontrolllösung und einer Propafenonkonzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$  erkennt man jedoch bereits bei 10 $\mu\text{mol/l}$  eine deutliche Abnahme des transmembranösen Kaliumstroms.

Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Versuche in Abbildung 11 betragen 90 $\mu\text{mol/l}$  (A), 96 $\mu\text{mol/l}$  (B) und 98 $\mu\text{mol/l}$  (C). Der Mittelwert der  $\text{IC}_{50}$ -Werte dieser Versuchsreihe betrug  $91 \pm 6\mu\text{mol/l}$ . Bei den 11 Versuchen konnte bei einer Propafenonkonzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$  relativ zum Kontrollwert eine Stromamplitude von  $0,99 \pm 0,02$  gefunden werden. Für 10 $\mu\text{mol/l}$  ergab sich ein Wert von  $0,91 \pm 0,04$ , für 100 $\mu\text{mol/l}$   $0,46 \pm 0,06$  und für 1000 $\mu\text{mol/l}$   $0,11 \pm 0,04$  (siehe auch Tabelle 2). In Abbildung 12 ist die Dosis-Wirkungs-Kurve dargestellt, die anhand dieser Mittelwerte errechnet wurde. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert dieser Kurve lag bei 92 $\mu\text{mol/l}$ .

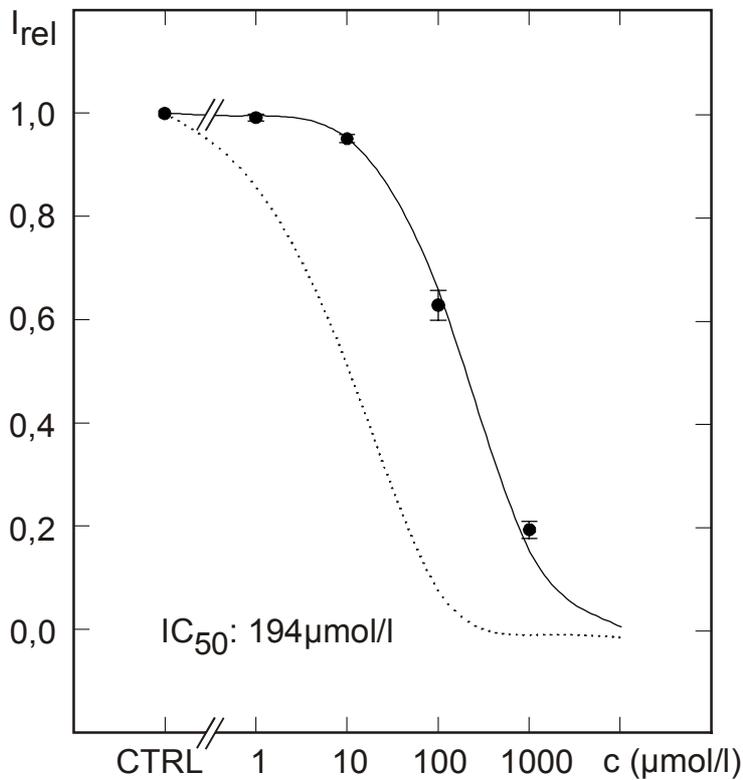
# Oozyten mit allen Hüllen



**Abb. 7:**

Exemplarische Darstellung von drei Einzelversuchen (A-C) der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Propafenon auf Kv2.1-Kaliumkanäle in Oozyten von *Xenopus laevis* mit allen Follikelzellschichten. Linke Spalte: Originalregistrierungen der Kaliumströme bei einem Spannungssprung auf +40mV unter Kontrollbedingungen (CTRL) und Propafenon in den angegebenen Konzentrationen. Rechte Spalte: Graphische Auswertung des jeweils links abgebildeten Einzelversuches.  $I_{\text{rel}}$ : Amplitude des Kaliumstromes normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen.  $c$ : Konzentration von Propafenon. Die Datenpunkte wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Propafenonkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen.

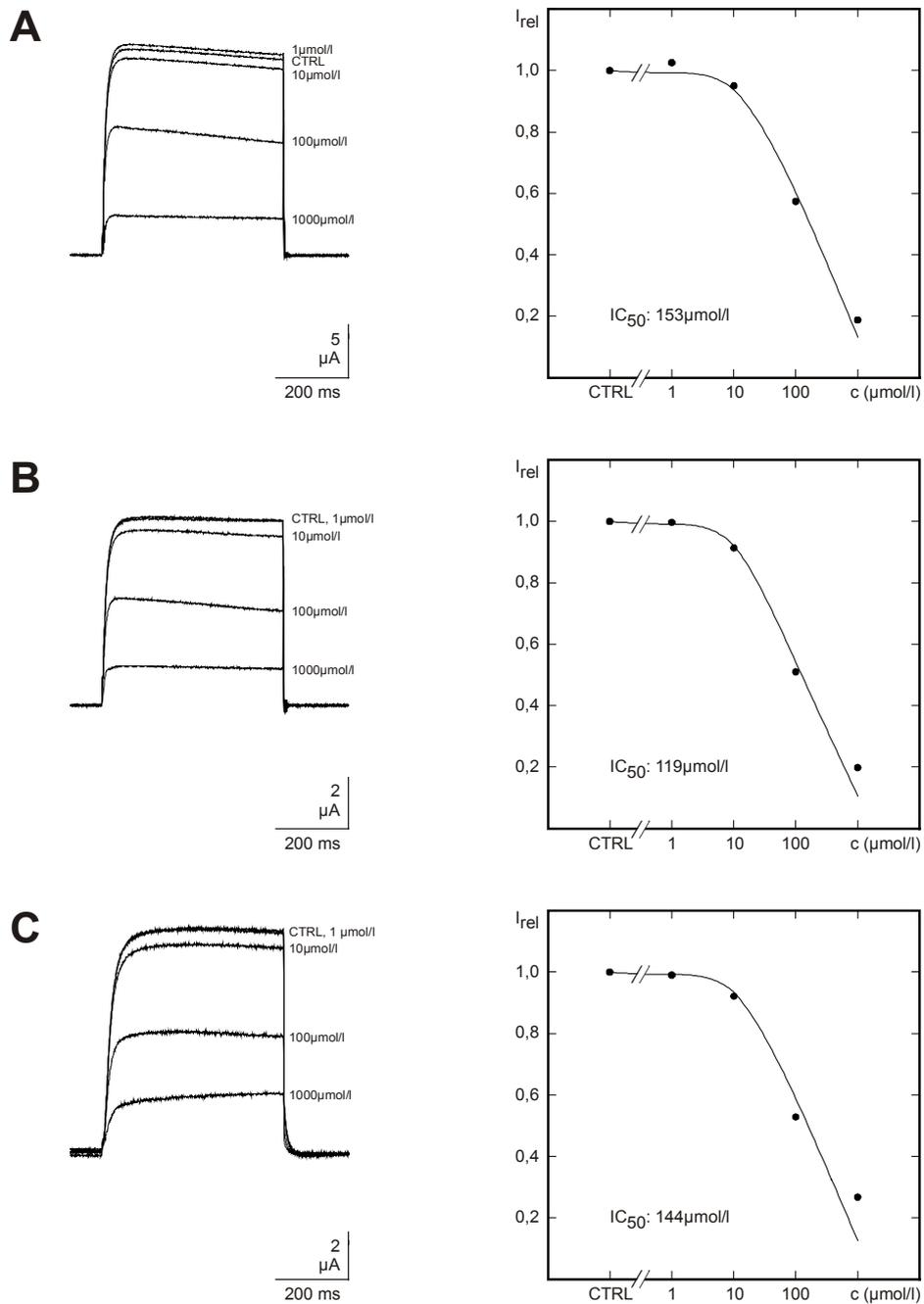
## Oozyten mit allen Hüllen



**Abb. 8:**

Mittelwertsdarstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Propafenon auf Kv2.1-Kaliumkanäle in Oozyten von *Xenopus laevis* mit allen Follikelzellschichten.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes bei Spannungssprüngen auf +40mV normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen.  $c$ : Konzentration von Propafenon. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von 12 Einzelversuchen dar und wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Mittlere Propafenonkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen. Die gestrichelte Linie gibt die in der Literatur angegebene Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Propafenon an einem Zelllinien-Expressionssystem an.

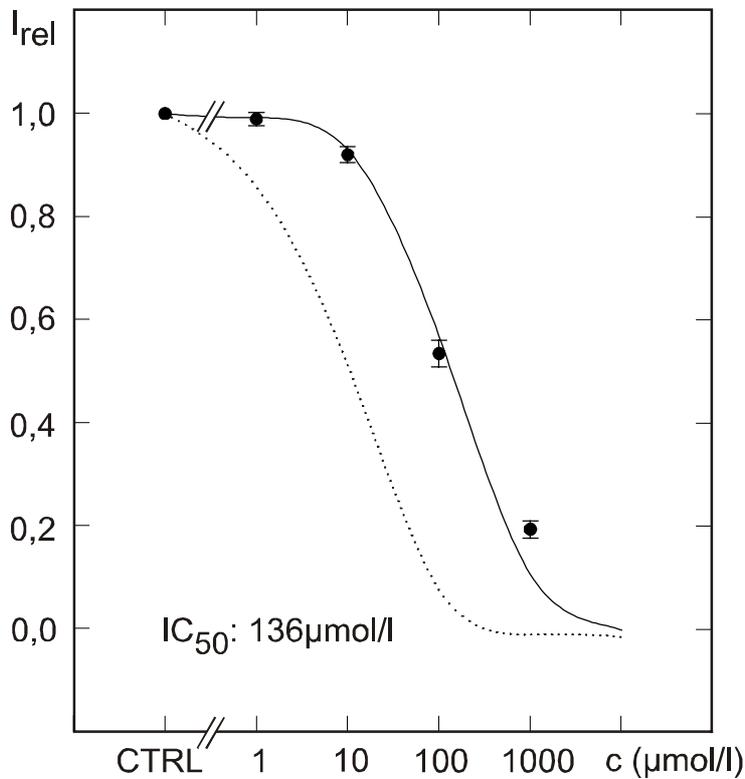
# Defollikulierte Oozyten



**Abb. 9:**

Exemplarische Darstellung von drei Einzelversuchen (A-C) der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Propafenon auf Kv2.1-Kaliumkanäle in defollikulierten Oozyten von *Xenopus laevis*. Linke Spalte: Originalregistrierungen der Kaliumströme bei einem Spannungssprung auf +40mV unter Kontrollbedingungen (CTRL) und Propafenon in den angegebenen Konzentrationen. Rechte Spalte: Graphische Auswertung des jeweils links abgebildeten Einzelversuches.  $I_{\text{rel}}$ : Amplitude des Kaliumstromes normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen.  $c$ : Konzentration von Propafenon. Die Datenpunkte wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Propafenonkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen.

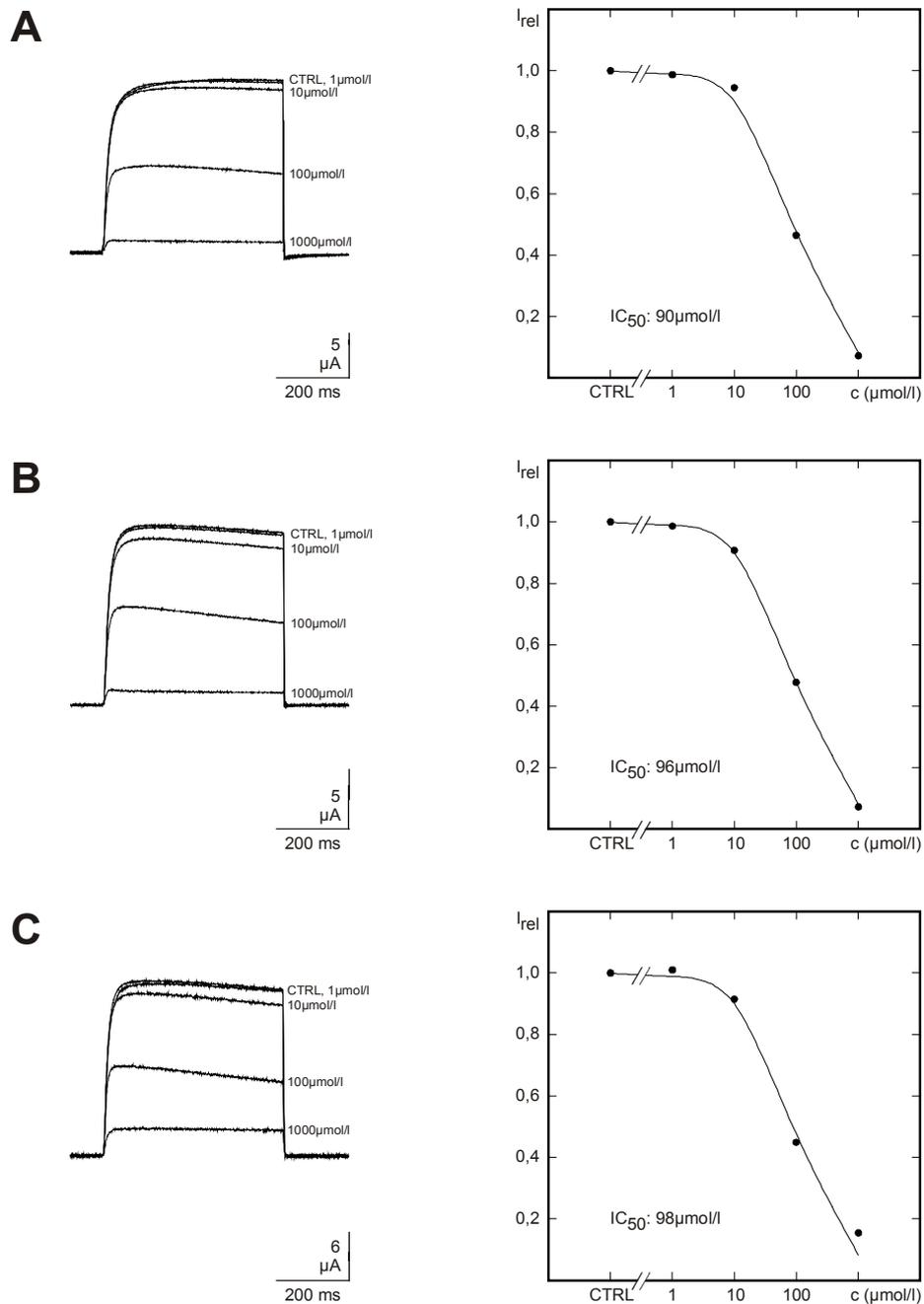
## Defollikulierte Oozyten



**Abb. 10:**

Mittelwertsdarstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Propafenon auf Kv2.1-Kaliumkanäle in defollikulierten Oozyten von *Xenopus laevis*.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes bei Spannungssprüngen auf +40mV normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen.  $c$ : Konzentration von Propafenon. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von 14 Einzelversuchen dar und wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Mittlere Propafenonkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen. Die gestrichelte Linie gibt die in der Literatur angegebene Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Propafenon an einem Zelllinien-Expressionssystem an.

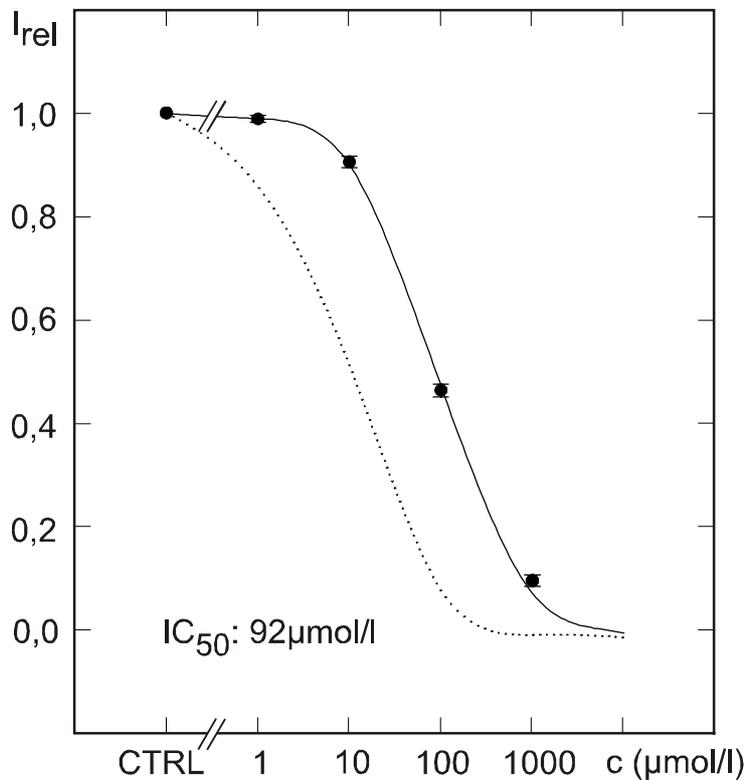
# Oozyten ohne Hüllen



**Abb. 11:**

Exemplarische Darstellung von drei Einzelversuchen (A-C) der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Propafenon auf Kv2.1-Kaliumkanäle in Oozyten von *Xenopus laevis* ohne Hüllen. Linke Spalte: Originalregistrierungen der Kaliumströme bei einem Spannungssprung auf +40mV unter Kontrollbedingungen (CTRL) und Propafenon in den angegebenen Konzentrationen. Rechte Spalte: Graphische Auswertung des jeweils links abgebildeten Einzelversuches.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen. c: Konzentration von Propafenon. Die Datenpunkte wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Propafenonkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen.

## Oozyten ohne Hüllen



**Abb. 12:**

Mittelwertsdarstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Propafenon auf Kv2.1-Kaliumkanäle in Oozyten von *Xenopus laevis* ohne Hüllen.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes bei Spannungssprüngen auf +40mV normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen.  $c$ : Konzentration von Propafenon. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von 11 Einzelversuchen dar und wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Mittlere Propafenonkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen. Die gestrichelte Linie gibt die in der Literatur angegebene Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Propafenon an einem Zelllinien-Expressionssystem an.

### 3.1.4 Vergleichende Auswertung

Die relativen Stromamplituden (im Vergleich zum Kontrollstrom) bei Propafenonkonzentrationen von 1 bis 1000  $\mu\text{mol/l}$  sowie die  $\text{IC}_{50}$ -Werte, die an Oozyten mit allen Follikelzellschichten, an defollikulierten Oozyten und an Oozyten ohne Hüllschichten gewonnen wurden, sind in Tabelle 2 anhand der Mittelwerte und Standardabweichungen zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Übersicht und statistische Auswertung der Ergebnisse zur Dosis-Wirkungs-Beziehung von Propafenon an Oozyten von *Xenopus laevis*.

	1 $\mu\text{mol/l}$	10 $\mu\text{mol/l}$	100 $\mu\text{mol/l}$	1000 $\mu\text{mol/l}$	$\text{IC}_{50}$
Mit allen Follikelzellschichten	0,99 $\pm$ 0,02 [12]	0,95 $\pm$ 0,03 [12]	0,63 $\pm$ 0,10 [12]	0,21 $\pm$ 0,06 [12]	216 $\pm$ 31 $\mu\text{mol/l}$ [12]
Defollikuliert	0,99 $\pm$ 0,05 [14]	0,92 $\pm$ 0,06 [14]	0,54 $\pm$ 0,10 [14]	0,21 $\pm$ 0,06 [14]	151 $\pm$ 17 $\mu\text{mol/l}$ [14]
Ohne Hüllen	0,99 $\pm$ 0,02 [11]	0,91 $\pm$ 0,04 [11]	0,46 $\pm$ 0,06 [11]	0,11 $\pm$ 0,04 [11]	91 $\pm$ 6 $\mu\text{mol/l}$ [11]
<b>p</b> mit Hüllen vs. defollikuliert	0,855	0,105	<b>0,023</b>	0,988	0,067
<b>p</b> defollikuliert vs. ohne Hüllen	0,972	0,461	<b>0,022</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,005</b>
<b>p</b> mit Hüllen vs. ohne Hüllen	0,722	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,001</b>

Die Spalten 2-5 enthalten die Ergebnisse zu den verschiedenen Propafenonkonzentrationen. Dabei stellen die Daten der oberen drei Zeilen die relativen Stromamplituden als Mittelwerte  $\pm$  SEM dar; die jeweilige Anzahl der Versuche ist in Klammern aufgeführt. Die unteren drei Zeilen geben die Wahrscheinlichkeit für eine fehlende statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Daten bei Oozyten mit allen Follikelzellschichten im Vergleich zu defollikulierten Oozyten (**p** mit Hüllen vs. defollikuliert), bei defollikulierten Oozyten im Vergleich zu Oozyten ohne Hüllen (**p** defollikuliert vs. ohne Hüllen) und bei Oozyten mit allen Follikelzellschichten im Vergleich zu Oozyten ohne Hüllen (**p** mit Hüllen vs. ohne Hüllen) an. Statistisch signifikante Werte ( $p < 0,05$ ) sind fett gedruckt. Die Spalte 6 gibt die entsprechenden Daten für die Propafenonkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen an ( $\text{IC}_{50}$ ).

Es zeigte sich, dass mit einer zunehmenden Entfernung der Hüllschichten der  $\text{IC}_{50}$ -Wert reduziert wurde. So lag der  $\text{IC}_{50}$ -Wert bei Oozyten mit allen Hüllschichten bei 216  $\pm$  31  $\mu\text{mol/l}$  ( $n = 12$ ), bei defollikulierten Oozyten bei 151  $\pm$  17  $\mu\text{mol/l}$  ( $n = 14$ ) und bei Oozyten ohne Hüllschichten bei 91  $\pm$  6  $\mu\text{mol/l}$  ( $n = 11$ ).

Zur Überprüfung, ob die Reduzierung der Stromamplitude sich in den drei verschiedenen Oozytenpräparationen statistisch signifikant unterschied, wurde der t-Test angewandt. Während sich bei einer Propafenonkonzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Präparationsarten der Oozyten zeigten, waren die Unterschiede

de zwischen Oozyten mit Hüllen und Oozyten ohne Hüllen statistisch signifikant bei  $10\mu\text{mol/l}$  ( $p = 0,003$ ). Bei  $100\mu\text{mol/l}$  konnte eine statistische Signifikanz zwischen Oozyten mit Hüllen und defollikulierten Oozyten ( $p = 0,023$ ), zwischen defollikulierten Oozyten und Oozyten ohne Hüllen ( $p = 0,022$ ) sowie zwischen Oozyten mit Hüllen und Oozyten ohne Hüllen ( $p < 0,001$ ) gefunden werden. Bei einer Propafenonkonzentration von  $1000\mu\text{mol/l}$  ergaben sich statistische Signifikanzen nur zwischen defollikulierten Oozyten und Oozyten ohne Hüllen ( $p < 0,001$ ) und zwischen Oozyten mit Hüllen und Oozyten ohne Hüllen ( $p < 0,001$ ). Beim Vergleich von Oozyten mit Hüllen und defollikulierten Oozyten wurde mit einem Wert für  $p = 0,988$  keine statistische Signifikanz gefunden.

Hinsichtlich der  $\text{IC}_{50}$ -Werte waren statistisch signifikante Unterschiede zwischen defollikulierten Oozyten und Oozyten ohne Hüllen festzustellen ( $p = 0,005$ ) sowie zwischen Oozyten mit Hüllen und Oozyten ohne Hüllen ( $p = 0,001$ ). Der Vergleich von Oozyten mit Hüllen und defollikulierten Oozyten brachte keine statistische Signifikanz ( $p = 0,067$ ).

## **3.2 Flecainid**

In dieser Versuchsreihe wurde der hemmende Effekt der antiarrhythmisch wirksamen Substanz Flecainid auf den transmembranösen Kaliumstrom von Oozyten unterschiedlicher Präparationsart untersucht. Es wurden insgesamt 45 Versuche an Oozyten durchgeführt. Im Einzelnen gelang die elektrophysiologische Untersuchung an 17 Oozyten mit allen Hüllen. Weiteren 16 Versuchen lagen defollikulierte Oozyten, und 12 weiteren Oozyten ohne Hüllen zugrunde.

### **3.2.1 Oozyten mit allen Hüllen**

Abbildung 13 zeigt drei elektrophysiologische Untersuchungen (A-C) mit Flecainid. Das bekannte Schema der Versuchsdurchführung (siehe Erläuterungen unter 3.1.1) wurde – abgesehen vom eingesetzten Pharmakon – beibehalten.

Der hemmende Effekt des Flecainids zeigt sich deutlich erst bei einer Konzentration von  $100\mu\text{mol/l}$  bzw.  $1000\mu\text{mol/l}$ . Die Stromkurven der Kontrolllösung und der für Flecainid bei

einer Konzentration von  $1\mu\text{mol/l}$  sind annähernd deckungsgleich. Der hemmende Effekt des Flecainids zeigt sich bei einer Konzentration von  $10\mu\text{mol/l}$  nur schwach.

Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der dargestellten Versuche lagen bei  $126\mu\text{mol/l}$  (A),  $127\mu\text{mol/l}$  (B) und  $128\mu\text{mol/l}$  (C). Die Berechnung des Mittelwertes aller 17 Versuche ergab  $215 \pm 33\mu\text{mol/l}$ . Bei den Versuchen dieser Messreihe ergab sich eine relative Stromamplitude – bezogen auf den Kontrollwert – von  $1,00 \pm 0,01$  für eine Flecainidkonzentration von  $1\mu\text{mol/l}$ . Für  $10\mu\text{mol/l}$  konnte der Wert von  $0,96 \pm 0,03$ , für  $100\mu\text{mol/l}$   $0,63 \pm 0,13$  und für  $1000\mu\text{mol/l}$   $0,18 \pm 0,08$  gefunden werden. Einen Überblick hierzu gibt Tabelle 3. Auch für diese Versuchsreihe wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt, welche die Mittelwerte aller 17 Einzelversuche beinhaltet (Abbildung 14). Für diese Dosis-Wirkungs-Kurve betrug der  $\text{IC}_{50}$ -Wert  $181\mu\text{mol/l}$ .

### 3.2.2 Defollikulierte Oozyten

Abgesehen von der Präparationsart wurden im Vergleich zur Versuchsreihe unter 3.2.1 keine Veränderungen im Versuchsaufbau vorgenommen. Es konnten an 16 Oozyten elektrophysiologische Messungen durchgeführt werden.

Abbildung 15 gibt drei exemplarische Originalregistrationen (A-C) und deren Auswertung wieder. Der hemmende Effekt des Pharmakons tritt deutlich bei Konzentrationen von  $100\mu\text{mol/l}$  und  $1000\mu\text{mol/l}$  auf. Bei  $10\mu\text{mol/l}$  ist nur eine schwache Abnahme des transmembranösen Kaliumstromes zu erkennen. Die Stromkurven der Kontrolllösung und für Flecainid bei  $1\mu\text{mol/l}$  unterscheiden sich kaum.

Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Versuche in Abbildung 15 betragen  $145\mu\text{mol/l}$  (A),  $133\mu\text{mol/l}$  (B) und  $142\mu\text{mol/l}$  (C). Die Berechnung des Mittelwertes der  $\text{IC}_{50}$ -Werte aller 16 Versuche ergab  $162 \pm 16\mu\text{mol/l}$ . Die Berechnung der Stromamplitude relativ zum Kontrollwert ergab für eine Flecainidkonzentration von  $1\mu\text{mol/l}$  einen Wert von  $0,99 \pm 0,01$ , für  $10\mu\text{mol/l}$   $0,94 \pm 0,02$ , für  $100\mu\text{mol/l}$   $0,59 \pm 0,08$  und für  $1000\mu\text{mol/l}$   $0,16 \pm 0,05$  (siehe auch Tabelle 3). Anhand dieser Mittelwerte wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt, welche in Abbildung 16 ersichtlich ist. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert dieser Kurve betrug  $151\mu\text{mol/l}$ .

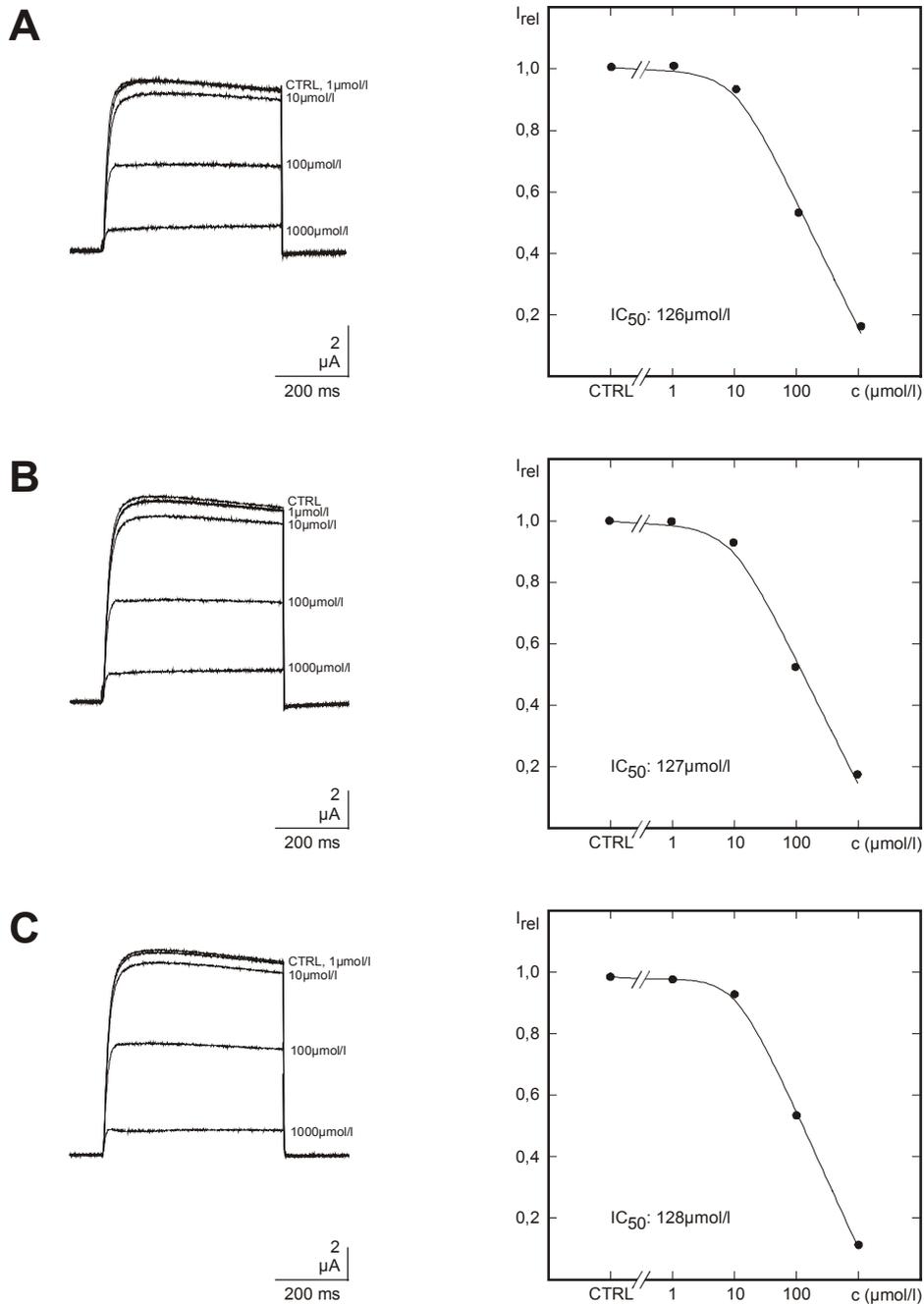
### 3.2.3 Oozyten ohne Hüllen

Im Rahmen dieser Versuchsreihe gelang an 12 Oozyten ohne Hüllen die elektrophysiologische Untersuchung. Der Versuchsaufbau wurde wiederum unverändert übernommen. Drei exemplarische Originalregistrationen (A-C) sind in Abbildung 17 zusammengestellt.

Der hemmende Effekt des Flecainids zeigt sich bei einer Konzentration von 100 und 1000 $\mu\text{mol/l}$ , bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$  ist nur ein schwacher Effekt feststellbar. Bei den Versuchen A und B der Abbildung ist bereits bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$  eine Abnahme des transmembranösen Kaliumstromes im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. Im Teil C dagegen überlagern sich die Stromkurven von Kontrolllösung und Flecainid bei 1 $\mu\text{mol/l}$ .

Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte können mit 295 $\mu\text{mol/l}$  (A), 288 $\mu\text{mol/l}$  (B) und 291 $\mu\text{mol/l}$  (C) angegeben werden. Die Berechnung des Mittelwertes der  $\text{IC}_{50}$ -Werte aller 12 Versuche ergab  $384 \pm 68\mu\text{mol/l}$ . Betrachtet man die Stromamplitude dieser Versuche relativ zum Kontrollwert, so findet man für die Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$  einen Wert von  $0,99 \pm 0,01$ , für 10 $\mu\text{mol/l}$   $0,95 \pm 0,02$ , für 100 $\mu\text{mol/l}$   $0,72 \pm 0,12$  und für 1000 $\mu\text{mol/l}$  einen Wert von  $0,23 \pm 0,12$ . Auch diese Werte sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Die anhand der Mittelwerte berechnete Dosis-Wirkungs-Kurve ist in Abbildung 18 dargestellt. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert für diese Kurve betrug 276 $\mu\text{mol/l}$ .

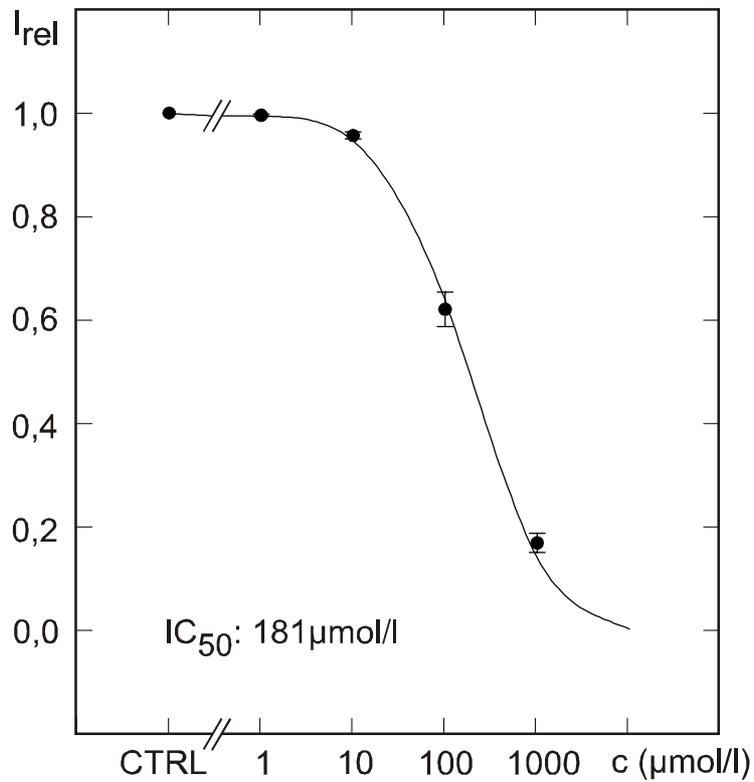
# Oozyten mit allen Hüllen



**Abb. 13:**

Exemplarische Darstellung von drei Einzelversuchen (A-C) der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Flecainid auf Kv2.1-Kaliumkanäle in Oozyten von *Xenopus laevis* mit allen Follikelzellschichten. Linke Spalte: Originalregistrierungen der Kaliumströme bei einem Spannungssprung auf +40mV unter Kontrollbedingungen (CTRL) und Flecainid in den angegebenen Konzentrationen. Rechte Spalte: Graphische Auswertung des jeweils links abgebildeten Einzelversuches.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen. c: Konzentration von Flecainid. Die Datenpunkte wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Flecainidkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen.

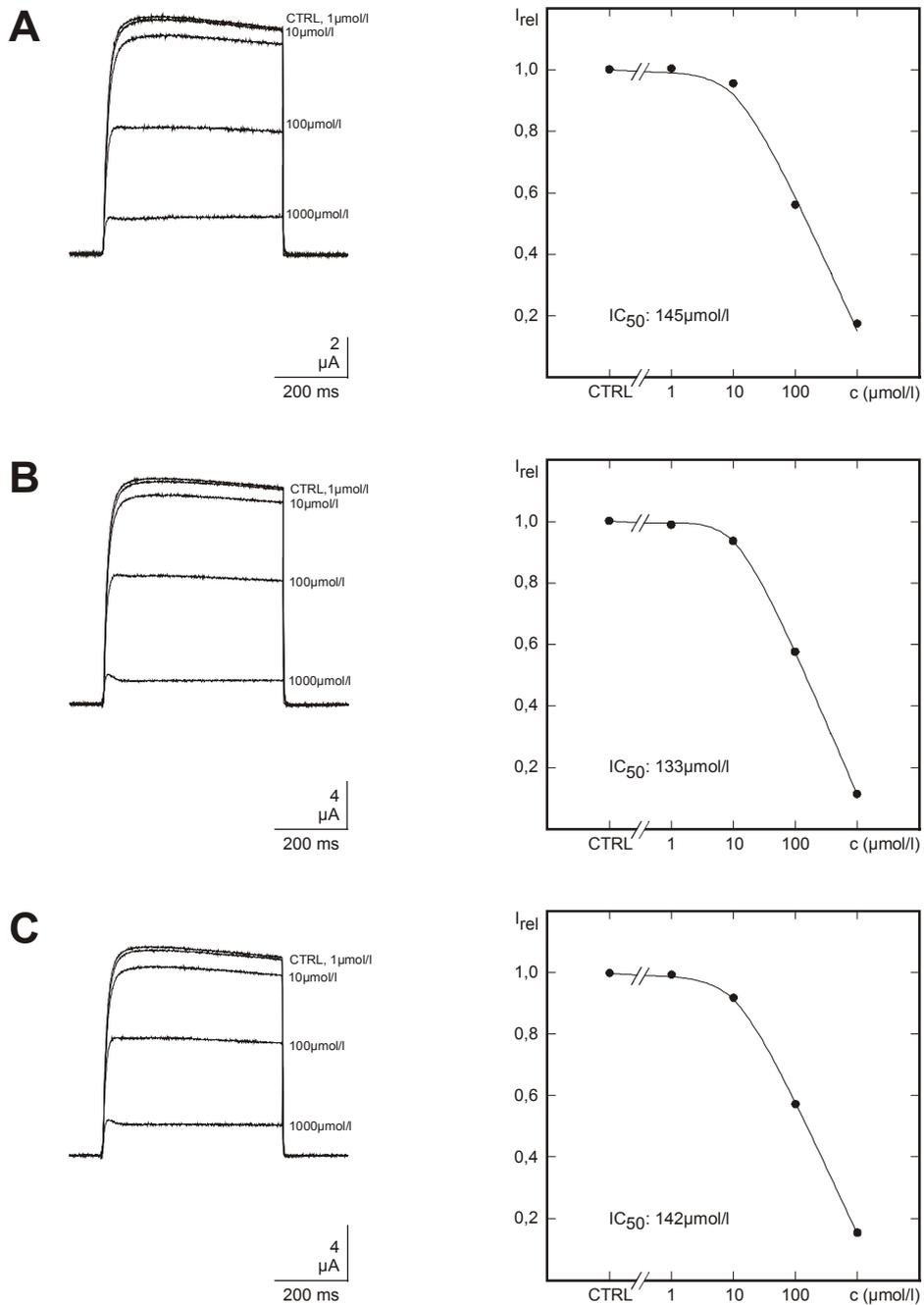
## Oozyten mit allen Hüllen



**Abb. 14:**

Mittelwertsdarstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Flecainid auf Kv2.1-Kaliumkanäle in Oozyten von *Xenopus laevis* mit allen Follikelzellschichten.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes bei Spannungssprüngen auf +40mV normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen.  $c$ : Konzentration von Flecainid. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von 17 Einzelversuchen dar und wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Mittlere Flecainidkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen.

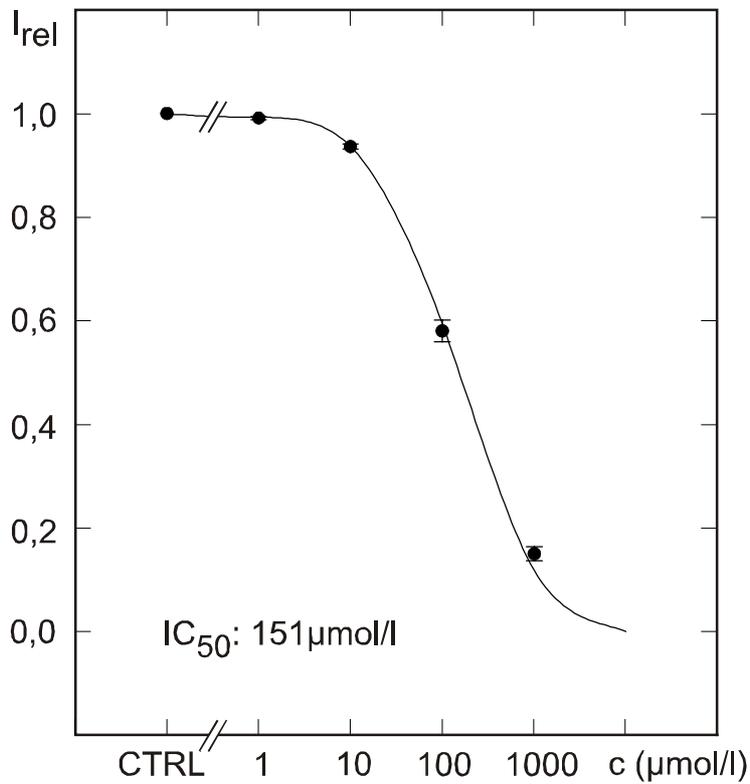
# Defollikulierte Oozyten



**Abb. 15:**

Exemplarische Darstellung von drei Einzelversuchen (A-C) der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Flecaïnide auf Kv2.1-Kaliumkanäle in defollikulierten Oozyten von *Xenopus laevis*. Linke Spalte: Originalregistrierungen der Kaliumströme bei einem Spannungssprung auf +40mV unter Kontrollbedingungen (CTRL) und Flecaïnide in den angegebenen Konzentrationen. Rechte Spalte: Graphische Auswertung des jeweils links abgebildeten Einzelversuches.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen.  $c$ : Konzentration von Flecaïnide. Die Datenpunkte wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Flecaïnidekonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen.

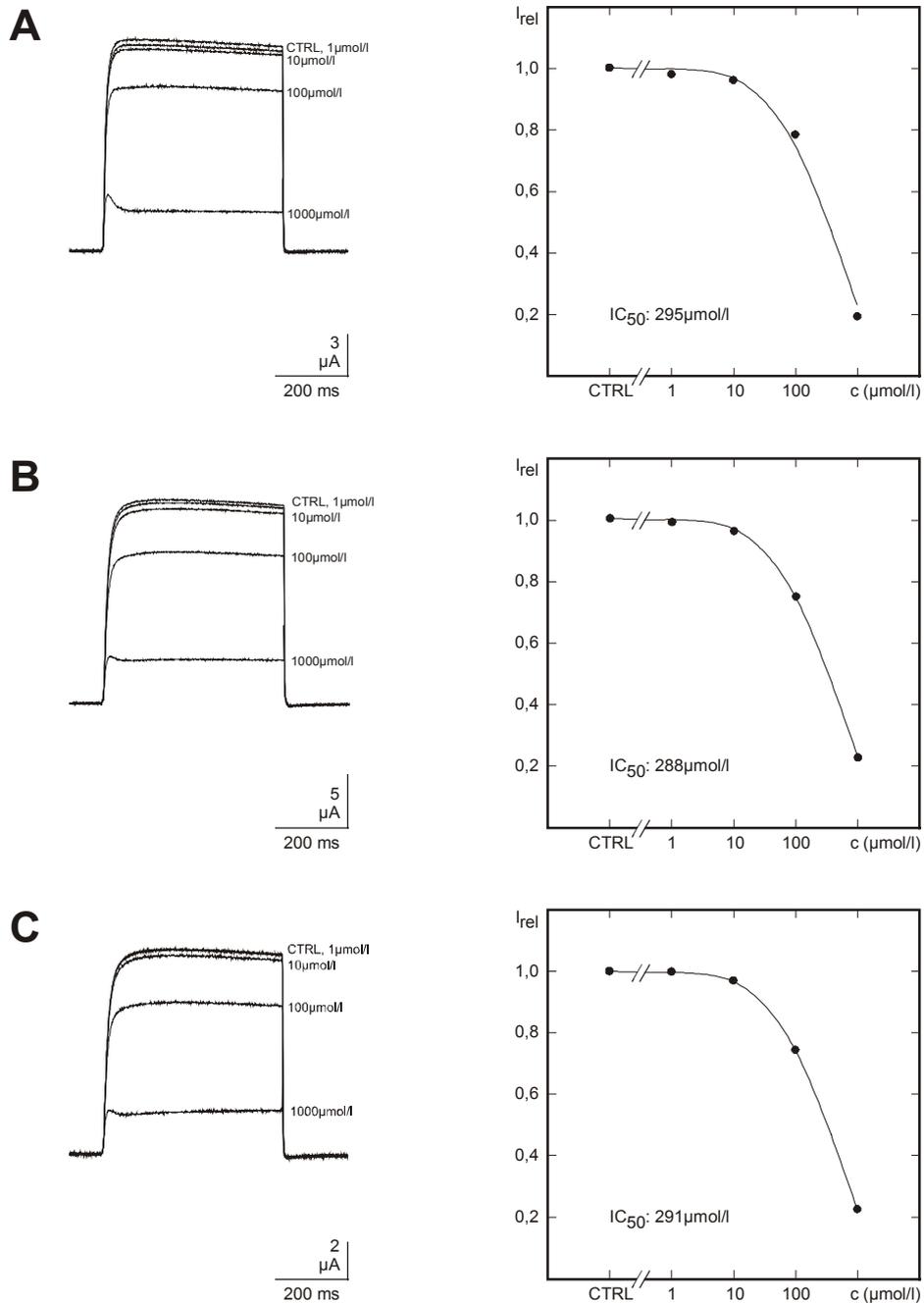
## Defollikulierte Oozyten



**Abb. 16:**

Mittelwertsdarstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Flecainid auf Kv2.1-Kaliumkanäle in defollikulierten Oozyten von *Xenopus laevis*.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes bei Spannungssprüngen auf +40mV normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen.  $c$ : Konzentration von Flecainid. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von 16 Einzelversuchen dar und wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Mittlere Flecainidkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen.

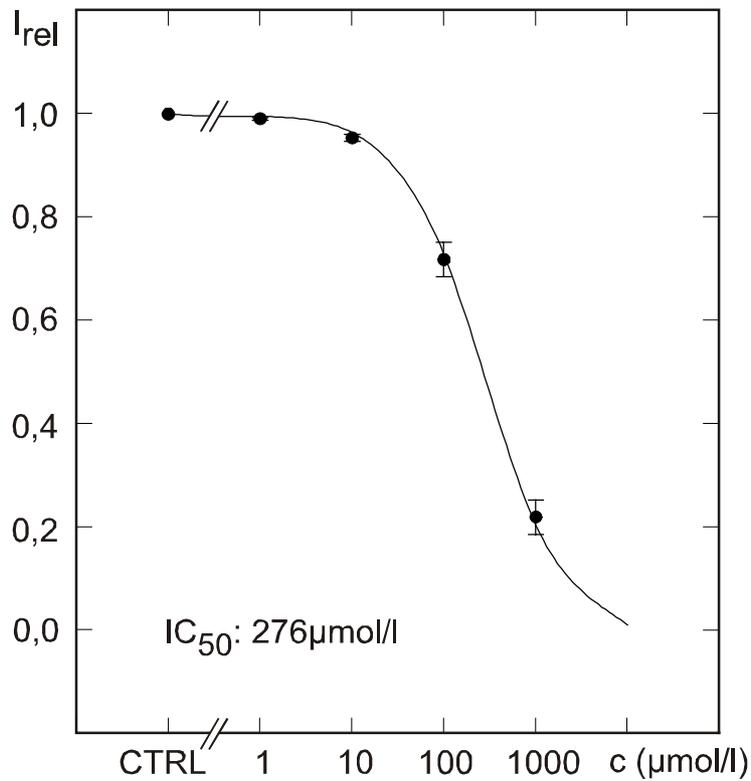
# Oozyten ohne Hüllen



**Abb. 17:**

Exemplarische Darstellung von drei Einzelversuchen (A-C) der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Flecaïnide auf Kv2.1-Kaliumkanäle in Oozyten von *Xenopus laevis* ohne Hüllen. Linke Spalte: Originalregistrierungen der Kaliumströme bei einem Spannungssprung auf +40mV unter Kontrollbedingungen (CTRL) und Flecaïnide in den angegebenen Konzentrationen. Rechte Spalte: Graphische Auswertung des jeweils links abgebildeten Einzelversuches.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen.  $c$ : Konzentration von Flecaïnide. Die Datenpunkte wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Flecaïnidekonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen.

## Oozyten ohne Hüllen



**Abb. 18:**

Mittelwertsdarstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Flecainid auf Kv2.1-Kaliumkanäle in Oozyten von *Xenopus laevis* ohne Hüllen.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes bei Spannungssprüngen auf +40mV normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen.  $c$ : Konzentration von Flecainid. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von 12 Einzelversuchen dar und wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Mittlere Flecainidkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen.

### 3.2.4 Vergleichende Auswertung

Wie schon für die Versuchsreihe unter 3.1, wurden auch für diese Versuchsreihe die Stromamplituden relativ zum Kontrollwert mit ihren Standardabweichungen bei entsprechender Konzentration Flecainid (1 – 1000µmol/l) sowie die IC<sub>50</sub>-Werte tabellarisch zusammengestellt (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Übersicht und statistische Auswertung der Ergebnisse zur Dosis-Wirkungs-Beziehung von Flecainid an Oozyten von *Xenopus laevis*.

	1µmol/l	10µmol/l	100µmol/l	1000µmol/l	IC <sub>50</sub>
Mit allen Follikelzellschichten	1,00 ± 0,01 [17]	0,96 ± 0,03 [17]	0,63 ± 0,13 [17]	0,18 ± 0,08 [17]	215 ± 33µmol/l [17]
Defollikulierte	0,99 ± 0,01 [16]	0,94 ± 0,02 [16]	0,59 ± 0,08 [16]	0,16 ± 0,05 [16]	162 ± 16µmol/l [16]
Ohne Hüllen	0,99 ± 0,01 [12]	0,95 ± 0,02 [12]	0,72 ± 0,12 [12]	0,23 ± 0,12 [12]	384 ± 68µmol/l [12]
<b>p</b> mit Hüllen vs. defollikulierte	0,258	<b>0,019</b>	0,309	0,423	0,168
<b>p</b> defollikulierte vs. ohne Hüllen	0,729	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,019</b>	<b>0,013</b>
<b>p</b> mit Hüllen vs. ohne Hüllen	0,365	0,428	<b>0,004</b>	<b>0,08</b>	<b>0,021</b>

Die Spalten 2-5 enthalten die Ergebnisse zu den verschiedenen Flecainidkonzentrationen. Dabei stellen die Daten der oberen drei Zeilen die relativen Stromamplituden als Mittelwerte ± SEM dar; die jeweilige Anzahl der Versuche ist in Klammern aufgeführt. Die unteren drei Zeilen geben die Wahrscheinlichkeit für eine fehlende statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Daten bei Oozyten mit allen Follikelzellschichten im Vergleich zu defollikulierten Oozyten (p mit Hüllen vs. defollikulierte), bei defollikulierten Oozyten im Vergleich zu Oozyten ohne Hüllen (p defollikulierte vs. ohne Hüllen) und bei Oozyten mit allen Follikelzellschichten im Vergleich zu Oozyten ohne Hüllen (p mit Hüllen vs. ohne Hüllen) an. Statistisch signifikante Werte (p<0,05) sind fett gedruckt. Die Spalte 6 gibt die entsprechenden Daten für die Flecainidkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen an (IC<sub>50</sub>).

Die Aufteilung in Oozyten mit allen Follikelzellschichten, defollikulierte Oozyten und Oozyten ohne Hüllen wurde beibehalten. Der Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte zwischen Oozyten mit allen Hüllschichten (215 ± 33µmol/l (n = 17)) und defollikulierten Oozyten (162 ± 16µmol/l (n = 16)) zeigt eine deutliche Abnahme. Dagegen steigt der IC<sub>50</sub>-Wert nach Entfernung der Vitelinmembran an. Er liegt für Oozyten ohne Hüllen bei 384 ± 68µmol/l (n = 12).

Zur Klärung, ob in der Abnahme bzw. Zunahme der Stromamplitude zwischen den einzelnen Präparationsformen der Oocyte eine statistische Signifikanz liegt, wurde der t-Test durchgeführt. Während bei einer Flecainidkonzentration von 1µmol/l keine statistische Signifikanz gefunden wurde, erbrachte der Vergleich zwischen Oozyten mit allen Hüllen und

defollikulierten Oozyten bei einer Konzentration von  $10\mu\text{mol/l}$  einen Wert für  $p = 0,019$ , und der Vergleich von defollikulierten Oozyten und Oozyten ohne Hüllen einen Wert für  $p < 0,001$ . Eine statistische Signifikanz konnte somit in beiden Fällen nachgewiesen werden. Beim Vergleich von Oozyten mit allen Follikelzellschichten und Oozyten ohne Hüllen bei einer Konzentration von  $10\mu\text{mol/l}$  ließen sich keine signifikanten Unterschiede finden. Bei einer Konzentration von  $100\mu\text{mol/l}$  fanden sich sowohl zwischen defollikulierten Oozyten und Oozyten ohne Hüllen ( $p < 0,001$ ) als auch zwischen Oozyten mit allen Hüllen und Oozyten ohne Hüllen ( $p = 0,004$ ) statistisch signifikante Unterschiede. Bei einer Konzentration von  $1000\mu\text{mol/l}$  fand sich nur zwischen defollikulierten Oozyten und Oozyten ohne Hüllen eine statistische Signifikanz ( $p = 0,019$ ).

Bei den  $IC_{50}$ -Werten ergab sich zwischen defollikulierten Oozyten und Oozyten ohne Hüllen ( $p = 0,013$ ), und zwischen Oozyten mit Hüllen und Oozyten ohne Hüllen ( $p = 0,021$ ) eine statistische Signifikanz. Mit einem Wert für  $p = 0,168$  konnte zwischen Oozyten mit Hüllen und defollikulierten Oozyten keine statistische Signifikanz gefunden werden.

### **3.3 Verapamil**

In dieser dritten Versuchsreihe wurde mit Hilfe der antiarrhythmisch wirksamen Substanz Verapamil die Abnahme des transmembranösen Kaliumstromes an *Xenopus*-Oozyten unterschiedlicher Präparationsart untersucht. Insgesamt wurden 27 Versuche an Oozyten durchgeführt. Dabei gelang an 8 Oozyten mit allen Hüllen, an 11 defollikulierten Oozyten und an 8 Oozyten ohne Hüllen die elektrophysiologische Untersuchung.

#### **3.3.1 Oozyten mit allen Hüllen**

In Abbildung 19 sind wieder drei Beispiele von Originalregistrationen (A-C) mit Verapamil und deren Auswertung dargestellt. Der hemmende Einfluss des Verapamils wird bei Konzentrationen von 100 und  $1000\mu\text{mol/l}$  deutlich. Bei  $10\mu\text{mol/l}$  kommt es zu einer geringen Abnahme des transmembranösen Kaliumstromes. Die Stromkurven der Kontrolle und für Verapamil bei einer Konzentration von  $1\mu\text{mol/l}$  unterscheiden sich nur marginal.

Die  $IC_{50}$ -Werte der dargestellten Versuche lagen bei  $55\mu\text{mol/l}$  (A),  $53\mu\text{mol/l}$  (B) und  $70\mu\text{mol/l}$  (C). Der Mittelwert der  $IC_{50}$ -Werte aller 8 Versuche betrug  $80 \pm 11\mu\text{mol/l}$ . Bei den Oozyten dieser Versuchsreihe ergab sich bei einer Verapamilkonzentration von  $1\mu\text{mol/l}$  eine Stromamplitude relativ zum Kontrollwert von  $0,98 \pm 0,01$ . Bei einer Konzentration von  $10\mu\text{mol/l}$  konnte ein Wert von  $0,87 \pm 0,03$ , bei  $100\mu\text{mol/l}$  ein Wert von  $0,40 \pm 0,08$  und bei  $1000\mu\text{mol/l}$  ein Wert von  $0,19 \pm 0,05$  gefunden werden. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Mit diesen Mittelwerten wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve errechnet. Sie ist in Abbildung 20 dargestellt. Der  $IC_{50}$ -Wert dieser Kurve betrug  $77\mu\text{mol/l}$ .

### 3.3.2 Defollikulierte Oozyten

Nach bewährtem Schema sind in Abbildung 21 drei exemplarische Originalregierungen (A-C) sowie deren Auswertung dargestellt. In den Versuchen A und C lässt sich schon bei einer Verapamilkonzentration von  $1\mu\text{mol/l}$  eine geringe Abnahme des transmembranösen Kaliumstromes erkennen. Dagegen sind in Versuch B die Stromkurven für die Kontrolllösung und für Verapamil bei  $1\mu\text{mol/l}$  nahezu deckungsgleich. In allen drei Versuchen erkennt man bei einer Konzentration von  $10\mu\text{mol/l}$  eine leichte Abnahme der Stromamplitude relativ zum Kontrollwert, wogegen der hemmende Effekt des Pharmakons bei Konzentrationen von 100 und  $1000\mu\text{mol/l}$  deutlich wird.

Die Werte für  $IC_{50}$  lagen bei  $59\mu\text{mol/l}$  (A),  $56\mu\text{mol/l}$  (B) und  $42\mu\text{mol/l}$  (C). Der Mittelwert der  $IC_{50}$ -Werte aller 11 Versuche betrug  $56 \pm 5\mu\text{mol/l}$ . Die Untersuchung der relativen Stromamplitude – bezogen auf den Kontrollwert – ergab für eine Konzentration von  $1\mu\text{mol/l}$   $0,98 \pm 0,02$ , für  $10\mu\text{mol/l}$   $0,85 \pm 0,05$ , für  $100\mu\text{mol/l}$   $0,33 \pm 0,07$  und für  $1000\mu\text{mol/l}$   $0,12 \pm 0,03$  (siehe auch Tabelle 4). Die auf der Basis dieser Mittelwerte erstellte Dosis-Wirkungs-Kurve ist in Abbildung 22 dargestellt. Für diese Kurve konnte ein  $IC_{50}$ -Wert von  $54\mu\text{mol/l}$  errechnet werden.

### 3.3.3 Oozyten ohne Hüllen

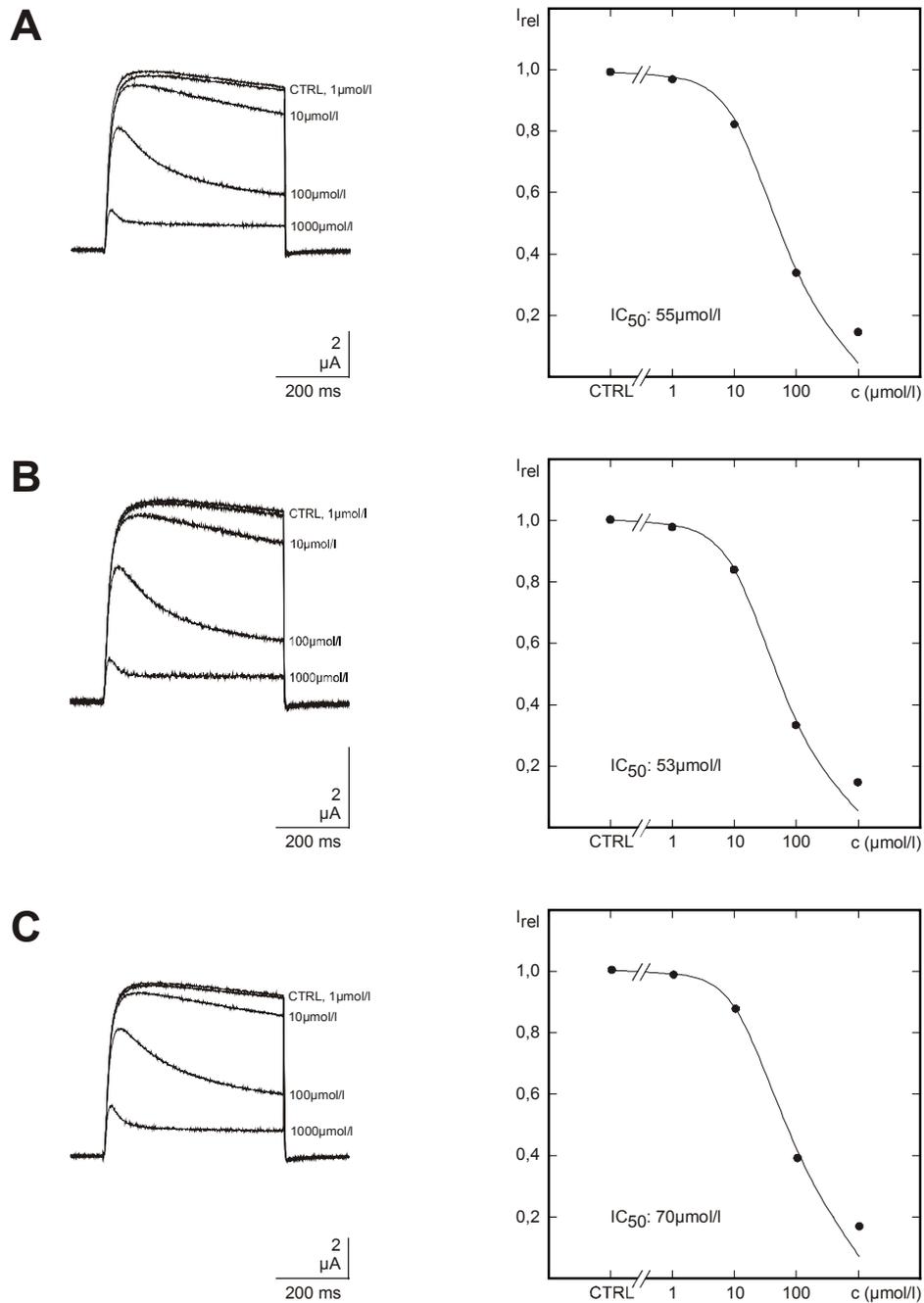
Drei Versuche (A-C) mit Oozyten ohne Hüllen sind in Abbildung 23 dargestellt. Wie in den Abbildungen zuvor sind auch hier die Auswertungen der Versuche mit aufgezeichnet (rechts).

In den Versuchen A und C sind die Verläufe der Stromkurven für die Kontrolllösung und für Verapamil bei einer Konzentration von  $1\mu\text{mol/l}$  nahezu identisch, während man bei Versuch B eine dezente Abnahme des transmembranösen Kaliumstromes im Vergleich zur Kontrolle erkennen kann. Der hemmende Effekt tritt bei Konzentrationen von  $10\mu\text{mol/l}$  in allen drei Versuchen leicht auf. Er zeigt sich deutlich bei Verapamilkonzentrationen von  $100$  und  $1000\mu\text{mol/l}$ .

Die  $IC_{50}$ -Werte der Beispiele in Abbildung 23 betragen  $49\mu\text{mol/l}$  (A),  $48\mu\text{mol/l}$  (B) und  $48\mu\text{mol/l}$  (C). Auch für diese Versuchsreihe wurde der Mittelwert der  $IC_{50}$ -Werte für alle 8 Versuche berechnet. Er betrug  $55 \pm 5\mu\text{mol/l}$ .

Die Auswertung aller 8 Versuche in Bezug auf die Stromamplitude relativ zum Kontrollwert brachte bei einer Verapamilkonzentration von  $1\mu\text{mol/l}$  einen Wert von  $0,98 \pm 0,01$ , für  $10\mu\text{mol/l}$   $0,86 \pm 0,03$ , für  $100\mu\text{mol/l}$   $0,33 \pm 0,07$  und für  $1000\mu\text{mol/l}$   $0,1 \pm 0,05$  (siehe auch Tabelle 4). Die Dosis-Wirkungs-Kurve für diese Mittelwerte ist in Abbildung 24 wiedergegeben. Hier betrug der  $IC_{50}$ -Wert  $53\mu\text{mol/l}$ .

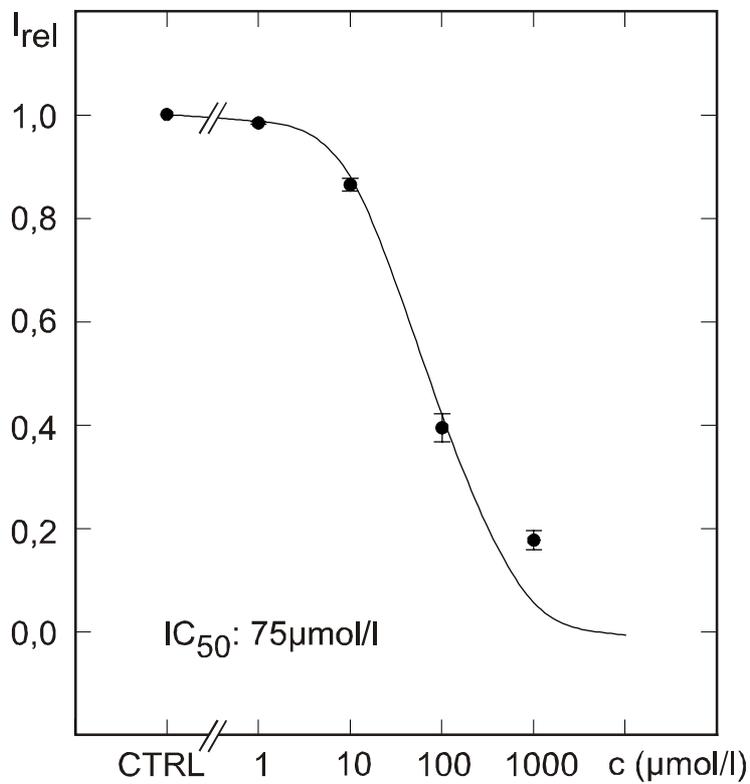
# Oozyten mit allen Hüllen



**Abb. 19:**

Exemplarische Darstellung von drei Einzelversuchen (A-C) der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Verapamil auf Kv2.1-Kaliumkanäle in Oozyten von *Xenopus laevis* mit allen Follikelzellschichten. Linke Spalte: Originalregistrierungen der Kaliumströme bei einem Spannungssprung auf +40mV unter Kontrollbedingungen (CTRL) und Verapamil in den angegebenen Konzentrationen. Rechte Spalte: Graphische Auswertung des jeweils links abgebildeten Einzelversuches.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen. c: Konzentration von Verapamil. Die Datenpunkte wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Verapamilkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen.

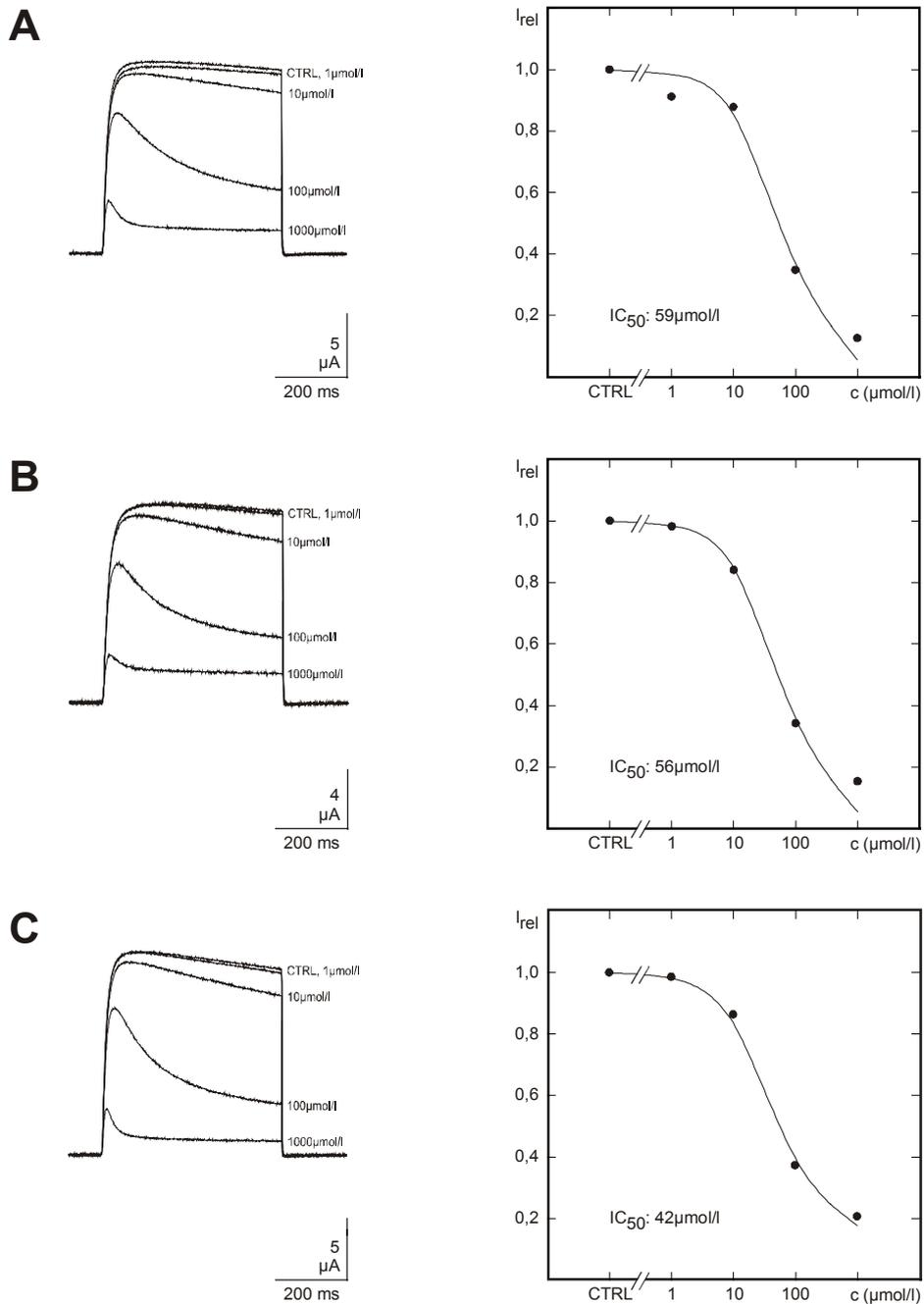
## Oozyten mit allen Hüllen



**Abb. 20:**

Mittelwertsdarstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Verapamil auf Kv2.1-Kaliumkanäle in Oozyten von *Xenopus laevis* mit allen Follikelzellschichten.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes bei Spannungssprüngen auf +40mV normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen.  $c$ : Konzentration von Verapamil. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von 8 Einzelversuchen dar und wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Mittlere Verapamilkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen.

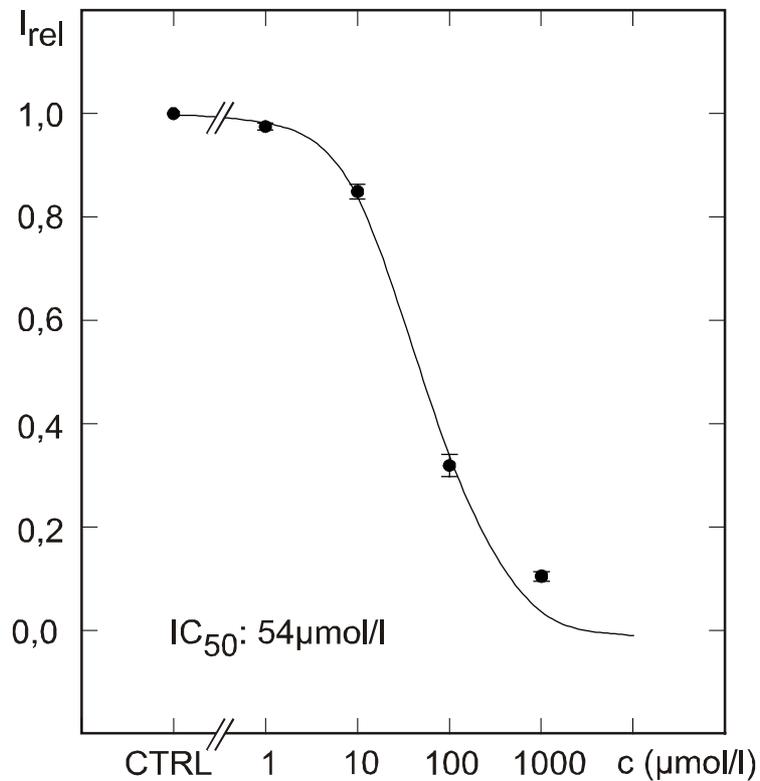
# Defollikulierte Oozyten



**Abb. 21:**

Exemplarische Darstellung von drei Einzelversuchen (A-C) der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Verapamil auf Kv2.1-Kaliumkanäle in defollikulierten Oozyten von *Xenopus laevis*. Linke Spalte: Originalregistrierungen der Kaliumströme bei einem Spannungssprung auf +40mV unter Kontrollbedingungen (CTRL) und Verapamil in den angegebenen Konzentrationen. Rechte Spalte: Graphische Auswertung des jeweils links abgebildeten Einzelversuches.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen. c: Konzentration von Verapamil. Die Datenpunkte wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Verapamilkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen.

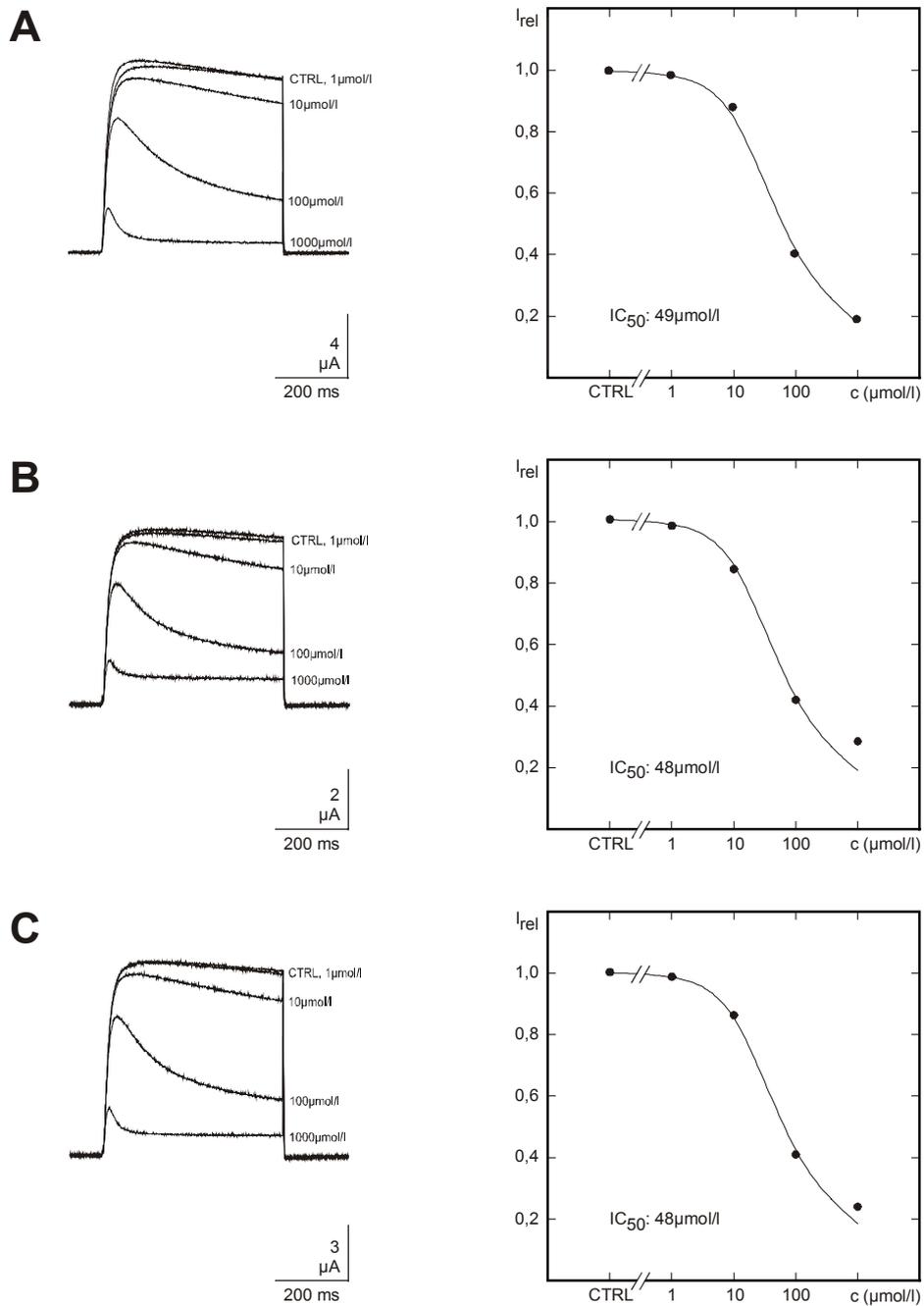
## Defollikulierte Oozyten



**Abb. 22:**

Mittelwertsdarstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Verapamil auf Kv2.1-Kaliumkanäle in defollikulierten Oozyten von *Xenopus laevis*.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes bei Spannungssprüngen auf +40mV normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen.  $c$ : Konzentration von Verapamil. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von 11 Einzelversuchen dar und wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Mittlere Verapamilkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen.

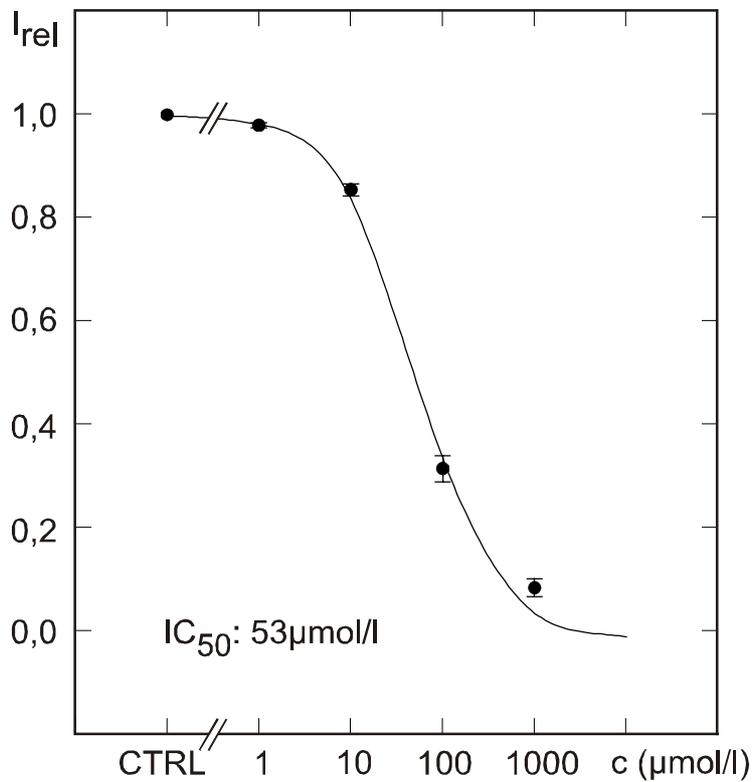
# Oozyten ohne Hüllen



**Abb. 23:**

Exemplarische Darstellung von drei Einzelversuchen (A-C) der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Verapamil auf Kv2.1-Kaliumkanäle in Oozyten von *Xenopus laevis* ohne Hüllen. Linke Spalte: Originalregistrierungen der Kaliumströme bei einem Spannungssprung auf +40mV unter Kontrollbedingungen (CTRL) und Verapamil in den angegebenen Konzentrationen. Rechte Spalte: Graphische Auswertung des jeweils links abgebildeten Einzelversuches.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen. c: Konzentration von Verapamil. Die Datenpunkte wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Verapamilkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen.

## Oozyten ohne Hüllen



**Abb. 24:**

Mittelwertsdarstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Verapamil auf Kv2.1-Kaliumkanäle in Oozyten von *Xenopus laevis* ohne Hüllen.  $I_{rel}$ : Amplitude des Kaliumstromes bei Spannungssprüngen auf +40mV normiert auf die Amplitude unter Kontrollbedingungen.  $c$ : Konzentration von Verapamil. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von 8 Einzelversuchen dar und wurden mit einer modifizierten Hill-Gleichung gefittet.  $IC_{50}$ : Mittlere Verapamilkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen.

### 3.3.4 Vergleichende Auswertung

In Tabelle 4 sind die relativen Stromamplituden für Verapamilkonzentrationen von 1-1000 $\mu$ mol/l sowie die IC<sub>50</sub>-Werte aufgelistet, die in den drei Versuchsreihen mit Oozyten unterschiedlicher Präparationsart gefunden wurden. Neben den Mittelwerten sind die Standardabweichungen angegeben.

**Tabelle 4:** Übersicht und statistische Auswertung der Ergebnisse zur Dosis-Wirkungs-Beziehung von Verapamil an Oozyten von *Xenopus laevis*.

	1 $\mu$ mol/l	10 $\mu$ mol/l	100 $\mu$ mol/l	1000 $\mu$ mol/l	IC <sub>50</sub>
Mit allen Follikelzellschichten	0,98 $\pm$ 0,01 [8]	0,87 $\pm$ 0,03 [8]	0,4 $\pm$ 0,08 [8]	0,19 $\pm$ 0,05 [8]	80 $\pm$ 11 $\mu$ mol/l [8]
Defollikulierte	0,98 $\pm$ 0,02 [11]	0,85 $\pm$ 0,05 [11]	0,33 $\pm$ 0,07 [11]	0,12 $\pm$ 0,03 [11]	56 $\pm$ 5 $\mu$ mol/l [11]
Ohne Hüllen	0,98 $\pm$ 0,01 [8]	0,86 $\pm$ 0,03 [8]	0,33 $\pm$ 0,07 [8]	0,1 $\pm$ 0,05 [8]	55 $\pm$ 5 $\mu$ mol/l [8]
<b>p mit Hüllen vs. defollikulierte</b>	0,301	0,471	<b>0,047</b>	<b>0,001</b>	<b>0,047</b>
<b>p defollikulierte vs. ohne Hüllen</b>	0,602	0,784	0,895	0,268	0,904
<b>p mit Hüllen vs. ohne Hüllen</b>	0,479	0,586	0,054	<b>0,003</b>	0,061

Die Spalten 2-5 enthalten die Ergebnisse zu den verschiedenen Verapamilkonzentrationen. Dabei stellen die Daten der oberen drei Zeilen die relativen Stromamplituden als Mittelwerte  $\pm$  SEM dar; die jeweilige Anzahl der Versuche ist in Klammern aufgeführt. Die unteren drei Zeilen geben die Wahrscheinlichkeit für eine fehlende statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Daten bei Oozyten mit allen Follikelzellschichten im Vergleich zu defollikulierten Oozyten (p mit Hüllen vs. defollikulierte), bei defollikulierten Oozyten im Vergleich zu Oozyten ohne Hüllen (p defollikulierte vs. ohne Hüllen) und bei Oozyten mit allen Follikelzellschichten im Vergleich zu Oozyten ohne Hüllen (p mit Hüllen vs. ohne Hüllen) an. Statistisch signifikante Werte ( $p < 0,05$ ) sind fett gedruckt. Die Spalte 6 gibt die entsprechenden Daten für die Verapamilkonzentration zur Reduzierung auf die halbmaximale Amplitude des Kaliumstromes unter Kontrollbedingungen an (IC<sub>50</sub>).

Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Entfernung der Hüllschichten eine Reduzierung des IC<sub>50</sub>-Wertes zur Folge hatte. Der IC<sub>50</sub>-Wert fiel dabei von 80  $\pm$  11 $\mu$ mol/l (n = 8; Oozyten mit allen Hüllen) und 56  $\pm$  5 $\mu$ mol/l (n = 11; defollikulierte Oozyten) auf 55  $\pm$  5 $\mu$ mol/l (n = 8; Oozyten ohne Hüllen).

Auch für Verapamil wurde untersucht, ob die Reduzierung der Stromamplitude nach schrittweiser Entfernung der Hüllschichten eine statistisch signifikante Bedeutung hat. Mit Hilfe des t-Testes konnte diese Frage beantwortet werden.

Während bei Verapamilkonzentrationen von 1 und 10 $\mu$ mol/l zwischen den Präparationsarten keine statistischen Signifikanzen gefunden werden konnten, ergab sich zwischen Oozyten mit

Hüllen und defollikulierten Oozyten bei einer Konzentration von  $100\mu\text{mol/l}$  ein Wert für  $p = 0,047$  und somit eine statistische Signifikanz. Die Werte zwischen defollikulierten Oozyten und Oozyten ohne Hüllen ( $p = 0,895$ ) und zwischen Oozyten mit Hüllen und Oozyten ohne Hüllen ( $p = 0,054$ ) unterschieden sich nicht signifikant. Bei einer Konzentration von  $1000\mu\text{mol/l}$  zeigte sich beim Vergleich der Werte zwischen Oozyten mit Hüllen und defollikulierten Oozyten ( $p = 0,001$ ) und zwischen Oozyten mit Hüllen und Oozyten ohne Hüllen ( $p = 0,003$ ) eine statistische Signifikanz, die beim Vergleich zwischen defollikulierten Oozyten und Oozyten ohne Hüllen nicht gefunden werden konnte ( $p = 0,268$ ).

Hinsichtlich der  $IC_{50}$ -Werte war nur zwischen Oozyten mit allen Hüllen und defollikulierten Oozyten eine statistische Signifikanz ( $p = 0,047$ ) feststellbar.

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die Hüllschichten der *Xenopus*-Oozyte einen Einfluss auf die Wirksamkeit verschiedener Antiarrhythmika auf Kv2.1-Kaliumkanäle haben und ob aus den an der Oozyte gefundenen wirksamen Substanzkonzentrationen auch Rückschlüsse auf Substanzkonzentrationen für die klinische Anwendung gezogen werden können.

### Bedeutung der Entfernung der Hüllschichten

Grob zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es nach schrittweiser Entfernung der Hüllschichten zu einer Erhöhung der Wirksamkeit der Antiarrhythmika kommt. Dieser Effekt ist besonders bei den Substanzen Propafenon und Verapamil zu beobachten, während bei Flecainid die Ergebnisse keine eindeutige Tendenz erkennen lassen.

Bei einer Propafenonkonzentration von  $100\mu\text{mol/l}$  beispielsweise zeigten sich statistisch signifikante Effekte für Oozyten mit allen Hüllen gegenüber defollikulierten Oozyten ( $p = 0,023$ ), für defollikulierte Oozyten gegenüber Oozyten ohne Hüllen ( $p = 0,022$ ) sowie für Oozyten mit allen Hüllen gegenüber Oozyten ohne Hüllen ( $p < 0,001$ ). Bei einer Propafenonkonzentration von  $1000\mu\text{mol/l}$  konnte ein statistisch signifikanter Effekt beim Vergleich von defollikulierten Oozyten mit Oozyten ohne Hüllen ( $p < 0,001$ ) und beim Vergleich von Oozyten mit allen Hüllen mit Oozyten ohne Hüllen ( $p < 0,001$ ) festgestellt werden. Anhand der  $IC_{50}$ -Werte ( $IC_{50}$  = Wert der halbmaximalen Hemmung) lässt sich die Zunahme des hemmenden Effekts der Substanz erkennen. So nimmt die zur halbmaximalen Hemmung notwendige Propafenonkonzentration von  $216\mu\text{mol/l}$  (Oozyten mit allen Hüllen) und  $151\mu\text{mol/l}$  (defollikulierte Oozyten) auf  $91\mu\text{mol/l}$  (Oozyten ohne Hüllen) ab. Hierbei zeigen sich statistische Signifikanzen zwischen defollikulierten Oozyten und Oozyten ohne Hüllen ( $p = 0,005$ ) sowie zwischen Oozyten mit Hüllen und Oozyten ohne Hüllen ( $p = 0,001$ ).

Bei der Versuchsreihe mit Verapamil konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. So bestehen hinsichtlich der Reduzierung der Stromamplitude relativ zum Kontrollwert bei einer Konzentration von  $100\mu\text{mol/l}$  statistisch signifikante Effekte beim Vergleich von Oozyten mit

allen Hüllen und defollikulierten Oozyten ( $p = 0,047$ ). Bei einer Konzentration von  $1000\mu\text{mol/l}$  bestehen statistische Signifikanzen beim Vergleich von Oozyten mit allen Hüllen und defollikulierten Oozyten ( $p = 0,001$ ) sowie beim Vergleich von Oozyten mit Hüllen und Oozyten ohne Hüllen ( $p = 0,003$ ). Auch bei dieser Versuchsreihe kommt es zu einer deutlichen Reduzierung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte von  $80\mu\text{mol/l}$  (Oozyten mit Hüllen) und  $56\mu\text{mol/l}$  (defollikulierte Oozyten) auf  $55\mu\text{mol/l}$  (Oozyten ohne Hüllen).

Eine dritte Versuchsreihe untersuchte den hemmenden Effekt des Antiarrhythmikums Flecainid auf  $\text{Kv}2.1$ -Kaliumkanäle. Hier kam es jedoch nicht zu einer konsequenten Abnahme des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes nach schrittweiser Entfernung der Hüllschichten. Der Wert der halbmaximalen Hemmung betrug für Oozyten mit allen Hüllen  $215\mu\text{mol/l}$  und für defollikulierte Oozyten  $162\mu\text{mol/l}$ . Für Oozyten ohne Hüllen stieg er jedoch auf  $384\mu\text{mol/l}$  an. Die Beobachtungen dieser Reihe korrelieren nicht mit denen für Propafenon und Verapamil. Daher sollen weiter unten mögliche Ursachen für dieses Ergebnis diskutiert werden.

#### Mögliche Ursachen der Wirksamkeitszunahme nach Entfernung der Hüllschichten

Es konnte gezeigt werden, dass es nach schrittweiser Entfernung der Hüllschichten zu einer Zunahme der Empfindlichkeit der Xenopus-Oozyte auf antiarrhythmisch wirksame Substanzen kommt, wobei die Empfindlichkeit etwa verdoppelt werden konnte (Vergleich von Oozyten mit allen Hüllen und Oozyten ohne Hüllen der Versuchsreihen Propafenon und Verapamil). Als Ursache hierfür können folgende Aspekte diskutiert werden:

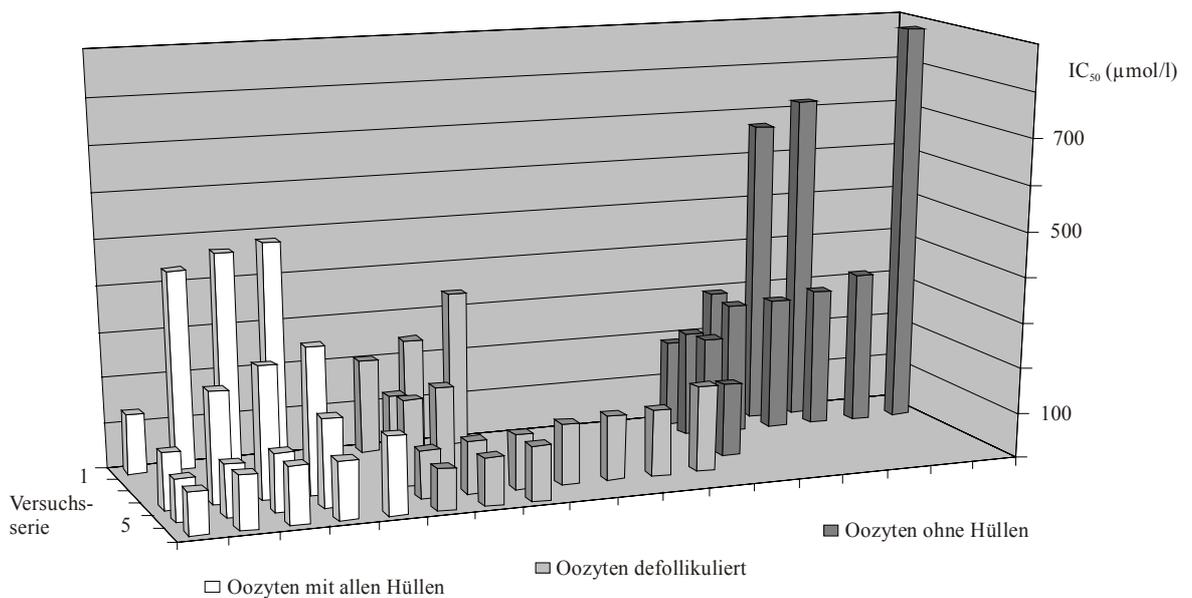
1. Diffusion: Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass der hemmende Effekt der antiarrhythmisch wirksamen Substanz mit Abnahme des Molekulargewichtes des Pharmakons zunimmt (Madeja et al., 1997). Da jedoch eine längere Applikationszeit der Substanz diesen Effekt nicht wesentlich beeinflussen kann, dürfte die Beseitigung eines Diffusionshindernisses nicht die alleinige Ursache sein und man vermutet zusätzlich z.B. das Vorhandensein von Pump- oder Bindungsmechanismen (Madeja et al., 1997). Vor dem Hintergrund, dass derartige Pumpmechanismen aber in der Regel sehr substanzspezifisch sind, erscheint deren Existenz unwahrscheinlich und eher unbedeutend (Stein, 1986). Dessev und Goldman konnten im Bereich der Hüllschichten Bindungsstellen für

zweiwertige Kationen nachweisen. Diese Beobachtung lässt die Existenz weiterer unspezifischer Bindungsstellen für andere Substanzen vermuten (Dessev und Goldman, 1990). Es ist bekannt, dass insbesondere bei der Entfernung des inneren Ovarieneithels, der Theka und Teilen der Follikelzellschicht ein Großteil zellspezifischer Strukturen entfernt wird. Somit ist denkbar, dass die Entfernung dieser Strukturen eine deutliche Zunahme der Empfindlichkeit der Oozyte bewirkt. In allen drei Versuchsreihen konnte nach der Defollikulierung eine deutliche Zunahme der Empfindlichkeit der Oozyte beobachtet werden (Propafenon: 216 $\mu\text{mol/l}$   $\rightarrow$  151 $\mu\text{mol/l}$ ; Flecainid: 215 $\mu\text{mol/l}$   $\rightarrow$  151 $\mu\text{mol/l}$ ; Verapamil: 80 $\mu\text{mol/l}$   $\rightarrow$  56 $\mu\text{mol/l}$ ).

2. Methodisches Vorgehen bei der Defollikulierung: Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter dem Einsatz von feinen Uhrmacherpinzetten, d.h. auf mechanischem Weg, die Entfernung der einzelnen Hüllschichten erreicht. Durch diese Art der Präparation könnte es zu einer Veränderung der Membraneigenschaften gekommen sein. Beim Vergleich von mechanisch defollikulierten Oozyten und solchen, denen auf enzymatischem Weg die Hüllschichten entfernt wurden, konnte jedoch kein Unterschied in Bezug auf die Empfindlichkeit gegenüber Testsubstanzen gefunden werden (Madeja et al., 1997).
3. Die Entfernung der Hüllschichten führt zu einer Veränderung der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration: Dieser Vorgang hätte eine Veränderung des Konzentrationsgradienten für  $\text{K}^+$  zur Folge und damit einen quantitativen Effekt auf den transmembranösen Kaliumstrom. Somit könnten beispielsweise weniger Kaliumionen pro Zeiteinheit den Kanal passieren, was sich elektrophysiologisch als eine Hemmung des Kaliumstroms darstellen würde. In einer Versuchsreihe mit Oozyten verschiedener Präparationsart, die einer 50mM  $\text{K}^+$ -Lösung ausgesetzt wurden, konnte jedoch keine Veränderung des transmembranösen Kaliumstroms festgestellt werden. Dieses scheint eine uneingeschränkte Diffusion von Kaliumionen durch die einzelnen Hüllschichten zu bestätigen und widerspricht somit der Vermutung einer veränderten extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration (Madeja et al., 1997).

## Diskussion der Befunde mit Flecainid

Im Rahmen der Versuchsreihe mit Flecainid kam es im Vergleich zu Oozyten mit allen Hüllen und defollikulierten Oozyten bei Oozyten ohne Hüllen zu einem deutlichen Anstieg des  $IC_{50}$ -Wertes. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den beiden anderen Versuchsreihen dieser Arbeit und soll daher hier gesondert diskutiert werden. Abbildung 25 gibt eine Übersicht der am jeweiligen Versuchstag (=Versuchsserie) gewonnenen  $IC_{50}$ -Werte.



**Abb. 25:** Graphische Darstellung der Versuchsreihe Flecainid. Für die jeweilige Versuchsserie (Y-Achse) sind die Einzelmessungen (X-Achse) mit ihren entsprechenden  $IC_{50}$ -Werten (Z-Achse) dargestellt. Die Graustufen der Säulen zeigen die verschiedenen Präparationsarten an.

In der ersten Versuchsserie konnten Untersuchungen an allen drei Präparationsarten der Oocyte durchgeführt werden. Hierbei kam es nicht zu einer schrittweisen Zunahme der Empfindlichkeit nach Entfernung der Hüllschichten. Für den  $IC_{50}$ -Wert konnten Mittelwerte von  $380 \pm 83 \mu\text{mol/l}$  (Oozyten mit allen Hüllschichten),  $263 \pm 40 \mu\text{mol/l}$  (defollikulierte Oozyten) und  $465 \pm 134 \mu\text{mol/l}$  (Oozyten ohne Hüllschichten) gefunden werden. Insgesamt liegt bei allen drei Präparationsformen eine weite Streuung der  $IC_{50}$ -Werte vor. Für die geringere Empfindlichkeit der Oozyten ohne Hüllen gegenüber Flecainid am ersten Versuchstag sollen mehrere Ursachen diskutiert werden:

1. Fehler beim Ansetzen der Stammlösung (1000 $\mu$ mol/l) durch unvollständige Auflösung des Flecainid: Es ist denkbar, dass es zu Beginn der Versuchsreihe zu einer unvollständigen Auflösung des weißen Granulates gekommen ist. Der Löslichkeitskoeffizient für Flecainid beträgt 300mg/ml Alkohol bzw. 48,8mg/ml Wasser (jeweils bei einer Temperatur von 37°C). Die verwendete Stammlösung (Flecainid in Oozyten-Ringer) wies jedoch mit 0,414mg/ml eine etwa 100-fach geringere Konzentration auf als eine gesättigte Flecainid-Lösung. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass auch am ersten Versuchstag das zugegebene Flecainid vollständig gelöst war. Zudem lässt sich damit nicht erklären, warum sich Oozyten ohne Hüllschichten unempfindlicher zeigen als Oozyten mit allen Hüllschichten oder defollikulierte Oozyten.
2. Jahreszeitlicher Einfluss: Die Untersuchungen mit Flecainid wurden in den Monaten Mai bis August durchgeführt. Von Stühmer werden dagegen die Wintermonate (November-April) als idealer Zeitpunkt für elektrophysiologische Untersuchungen an *Xenopus*-Oozyten angegeben (Stühmer, 1992). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass zu bestimmten Jahreszeiten die Hüllschichten die Wirksamkeit von Substanzen steigern sollten. Außerdem müsste sich am ersten Versuchstag dieser jahreszeitliche Einfluss auf alle drei Präparationsarten der Oozyte, und nicht nur auf Oozyten ohne Hüllen, auswirken.
3. Unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Oozyten-Fraktionen: Die einzelnen Versuchsserien wurden an Oozyten durchgeführt, die zum Teil von verschiedenen *Xenopus*-Weibchen gewonnen wurden. Hierin könnte eine Ursache für geringe Unterschiede in der Empfindlichkeit der Oozyten liegen. Dadurch lässt sich jedoch nicht erklären, warum sich innerhalb der ersten Versuchsserie Oozyten ohne Hüllschichten unempfindlicher zeigen als Oozyten mit allen Hüllschichten oder defollikulierte Oozyten.

Vergleicht man die sechs Serien der Versuchsreihe untereinander, so fällt auf, dass vor allem in den ersten beiden Versuchsserien insgesamt hohe IC<sub>50</sub>-Werte gefunden wurden. Diese Tatsache lässt sich mit dem Argument der fehlerhaften Stammlösung nicht erklären, da die Lösung auch für die übrigen Versuchsserien verwendet wurde. Zudem bleibt der Grund für die große Streuung der IC<sub>50</sub>-Werte ungeklärt. Das Argument des jahreszeitlichen Einflusses

wird dadurch entkräftet, dass alle Versuchsserien zu Jahreszeiten durchgeführt wurden, die von Stühmer als suboptimal für elektrophysiologische Untersuchungen an Oozyten angegeben werden (Stühmer, 1992). Verschiedene Oozyten-Fractionen können geringe Unterschiede in der Empfindlichkeit aufweisen. Diese Tatsache erklärt jedoch nicht, dass es zu Schwankungen des  $IC_{50}$ -Wertes um den Faktor 2 kommt. Bei Annahme derart hoher Schwankungen müsste die Eignung des Oozyten-Expressionssystems als solches in Frage gestellt werden.

Die ungewöhnlichen Ergebnisse der Versuchsreihe mit Flecainid lassen sich letztlich nicht auf eine klare Ursache zurückführen, sondern können nur spekulativ diskutiert werden.

### Bedeutung der Ergebnisse für Untersuchungen an Herzmuskelzellen

Generell ist festzustellen, dass selbst nach Entfernung der Hüllschichten deutlich höhere Konzentrationen des entsprechenden Pharmakons benötigt wurden als in der medikamentösen Therapie von Arrhythmien beim Menschen. Diese Beobachtung konnte bei Propafenon, Flecainid und Verapamil gemacht werden und ist daher stoffunabhängig. Das unterstützt die Vermutung, dass die Ursache hierfür im Expressionssystem der Oozyte selbst zu suchen ist. In der Literatur wird der therapeutische Bereich der verwendeten Substanzen mit Plasmakonzentrationen von 0,1-1 $\mu$ g/ml angegeben (Kalusche, 1996). Das entspricht im Vergleich zum Oozyten-System einer etwa 100-fach geringeren Menge. Die Entfernung der Hüllschichten hatte lediglich eine Verdoppelung der Empfindlichkeit zur Folge. Unter Berücksichtigung der klinischen Relevanz dieser Arbeit scheint es daher von geringerer Bedeutung zu sein, an welcher Präparationsart der Oozyte solche Versuche durchgeführt werden.

In der Literatur existieren mehrere Arbeiten, die sich mit dem Effekt von Antiarrhythmika auf klonierte Kaliumkanäle beschäftigen. Dabei kamen jedoch unterschiedliche Expressionssysteme zum Einsatz. Grissmer untersuchte an Fibroblasten der Maus den Effekt von Flecainid auf Kv1.2-Kaliumkanäle. Er fand einen  $IC_{50}$ -Wert von 217 $\mu$ mol/l (Grissmer et al., 1994). Yamagishi führte vergleichbare Untersuchungen an Xenopus-Oozyten durch und kam dabei auf einen  $IC_{50}$ -Wert von 1023 $\mu$ mol/l (Yamagishi et al., 1995), was einer 5-fach geringeren Empfindlichkeit der Oozyte entspricht.

Der Effekt der antiarrhythmisch wirksamen Substanz Quinidin auf Kv1.4-Kaliumkanäle in L-Zellen der Maus wurde von Yeola und Snyders untersucht. Sie fanden einen IC<sub>50</sub>-Wert von 20µmol/l (Yeola und Snyders, 1997). Yamagishi dagegen fand im Oozyten-Expressionssystem unter Verwendung desselben Kanals und derselben Substanz einen IC<sub>50</sub>-Wert von 186µmol/l, was einer 9-fach geringeren Empfindlichkeit der Oozyte entspricht (Yamagishi et al., 1995).

In einer Arbeit von Harris wurde unter anderem der hemmende Effekt des Mykotoxins Muscimol auf GABAA-Rezeptoren untersucht, die sowohl in L(tk)-Zellen wie auch in Xenopus-Oozyten exprimiert wurden. Es wurde eine 2,6 bis 26-fach geringere Empfindlichkeit der Oozyte im Vergleich zu L(tk)-Zellen festgestellt (Harris et al., 1997).

Rampe untersuchte den hemmenden Effekt von Verapamil auf Kv1.5-Kaliumkanäle und benutzte als Expressionssystem humane embryonale Nierenzellen. Er fand einen IC<sub>50</sub>-Wert von 21µmol/l (Rampe et al., 1993). Dagegen fand Waldegger im Expressionssystem der Oozyte einen IC<sub>50</sub>-Wert von 5,1µmol/l (Waldegger et al., 1999). Im Gegensatz zu den o.g. Arbeiten wurde hier eine etwa 4fach höhere Empfindlichkeit der Xenopus-Oozyte festgestellt. Für seine Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Versuche benutzte Waldegger Oozyten ohne Hüllen. Da Oozyten dieser Präparationsart eine insgesamt höhere Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Pharmaka aufweisen, könnte dieser Umstand der Grund für die hohe Empfindlichkeit der Oozyten sein. Es bleibt jedoch unverständlich, warum die Empfindlichkeit höher ist als bei der Zelllinie. Die modifizierende Wirkung von zusätzlichen Untereinheiten in den Nierenzellen oder eine präparationsbedingte Zerstörung der Integrität der Oozytenmembran bei einer möglicherweise intrazellulären Wirkung können daher in Betracht gezogen werden.

Im Rahmen einer Arbeit zur molekularen Wirkungsweise von antiarrhythmisch wirksamen Substanzen untersuchte Madeja den Effekt von Propafenon auf Kv1.2- und Kv2.1-Kaliumkanäle sowohl an CHO-Zellen (CHO = Chinese hamster ovary) als auch an Xenopus-Oozyten ohne Hüllen. Beide Kaliumkanäle zeigten in CHO-Zellen eine deutlich höhere Empfindlichkeit gegenüber Propafenon als in Xenopus-Oozyten. Für den Kanal Kv1.2 wurden IC<sub>50</sub>-Werte von 9,8µmol/l (CHO-Zelle) und 953µmol/l (Oozyte) gefunden (Faktor 97), für den Kanal Kv2.1 1,2µmol/l (CHO-Zelle) und 91µmol/l (Oozyte) (Faktor 75) (Madeja

et al., 2003). Zhu fand für Kv2.1-Kaliumkanäle, deren Empfindlichkeit gegenüber Propafenon in CHO-Zellen untersucht wurde, einen IC<sub>50</sub>-Wert von 7 μmol/l (Zhu et al., 1999).

Weiter oben wurde bereits auf die verhältnismäßig hohen Pharmakon-Konzentrationen bei Xenopus-Oozyten im Vergleich zu therapeutischen Plasmakonzentrationen eingegangen. Es muss festgestellt werden, dass die an Oozyten wirksame Substanzkonzentration nicht ohne weiteres auf Herzmuskelzellen des Menschen übertragbar ist. Das gilt auch für Ergebnisse, die durch Versuche an Oozyten ohne Hüllen gewonnen wurden. An Oozyten wird eine etwa 100-fach höhere Substanzkonzentration benötigt als die in der Therapie eingesetzte Menge.

### Möglichkeiten der geringeren Wirksamkeit von Substanzen in Xenopus-Oozyten

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach schrittweiser Entfernung der Hüllschichten zu einer Zunahme der Empfindlichkeit gegenüber antiarrhythmisch wirksamen Substanzen kommt. Die Ergebnisse stimmen mit Angaben in der Literatur überein (Madeja et al., 1997). Trotzdem bleibt die Frage offen, warum selbst Oozyten, die nur noch von Teilen der Vitelinmembran bedeckt sind oder gar keine Hüllschichten mehr aufweisen, sich unempfindlicher gegenüber verschiedenen Substanzen zeigen als andere Zellen. Deshalb sollen im Folgenden drei Erklärungsansätze dargestellt werden:

#### 1. Diffusionsbarrieren

Die Vitelinmembran der Xenopus-Oozyte besteht aus zwei Schichten: Einem inneren dünnen Netzwerk aus horizontal verlaufenden Fibrillen und einer äußeren Schicht aus großen, kabelartigen Fasern, die geflechtartig miteinander verwoben sind (Dumont und Brummett, 1978; Larabell und Chandler, 1988).

In der Literatur sind Arbeiten zu finden, in denen der hemmende Effekt von Peptid-Toxinen auf Ionenkanäle untersucht wurde. Ein Vertreter dieser Gruppe ist α-Dendrotoxin (DTX), welches von einer Schlangenart (*Dendroaspis angusticeps*) produziert wird. Dieses Toxin ist ein einkettiges, aus 59 Aminosäuren bestehendes Molekül und weist drei Disulfidbrücken auf. Es hat ein Molekulargewicht von 7071 Da. Unter dem Einfluss von DTX kommt es sowohl in Oozyten (Tytgat et al., 1995; Hurst et al., 1991) als auch in anderen Expressionssystemen, z.B. in Fibroblasten (Werkman et al., 1992), zu einer ausgeprägten Hemmung verschiedener

Kaliumkanäle. Vergleicht man die zur halbmaximalen Hemmung notwendigen Substanzkonzentrationen, so stellt man fest, dass die  $IC_{50}$ -Werte in den unterschiedlichen Expressionssystemen ähnlich sind und jeweils im nanomolaren Bereich liegen (Harvey, 1997). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen daher eine ungehinderte Diffusion des  $\alpha$ -Dendrotoxins in den verschiedenen Expressionssystemen vermuten. Antiarrhythmisch wirksame Substanzen besitzen im Vergleich zu DTX ein deutlich geringeres Molekulargewicht (Propafenon: 341Da, Flecainid: 414Da, Verapamil: 455Da). Daher muss aus sterischen Gründen davon ausgegangen werden, dass es zu einem ungehinderten Durchtritt dieser Substanzen durch die Vitelinmembran kommt. In verschiedenen Arbeiten wurde der ungehinderte Durchtritt von Ionen und kleinen Molekülen nachgewiesen (Sehy et al., 2002; Cougnon et al., 1995; Dordas und Brown, 2001; Faszewski und Kunkel, 2001).

Die Plasmamembran der *Xenopus*-Oozyte ist stark gefaltet (Stühmer, 1992). Hierdurch könnten Membranabschnitte entstehen, die für hydrophile Substanzen nicht zugänglich sind. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind die von der Plasmamembran gebildeten Mikrovilli zu erkennen. Es scheint jedoch nicht zu einer ausgedehnten Kavernenbildung zu kommen (Zhang et al., 2000). Beim Vergleich der blockierenden Wirkung von Propafenon auf Kv2.1-Kaliumkanäle an isolierten Membranabschnitten (Membranpatch in der inside-out-Konfiguration) und ganzen Oozyten konnte dagegen gezeigt werden, dass an isolierten Membranabschnitten geringere Substanzkonzentrationen nötig sind. Hieraus ergibt sich die Vermutung, dass bei ganzen Oozyten ein insgesamt erschwerter Zugang der Substanz zum Wirkort vorliegen muss (Madeja et al., 2003).

## 2. Akkumulation in Lipidvesikeln bzw. intrazelluläre Bindung

Im Zytoplasma der *Xenopus*-Oozyte lassen sich eine Reihe unterschiedlicher Zellorganellen, wie z.B. lipophiles Eidotter (yolk, yolk platelets), Vesikel und multivesikuläre Körper finden. Es ist bekannt, dass es während der Entwicklung der Oozyte zu einem Austausch von Substanzen zwischen diesen Organellen kommt. Ein Beispiel hierfür ist das an Vitellogenin gebundene Zink, welches in Oozyten früher Entwicklungsstadien (Stadium II) vor allem im Zytosol vorliegt. Im Laufe der Oogenese (Stadium III-IV) lässt es sich jedoch in Vesikeln bzw. multivesikulären Körpern, und danach (Stadium V-VI) zu großen Teilen im lipophilen Eidotter nachweisen (Falchuk et al., 1995). Aufgrund dieser Tatsache ist es denkbar, dass es in den Oozyten, die für die Versuche dieser Arbeit verwendet wurden (Stadium V-VI), zu

einer Akkumulation der Antiarrhythmika im Eidotter gekommen sein könnte. Ein derartiger Vorgang könnte zu einer Verminderung der effektiv wirksamen Konzentration führen. In den Arbeiten von Lai und Yatani wird diese Vermutung ebenfalls geäußert (Lai et al., 1999; Yatani et al., 1993). Daneben wird auch die Möglichkeit der unspezifischen Bindung an intrazelluläre Stoffe diskutiert. Beiden Vermutungen fehlt jedoch der wissenschaftliche Nachweis.

### 3. Veränderung der Kanäle in verschiedenen Expressionssystemen

Posttranslationale Modifikation der Bindungsfähigkeit des Kanals: Eine Veränderung des Kanals durch Phosphorylierung, N-Glykosylierung, Hydroxylierung oder Acetylierung wurde häufig beschrieben (Sigel, 1990; Soreq, 1985). Inwieweit diese Vorgänge jedoch einen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit des Kanals haben, ist unklar. In verschiedenen Artikeln wird zwar auf diese Möglichkeit hingewiesen (Lai et al., 1999; Deal et al., 1996; Rolf et al., 2000; Harris et al., 1997; Kumar et al., 1998; Petersen und Nerbonne, 1999), der wissenschaftliche Nachweis einer veränderten Bindung von Substanzen steht indes aus.

Veränderung der Wirksamkeit der Bindung durch endogene auxiliäre Kanaluntereinheiten: Petersen untersuchte unter anderem den Einfluss von  $\alpha$ -Untereinheiten an Kv1.4 und Kv4.2-Kaliumkanälen in verschiedenen Expressionssystemen. Er fand heraus, dass es unter dem Einfluss dieser Untereinheiten zu  $K^+$ -Strömen über die Membran kommt. Jedoch stellte er quantitative Unterschiede in den jeweiligen Expressionssystemen fest. Daraus lässt sich ableiten, dass es zellspezifische Interaktionen mit endogenen  $\alpha$ -Untereinheiten oder akzessorische  $\beta$ -Untereinheiten geben könnte (Petersen und Nerbonne, 1999).

Vor dem Hintergrund der klinischen Relevanz dieser Arbeit muss bezweifelt werden, dass elektrophysiologische Untersuchungen an Oozyten geeignet sind, Aussagen zu therapeutisch wirksamen Substanzkonzentrationen zu machen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch die Entfernung der Hüllschichten der Oozyte zu einer Zunahme ihrer Empfindlichkeit auf bestimmte Antiarrhythmika kommt (Faktor 2). Die zur halbmaximalen Hemmung notwendigen Substanzkonzentrationen liegen jedoch immer noch deutlich über den therapeutisch angewendeten Dosen (Faktor 50-100). Es sollte daher anderen, weitaus empfindlicheren Expressionssystemen (CHO-Zellen, Myozyten adulter Ratten) der Vorzug

gegeben werden, wenn therapeutisch wirksame Substanzkonzentrationen gefunden werden sollen.

Bei der Grundlagenforschung, beispielsweise bei der Untersuchung der Mechanismen der blockierenden Wirkung verschiedener Substanzen auf Ionenkanäle, hat sich das Oozyten-Expressionssystem vielfach bewährt. Jedoch stellt sich die Frage, welche der drei Präparationsarten der Oozyte für derartige Versuche am besten geeignet ist. Meiner Meinung nach sollten dazu Oozyten mit allen Hüllen herangezogen werden, da sie sich im Vergleich zu defollikulierten Oozyten oder Oozyten ohne Hüllen mechanisch unempfindlicher zeigen. Zudem entfällt die schwierige und zeitaufwendige Präparation, die auch in gewissem Maße eine Verletzung der Zellintegrität bedeuten kann.

## 5. Zusammenfassung

Bei der antiarrhythmischen Wirkung der Substanzen Propafenon, Flecainid und Verapamil wird auch eine Blockierung von Ionenkanälen diskutiert. Untersuchungen zur Wirksamkeit dieser Substanzen an Ionenkanälen werden häufig am Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyte durchgeführt. Es war Ziel dieser Arbeit, den Einfluss der Hüllschichten der Oozyte auf die Wirkung der Antiarrhythmika zu untersuchen. Vor dem Hintergrund der klinischen Relevanz sollte ferner geprüft werden, ob Ergebnisse aus Versuchen an Oozyten geeignet sind, Angaben zu therapeutisch wirksamen Substanzkonzentrationen zu erarbeiten.

Als Referenz wurde der Kaliumkanal Kv2.1 in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) exprimiert. Die Wirkung der Antiarrhythmika auf diesen Kanal wurde in Oozyten dreier Präparationszustände untersucht: Mit Hüllen, nur mit den inneren Hüllschichten und ohne Hüllschichten. Dazu wurden mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik die durch die Kv2.1-Kaliumkanäle fließenden Ionenströme registriert und die Abnahme der Ionenströme bei Applikation der Substanzen gemessen.

Die mittleren Konzentrationen der halbmaximalen Hemmung der Kaliumströme waren bei zunehmender Entfernung der Hüllschichten für Propafenon in den drei Präparationszuständen 216  $\mu\text{mol/l}$  ( $n = 12$ ), 151  $\mu\text{mol/l}$  ( $n = 14$ ) und 91  $\mu\text{mol/l}$  ( $n = 11$ ), für Flecainid 215  $\mu\text{mol/l}$  ( $n = 17$ ), 162  $\mu\text{mol/l}$  ( $n = 16$ ) und 384  $\mu\text{mol/l}$  ( $n = 12$ ) und für Verapamil 80  $\mu\text{mol/l}$  ( $n = 8$ ), 56  $\mu\text{mol/l}$  ( $n = 11$ ) und 55  $\mu\text{mol/l}$  ( $n = 8$ ). Durch die Entfernung der Hüllschichten lässt sich damit für Propafenon und Verapamil eine ansteigende Zunahme der Empfindlichkeit der Oozyte bis etwa um den Faktor 2 erreichen, während für Flecainid in dieser Arbeit eine Abnahme bei Oozyten ohne Hüllen gemessen wurde.

Aus den Ergebnissen der Arbeit und dem Vergleich mit Literaturbefunden lässt sich ableiten, dass

1. die Entfernung der Hüllschichten der *Xenopus*-Oozyte zu einer Zunahme der Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Antiarrhythmika führt,

2. im Vergleich zu anderen Expressionssystemen selbst in Oozyten ohne Hüllen höhere Substanzkonzentrationen nötig sind, um denselben blockierenden Effekt zu erreichen,
3. die in der Literatur angegebenen therapeutischen Plasmakonzentrationen im Bereich der Werte anderer Expressionssysteme liegen, jedoch von denen der Xenopus-Oozyte abweichen.

Die Arbeit zeigt, dass es nicht möglich ist, auf der Basis von Ergebnissen, die im Expressionssystem der Oozyte gewonnen wurden, Angaben zu therapeutisch wirksamen Substanzkonzentrationen von Antiarrhythmika zu erarbeiten.

Für konzentrationsunabhängige Versuche, wie z.B. für grundsätzliche Wirkmechanismen, sollten vorzugsweise Oozyten mit allen Hüllen herangezogen werden, da sie mechanisch unempfindlicher sind.

## 6. Literatur

- ARIAS C, GONZÁLEZ T, MORENO I, CABALLERO R, DELPÓN E, TAMARGO J, VALENZUELA C (2003) Effects of propafenone and its main metabolite, 5-hydroxypropafenone, on HERG channels. *Cardiovasc Res* **57(3)**: 660-669.
- BARTH LG, BARTH LJ (1959) Differentiation of cells of the *Rana pipiens* gastrula in unconditioned medium. *J Embryol Exp Morph* **7**: 210-222.
- BECK OA, HOCHREIN H (1978) Indications and risks of antiarrhythmia treatment with propafenone. *Dtsch Med Wochenschr* **103(32)**: 1261-1265.
- BEZANILLA F, ARMSTRONG CM (1977) Inactivation of the sodium channel. I: Sodium current experiments. *J Gen Physiol* **70(5)**: 549-566.
- BOU-ABBOUD E, LI H, NERBONNE JM (2000) Molecular diversity of the repolarizing voltage-gated K<sup>+</sup> currents in mouse atrial cells. *J Physiol* **529 (2)**: 345-358.
- COUGNON M, BOUYER P, HULIN P, ANAGNOSTOPOULOS T, PLANELLES G (1996) Further investigation of ionic diffusive properties and of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pathways in *Xenopus laevis* cell membrane. *Eur J Physiol* **431**: 658-667.
- COVARRUBIAS M, WEI A, SALKOFF L (1991) Shaker, Shal, Shab and Shaw express independent K<sup>+</sup> current systems. *Neuron* **7**: 763-773.
- DASCAL N (1987) The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *Crit Rev Biochem* **22**: 317-387.
- DEAL KK, ENGLAND SK, TAMKUN MM (1996) Molecular physiology of cardiac potassium channels. *Physiol Rev* **76**: 49-67.
- DESSEV G, GOLDMAN R (1990) Effect of calcium on the stability of the vitelline envelope of surf clamp oocytes. *Biol Bull* **178**: 210-216.
- DIXON JE, MCKINNON D (1994) Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circ Res* **75**: 252-260.
- DORDAS C, BROWN PH (2001) Permeability and the mechanism of transport of boric acid across the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Biol Trace Elem Res* **81(2)**: 127-139.
- DOYLE DA, CABRAL JM, PFUETZNER RA, KUO A, GULBIS JM, COHEN SL, CHAIT BT, MACKINNON R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science (Wash DC)* **280**: 69-77.
- DRAPER MH, WEIDMANN S (1951) Cardiac resting and action potential recorded with an intracellular electrode. *J Physiol (Lond)* **115**: 74-82.

- DUMONT JN (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* **136**: 153-179.
- DUMONT JN, BRUMMETT AR (1978) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. *J Morphol* **155 (1)**: 73-97.
- ENGLAND SK, UEBELE VN, SHEAR H, KODALI J, BENNETT PB (1995) Characterization of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel  $\beta$  subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6309-6313.
- FALCHUK KH, MONTORZI M, VALLEE BL (1995) Zinc uptake and distribution in *Xenopus laevis* oocytes and embryos. *Biochemistry* **34(50)**: 16524-16531.
- FASZEWSKI EE, KUNKEL JG (2001) Covariance of ion flux measurements allows new interpretation of *Xenopus laevis* oocyte physiology. *J Exp Zool* **290**: 652-661.
- GALILI G, KATAWA EE, SMITH LD, LARKINS BA (1988) Role of the 3'-poly(A) sequence in translational regulation of mRNAs in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* **263(12)**: 5764-5770.
- GOLDIN AL (1992) Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. *Methods Enzymol* **207**: 266-279.
- GRISSMER S, NGUYEN AN, AIYAR J, HANSON DC, MATHER RJ, GUTMAN GA, KARMILOWICZ MJ, AUPERIN DD, CHANDY KG (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5 and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* **45**: 1227-1234.
- GRUPE A, SCHROTER KH, RUPPERSBERG JP, STOCKER M, DREWES T, BECKH S, PONGS O (1990) Cloning and expression of a human voltage-gated potassium channel. A novel member of the RCK potassium channel family. *EMBO J* **9**: 1749-1756.
- HARRIS RA, MIHIC SJ, BROZOWSKI S, HANDINGHAM K, WHITING PJ (1997) Ethanol, flunitrazepam, and pentobarbital modulation of GABAA receptors expressed in mammalian cells and *Xenopus* oocytes. *Alcohol Clin Exp Res* **21(3)**: 444-451.
- HARVEY AL (1997) Recent studies on dendrotoxins and potassium ion channels. *Gen Pharmac* **28(1)**: 7-12.
- HODGKIN AL, HUXELEY AF, KATZ B (1952) Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol (Lond)* **116**: 424-448.
- HOSHI T, ZAGOTTA WN, ALDRICH RW (1990) Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **250**: 533-538.
- HUANG B, QIN D, EL-SHERIF N (2000): Early down-regulation of K<sup>+</sup> channel genes and currents in the postinfarction heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* **11**: 1252-1261.

- HURST RS, BUSCH AE, KAVANAUGH MP, OSBORNE PB, NORTH RA, ADELMAN JP (1991) Identification of amino acid residues involved in dendrotoxin block of rat voltage-dependent potassium channels. *Mol Pharmacol* **140**: 572-576.
- HWANG PM, GLATT CE, BREDT DS, YELLEN G, SNYDER SH (1992) A novel K<sup>+</sup> channel with unique localizations in mammalian brain: molecular cloning and characterization. *Neuron* **8**: 473-481.
- KALUSCHE D (1996) Klinik der medikamentösen Therapie. In: ROSKAMM H, REINDELL H (HRSG.) Herzkrankheiten – Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie. **4. Aufl.** Springer-Verlag Berlin, S. 1224-1240.
- KRIEG PA, MELTON DA (1987) In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Meth Enzymol* **155**: 397-415.
- KUMAR CK, NGUYEN TT, GONZALES FB, SAID HM (1998) Comparison of intestinal folate carrier clone expressed in IEC-6 cells and in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* **274 (1 Pt 1)**: C289-94.
- LAI LP, SU MJ, TSENG YZ, LIEN WP (1999): Sensitivity of the slow component of the delayed rectifier potassium current (I<sub>Ks</sub>) to potassium channel blockers: Implications for clinical reverse use-dependent effects. *J Biomed Sci* **6**: 251-259.
- LARABELL CA, CHANDLER DE (1988) The extracellular matrix of *Xenopus laevis* eggs: a quick-freeze, deep-etch analysis of its modification at fertilization. *J Cell Biol* **107(2)**: 731-741.
- LEWALTER T, LÜDERITZ B (2000) Arzneimitteltherapie der Herzrhythmusstörungen. *Internist* **41**: 22-33.
- LI M, JAN YN, JAN LY (1992) Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* **257**: 1225-1230.
- LITTAUER ZU, SOREQ H (1982) The regulatory function of poly(A) and adjacent 3' sequences in translated RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **27**: 53-83.
- MACKINNON R, YELLEN G (1990) Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage activated K<sup>+</sup> channels. *Science* **250**: 276-279.
- MADEJA M, LEICHLER T, FRIEDRICH P, PUNKE MA, HAVERKAMP W, MUBHOFF U, BREITHARDT G, SPECKMANN EJ (2003) Molecular site of action of the antiarrhythmic drug propafenone at the voltage-operated potassium channel Kv2.1. *Mol Pharmacol* **63**: 547-556.
- MADEJA M, MUBHOFF U (1992) Die Eizellen des Krallenfrosches als Modell in der Neurophysiologie. *EEG-Labor* **14**: 25-37.
- MADEJA M, MUBHOFF U, SPECKMANN EJ (1997) Follicular tissues reduce drug effects on ion channels of *Xenopus laevis*. *Eur J Neurosci* **9**: 599-604.

- MANZ M, MLETZKO R, JUNG W, LÜDERITZ B (1992) Electrophysiological and hemodynamic effects of lidocaine and ajmaline in the management of sustained ventricular tachycardia. *Eur Heart J* **13**: 1123-1128.
- MCCAMAN RE, CARBINI L, MAINES V, SALVATERRA PM (1988) Single RNA species injected in *Xenopus* oocyte directs the synthesis of active choline acetyltransferase. *Brain Res* **427(2)**: 107-113.
- MELTON DA, KRIEG PA, REBAGLIATI MR, MANIATIS T, ZINN K, GREEN MR (1984) Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acid Res* **12**: 7035-7056.
- MEMBERS OF THE SICILIAN GAMBIT (2001) New approaches to antiarrhythmic therapy: emerging therapeutic applications of the cell biology of cardiac arrhythmias. *Cardiovasc Res* **52**: 345-360.
- MILEDI R, WOODWARD RM (1989) Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **416**: 601-621.
- MILLER C (1991) 1990: Annus mirabilis of potassium channels. *Science* **252**: 1092-1096.
- MORI Y, FRIEDRICH T, KIM MS, MIKAMI A, NAKAI J, RUTH P, BOSSE E, HOFMANN F, FLOCKERZI V, FURUICHI T, MIKOSHIBA K, IMOTO K, TANABE T, NUMA S (1991) Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* **350**: 398-402.
- NISHIYAMA A, KAMBE F, KAMIYA K, SEO H, TOYAMA J (1998) Effects of thyroid status on expression of voltage-gated potassium channels in rat left ventricle. *Cardiovasc Res* **40**: 343-351.
- NODA M, IKEDA T, KAYANO T, SUZUKI H, TAKESHIMA H, KURASAKI M, TAKAHASHI H, NUMA S (1986) Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature* **320**: 188-192.
- NUMBERGER M, DRAGUHN A (1996) Patch-clamp-Technik. *Spektrum Akademischer Verlag (Heidelberg)* S.112-113.
- PAPAZIAN DM, TIMPE LC, JAN YN, JAN LY (1991) Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* **349**: 305-310.
- PETERSEN KR, NERBONNE JM (1999) Expression environment determines K<sup>+</sup> current properties: Kv1 and Kv4 alpha-subunit-induced K<sup>+</sup> currents in mammalian cell lines and cardiac myocytes. *Pflugers Arch* **437(3)**: 381-392.
- PONGS O (1992) Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol Rev* **72**: 69-88.
- QIN D, HUANG B, DENG L, EL-ADAWI H, GANGULY K, SOWERS JR, EL-SHERIF N (2001) Downregulation of K<sup>+</sup> channel genes expression in type I diabetic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* **283**: 549-553.

RAMPE D, WIBLE B, FEDIDA D, DAGE RC, BROWN AM (1993) Verapamil blocks a rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> channel cloned from human heart. *Mol Pharmacol* **44**: 642-648.

Roden DM, Woosley RL (1986) Drug therapy. Flecainide. *N Engl J Med* **315**(1): 36-41.

RODEN DM, KUPERSHMITD S (1999) From genes to channels: normal mechanisms. *Cardiovasc Res* **42**: 318-326.

ROLF S, HAVERKAMP W, BORGGREFE M, MUBHOFF U, ECKARDT L, MERGENTHALER J, SNYDERS DJ, PONGS O, SPECKMANN EJ, BREITHARDT G, MADEJA M (2000) Effects of antiarrhythmic drugs on cloned cardiac voltage-gated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **362**: 22-31.

RUPPERSBERG JP, SCHROETER KH, SAKMAN B, STOCKER M, SEWING S, PONGS O (1990) Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* **345**: 535-537.

SEHY JV, ACKERMAN JJ, NEIL JJ (2002) Apparent diffusion of water, ions and small molecules in the *Xenopus* oocyte is consistent with Brownian displacement. *Magn Reson Med* **48**(1): 42-51.

SIGEL E (1990) Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J Membrane Biol* **117**: 201-221.

SINGH BN, NADEMANEE K, BAKY SH (1983) Calcium antagonists. Clinical use in the treatment of arrhythmias. *Drugs* **25**(2): 125-153.

SIPPEL AE (1973) Purification and characterization of adenosine triphosphate: ribonucleic acid adenyltransferase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **37**(1): 31-40.

SNUTCH TP (1988) The use of *Xenopus* oocytes to probe synaptic communication. *Trends Neurosci* **11**: 250-256.

SNYDERS DJ (1999) Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* **42**: 377-390.

SOREQ H (1985) The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected *Xenopus* oocytes. *CRC Crit Rev Biochem* **18**(3): 199-238.

STEIN WD (1986) Transport and diffusion across cell membranes. *Academic Press, London*.

STÜHMER W (1992) Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol* **207**: 319-339.

SWANSON R, MARSHALL J, SMITH JS, WILLIAMS JB, BOYLE MB, FOLANDER K, LUNEAU CJ, ANTANAVAGE J, OLIVA C, BUHROW SA ET AL. (1990) Cloning and expression of cDNA and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain. *Neuron* **4**(6): 929-939.

- TANABE T, TAKESHIMA H, MIKAMI A, FLOCKERZI V, TAKAHASHI H, KANGAWA K, KOJIMA M, MATSUO H, HIROSE T, NUMA S (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**: 313-318.
- TRISTANI-FIROUZI M, CHEN J, MITCHESON JS, SANGUINETTI MC (2001) Molecular biology of K<sup>+</sup> channels and their role in cardiac arrhythmias. *Am J Med* **110**: 50-59.
- TYTGAT J, DEBONT T, CARMELIET P, DAENENS P (1995) The  $\alpha$ -dendrotoxin footprint on a mammalian potassium channel. *J Biol Chem* **270**: 24776-24781.
- VAUGHAN EM, WILLIAMS DM (1975) Classification of antidysrhythmic drugs. *Pharmacol Ther [B]***1(1)**: 115-138.
- WALDEGGER S, NIEMEYER G, MÖRIKE K, WAGNER CA, SUESSBRICH H, BUSCH AE, LANG F, EICHELBAUM M (1999) Effect of verapamil enantiomers and metabolites on cardiac K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Cell Physiol Biochem* **9**: 81-89.
- WANG HC, BEER B, SASSANO D, BLUME AJ, ZIAI M (1991) Gene expression in *Xenopus* oocytes. *Int J Biochem* **23**: 271-276.
- WALSH KB, SWEET JK, PARKS GE, LONG KJ (2001) Modulation of outward potassium currents in aligned cultures of neonatal rat ventricular myocytes during phorbol ester-induced hypertrophy. *Mol Cell Cardiol* **33**: 1233-1247.
- WATERS DD, SZLACHCIC J, THEROUX P, DAUWE F, MIZGALA HF (1981) Ergonovine testing to detect spontaneous remissions of variant angina during long-term treatment with calcium antagonist drugs. *Am J Cardiol* **47(1)**: 179-184.
- WERKMAN TR, KAWAMURA T, YOKOYAMA S, HIGASHIDA H, ROGAWSKI MA (1992) Charybdotoxin, dendrotoxin and mast cell degranulating peptide block the voltage-activated K<sup>+</sup> current of fibroblast cells stably transfected with NGK1 (Kv1.2) K<sup>+</sup>-channel. *Neuroscience* **50**: 935-946.
- YAMAGISHI T, ISHII K, TAIRA N (1995) Antiarrhythmic and bradycardiac drugs inhibit currents of cloned K<sup>+</sup> channels, K<sub>v1.2</sub> and K<sub>v1.4</sub>. *Eur J Pharmacol* **281**: 151-159.
- YATANI A, WAKAMORI M, MIKALA G, BAHINSKI A (1993) Block of transient outward-type cloned cardiac K<sup>+</sup> channel currents by quinidine. *Circ Res* **73**: 351-359.
- YELLEN G (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature (England)* **419**: 35-42.
- YEOLA SW, SNYDERS DJ (1997) Electrophysiological and pharmacological correspondence between Kv4.2 current and rat cardiac transient outward current. *Cardiovasc Res* **33**: 540-547.
- ZAGOTTA WN, ALDRICH RW (1990) Voltage-dependent gating of shaker A-type potassium channels in *Drosophila* muscle. *J Gen Physiol* **95**: 29-60.

ZHANG Y, GAO F, POPOV VL, WEN JW, HAMILL OP (2000) Mechanically gated channel activity in cytoskeleton-deficient plasma membrane blebs and vesicles from *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **523.1**: 117-130.

ZHU X-R, NETZER R, BÖHLKE K, LIU Q, PONGS O (1999) Structural  $\gamma$ -subunit of voltage-gated potassium channel. *Receptors Channels* **6**: 337-350.

## **7. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Erwin-Josef Speckmann möchte ich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten im Institut für Physiologie danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Madeja, der mir mit seinem großen Engagement bei der Betreuung und mit seiner menschlichen Art eine unverzichtbare Stütze bei der Fertigstellung der Dissertation war. Insbesondere bei den ersten Schritten im Rahmen der experimentellen Arbeiten zeigte er Verständnis für anfängliche Schwierigkeiten und gab mir mit seiner Nachsicht den Mut, bei Misserfolgen nicht zu resignieren, sondern die Versuche voranzutreiben.

Ich bedanke mich bei Frau Alexandra Zirpins für die kompetente und unkomplizierte Einführung in die labortechnischen Feinheiten sowie für ihre Unterstützung bei der Vorbereitung der Versuche.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie, insbesondere Herrn Dr. Martin Schwarz, möchte ich für ihre offene Art und ihre Hilfsbereitschaft danken. Sie gaben mir als Doktorand das Gefühl, im Institut erwünscht und integriert zu sein.

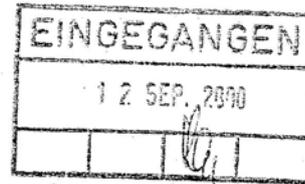
## 8. Lebenslauf

Name:	Claudius Middelberg
Geburtsdatum:	30.08.1975
Geburtsort:	Greven
Eltern:	Dr. phil. Paul Middelberg (verstorben am 02.01.1981) und Gerda Middelberg, geb. Hüls
1982 – 1986:	Besuch der Katholischen Grundschule Havixbeck.
1986 – 1995:	Besuch des Gymnasium Paulinum Münster; Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am 14.06.1995.
09/1995:	Beginn der Ausbildung für den gehobenen Polizeidienst.
10/1995:	Beendigung der Ausbildung für den gehobenen Polizeidienst auf eigenen Wunsch.
12/1995 – 01/1997:	Ableistung des Zivildienstes in der Akutpsychiatrischen Abteilung der „Klinik am Schlossgarten“, Dülmen.
04/1997:	Beginn des Studiums der Zahnheilkunde an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.
23.09.1998:	Naturwissenschaftliche Vorprüfung.
28.09.1999:	Zahnärztliche Vorprüfung.
11/1999:	Beginn der experimentellen Tätigkeit für die Promotion am Institut für Physiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität unter der Leitung von Prof. Michael Madeja.
09.07.2002:	Staatsexamen.
22.07.2002:	Approbation als Zahnarzt.
02.09.2002:	Beginn der Tätigkeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Zahnärztliche Prothetik des Universitätsklinikums Münster.

## **9. Anhang**



Bezirksregierung Münster



Bezirksregierung Münster . 48128 Münster

Herrn  
Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann  
Institut für Physiologie der  
Westf. Wilhelms-Universität Münster  
Robert-Koch-Str. 27 a

48149 Münster

Dienstgebäude  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Zimmer: 431  
Frau Möllers  
Aktenzeichen  
23.0835.1.0 ( G 32/97 )

7 . September 2000

Betr.: Tierschutz;  
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren  
Verlängerung des Tierversuchs G 32/97:  
" Experimentelle Epilepsieforschung "

Bezug: Antrag vom 24.08.2000  
Mein Genehmigungsbescheid vom 23.10.1997 - Az.: w. o. -

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Speckmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) verlängere ich auf Ihren Antrag hin die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o.a. Versuchsvorhabens bis zum 31.10.2001.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Dr. Piontkowski