

Funktionelle Eigenschaften von EAG-Kaliumkanälen und ihre Rolle in humanen  
Melanomzellen

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dr. rer. nat./VAK Oxana Gavrilova-Ruch,  
geboren am 16.05.1970 in Moskau

**Gutachter:**

**Prof. Dr. Stefan H. Heinemann**

Arbeitsgruppe „Molekulare und zelluläre Biophysik“, Klinikum der Friedrich-Schiller  
Universität Jena

**Prof. Dr. Ingo Dahse**

Institut für Biochemie und Biophysik, Friedrich-Schiller Universität Jena

**Prof. Dr. Albrecht Schwab**

Institut für Physiologie II, Klinikum der Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Tag der Verteidigung: 15.11.2004

## **Inhalt**

### **1. Einleitung**

- 1.1 Vielfältigkeit der Kaliumkanäle
- 1.2 Kaliumkanäle der EAG-Familie
  - 1.2.1 Elektrophysiologische Eigenschaften
  - 1.2.2 Regulation des EAG-Kanals durch Magnesium und andere divalente Kationen
  - 1.2.3 Calcium-Regulation
  - 1.2.4 Pharmakologie
  - 1.2.5 Physiologische Bedeutung der EAG-Kanäle
- 1.3 Proliferation der Melanomzelle
- 1.4 Regulation der Kaliumkanäle durch Fettsäuren
- 1.5 Zielstellung der Arbeit
  - 1.5.1 Pharmakologische Untersuchungen an hEAG-Kanälen
  - 1.5.2 Physiologische Rolle von hEAG-Kanälen in Melanomzellen
  - 1.5.3 Wechselwirkung von hEAG-Kanälen mit ungesättigten Fettsäuren

### **2. Material und Methoden**

- 2.1 Experimente mit Säugerzellen
  - 2.1.1 Zellkulturen
  - 2.1.2 Herstellung von DNA-Chimären und Mutanten

- 2.1.3 Transfektion
- 2.1.4 Elektrophysiologische Messungen
- 2.1.5 Applikation von Wirksubstanzen
- 2.1.6 Proliferationsuntersuchungen
- 2.2 Experimente an *Xenopus*-Oozyten
  - 2.2.1 Herstellung von mRNA
  - 2.2.2 mRNA-Injektion in Oozyten
  - 2.2.3 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme
  - 2.2.4 Patch-Clamp in „Inside-Out“ und „Outside-Out“ Konfigurationen
- 2.3 Protokolle und Datenanalyse
  - 2.3.1 Datenauswertung
  - 2.3.2 Pharmakologische Messungen an Ionenkanälen
  - 2.3.3 Auswertung des Schaltverhaltens der Kanäle aus der Strom-Spannungskennlinie
  - 2.3.4 EAG-Aktivierungsmodell

### **3. Ergebnisse**

- 3.1 Ionenkanäle von IGR1-Melanomzellen und ihre pharmakologischen Eigenschaften
  - 3.1.3 hEAG1-Kanal
  - 3.1.2 Calcium-aktivierte Kaliumkanäle

- 3.1.3 Volumen-aktivierte Chloridkanäle
- 3.1.4 Cs<sup>+</sup>-permeabler Kanal
- 3.2 Ionenkanäle von IGR39-Melanomzellen und ihre pharmakologischen Eigenschaften
- 3.3 Physiologische Bedeutung von hEAG1-Kanälen in Melanomzellen
  - 3.3.1 Inhibition des Wachstums von Melanomzellen durch Ionenkanalblocker
    - 3.3.1.1 Wirkstoffstabilitätstest
    - 3.3.1.2 Proliferation der IGR1-Zellen bei Applikation von verschiedenen Ionenkanalblockern
    - 3.3.1.3 Proliferation der IGR39-Zellen bei Applikation von Imipramin und ChTX
  - 3.3.2 Kaliumkanäle kontrollieren das Ruhepotential von IGR1-Zellen
- 3.4 Mechanismus des Imipramin-Blockes der hEAG-Kanäle
  - 3.4.1 Biophysikalische Eigenschaften des hEAG1-Kanal-Blockes durch Imipramin
  - 3.4.2 Block des hEAG2-Kanals durch Imipramin
- 3.5 Wechselwirkung von EAG-Kaliumkanälen mit Fettsäuren
  - 3.5.1 Ungesättigte Fettsäuren aktivieren Kaliumkanäle der EAG-Subfamilie
  - 3.5.2 Der Effekt von Arachidonsäure auf die Kanäle rNav1.4 und hKv1.5
  - 3.5.3 Regulation von hEAG1-Kanälen mit Arachidonsäure bei -30 mV
  - 3.5.4 Die Suche nach den molekularen Mechanismen der Wechselwirkung von Arachidonsäure mit EAG-Kanälen

## **4. Diskussion**

- 4.1 Der Block von hEAG-Kanälen durch Imipramin
- 4.2 Ionenkanäle der Melanomzellen und Proliferation
  - 4.2.1 Pharmakologie der Ionenkanäle in IGR1- und IGR39-Melanomzellen
  - 4.2.2 Proliferation der IGR1-Zellen
  - 4.2.3 Proliferation der IGR39-Zellen
- 4.3 hEAG1-Kanal und Zellzyklus der IGR1-Zellen
  - 4.3.1 Regulation von hEAG1-Kanälen im Laufe des Zellzyklus
  - 4.3.2 Regulation des Zellzyklus durch den hEAG1-Kanal
- 4.4 Aktivierung von EAG-Kanälen durch ungesättigten Fettsäuren
  - 4.4.1 Wirkung von Arachidonsäure auf Kv1.5 und hEAG-Kanäle
  - 4.4.2 Wirkung von verschiedenen ungesättigten Fettsäuren auf den hEAG1-Kanal
  - 4.4.3 Mechanismus der Arachidonsäure-Wirkung auf den hEAG1-Kanal
  - 4.4.4 Physiologische Rolle von Aktivierung der hEAG-Kanäle durch Fettsäuren

## **5. Zusammenfassung**

## **6. Referenzen**

## 1. Einleitung

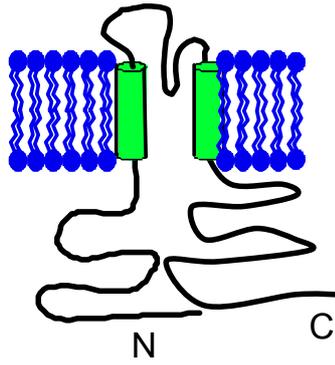
### 1.1 Vielfältigkeit der Kaliumkanäle

Alle lebenden Zellen führen einen Ionenaustausch mit der Umwelt durch. Kationen und Anionen werden ständig durch die Zellmembran geleitet. Durch diesen Austausch wird sowohl die elektrische Erregbarkeit als auch die osmotische Bilanz der Zellen reguliert. Der Ionentransport wird durch spezielle Proteine, die in die zweischichtige Lipidmatrix eingebettet sind, ausgeführt.

ATPasen, die die Energie der ATP-Hydrolyse dazu benutzen, um Ionen oder kleine Moleküle gegen deren elektrochemische Gradienten zu bewegen, werden Pumpen genannt. Transporter binden Ionen oder Moleküle und wechseln dabei fortwährend ihre Konformation. Kanäle leiten die Ionen passiv, d.h. aufgrund deren chemischer Gradienten und des elektrischen Potentials der Membran. Während Pumpen oder Transporter lediglich eine Durchlässigkeit von ca.  $10^{-10}$  Ionen/s erreichen, können bis zu  $10^8$  Ionen/s durch spezifische Kanäle fließen. Die Kanäle werden dabei oft mit Hilfe des elektrischen Membranpotentials oder durch das Binden von Liganden geöffnet oder geschlossen.

Kaliumkanäle sind integrale Membranproteine, welche geregelten Strom von  $K^+$ -Ionen gewährleisten. Diese Kanäle sind in allen Zelltypen vorhanden, auch in Prokaryonten. Durch den Kaliumstrom wird das Membranpotential gesteuert und die Repolarisation nach einem Aktionspotential reguliert. In multizellulären Organismen regelt Kaliumstrom die neuronale Erregbarkeit, die Freisetzung von Hormonen und Neurotransmittern, die Rhythmik des Herzschlages und andere wichtige Funktionen. Außerdem spielt der Kaliumtransport eine wichtige Rolle für die osmotische Bilanz der Zelle.

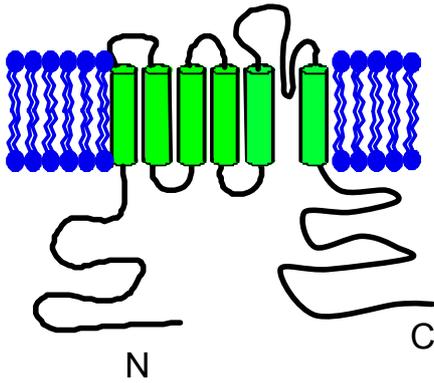
Hydrophobizitätsanalysen der Primärstrukturen der Proteine, die funktionelle Kaliumkanäle bilden können (sog.  $\alpha$ -Untereinheiten), deuten auf eine Topologie mit zwei oder sechs membranspannenden Bereichen hin (Abb. 1). Die heutigen Vorstellungen über die Porenstruktur von Kaliumkanälen basieren auf der Röntgenstrukturanalyse des bakteriellen Kaliumkanals KcsA aus *Streptomyces lividans* (Doyle et al., 1998; Clapman, 1999). Dieser Kaliumkanal hat zwei Transmembransegmente in jeder seiner vier Untereinheiten. Die Röntgenstrukturanalyse zeigt, dass die vier Untereinheiten sich so anordnen, dass sich in ihrer Mitte ein zentraler Kanal bildet, durch den Ionen fließen (sog. Pore). Die besonders starke Konservierung von Aminosäuren im Bereich



2 TM:

Bakterieller Kanal KscA

K<sub>ir</sub>-Kanäle



6 TM:

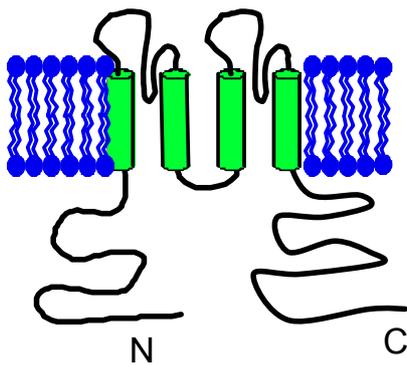
K<sub>v</sub>-Kanäle

EAG-Kanäle

KCNQ-Kanäle

Calcium-regulierte Kanäle

CNG-Kanäle



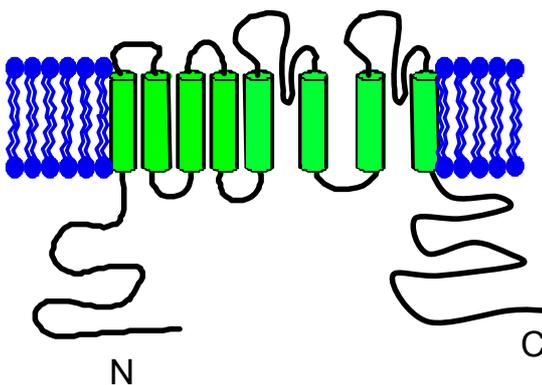
2 TM-2 P:

TWIK

TREK

TRAAK

TASK



6 TM-2 P:

TOK-1

**Abb. 1** Strukturelle Verwandtschaft zwischen Kaliumkanälen. Dargestellt sind topologische Modelle der  $\alpha$ -Untereinheiten.

des Selektivitätsfilters und die Tatsache, dass die KcsA-Kanalblocker auch in Poren der anderen Kaliumkanäle binden, spricht dafür, dass die Grundstruktur der KcsA-Pore auf alle homologen Kaliumkanäle übertragbar ist (MacKinnon et al., 1998).

Viele  $\alpha$ -Untereinheiten assoziieren mit anderen kleineren Proteinen, den  $\beta$ -Untereinheiten. Diese zytoplasmatischen Proteine binden an  $\alpha$ -Untereinheiten der Kaliumkanäle im Bereich des N-Terminus (Sewing et al., 1996) und verändern die Funktion der  $\alpha$ -Untereinheiten (sie tragen z.B. zur Inaktivierung der Kanäle bei; Rettig et al., 1994).

Abb. 1 zeigt das topologische Schema der  $\alpha$ -Untereinheiten der bekannten Kaliumkanäle (nach Wei et al., 1996). Zu den Kanälen mit zwei Transmembransegmenten (2TM) gehören der bakterielle Kaliumkanal KcsA und die Gruppe von Einwärtsgleichrichtern (Kir,  $K^+$  channel inward rectifier). Kir-Kanäle sind im negativen Spannungsbereich geöffnet. Der dabei durch die Kanäle fließende auswärtsgerichtete Strom trägt wesentlich zur Einstellung des zellulären Ruhepotentials bei (Reimann und Ashcroft, 1999).

Zu den Kanälen mit sechs Transmembrangängen (6TM) gehören die Gruppen der Kv-Kanäle ( $K^+$  channel voltage-gated; sog. *Shaker*-Gruppe) und der EAG-Kanäle ( $K^+$  channel *ether à go-go*). Diese Kanäle werden durch Änderungen des elektrischen Membranpotentials zum Öffnen oder Schließen veranlasst. Kv- und EAG-Kanäle zeigen große Ähnlichkeiten im Bereich der Transmembransegmente. Die Transmembrandomänen S1, S2, S3, S5 und S6 sind überwiegend aus Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten aufgebaut. Das S4-Segment trägt dagegen positiv geladene Aminosäuren. Dieses Segment funktioniert wie ein Spannungssensor (Yellen, 1998; Papazian, 1999). Die im Zytoplasma lokalisierten N- und C-Termini zeigen dagegen geringe Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen.

Eine weitere Gruppe bilden die KCNQ-Kanäle. Sie unterscheiden sich von Kv-Kanälen vor allem in den Aminosäuresequenzen im N-Terminus sowie im Bereich zwischen der Pore und dem S6-Segment. Der erste klonierte Kanal aus dieser Gruppe, KvLQT1 (KCNQ1), regelt die Repolarisation in Herzmuskelzellen.

Die Kanäle anderer Gruppen binden spezifische Liganden, die das Schaltverhalten der Kanäle regulieren. Als solche Liganden sind Calcium-Ionen oder zyklische Nukleotide (cAMP, cGMP) bekannt. Calcium-regulierte Kanäle werden anhand ihrer Einzelkanalleitfähigkeiten in die drei Subfamilien SK (small), IK (intermediate) und BK (big conductance) eingeteilt. Die Kanäle der BK-Familie sind zudem durch Depolarisation aktivierbar. Calcium-regulierte Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der zellulären Signalübertragung (Vergara et al., 1998).

Die durch Bindung der zyklischen Nukleotide regulierten Kanäle (CNG, cyclic nukleotide gated) zeigen eine strukturelle Verwandtschaft zu den oben genannten Kaliumkanälen, sind im Gegensatz zu diesen jedoch unselektiv. Sie lassen außer  $K^+$ - auch  $Ca^{2+}$ - und  $Na^+$ - Ionen passieren. Der durch diese Kanäle gewährleistete Kationen-Strom spielt eine wichtige Rolle für die Signalübertragung in Photo- und Odorantrezeptorzellen (Zufall et al., 1997; Biel et al., 1999).

Eine weitere Gruppe bilden die sog. „Zwei-Poren-Kanäle“. Zwei 2-Poren- $\alpha$ -Untereinheiten bilden einen Kanal mit zentraler Pore und tetramerer Symmetrie. Ihre Aktivität hängt nicht vom Membranpotential, sondern von anderen Regulationsmechanismen (z.B. vom intrazellulären pH-Wert, der Fettsäurekonzentration, der mechanischen Dehnung) ab. Die bedeutende Rolle dieser Kanäle bei der Einstellung des zellulären Ruhepotentials ist seit kurzem bekannt (Lesage und Lazdunski, 2000).

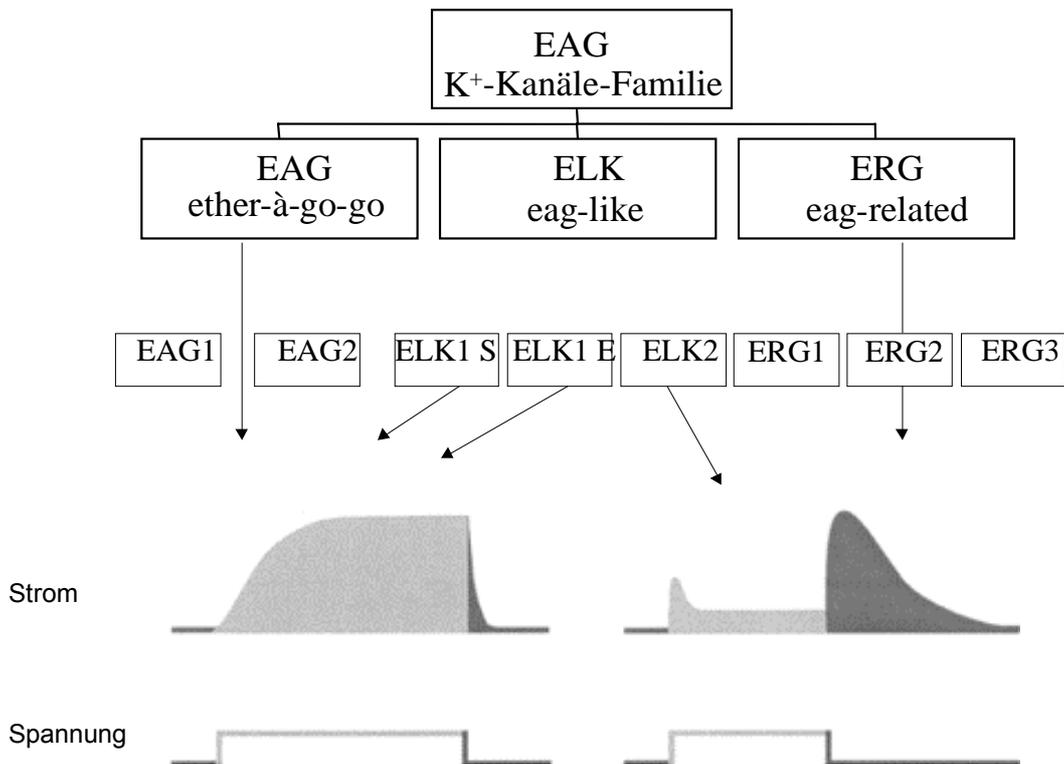
Der TOK-1 Kanal ist bei der Untersuchung von Hefezellen beschrieben (Bertl et al., 1998). Dieses Protein besteht aus zwei 2-Porendomänen mit einem typischem 6TM-Aufbau.

## 1.2 Kaliumkanäle der EAG-Familie

Zu den spannungsabhängigen auswärtsgleichrichtenden Kanälen gehören die Kaliumkanäle der *EAG*-Familie. Die Bezeichnung *ether à go-go* (EAG) ist entstanden, als bei der Mutation des das Protein kodierenden Gens das rhythmische Zucken der Beine von *Drosophila* während Etherbehandlung beobachtet wurde (Warmke et al., 1991). Elektrophysiologische und pharmakologische Eigenschaften der Kanäle wurden von Brüggemann und Kollegen (1993) im *Xenopus*-Oozyten-Expressionssystem untersucht. Der auswärtsgleichrichtende Strom von nicht-inaktivierenden Kanälen wurde ab  $-40$  mV registriert. Die Kanäle zeigten eine hohe Selektivität für  $K^+$ -Ionen. Die dEAG-Kanäle waren auch für  $NH_4^+$  und  $Cs^+$  durchlässig.

Sequenzen, die eine Homologie zu *Drosophila* EAG zeigten, wurden später auch in Genomen von Säugetieren entdeckt (Warmke und Ganetzky; 1994).

Heute unterscheidet man in der *EAG*-Familie drei Subfamilien: EAG, ELK (*eag-like*  $K^+$ ) und ERG (*eag-related gene*) (Bauer und Schwarz; 2000). Kanäle der EAG-Subfamilie und ELK1-Kanal inaktivieren nicht; die Kanäle der ERG-Subfamilie und ein ELK2-Kanal inaktivieren dagegen schnell (Abb. 2).



**Abb. 2** Familie der EAG-Kanäle (nach Bauer und Schwarz, 2000)

(Oben) Die EAG-Familie der K<sup>+</sup>-Kanäle besteht aus drei Subfamilien: EAG (*ether á go-go*)-Kanäle, ELK (*eag-like*)-Kanäle und ERG (*eag-related*)-Kanäle. Jede Subfamilie hat 2-3 verschiedene Mitglieder. (Unten links) Schematische Darstellung des EAG-Stroms. Bei Depolarisation entsteht ein langsam aktivierender Auswärtsstrom. Dieser nach außen gerichtete Strom wird durch nicht-inaktivierende Kanäle gewährleistet. (Unten rechts) Schematische Darstellung von ERG-Strom während der Depolarisation. Bei negativem Haltepotential ist der ERG K<sup>+</sup>-Kanal geschlossen und deaktiviert. Unter starker Depolarisation entstehen nur geringe Kaliumströme. Bei Repolarisation entsteht ein großer transienter Auswärtsstrom. Grund hierfür ist die schnellere Inaktivierung im Vergleich zur Aktivierung des Kanals bei Depolarisation (Trudeau et al., 1995; Smith et al., 1996; Schönherr und Heinemann, 1996; Wang et al., 1997).

Die Kanäle der *EAG* -Familie sind vor allem in neuronalem Gewebe vorhanden. Die spezifische Verbreitung dieser Kanäle in Rattenhirn ist von Ludwig et al. (2000) und von Saganich et al. (2001) dargestellt worden. Die Kanäle der ERG-Subfamilie sind auch in sympathischen Ganglien vorhanden (Shi et al., 1997). Die EAG2- und ELK1-Kanäle öffnen sich schon bei Spannungen, die nahe dem negativen Ruhepotential der Zelle liegen (Engeland et al., 1998; Saganich et al., 1999). Die Auslösung von auswärtsgerichteten Strömen durch nicht-inaktivierende Kaliumkanäle an der Aktionspotentialschwelle kann das Aktionspotential hemmen. Man vermutet, dass die EAG-Kanäle die adaptive Rolle des M-Stroms in repetitiv erregbaren Neuronen unterstützen. Die physiologische Rolle von schnell inaktivierenden ERG-Kanälen im zentralen Nervensystem ist bis heute nicht geklärt. Die Rolle von ERG-Kanälen in

Herzmuskelzellen ist dagegen gut untersucht. Diese Kanäle ähneln funktionell bei ausgeglichenen Kalium-Verhältnissen den einwärtsgleichrichtenden Kanälen. Das Öffnen des Kanals ist bei der Repolarisation der Herzmuskelzellen von großer Bedeutung. Die Mutationen in ERG-Genen ist eine Ursache erblicher Herzrhythmusstörungen (sog. Long-QT2-Syndrom).

Alle EAG-Verwandten bestehen aus Untereinheiten mit sechs  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen (S1-S6) und einer Porenregion (P) (Abb. 3). N- und C-Termini befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Das positiv geladene S4 Segment funktioniert wie ein Spannungssensor. Diese Bauweise ist der der Kaliumkanäle aus der *Shaker*-Familie sehr ähnlich. Die Sequenzanalyse zeigt aber, dass EAG-Kanäle strukturell mehr mit den CNG (cyclic nucleotide gated)-Kanälen und mit den pflanzlichen Kaliumkanälen AKT1 und KAT verwandt sind. Die dem S6 Segment folgende zytoplasmatische Region teilt eine substantielle Ähnlichkeit mit der Domäne, die in den CNG-Kanälen vertreten ist. Die ferne Verwandtschaft von EAG- und *Shaker*-Typ-Kanälen wurde durch Experimente von Tang und Kollegen (1998) bestätigt: Die Koexpression von Untereinheiten der beiden Kanalgruppen führte nicht zum Bau der Heteromultimeren. Eine spezifische strukturelle Eigenschaft der EAG-Kanäle ist die Präsenz der sog. PAS-Domäne im N-Terminus. Diese Sequenz von ca.135 Aminosäuren reguliert biochemische Prozesse und nimmt vermutlich an Ligand-Protein und Protein-Protein Interaktionen teil (Cabral et al., 1998).

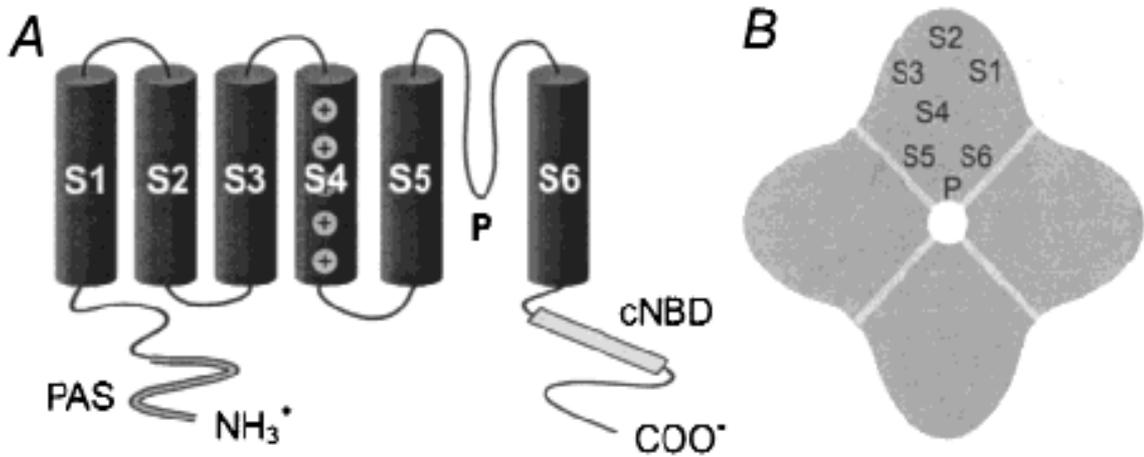


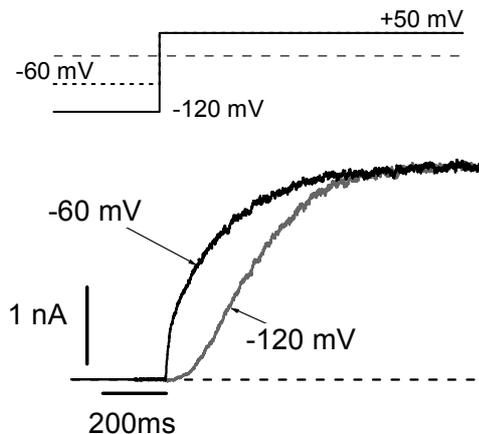
Abb. 3 Struktur des EAG-Kanals (nach Bauer & Schwarz, 2000)

(A) EAG-Kanal  $\alpha$ -Untereinheiten bestehen aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6). Die sogenannte PAS-Domäne befindet sich im N-Terminus, die zyklische Nukleotide bindende Domäne (cNBD) im C-Terminus. (B) Vermutliche tetramere Struktur des EAG-Kaliumkanals. Die Porenregion P und S6 bilden den inneren Kern des Kanals, S4 funktioniert wie ein Spannungssensor.

### 1.2.1 Elektrophysiologische Eigenschaften

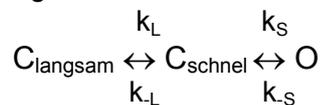
Der EAG1-Kanal leitet nicht-inaktivierenden Strom und öffnet sich bei einer negativen Spannung von  $-40$  mV. Die Aktivierung des hEAG1-Kanals zeigt exponentiellen Verlauf, wenn eine Depolarisation auf  $+50$  mV von einem zellulären Ruhepotential ( $-60$  mV) aus erfolgt. Wird die Zellmembran hyperpolarisiert ( $-120$  mV), zeigt die Kanalaktivierung einen langsamen und typisch sigmoiden Verlauf (Abb. 4). Diese Eigenschaft wird Cole-Moore-Effekt genannt, weil die Abhängigkeit der Aktivierungskinetik vom Haltepotential zuerst an Kaliumkanälen in Tintenfisch-Riesenaxonen von Cole und Moore (1960) beschrieben wurde.

Dieser Effekt wurde bei weiteren Homologen der EAG-Kanäle beobachtet: Ratte-, Maus-, Rind- und humane EAG-Kanäle zeigten dabei eine deutlichere Abhängigkeit der Aktivierungskinetik vom Haltepotential als *Drosophila*-EAG (Terlau et al., 1996).



**Abb. 4** Dargestellt ist eine Ganzzell-Aufnahme von einer transfizierten CHO-Zelle, in welcher hEAG1 exprimiert wurde. Die Spannung des Test-Pulses betrug +50 mV bei Haltepotentialen von -120 und -60 mV. Die extrazelluläre  $Mg^{2+}$ -Konzentration betrug 2 mM.

Um den Cole-Moore Effekt darzustellen, wurde ein Modell für das Schaltverhalten des Kanals mit zwei geschlossenen und einem geöffneten Zustand vorgeschlagen (Terlau et al., 1996). Man unterscheidet danach einen langsam ( $C_{\text{langsam}}$ ) und einen schnell ( $C_{\text{schnell}}$ ) aktivierbaren geschlossenen Zustand. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Untereinheit des Kanals sich in dem Zustand  $C_{\text{langsam}}$  befindet, ist bei Membranspannungen von -130 bis -80 mV größer als bei Spannungen von -80 bis -50 mV. Dafür erhöht sich bei Haltepotentialen von -80 bis -50 mV die Wahrscheinlichkeit des Zustandes  $C_{\text{schnell}}$ . Der Übergang zu einem offenen Zustand (O) von  $C_{\text{langsam}}$  ist nur über  $C_{\text{schnell}}$  möglich.



Mit Hilfe solcher Modelle kann der Unterschied der Aktivierungskinetik bei verschiedenen Haltepotentialen (z.B. -120 mV und -60 mV) dargestellt werden. Die Aktivierung von -120 mV ist deutlich langsamer als von -60 mV, weil die Untereinheiten des Kanals erst vom Zustand  $C_{\text{langsam}}$  in den Zustand  $C_{\text{schnell}}$  übergehen, bevor die Öffnung ermöglicht wird. Vom Haltepotential -60 mV ist dagegen nur der Übergang von  $C_{\text{schnell}}$  zu O erforderlich.

Ein anderes Mitglied der EAG-Subfamilie, welches solche Cole-Moore Eigenschaften besitzt, ist EAG2. Der nicht inaktivierende Kanal leitet auswärtsgleichrichtenden Strom. Der EAG2-Kanal öffnet sich bei Spannungen ab -100 mV. Seine Aktivierungskinetik ist langsamer als die von hEAG1 (Saganich et al., 1999; Schönherr et al., 2002).

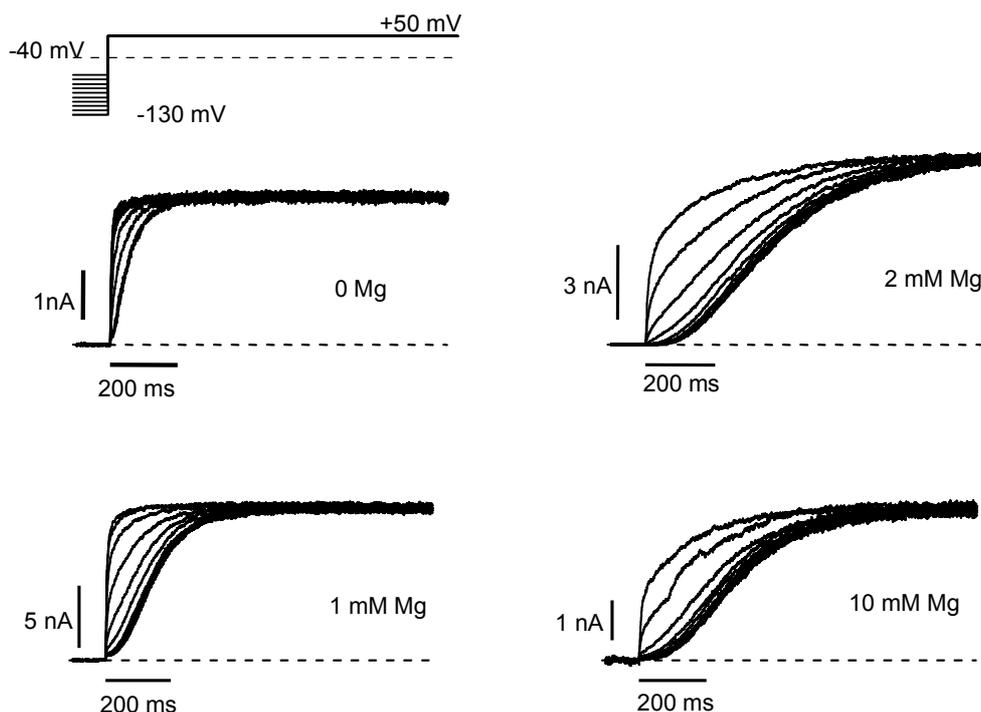
Occhiodoro et al. (1998) zeigten, dass sich die kodierende Region des aus 938 Aminosäuren bestehenden hEAG1-Proteins (108 kDa) im chromosomalen Locus 1q32-42 befindet. Publikationen zu molekularen Eigenschaften des hEAG2 Kanals erschienen

kürzlich (Ju und Wray, 2002; Schönherr et al., 2002). Das aus 988 Aminosäuren bestehende hEAG2-Protein (112 kDa) ist zu 73% identisch mit hEAG1. Das hEAG2-Gen ist auf dem Chromosom 14 zu lokalisieren.

Die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften des hEAG1- sowie des hEAG2-Kanals ähneln den Maus-, Ratte- und Rind-Kanälen. Der Hauptunterschied zwischen hEAG1 und hEAG2 ist die langsamere Aktivierung und die kleinere Spannungsabhängigkeit von hEAG2 (Ju und Wray 2002; Schönherr et al., 2002). Die Aminosäuresequenz des S4-Segmentes (vermutlicher Spannungssensor) ist jedoch in beiden Isoformen konserviert.

### 1.2.2 Regulation des EAG-Kanals durch Magnesium und andere divalente Kationen

Terlau et al. (1996) zeigten, dass die Geschwindigkeit der Öffnung des EAG-Kanals durch extrazelluläres Magnesium moduliert wird (Abb. 5).



**Abb. 5** Abhängigkeit der Aktivierung des hEAG1-Kanals von der externen  $Mg^{2+}$ -Konzentration. Dargestellt sind Ganzzell-Aufnahmen von transfizierten CHO-Zellen, in welchen hEAG1 exprimiert wurde. Die Spannung des Test-Potentials betrug +50 mV, das Haltepotential variierte von -130 bis -40 mV in 10 mV-Schritten (sog. Cole-Moore Sequenz). Beim Haltepotential von -130 mV ist die Kanalaktivierung langsam, bei -40 mV schnell.

In Präsenz von externen Magnesiumionen wird die Aktivierung langsamer. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig.

Um die Abhängigkeit der Aktivierungskinetik des Kanals von der Haltespannung zu beschreiben, hatten die Autoren ein Modell für das Schaltverhalten der Ionenkanäle an rEAG1 angepasst. Aufgrund der erhobenen Daten wurde der Magnesium-Effekt damit erklärt, dass Magnesiumionen die Übergänge der Kanaluntereinheiten von langsam aktivierenden ( $C_{\text{langsam}}$ ) zu schnell aktivierenden geschlossenen Zuständen ( $C_{\text{schnell}}$ ) verlangsamen. Silverman und Kollegen wiesen die Bindungsstelle für  $Mg^{2+}$  an dem Loop zwischen dem S2- und dem S3-Segment für *Drosophila*-EAG später nach (Silverman et al., 2000). Weil das S4-Segment am Schaltverhalten des Kanals teilnimmt (Terlau et al., 1997), wird eine Zusammenwirkung des S4- Segmentes mit S3- bzw. S2-Segmenten angenommen (Schönherr et al., 2002).

Terlau et al. (1996) zeigten, dass die Geschwindigkeit der Öffnung des EAG-Kanals zusätzlich durch andere extrazelluläre divalente Kationen moduliert wird (z. B.  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ). Eine konzentrationsabhängige Verlangsamung der Aktivierungskinetik wurde bei Zugabe von Nickelionen beschrieben, wobei die kompetitive Bindung an den Kanal die gleiche Bindungsstelle wie bei den  $Mg^{2+}$ -Ionen voraussetzt (Neef, 1999).

Die Regulation des EAG-Kanals kann durch divalente Kationen eine physiologische Bedeutung haben, da  $Mg^{2+}$ -Ionen in extrazellulären Flüssigkeiten (z.B. Blut) in mM Konzentrationen vorkommen.  $Zn^{2+}$ -Ionen kommen in 1 mM Konzentration in präsynaptischen Vesikeln der Neuronen vor (Frederickson et al., 2000). Bei Depolarisation wird der Inhalt des Vesikels in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Ob EAG-Kanäle in den Synapsen vorkommen, ist jedoch bisher unbekannt.

### 1.2.3 Calcium-Regulation

Bei der Expression des EAG1-Kanals der Ratte in Säugerzellen hatten Stansfeld und Mitarbeiter (Stansfeld et al., 1996) beobachtet, dass erhöhte Konzentrationen intrazellulären Calciums den Kanal reversibel inhibieren können. Dieser Effekt war unabhängig von der Membranspannung. Der  $IC_{50}$ -Wert für diese Inhibierung beträgt 70 nM  $[Ca^{2+}]_i$ .

Meyer und Heinemann (1998) zeigten, dass die Acetylcholin-Stimulation der muscarinischen Rezeptoren der Neuroblastomzellen SH-SY5Y in diesen Zellen vorhandene hEAG1-Kanäle inhibieren. Eine direkte Beladung der Zellen mit  $Ca^{2+}$ -Ionen über die Patch-Pipette verursachte den gleichen Effekt. Dies wies auf eine zelluläre  $Ca^{2+}$ -Regulation des EAG1-Kanals hin. Es wurde später gezeigt, dass der Sensor für

freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Calmodulin ist, das an den C-Terminus des EAG-Kanals bindet (Schönherr et al., 2000).

#### 1.2.4 Pharmakologie

Der hERG1-Kanal der EAG-Familie spielt eine besondere Rolle bei der Repolarisation der Herzmuskelzelle (Ackermann, 1998). Die Pharmakologie des hERG1-Kanals ist deswegen von großer medizinischer Bedeutung. Der hERG1-Kanal ist gegenüber vielen Substanzen (antiarrhythmische Blocker) empfindlich (Lees-Miller et al., 2000; Kamija et al., 2001; Sánchez-Chapula et al., 2002). Dabei haben diese Substanzen keinen Einfluss auf andere spannungsabhängige Kaliumkanäle. Der Grund dafür sind spezifische Aminosäuren im Poren- und im S6-Segment-Bereich des hERG1-Kanals (Mitcheson et al., 2000). Aminosäuren im S6-Segment-Bereich sind innerhalb der EAG-Familie konservativ. Aufgrund der medizinischen Bedeutung ist daher auch die Erforschung weiterer Kanäle der EAG-Familie hinsichtlich deren pharmakologischen Eigenschaften angezeigt.

Der hEAG1-Kanal und seine Homologe sind insensitiv gegenüber bekannten Kaliumkanalblockern wie 4-Aminopyridin und TEA, auch wenn diese in relativ hohen Konzentrationen appliziert werden (Ludwig et al., 1994; Bijlenga et al., 1998). Andere Kaliumkanalantagonisten wie Quinin und Quinidin blocken EAG1-Kanäle mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten von 0.4-0.7 mM bei +40 mV (Brüggemann et al., 1993; Ludwig et al., 1994). Diese Substanzen sind bei anderen Kaliumkanälen jedoch bereits bei niedrigeren Konzentrationen wirksam (Yamagishi et al., 1995; Fedida, 1997; Rolf et al., 2000).

Der EAG2-Kanal wird wie die EAG1-Isoform nicht von 4-Aminopyridin geblockt und ist nur mit sehr hohen Konzentrationen von TEA (über 10 mM) zu inhibieren (Saganich et al., 1999). Schönherr und Kollegen (Schönherr et al., 2002) zeigten, dass sich die Empfindlichkeit des humanen EAG2-Kanals auf Quinidin von dem des hEAG1-Kanals unterscheidet: Quinidin inhibiert den Strom durch hEAG1 wesentlich potenter als den Strom durch hEAG2; der  $\text{IC}_{50}$ -Wert bei einer Spannung von +50 mV ist um einen Faktor 40 höher. Verschiedene Empfindlichkeiten der Kanäle sind auch bei Zugabe eines Antihistaminikum (Terfenadin) nachgewiesen: hEAG1 wird stärker als hEAG2 inhibiert (Ju und Wray, 2002). Die molekulare Basis für die unterschiedliche pharmakologische Sensitivität von hEAG1 und 2 sind verschiedene Aminosäuren in der Pore und in S6-Segment-Bereich (Gessner et al., 2004).

Es besteht grundsätzlich ein Problem, EAG-Kanäle mit Hilfe von pharmakologischen Mitteln von anderen Kanälen zu unterscheiden. Beide Isoformen sind gegenüber Kaliumkanalblockern relativ unempfindlich.

#### 1.2.5 Physiologische Bedeutung der EAG-Kanäle

Biophysikalische Eigenschaften der EAG-Kanäle (Spannungsabhängigkeit, Regulation durch divalente Kationen) sind gut untersucht. Über die spezifische Funktion der EAG-Kanäle in multizellulären Organismen ist noch wenig bekannt.

*Drosophila*-Mutanten mit defektem EAG-Kanal zeigen eine gestörte Motorik: Das rhythmische Zucken der Beine wurde bei Etherbehandlung beobachtet (Ganetzky und Wu, 1983). Bei Larven von solchen Mutanten wurden spontane Aktionspotentiale in Motorneuronen festgestellt; Amplitude und Dauer von Endplattenpotentialen wurden ebenfalls erhöht. Man vermutete, dass EAG die neuronale Erregbarkeit und die Freisetzung von Neurotransmittern kontrolliert. Auch Lernen und Odorant-Reaktionen wurden in *Drosophila*-Mutanten mit defektem EAG-Kanal beeinflusst (Warmke et al., 1991; Griffith et al., 1994; Dubin et al., 1998).

In Säugetieren sind die Kanäle der EAG-Familie vor allem im neuronalen Gewebe vorhanden. Die genaue Rolle der Kanäle im Gehirn ist noch zu klären (Ludwig et al., 2000; Saganich et al., 2001). Piros und Kollegen (1999) zeigten, dass das Schaltverhalten des EAG-Proteins durch eine Bindung zum 95 kDa Protein Epsin reguliert wird. Epsin spielt eine wichtige Rolle in der zellulären Endozytose von synaptischen Vesikeln (Kariya et al., 2000). Dies unterstützt die Vermutung eines Zusammenhanges zwischen dem EAG-Kanalschaltverhalten und der neuronalen Transmitterfreisetzung.

Eine Regulation des Kanals im Zellzyklusverlauf wurde von Brüggemann und Kollegen (Brüggemann et al., 1997) in *Xenopus*-Oozyten untersucht. Die Autoren zeigten, dass die Aktivierung des Mitosis-Promoting-Faktors EAG-Strom inhibiert. Auch die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals ändern sich in der M-Phase des Zellzyklus: Die Selektivität für Kaliumionen und die Sensitivität für eine Blockade mit intrazellulären Natriumionen erhöht sich, wobei die Stromamplitude stark abnimmt (Brüggemann et al., 1997; Pardo et al., 1998).

Der hEAG1-Kanal ist in Vorläufern der Muskelzellen (Myoblasten) präsent (Bijlenga et al., 1998; Liu et al., 1998; Occhiodoro et al., 1998). Das Membranpotential der humanen Myoblasten ändert sich bei der Differenzierung der Zelle: Die Membran wird durch einen Potentialwechsel von -10 auf -30 mV hyperpolarisiert. Dabei ändert

sich die Expression von Kaliumkanälen: Der hEAG1-Kanal wird hochreguliert. Man nimmt an, dass die auswärtsgerichteten Kaliumströme des hEAG1-Kanals das Membranpotential der Myoblast-Zelle steuern und den Differenzierungsprozess regulieren. Kurz vor der Fusion exprimiert die Zelle das Gen eines anderen Kaliumkanals, den sogenannten einwärtsgerichteten  $K_{ir}$ . Dieser ermöglicht eine weitere Hyperpolarisation bis zu -65 mV. Die Blockade vom  $K_{ir}$ -Strom reduziert diese Hyperpolarisation und die Fusion wird gestoppt. Ob die Blockade des hEAG1-Kanals im früheren Differenzierungsstadium die Hyperpolarisation der Zelle stoppen kann, lässt sich leider nicht überprüfen: Zur Zeit ist kein spezifischer EAG-Blocker bekannt.

Auch die Tumorzellen SH-SY5Y (Neuroblastom) exprimieren hEAG1 (Meyer und Heinemann, 1998). Die Autoren zeigten, dass der EAG1-Kanal auch in diesen Zellen im Zellzyklusverlauf reguliert wird. Bei Behandlung mit 10  $\mu$ M Retinat wurden die Zellen in der G0/1 Phase synchronisiert. Die Expression des hEAG1-Kanals wurde herabreguliert. Dafür exprimierten die Zellen einen anderen spannungsabhängigen auswärtsgerichteten Kaliumkanal.

Der hEAG1-Kanal wurde in vielen anderen Tumorzelllinien nachgewiesen: z.B. in Brustkarzinomzellen EMF-19 sowie in MCF-7 (Pardo et al., 1999). Pardo und Kollegen konnten mittels „Antisense“- Oligonukleotiden in EMF-19, MCF-7 und SH-SY5Y Zellen hEAG1-Kanäle ausschalten. Auffällige Abnahmen der Zellproliferation wurden in allen Linien beobachtet. Zusätzlich wurde hEAG1 in Ovarienzellen vom chinesischen Hamster (CHO) exprimiert. Die Transfektion erhöhte die Proliferation und den Metabolismus der Zellen. Als transfizierte Zellen in immundefizitäre Mäuse implantiert wurden, entwickelten sich aggressive Tumoren (Pardo et al., 1999). Solche Ergebnisse deuten darauf hin, dass hEAG1-Kanäle die Proliferation von Tumorzellen *in vivo* fördern.

### 1.3 Proliferation der Melanomzelle

Maligne Melanome sind Krebsformen, die nur unzureichend mit konventioneller Chemo- und Radiotherapie behandelbar sind (Villikka und Pyrhonen, 1996). Effektiver ist eine Kombination von Chemo- und Immuntherapie. Trotzdem haben die Patienten mit Melanom-Tumoren geringe Überlebenschancen. Melanomzellen sind gegen viele Wirkstoffe resistent und weichen erfolgreich der Apoptose aus (Satyamoorthy et al., 2001). Für ihre unlimitierte Proliferation brauchen Krebszellen keine Wachstumsfaktoren (Hanahan und Weinberg, 2000). Ihr Bedürfnis an Calcium-Ionen ist minimal (Takuwa et al., 1995). Melanomzellen meiden die G0-Phase und die terminale Differenzierung. Aggressive Melanome metastasieren in Blut- und Lymphgefäßen über fünf verschiedene

Stadien (Welch und Goldberg, 1997; Li und Herlyn, 2000): 1) Nevi mit normalen Melanozyten; 2) Dysplastische Nevi mit struktureller Atypie (Melanom-Vorgängerzellen); 3) Frühe Radialwachstumsphase der Primärmelanome (nicht metastasierte Zellen); 4) Vertikalwachstumsphase der Primärmelanome (Zellen haben Metastasierungspotential); 5) Maligne Metastasen. Die malignen Melanomzellen sekretieren autokrine Wachstumsfaktoren und haben ein unlimitiertes Proliferationspotential (Lázár-Molnár et al., 2000). Das unlimitierte Proliferationspotential der malignen Melanomzellen wird durch die Expression von krebsspezifischen Genen (Onkogenen) befördert (Hesketh, 2002).

Für die schnelle Proliferation der Tumorzellen können verschiedene Ionenkanäle eine wichtige Rolle spielen. Kaliumkanäle erlauben die Hyperpolarisation von Zellen, die sich in der G1-Phase befinden (Wonderlin und Strobl, 1996). Dies ist für den Übergang der Zelle in weitere Zellzyklusstadien von großer Bedeutung. Die Aktivierung von Chloridkanälen bewirkt eine Zunahme der Zellvolumina in der Phase der DNA-Synthese (Nilius et al., 1996).

Die Linie der melanomalen IGR1-Zellen wurde als etabliertes Modellsystem für Studien der Tumor-Progression benutzt (Pettersson et al., 1993). Die Ionenkanäle in diesen Zellen wurden erstmals von Nilius und Kollegen (Nilius et al., 1990) beschrieben. In IGR1-Zellen wurde ein nicht-inaktivierender Kaliumkanal mit einer Leitfähigkeit von 10 pS festgestellt, der mit 10 mM TEA und 5  $\mu$ M Isoproterenol zu blocken war. Dieser Kanal wurde bereits bei Spannungen nahe dem Ruhepotential der IGR1-Zellen (-20 - -30 mV) aktiviert. Applikationen von 10 mM TEA inhibierte die Proliferation der IGR1-Zellen. Dies wurde als ein Hinweis für die mögliche Rolle des Kaliumkanals auf die Zellproliferation angesehen. Die Autoren merkten dabei an, dass der funktionelle Kaliumkanal in den sich nicht teilenden IGR1-Zellen (z.B. in 7-Tage-alten Kulturen) kaum nachzuweisen war. Nilius und Wohlrab (1992) hatten weitere Studien an Ionenkanälen der IGR1-Zellen durchgeführt. Der nicht-inaktivierende Kaliumkanal mit einer Leitfähigkeit von 10 pS konnte auch mit Membran-permeablem cAMP geblockt werden. Es wurden neue Hinweise für die mögliche Rolle des Kanals für die Zellzyklusregulation gefunden: Applikation von Blockern des nicht-inaktivierenden Kaliumkanals (TEA oder cAMP) stoppte den Eintritt der Zellen in die S-Phase; die maximale Aufnahme von [ $^3$ H]-Thymidin korrelierte mit der maximalen Expression des Kanals. Volumen-aktivierte Chloridkanäle ( $Cl_{Vol}$ ) wurden in IGR1-Zellen erstmals von Nilius und Kollegen (Nilius et al., 1994) beschrieben.

Nilius und Kollegen (Nilius et al., 1993) hatten die Rückkopplungsregulation („feedback-regulation“) des Calcium-Einstromes durch das Membranpotential in IGR1-

Zellen beschrieben. Mit Hilfe der Methode des perforierten „Patches“ hatten die Autoren gezeigt, dass negativere Membranspannungen den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom unterstützen, bei positiveren Spannungen nimmt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle ab. Die Zunahme von intrazellulärer Calcium-Konzentration aktiviert Calcium-abhängige Kaliumkanäle, die zur weiteren Hyperpolarisation der Zelle führen.

Eingehender untersucht wurden die Kaliumkanäle der IGR1-Zellen durch Meyer und Kollegen (1999). Mit Hilfe der RT-PCR-Methode wurde der nicht-inaktivierende Kaliumkanal als hEAG1-Kanal identifiziert. Die Calcium-abhängigen Kaliumkanäle wurden als Kanäle der hIK-, hSK1- und hSK2-Gruppen beschrieben.

Die wichtige Rolle des hEAG1-Kanals für die Proliferation von verschiedenen Tumor-Zellen wurde in den Arbeiten von Heinemann und Meyer (1998), Pardo und Kollegen (Pardo et al., 1999) bestätigt.  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanäle sind auch für den Zellzyklusverlauf der Krebszellen von Bedeutung. Diese Kanäle öffnen bei zunehmendem  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Das Öffnen der  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanäle hyperpolarisiert die Zelle und führt zu einem weiteren  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx (Nilius et al., 1993; Leppe-Wienhues et al., 1996; Wonderlin und Strobl, 1996). Intrazelluläres Calcium ist ein wichtiger Botenstoff für den Zellzyklusverlauf (Whitfield et al., 1979; Santella, 1998). Rane berichtete über eine erhöhte Expression von IK-Kanälen in Prostata-Krebszellen der Ratte (Rane, 2000). Die erhöhte Expression dieser Kanäle wurde in den mit Ras- oder mit Raf-Genen transfizierten Fibroblasten ebenfalls beobachtet. Die Hochregulation dieser Kanäle geschieht durch den Signalweg von Ras mitogen-aktivierter Proteinkinase (Pena und Rane, 1999; Rane, 2000). Chloridkanäle können die Proliferation der Krebszellen ebenfalls beeinflussen. Shen und Kollegen synchronisierten humane Cervix-Karzinomzellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus und beobachteten eine Zunahme von  $\text{Cl}_{\text{Vol}}$ -Strom (Shen et al., 2000). Die pharmakologische Blockade von Cl-Kanälen (Tamoxifen, NPPB) inhibierte die Proliferation dieser Krebszellen. Es stellt sich die Frage, welche Kanalgruppen zur Proliferation von Melanomzellen beitragen.

#### 1.4 Regulation der Kaliumkanäle durch Fettsäuren

Ungesättigte Fettsäuren sind Botenstoffe, die verschiedene zelluläre Prozesse regulieren. Die direkte Wechselwirkung mit Ionenkanälen ist eine ihrer vielfältigen Funktionen (Kogteva und Bezuglov, 1998).

Unterschiedliche Kaliumkanäle werden auch auf unterschiedliche Weise reguliert. So werden spannungsabhängige schnell aktivierende *Shaker*-Typ-Kanäle durch Fettsäuren inhibiert (Villaruel und Schwarz, 1996). Die Hintergrundkaliumkanäle,

welche nicht inaktivieren, werden dagegen durch Fettsäuren aktiviert (Colbert und Pan, 1999). Der auswärtsgerichtete Kaliumstrom durch die nicht-inaktivierenden Kanäle ermöglicht den Durchgang des Aktionspotentials ohne Erhöhung der Erregbarkeit des Neurons. Der Mangel an ungesättigten Fettsäuren verursacht viele neuronale und kardiale Krankheiten: z.B. epileptische Anfälle, Depressionen, Verhaltensstörungen, zerebrale Ischämie, koronare Herzkrankheiten, Risiko für plötzlichen Herztod, tödliche ventrikuläre Arrhythmien (Lauritzen et al., 2000).

Von den ungesättigten Fettsäuren, die in der Zelle vorhanden sind, spielt Arachidonsäure eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Kanälen. Sie wird aus der Membran freigesetzt durch die Aktivierung von Phospholipase A<sub>2</sub> (eine erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Konzentration löst den Phosphatidylcholin- oder Phosphatidylethanolamin-Zerfall aus), durch die Aktivierung von Phospholipase C (Zerfall von Phosphatidylinositolbiphosphaten und der darauf folgenden Hydrolyse von Diacylglycerol) oder durch Aktivierung von Phospholipase D (Hydrolyse von Phosphatidylcholin) (Piomelli, 1998). Freie Arachidonsäure kann durch verschiedene Enzyme metabolisiert werden: durch Lipoxygenase, Cyclooxygenase, Zytochrom P-450. Um eine direkte Wechselwirkung von Arachidonsäure mit dem Kanal nachzuweisen, müssen Reaktionen mit allen anderen Metaboliten ausgeschlossen sein.

Die direkte Aktivierung der Kaliumkanäle der 2-Poren-Domänen-Klasse (TREK, TRAAK, TASK) mit Hilfe von Arachidonsäure ist in den Arbeiten von Fink und Kollegen (Fink et al., 1998) und Maingret und Kollegen (Maingret et al., 1999) beschrieben. Fettsäure-bindende Stellen unterscheiden sich aber innerhalb der Klasse (Kim et al., 2001). Direkte Aktivierung von anderen Kaliumkanälen (einwärtsgerichtete, Calcium-aktivierte, ATP-regulierbare u.a.) ist durch Arachidonsäure bekannt (Meves, 1994; Denson et al., 2000; Liu et al., 2001), wobei oft ein dualer Effekt nachgewiesen wurde: Eine niedrige Konzentration der Fettsäure aktiviert den Kanal; eine höhere Konzentration inhibiert den Strom (Xu und Lee, 1996). Bei der Einwirkung von Arachidonsäure auf Kanäle der *Shaker*-Familie ist ein weiterer 2-Phasen-Effekt beschrieben: Arachidonsäure beschleunigt sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung des Kanals (Honoré et al., 1994; Gubitosi-Klug et al., 1995; Villarroel und Schwarz, 1996; Visentin und Levi, 1998). Durch die beschleunigte Inaktivierung wird der Kv -Strom inhibiert.

Die Wechselwirkung der Kanäle der EAG-Familie mit Fettsäuren wurde noch nicht ausführlich untersucht. Arachidonsäure erhöht auswärtsgerichtete Ströme von hERG1-Kanälen und inhibiert deren „tail“-Strom bei einer Deaktivierung (Schledermann et al., 2001). Meyer und Heinemann (1999) beschrieben die Regulation von hEAG1-

Strom durch die ungesättigte Fettsäure Retinat. Bei direkter Applikation von 10  $\mu$ M Retinat wurde die hEAG1-Stromamplitude erhöht.

## 1.5 Zielstellung der Arbeit

### 1.5.1 Pharmakologische Untersuchungen an hEAG-Kanälen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere funktionelle Eigenschaften der humanen EAG-Kanäle zu untersuchen. Das Wissen über die Pharmakologie der EAG-Kanäle sollte erweitert werden. Dafür hatten wir potente Blocker für die Behandlung der EAG-Kanäle gesucht. Es sollte geklärt werden, welche Blocker sich für Untersuchung der EAG-Funktion in Zelllinien eignen. Das trizyklische Antidepressivum Imipramin ist als potenter Blocker von ELK-Kanälen des Nematoden *Caenorhabditis elegans* und von murinen EAG1-Kanälen beschrieben (Weinschenker et al., 1999). Die Messungen wurden im *Xenopus*-Oozyten-System durchgeführt. Der Block von hERG1-Kanälen in CHO-Zellen ist von Teschemacher und Kollegen untersucht worden (Teschemacher et al., 1999). Unser Ziel war es, die biophysikalischen Eigenschaften des Blocks von hEAG-Kanälen durch Imipramin kennen zu lernen.

### 1.5.2 Physiologische Rolle von hEAG-Kanälen in Melanomzellen

Wonderlin und Strobl (1996) hatten Beweise zusammengefasst, die auf eine leitende Rolle der Kaliumkanäle im Zellzyklusverlauf hinweisen. Aus vielen Arbeiten ist bekannt (Brüggemann et al., 1997; Meyer und Heinemann, 1998; Pardo et al., 1999), dass EAG-Kanäle eine wichtige Rolle im Zellzyklus spielen. Die Expression sowie elektrophysiologische Eigenschaften des EAG1-Kanals ändern sich im Zellzyklusverlauf. Wir suchten uns eine Zelllinie aus, in der nativer EAG-Strom vorkommt. Als Zellsystem wurden humane Melanom-Zellen verwandt.

Es sollte untersucht werden, welche Ionenkanäle in ausgewählten Zelllinien vorhanden sind. Mit Hilfe der spezifischen Kanalblocker war es herauszufinden, welchem Kanal eine bedeutende Rolle für die Zellproliferation zukommt.

### 1.5.3 Wechselwirkung von hEAG-Kanälen mit ungesättigten Fettsäuren

Sekundäre Botenstoffe ( $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP, Fettsäuren) nehmen an der zellulären Signaltransduktion teil. Die direkte Regulation von Ionenkanälen durch Fettsäuren ist in vielen Studien nachgewiesen (Meves, 1994; Kogteva und Bezuglov, 1998).

EAG-Kanäle lassen sich durch eine Reihe von Parametern (intrazelluläre Calciumkonzentration, extrazelluläre Magnesiumkonzentration, Haltepotential) regulieren. Dies legt eine mögliche Modulation über Signalkaskaden nahe. Arachidonsäure spielt eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen (Piomelli, 1996). Als Aktivator oder Inhibitor von verschiedenen Ionenkanälen kommt sie als wichtiger Baustein in einem komplexen Regulationsmechanismus vor.

Meyer und Heinemann beschrieben die Wirkung der ungesättigten Fettsäure Retinat auf den hEAG1-Strom in der Neuroblastomzelle (Meyer und Heinemann, 1998). Der hEAG1-Kanal wird durch Retinat aktiviert. Wir wollten untersuchen, inwieweit EAG-Kanäle durch Arachidonsäure und andere zelluläre Fettsäuren reguliert werden können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Experimente mit Säugerzellen

#### 2.1.1 Zellkulturen

Die folgenden Zelllinien wurden aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) bezogen: Zellen des chinesischen Hamsterovariums CHO-K1; humane Melanomzelllinie IGR1; humane Melanomzelllinie IGR39; humane embryonale Nierenzellen HEK 293.

Für die Kultivierung der Zellen benutzten wir: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland); Dulbecco's modified Eagle's medium-HAM' S F-12 (BIOCHROM, Berlin, Deutschland). IGR1-Zellen und IGR39-Zellen wurden in 250-ml Flaschen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) in DMEM-Medium mit fötalem Kälberserum (FKS) kultiviert. Die endgültige FKS-Konzentration im Medium betrug 10%. Die Zellen wurden bei 37°C in humider 10%-iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre gehalten. CHO-K1- und HEK 293-Zellen wurden in 250 ml Flaschen entsprechend in F-12 Medium und in einer Mischung von F-12- und DMEM-Medium (1:1) mit FKS bei 37°C in humider 5%-iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die Zellen aller Linien wurden alle 3-4 Tage umgesetzt.

#### 2.1.2 Herstellung von DNA-Chimären und Mutanten

hEAG1 und hEAG2-Sequenzen wurden aus einer cDNA Bibliothek vom humanen Hirn kloniert (Schönherr, Löber und Heinemann, 2000; Schönherr et al., 2002). hEAG1- und hEAG2-DNA und DNA-Konstrukte (Chimären und Mutanten) wurden in einen Expressionsvektor pcDNA3 für Säugerzellen eingebracht (Invitrogen, Groningen, Niederlande). Wir verwendeten folgende in unserem Labor hergestellten DNA-Konstrukte:

- Chimäre E2-p1: hEAG2(1-435)-hEAG1(432-487)-hEAG2(492-962);
- Chimäre E1-p2: hEAG1(1-431)-hEAG2(436-491)-hEAG1(488-988);
- Chimäre E1-c2: hEAG1(1-177)-hEAG2(175-487)-hEAG1(492-962);
- Doppelmutante von hEAG1 S436T•V437I (Gessner et al., 2004).

Die im Expressionsvektor pBK-CMV eingebrachte DNA vom humanen Kv1.5-Kanal wurde freundlicherweise von Dr. M. Tamkun zur Verfügung gestellt (Snyders et al., 1993).

### 2.1.3 Transfektion

#### Transfektion von CHO-K1-Zellen

Für die Transfektion der Zellen wurde die Superfect-Methode (Qiagen, Hilden, Germany) angewandt. Am zweiten Tag nach dem Umsetzen wurden die Zellen mit 2 µg linearisierter hEAG-DNS, 0.5 µM CD-8-Antigen-DNS und 10 µl Superfect für 4 Stunden inkubiert. Danach wurde die Mischung abgesaugt und durch das normale Kulturmedium mit FKS ersetzt. Transient transfizierte Zellen wurden durch CD-8-Antikörper-Beads (anti-CD-8, Dynal, Hamburg, Germany) visuell identifiziert (Jurman et al., 1994).

#### Stabile Expression von hEAG1 in CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden nach der Superfect-Methode (Qiagen) transfiziert. Der pcDNA3 Vektor erhielt die Region, die eine Resistenz gegen Antibiotikum G418 kodierte. Stabile Zelllinien mit hEAG1 waren resistent gegen G-418 und wurden in 96-Well-Gewebekultur-Platten (Greiner) selektiert.

Stabile Linien von mit dem Na<sup>+</sup>-Kanal rNav1.4 transfizierten HEK 293-Zellen waren im Labor vorhanden (Chen et al., 2000).

### 2.1.4 Elektrophysiologische Messungen

Für die elektrophysiologischen Messungen plattierten wir die Zellen in 35 mm große Petri-Schalen. Die Messungen fanden 1-2 Tage nach dem Umsetzen statt. Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik (Hamill et al., 1981) wurden verschiedene Spannungen an die Membran der Zelle gelegt und die über die Zellmembran fließenden Ströme gemessen. Die Experimente wurden in der Ganzzell-Konfiguration („whole-cell“) durchgeführt: Die Spitze einer Glaspipette wurde an die Zellmembran geführt; mittels eines leichten Unterdruckes und unter negativer Spannung wurde eine Dichtung („seal“) von mehr als 1 GΩ erstellt. Mit einem kurzen Saugstoß zerstörten wir die Membran unter der Pipettenspitze. Das Membranpotential wurde mit Hilfe des Verstärkers EPC 9 eingestellt (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) (s. Abb. 6 B). In der mit Elektrolytlösung gefüllten Pipette befand sich eine Ag/AgCl-Elektrode.

Die Glaspipetten wurden von Kimax-51 Glas (Kimble Glass, Vineland, NJ, USA) hergestellt. Zur Verbesserung der „seal“-Bildung wurde die Pipettenspitze durch nahes Heranbringen an einen erhitzten Platin-Iridium-Draht poliert. Der Widerstand der polierten Pipetten betrug 1-3 MΩ. Bei den Messungen der sog. „tail“-Kalium- und Natrium-Ströme wurde die Pipettenspitze vor dem Polieren zur Verringerung der

kapazitiven Aufladung mit Silikon-Kautschuk (RTV, General Electrics, Niederlande) überzogen.

Die Applikation der Spannungsprotokolle erfolgte mit dem Programm „Pulse“ (HEKA Elektronik). Die abgeleiteten Stromsignale als Antwort auf Spannungssprünge wurden zum Verstärker EPC 9 weitergeleitet. Die durch den Zugangswiderstand (series resistance) zur Zelle entstehenden Spannungsfehler kompensierten wir zu 70-80% mit Hilfe des EPC 9. Leck-Korrekturen und Kapazitäten-Abgleich wurden nach der P/n Methode (bei Abwesenheit der Strom-Komponente bei negativen Membranspannungen von -100- -120mV) durchgeführt. Die Signale wurden mit 5 kHz mittels eines 3-Pol-Bessel-Filters gefiltert, über einen in dem EPC 9 eingebauten AD/DA-Wandler digitalisiert und auf der Festplatte eines Power Macintosh Computers (G4) gespeichert.

Alle elektroфизиologischen Messungen wurden bei 19-21°C durchgeführt. Die Temperatur der Badlösung wurde mit Hilfe eines Peltierelements in diesem Bereich eingestellt.

Die Zusammensetzungen der für die elektroфизиologischen Messungen eingesetzten Lösungen sind in den Tabelle 1 aufgeführt. Die verwendete Kombination von extrazellulärer und intrazellulärer Lösung wird später als [Lösung 1<sub>ex</sub>/Lösung 4<sub>in</sub>] bezeichnet. Der pH-Wert in Natrium-haltigen Lösungen wurde mit 1 M NaOH, in Kalium-haltigen mit 1 M KOH und in Cäsium-haltigen mit 1 M CsOH eingestellt. Der pH-Wert in der TEA-haltigen Lösung wurde mit 1 M NaOH eingestellt. Die Osmolarität wurde mit einem Dampfdruckosmometer (Wescor 5500, Wescor Inc., Logan, Utah, USA) gemessen. Der Gehalt von freiem Calcium wurde mit dem Programm „Patcher's Power Tools“ (Public Domain Software) eingestellt. Für die Messungen von Chloridströmen wurden die Pipettenspitzen jeweils mit intrazellulären Lösungen ohne NaATP gefüllt, um die Bildung der Dichtung zwischen Zellmembran und Pipette („seal“) zu erleichtern.

Tabelle 1 Lösungen für die Messung der Ströme in Säugerzellen

| Name                     | Inhalt (mM)  | Osmolarität, mOsm | pH  |
|--------------------------|--|-------------------|-----|
| extrazelluläre Lösung 1  | 5 KCl, 135 NaCl, 2 CaCl <sub>2</sub> , 10 HEPES  | 298               | 7.4 |
| extrazelluläre Lösung 2  | 10 KCl, 130 NaCl, 2 CaCl <sub>2</sub> , 10 HEPES   | 298               | 7.4 |
| extrazelluläre Lösung 3  | 40 KCl, 100 NaCl, 2 CaCl <sub>2</sub> , 10 HEPES   | 298               | 7.4 |
| intrazelluläre Lösung 4  | 130 KCl, 2 MgCl <sub>2</sub> , 10 EGTA, 10 HEPES   | 285               | 7.4 |
| intrazelluläre Lösung 5  | 130 KCl, 2 MgCl <sub>2</sub> , 9.3 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 EGTA, 10 HEPES; freies Ca <sup>2+</sup> : 800 nM          | 294               | 7.4 |
| extrazelluläre Lösung 6  | 5 CsCl, 110 NaCl, 2 CaCl <sub>2</sub> , 80 Mannitol, 10 HEPES  | 307               | 7.4 |
| extrazelluläre Lösung 7  | 5 KCl, 135 NaCl, 2 CaCl <sub>2</sub> , 10 HEPES  | 237               | 7.4 |
| intrazelluläre Lösung 8  | 130 CsCl, 2 MgCl <sub>2</sub> , 5.79 CaCl <sub>2</sub> , 10 EGTA, 4 NaATP, 10 HEPES: freies Ca <sup>2+</sup> : 100 nM  | 301               | 7.4 |
| intrazelluläre Lösung 9  | 130 TEA-Cl, 2 MgCl <sub>2</sub> , 4.07 CaCl <sub>2</sub> , 10 EGTA, 4 NaATP, 10 HEPES: freies Ca <sup>2+</sup> : 50 nM | 298               | 7.4 |
| extrazelluläre Lösung 10 | 150 NaCl, 2 KCl, 1.5 CaCl <sub>2</sub> , 10 HEPES  | 310               | 7.4 |
| intrazelluläre Lösung 11 | 35 NaCl, 105 CsF, 10 EGTA, 10 HEPES  | 300               | 7.4 |

### 2.1.5 Applikation von Wirksubstanzen

Die folgenden pharmakologischen Wirksubstanzen wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen:

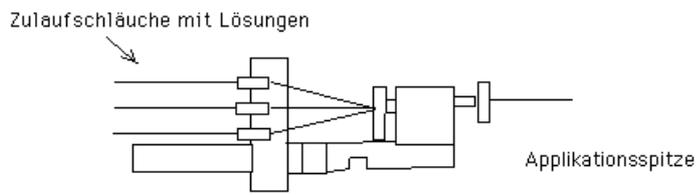
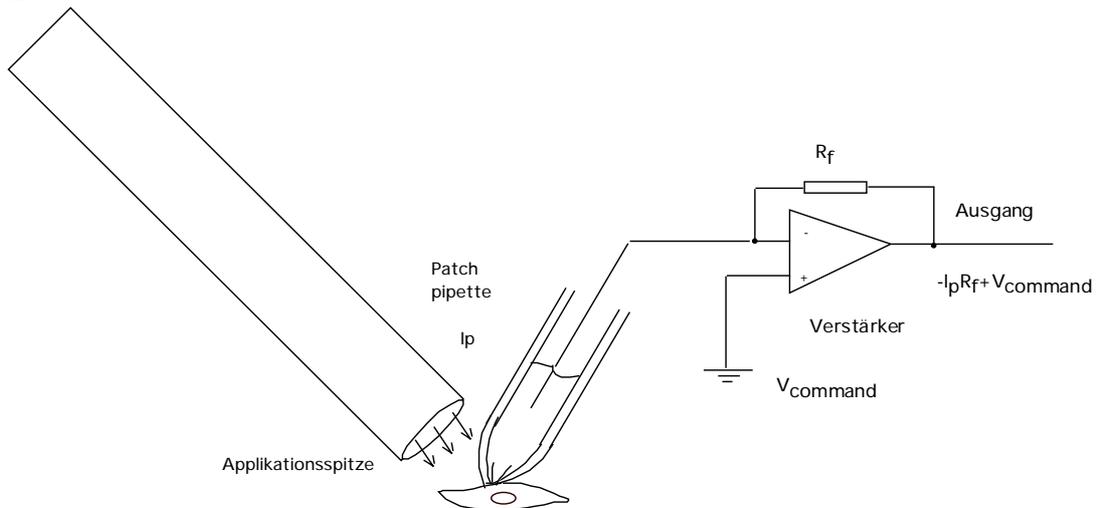
4-Amino-10-methylfolat (Methotrexat); Arachidonylkoenzym A; Charybdotoxin (ChTX); 4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonat (DIDS); Dimethylsulfoxid (DMSO); cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure (EPA); cis-5,8,11,14-Eicosatetraensäure (Arachidonsäure, AA); 5,8,11,14-Eicosatetraensäure (ETYA); Imipramin; 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoesäure (NPPB); cis-9-Octadecensäure (Oleinsäure); cis-9,12,15-Octadecatriensäure (Linolensäure); Pamonsäure; Tamoxifen; N-(3-[Trifluoromethyl]phenyl)anthranilsäure (Flufenaminsäure); Niflumsäure.

cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure (EPA) für die Messungen in IGR1-Zellen wurde von Firma ICN Biomedicals GmbH (Eschwege, Deutschland) als 10 mg/ml Ethanol-Lösung bezogen. Imipramin und Methotrexat wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und als 100 mM bzw. 10 mM Stammlösung aufbewahrt. Charybdotoxin wurde als

10  $\mu$ M Stammlösung in bidestilliertem Wasser gelöst und mit 10 mM HEPES auf pH 6.9 gepuffert. NPPB, Tamoxifen, Flufenaminsäure, Niflumsäure und DIDS wurden in DMSO als 150 mM, 100 mM und 50 mM Stammlösungen vorbereitet. Ungesättigte Fettsäuren von der Firma Sigma wurden als 20 mM Stammlösungen in DMSO eingesetzt. Die endgültige DMSO-Konzentration in der Applikationslösung war nicht höher als 0.1%. 100 mM Paminsäure-Stammlösungen wurden auf der Basis von extrazellulären Lösungen für elektrophysiologische Messungen von Kalium- und Chloridströmen vorbereitet. Alle Stammlösungen wurden bei  $-18^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und in entsprechenden Messlösungen kurz vor Beginn der Experimente verdünnt.

Der Wirkstoff LY 97241 wurde von Firma Eli Lilly (Indianapolis, Indiana, USA) zur Verfügung gestellt und als 10 mM Stammlösung in DMSO bei  $-18^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Die mit den unter 2.1.1.4 beschriebenen Messlösungen verdünnten Substanzen wurden mit Hilfe des „7-fold“ (konstruiert in der Arbeitsgruppe Molekulare und zelluläre Biophysik, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Deutschland) appliziert (Abb. 6 A). Der „7-fold“ erlaubte die abwechselnde Applikation von sieben verschiedenen Lösungen durch Quatzkapillaren. Die Applikationsspitze wurde mit Hilfe eines mechanischen Mikromanipulators an das Zielobjekt (die Zelle) gebracht (Abb. 6 B). Als erstes applizierten wir Kontrolllösung (extrazelluläre Messlösung) auf die Zelle. Innerhalb von einer Sekunde war die anschließende Applikation der Lösung mit der Wirkungssubstanz möglich.

**A****B****Abb. 6** Applikation von Wirksubstanzen

(A) Schematische Darstellung der Applikationspipette. Die Applikationsspitze wird mit Hilfe des mechanischen Manipulators positioniert. (B) Schematische Darstellung des Patch-Clamp Systems.

### 2.1.6 Proliferationsuntersuchungen

Die Effekte von Wirksubstanzen auf den Metabolismus und die Proliferation der humanen Melanomzellen IGR1 wurden nach den Methylthiazoltetrazolium (MTT)- und Bromdesoxyuridin (BrdU)-Methoden (Roche, Mannheim, Deutschland) ausgewertet. Alle Proliferationsuntersuchungen wurden von Dr. K. Schönherr durchgeführt.

## 2.2 Experimente an *Xenopus*-Oozyten

Die Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* stellen ein etabliertes System dar, das die Messungen an Ionenkanälen erlaubt (Stühmer et al., 1992). Hierfür wird die mRNA von ausgewählten Kaliumkanälen in Oozyten exprimiert. Das System erlaubt die Messungen mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Ganzzell-Konfiguration) sowie mittels der Patch-Clamp-Methode („Inside-Out“ und „Outside-Out“ Konfigurationen).

In einigen Experimenten prüften wir die Stabilität der Wirksubstanzen. Hierfür hatten wir die mRNA von ausgewählten Kaliumkanälen (hEAG1, mKv1.3) in Oozyten exprimiert und die Wirkung der inkubierten Substanzen auf die Kaliumströme mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gemessen.

Um die Frage zu beantworten, ob die Wirkstoffe Imipramin und Arachidonsäure von der inneren oder der äußeren Membranseite auf den hEAG1-Kanal einwirken, hatten wir mRNA vom hEAG1-Kanal in Oozyten exprimiert und die Wirkung von Substanzen in „Inside-Out“ und „Outside-Out“ Patch-Clamp-Konfigurationen verglichen.

### 2.2.1 Herstellung von mRNA

Die für die mRNA-Herstellung verwendeten Plasmide waren im Labor wie nachstehend aufgeführt vorhanden (Tabelle 2):

*Tabelle 2 Verwendete Plasmide für die Expression in Xenopus-Oozyten*

| <i>Plasmide</i>  | <i>Expressionsvektor</i> | <i>Referenzen bzw. Herkunft</i>  |
|--|--------------------------|--|
| hEAG1  | pGEM-HE                  | Schönherr et al., 2000   |
| dEAG   | pGH 19                   | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. T. Hoshi (Chen et al., 1996)                      |
| Chimäre hEAG1 mit C-Terminus von dEAG: bEAG1(1-512)-dEAG(530-1174) | pGEM-HE                  | Hergestellt von K. Löber durch gezielte Mutagenese mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion         |
| bEAG1  | pGEM-HE                  | Schönherr et al., 1999   |
| hEAG1-Konstrukt mit entfernten N-Terminus: hEAG1•Δ2-190            | pGEM-HE                  | Hergestellt von Dr. R. Schönherr durch gezielte Mutagenese mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion |
| bEAG1-Mutante L322H  | pGEM-HE                  | Schönherr et al., 1999   |
| bEAG1-Mutante L322C  | pGEM-HE                  | Schönherr et al., 2002a  |
| bEAG1-Mutante D316N  | pGEM-HE                  | Hergestellt von Dr. R. Schönherr durch gezielte Mutagenese mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion |
| mKv1.3   | pSP64T                   | freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. S. Grissmer (Grissmer et al., 1990)               |

Die vorhandenen Plasmide wurden mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease linearisiert; mRNA wurde durch die Transkription mit SP6 mRNA-Polymerase synthetisiert (mMESSAGE mMACHINE Kit, Ambion Inc., Austin, Texas, USA) und durch ein denaturierendes Agarosegel überprüft.

### 2.2.2 mRNA-Injektion in Oozyten

Es wurden 50 nl (0.1-0.5 µg/µl) mRNA-Lösung mit Glas-Mikroinjektionsnadeln in Oozyten des 5. oder 6. Reifestadiums (Dumont, 1972) von Ovariallappen adulter Frösche injiziert. Nach der Injektion wurden die Oozyten in mit standardisierter Barth-

Lösung gefüllten 24-Well-Geweberkultur-Platten (Costar Corning Inc., NY, USA) überführt und für 2-3 Tage bei 17.5°C inkubiert.

### 2.2.3 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Die Methode der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme erlaubt eine Kontrolle der über der Membran liegenden Spannung und eine parallele Messung der über die Zellmembran fließenden Ströme. Der fließende Strom verursacht einen Spannungsabfall, der mittels der in der Zelle eingeführten Glasmikroelektrode (Spannungselektrode) gemessen wird. Durch die Injektion eines Stromes durch eine zweite intrazelluläre Glaselektrode, der Stromelektrode, wird eine Membranspannung angelegt (Stühmer et al., 1992). Die Mikroelektroden wurden aus Filamentglas (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) gezogen. Wir füllten die Elektroden mit 2 M KCl Lösung. Nach Abbrechen der Spitze wiesen sie einen Widerstand im Bereich von 0.4 bis 0.8 M $\Omega$  auf. NFR-Lösung (Lösung 13) wurde als extrazelluläre Badlösung eingesetzt. Die Spannungsprotokolle wurden mit dem Programm „Pulse“ (HEKA Elektronik) erzeugt, als Messverstärker benutzten wir das Gerät Turbo-TEC 10CD (NPI, Tamm, Deutschland). Leck-Korrekturen und Kapazitäten-Abgleich wurden nach der P/n Methode durchgeführt. Die Stromsignale wurden mit einem 8-Pol-Bessel-Filter bei 1-2kHz gefiltert, über einen AD/DA-Wandler (ITC1/16, Instrutech Corp., USA) digitalisiert und auf der Festplatte eines Macintosh Quadra 650 Computers gespeichert.

Die inkubierten Substanzen wurden manuell mit der Pasteurpipette appliziert. Das Absaugen geschah mit einer Pumpe. Der vollständige Austausch des Badvolumens war innerhalb von 10 Sekunden möglich.

Tabelle 3 Lösungen für die Arbeit mit *Xenopus*-Oozyten

| Name  | Inhalt (mM)   | Osmolarität,<br>mOsm | pH  |
|---|---|----------------------|-----|
| Lösung 12 (Barth-Lösung)                    | 80 NaCl, 10 KCl, 2.4 NaHCO <sub>3</sub> , 0.82 MgSO <sub>4</sub> , 0.33 Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 0.41 CaCl <sub>2</sub> , 7.5 TRIS-HCl; freies Ca <sup>2+</sup> : 410µM | 200                  | 7.4 |
| Lösung 13 (Normal Frog Ringer, NFR Lösung): | 115 NaCl, 2.5 KCl, 1.8 CaCl <sub>2</sub> , 10 HEPES   | 300                  | 7.2 |
| extrazelluläre Lösung 14                    | 103.6 Na-Asp, 11.4 KCl, 1.8 CaCl <sub>2</sub> , 10 HEPES  | 198                  | 7.2 |
| intrazelluläre Lösung 15                    | 100 K-Asp, 15 KCl, 10 EGTA, 10 HEPES  | 216                  | 7.2 |

#### 2.2.4 Patch-Clamp in „Inside-Out“ und „Outside-Out“ Konfigurationen

Der Strom von den in *Xenopus*-Oozyten exprimierten EAG-Kanälen wurde auch mit der Patch-Clamp-Methode (s. 2.1.4) gemessen. Dafür wurde die Vitellinmembran von den Oozyten entfernt und danach die Messungen in „Inside-Out“ und „Outside-Out“ Konfigurationen (Hamill et al., 1981) durchgeführt. Bei der „Inside-Out“ Konfiguration stand die Außenseite der Membran in Kontakt mit der Pipettenlösung, bei der „Outside-Out“- mit der Badlösung. Die Pipetten mit dem Widerstand von 0.8-1.5 MΩ wurden aus Aluminiumsilikatglas (Hilgenberg) hergestellt.

### 2.3 Protokolle und Datenanalyse

#### 2.3.1 Datenauswertung

Die Daten wurden mittels der Programme PulseFit (HEKA Elektronik) und Igor-Pro (Wave-Metrics, Lake Oswego, OR, USA) ausgewertet.

Die jeweiligen Datenpunkte stellen den Mittelwert einer mit  $n$  bezeichneten Anzahl unabhängiger Messungen dar. Diese Mittelwerte sind mit ihren Standardfehlern (mean±S.E.M.) dargestellt. Die statistische Signifikanz ( $P < 0.05$ ) der Differenz zwischen zwei Mittelwerten wurde mit dem Student's  $t$  - Test geprüft. Im Fall von nicht-Gauss-Verteilung stellen die Werte Median ± Standardabweichung dar.

### 2.3.2 Pharmakologische Messungen an Ionenkanälen

Der nach Applikation der Wirksubstanz für die bestimmte Spannung erhaltene Strom ( $I$ ) wurde auf den Kontrollwert ( $I_{\text{control}}$ ) normiert und in Graphen gegen die jeweilige Konzentration der Wirksubstanz  $[D]$  dargestellt. Die Blocker-Kanal-Interaktionen wurden nach dem Clark-Schema (Clark, 1933) beschrieben: Der apparente  $IC_{50}$ -Wert und Hill-Koeffizient ( $h$ ) wurden aus der Anpassung an die Hill-Funktion bestimmt:

$$I/I_{\text{control}} = (IC_{50} / [D])^h / (1 + (IC_{50} / [D])^h) \quad (1)$$

Der effektive Ladungstransfer  $q$  wurde mit der folgenden Gleichung bestimmt:

$$\tau_{\text{block}} = \tau_0 \exp\{-Vq/kT\} \quad (2)$$

$$q = \sigma z e_0$$

Hierbei ist  $\tau_{\text{block}}$  die Kinetik der Stromabnahme während der Blocker-Applikation. Wir erhielten sie anhand der monoexponentialen Anpassungen an den EAG-Strom bei der Depolarisation der Zelle an verschiedene Spannungen ( $V$ ).  $\tau_0$  ist  $\tau_{\text{block}}$  bei Referenzpotential 0 mV,  $\delta$  stellt die relative elektrische Distanz dar (sie gibt an, welcher Anteil der über der Membran abfallenden Spannung auf die Bindungsstelle entfällt),  $e_0$ -Elementarladung,  $z$ - Valenz der Blocker-Moleküle;  $k$ - Boltzmann-Konstante.

### 2.3.3 Auswertung des Schaltverhaltens der Kanäle aus der Strom-Spannungs-Kennlinie

Die Änderung des elektrischen Potentials der Membran beeinflusst den Zustand der spannungsabhängigen Ionenkanäle: Sie werden geöffnet oder geschlossen. Der durch den geöffneten Kaliumkanal fließende Strom ( $I$ ) wird als Funktion der Spannung ( $V$ ) nach der Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung (3) (Aidley und Stansfield, 1996) berechnet:

$$I(V) = \Gamma V \frac{1 - e^{-(V - E_{\text{rev}}) / 25 \text{ mV}}}{1 - e^{-V / 25 \text{ mV}}} \quad (3)$$

Hierbei nimmt man an, dass 25 mV der physikalischen Konstante  $RT/F$  bei Raumtemperatur entspricht ( $R$ - Gaskonstante,  $T$ - absolute Temperatur,  $F$ - Faraday-Konstante). Als  $\Gamma$  wird die Leitfähigkeit des Kanals bezeichnet, als  $E_{\text{rev}}$  das Umkehrpotential der durch den Kanal fließenden Ionen.

In der Theorie nimmt man an, dass die Bewegung von bestimmten geladenen Partikeln in transmembranen elektrischen Feldern das Schaltverhalten der Kanäle steuert (Aidley und Stansfield, 1996; Hille, 2002). Ausgehend davon, dass nur zwei Zustände für die geladen Partikel möglich sind, die dem geöffneten und dem geschlossenen Zustand des Kanals entsprechen, kann man auch die Wahrscheinlichkeit des geöffneten Zustandes ( $P_o$ ) als Funktion der Membranspannung ( $V$ ) darstellen. Für die thermische Energie der Partikel, die für den Übergang der Energie-Barriere zwischen zwei mögliche Zuständen benötigt wird, gilt die Boltzmann-Verteilung (Aidley und Stansfield, 1996). Für die aus 4 Untereinheiten bestehenden Kaliumkanäle wird diese Funktion als Gleichung (4) angenommen:

$$P_o(V) = \frac{1}{(1 + e^{-(V-V_n)/k_n})^4} \quad (4)$$

$$k_n = kT/q$$

Hierbei ist  $k$  die Boltzmann-Konstante,  $T$  die absolute Temperatur,  $q$  die effektive Ladungstransfer.  $V_n$  ist die Spannung, bei der sich 50 % der Untereinheiten in geöffnetem Zustand befinden.

Bei elektrophysiologischen Messungen wurde die Stromamplitude am Ende des Depolarisationspulses gegen die Spannung aufgetragen. Die resultierende Strom-Spannungs-Kennlinie wurde mit Hilfe des Programms Pulse Fit (HEKA Elektronik) der Gleichung (5) angepasst.

$$I(V) = \Gamma V \frac{1 - e^{-(V-E_{rev})/25mV}}{1 - e^{-V/25mV}} \frac{1}{(1 + e^{-(V-V_n)/k_n})^4} \quad (5)$$

Das Umkehrpotential  $E_{rev}$  wurde nach der Nernst-Gleichung (6) berechnet und bei der Anpassung der Strom-Spannungs-Kennlinie auf die Gleichung (5) übertragen:

$$E_{rev} = -\frac{RT}{F} \ln \frac{C_{in}}{C_{out}} \quad (6)$$

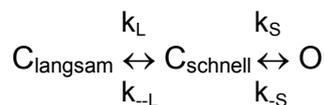
Hierbei sind  $C_{out}$  und  $C_{in}$  die Konzentrationen von Kalium-Ionen in extrazellulären und in intrazellulären Messlösungen.

Die ermittelten Parameter  $V_n$  und  $k_n$  dienen zur Charakterisierung des Schaltverhaltens der Kanäle.

Zum Vergleich der Messergebnisse von verschiedenen Zellen wurden die Strom-Spannungs-Kennlinien auf die Stromamplitude bei +60 mV von der entsprechenden Kontrollmessung normiert und als sog. „normalisierte“ IV-Kurven dargestellt.

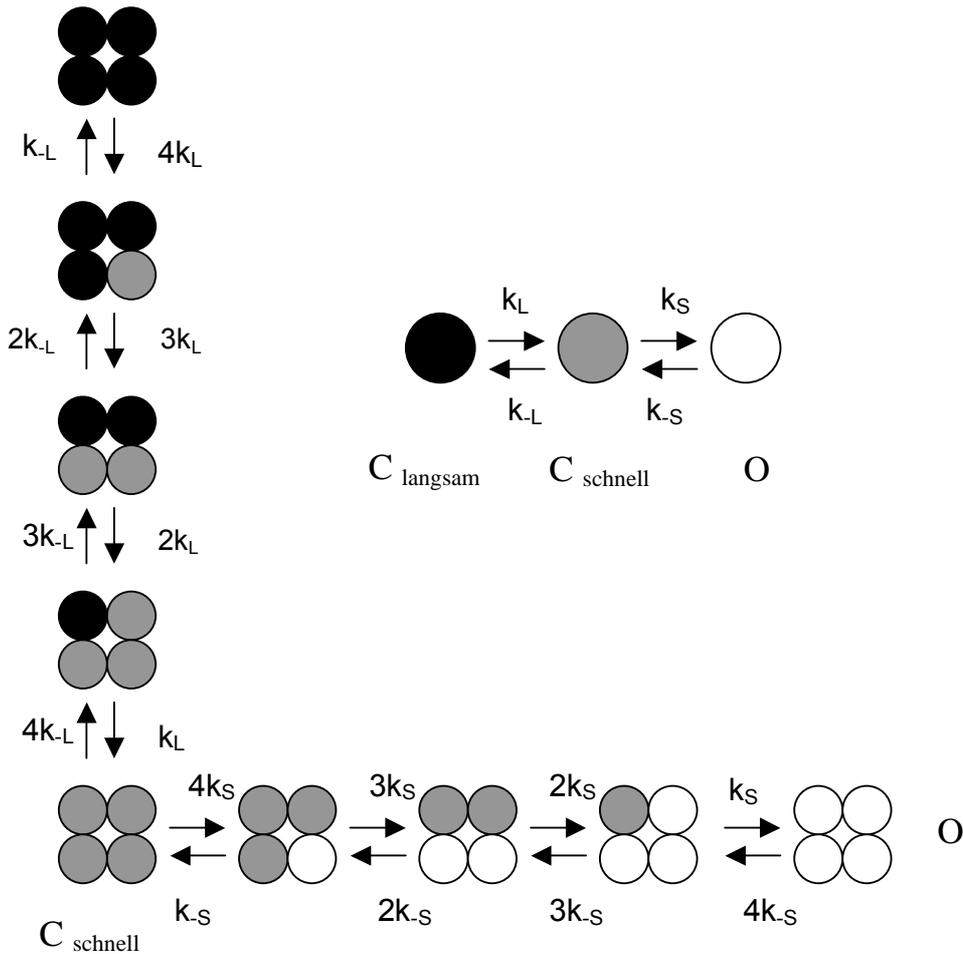
#### 2.3.4 EAG-Aktivierungsmodell

Das Schaltverhalten von Ionenkanälen kann mit Hilfe von Zustandsmodellen beschrieben werden (Hoshi et al., 1994; Zagotta et al., 1994a, b). Solche Modelle für EAG-Kanäle wurden von Terlau und Kollegen (Terlau et al., 1996) vorgeschlagen. Um die für diese Kanäle spezifische Abhängigkeit der Aktivierungskinetik von der Haltespannung zu beschreiben, wurden zwei geschlossene Zustände vorgestellt:  $C_{\text{schnell}}$  und  $C_{\text{langsam}}$  - schnell und langsam aktivierbare geschlossene („closed“) Zustände. Bei einer Membranspannung unter -100 mV wird der Zustand  $C_{\text{langsam}}$  besetzt; bei -50- -80 mV  $C_{\text{schnell}}$ . Der Übergang zu einem offenen Zustand (O) von  $C_{\text{langsam}}$  ist nur über  $C_{\text{schnell}}$  möglich. Im Modell nimmt man an, dass jede der vier identischen Untereinheiten des EAG-Kanals in einem der drei Zustände sein kann (in  $C_{\text{langsam}}$ ,  $C_{\text{schnell}}$  oder O). Die Schnelligkeit der Übergänge von einem zum anderen Zustand und zurück werden mit Hin- und Rückkonstanten beschrieben, z.B.



Die sigmoidale Stromaktivierung nach depolarisierenden Pulsen (Übergang von  $C_{\text{langsam}}$  zu  $C_{\text{schnell}}$ ) konnte mit Funktionen der Form  $I(t) = a [1 - \exp(-k_L t)]^n$  beschrieben werden. Für den EAG-Kanal bei hoher externer  $Mg^{2+}$ -Konzentration wurde die Funktion mit  $n > 3$  angepasst, daraus schloss man, dass jede der 4 Untereinheiten des Tetramers im Zustand  $C_{\text{langsam}}$  vorliegen kann. Die Unabhängigkeit des Schaltverhaltens aller vier Untereinheiten des Kanals von dem Zustand  $C_{\text{langsam}}$  wurde später experimentell bestätigt (Schönherr et al., 1999).

Im Modell von Terlau et al. (1996) nahm man an, dass der Übergang der Untereinheiten von  $C_{\text{schnell}}$  zum geöffneten Zustand erst möglich sein soll, wenn alle vier Untereinheiten den Zustand  $C_{\text{schnell}}$  erreicht haben (Abb. 7). Der Kanal ist danach geöffnet, wenn alle vier Untereinheiten in Zustand O sind.



**Abb. 7** (nach Terlau et al., 1996; modifiziert) Das Zustandsdiagramm stellt identische und unabhängige Übergänge der vier Untereinheiten zwischen den Zuständen  $C_{\text{langsam}}$  und  $C_{\text{schnell}}$  und zwischen  $C_{\text{schnell}}$  und  $O$  dar. Der Übergang zwischen  $C_{\text{schnell}}$  und  $O$  kann nur stattfinden, wenn sich alle Untereinheiten in  $C_{\text{schnell}}$  befinden. Sind alle vier Untereinheiten in Zustand  $O$ , wird der Kanal geöffnet.

Die Aktivierung der einzelnen Untereinheiten kann auch mit einem vereinfachten Modell beschrieben werden (Schönherr et al., 1999):

$$I(t) = a \left\{ (1 - P_{\text{slow}})^4 (1 - e^{-t/\tau_{\text{fast}}}) + \sum_{i=1}^4 \binom{4}{i} P_{\text{slow}}^i (1 - P_{\text{slow}})^{4-i} (1 - e^{-t/\tau_{\text{slow}}})^i \right\} \quad (7)$$

Hierbei ist  $a$  die Amplitude des Stroms, der durch den geöffneten Kanal fließt,  $P_{\text{slow}}$  die Wahrscheinlichkeit der einzelnen Untereinheit in dem Zustand  $C_{\text{langsam}}$  zu sein;

$\tau_{fast}$  die Zeitkonstante des Übergangs von Zustand  $C_{schnell}$  in den geöffneten Zustand ( $1/k_S$ ) und  $\tau_{slow}$  die Zeitkonstante des Übergangs von Zustand  $C_{langsam}$  in den Zustand  $C_{schnell}$  ( $1/k_L$ ).

In diesem Modell wird die Aktivierung der einzelnen Untereinheiten unabhängig vom Zustand der anderen drei Untereinheiten betrachtet. Es wird angenommen, dass die maximale Stromamplitude  $a$  keine für die Kinetik relevante Information trägt. Die Stromamplitude wird bei  $t \rightarrow \infty$ , d.h. bei geöffnetem Kanal, angenommen und nur als Proportionalitätsfaktor verwendet. Der Übergang vom Zustand  $C_{schnell}$  in den geöffneten Zustand wird mit der monoexponentiellen Funktion beschrieben.

Um den Zustand des EAG-Kanals in unseren Experimenten zu charakterisieren, wurden die Stromkurven der Gleichung (7) mit dem Programm Igor Pro (Wave Metrics) angepasst. Die Aktivierung von EAG-Kanälen wurde durch die Stromamplitude am Ende des Depolarisationspulses ( $a$ ), die Wahrscheinlichkeit des Zustandes  $C_{langsam}$  vor Depolarisation für die einzelne Untereinheit ( $P_{slow}$ ) und Zeitkonstanten  $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$  charakterisiert.

Die Änderungen der Depolarisationsspannung haben keinen Einfluss auf den Wert von  $P_{slow}$ , dieser Parameter kann als eine Funktion des Haltepotentials beschrieben werden. Die Zeitkonstanten  $\tau_{slow}$  und  $\tau_{fast}$  sind kaum vom Haltepotential abhängig, sie können daher als Funktionen der Depolarisationsspannung angesehen werden (Schönherr et al., 1999).

Der  $P_{slow}$ -Wert wird als Funktion des Haltepotentials dargestellt. Der Zusammenhang zwischen  $P_{slow}$  und Haltepotential kann durch eine Boltzmann-Funktion beschrieben werden (Schönherr et al., 1999):

$$P_{slow}(V) = \frac{P_{-\infty}}{1 + e^{-(V-V_h)/k_h}} \quad (8)$$

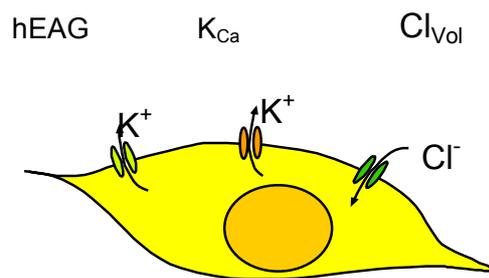
Hierbei ist  $V_h$  die Spannung für halbmaximale Besetzung von  $C_{langsam}$  für einzelne Untereinheiten des Kanals;  $k_h$  der Steigungsparameter.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ionenkanäle der IGR1-Melanomzelle und ihre pharmakologischen Eigenschaften

In der Melanomlinie IGR1 wurden spannungsabhängige Kaliumkanäle sowie Calcium-regulierbare Kaliumkanäle nachgewiesen (Nilius et al., 1990; Nilius und Wohlrab, 1992; Nilius et al., 1993). Volumen-aktivierte Chloridkanäle sind auch in diesen Zellen beschrieben (Nilius et al., 1994) (Abb. 8).

Das Ziel unserer Experimente war es, die Rolle von verschiedenen Ionenkanalgruppen für die Proliferation der IGR1-Zellen zu untersuchen. Die Proliferationsversuche mit spezifischen Blockern für hEAG1-,  $K_{Ca}$ - und  $Cl_{Vol}$ -Kanäle sollten zeigen, welche Kanalgruppe die entscheidende Rolle für den Zellzyklusverlauf der IGR1-Zellen spielt. Dafür hatten wir für jede Kanalgruppe spezifische Blocker auf ihren Einfluss auf andere Kanäle der IGR1-Zellen getestet.

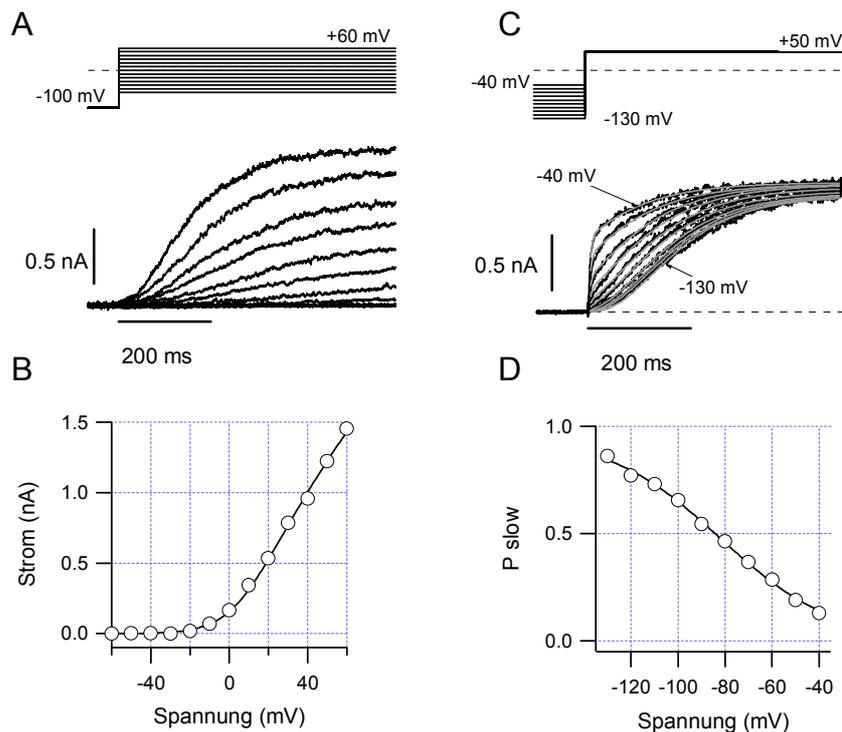


**Abb. 8** Schematische Darstellung der Ionenkanaltypen in IGR1 Zelle.

##### 3.1.1 hEAG1-Kanal

hEAG1-Strom wurde in 54 von 68 getesteten IGR1 Zellen nachgewiesen, die mittlere Stromdichte betrug  $5.9 \pm 0.1$  pA/pF bei +60 mV.

hEAG1-Strom in der Melanomzelle ist in Abb. 9 dargestellt. Abb. 9 A stellt die Stromspuren bei verschiedenen Test-(Depolarisations)-Spannungen ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV dar. Bei steigenden Depolarisationsspannungen ist eine zunehmende Stromamplitude und eine schnellere Aktivierungskinetik zu beobachten. Die Stromamplitude am Ende des Depolarisationspulses ist als Funktion der Spannung in Abb. 9 B dargestellt. Die Gleichung (5) kann an die Kurve angepasst werden. Aufgrund der Daten in Abb. 9 A, B können wir feststellen, dass hEAG1-Kanäle in dieser Melanomzelle ab -20 mV öffnen. Die Spannung, bei der sich 50 % der Kanäle

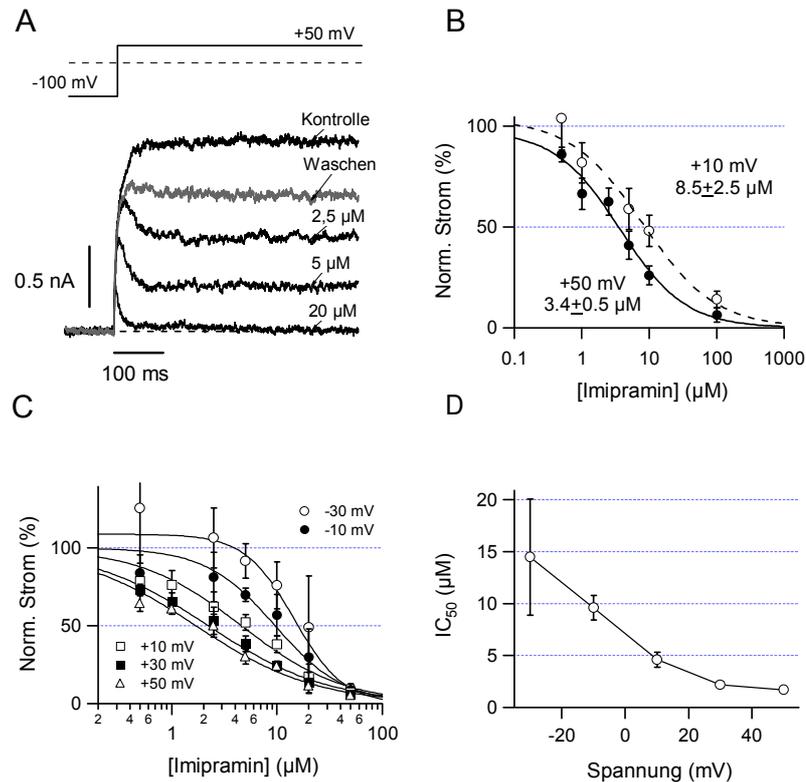


**Abb. 9** Elektrophysiologische Eigenschaften des hEAG-Kanals in IGR1-Zellen.

(A) [Lösung  $1_{\text{ex}}$  mit  $2 \text{ mM Mg}^{2+}$  /Lösung  $4_{\text{in}}$ ] Strom-Spannungs-Abhängigkeit des hEAG1-Kanals. Ausgehend von einem für 1 s angelegten Haltepotential von  $-100 \text{ mV}$  wurde die Zelle auf Spannungen von  $-60 \text{ mV}$  bis  $+60 \text{ mV}$  in  $10 \text{ mV}$ -Schritten depolarisiert. (B) Die Stromamplitude am Ende des Depolarisationspulses (A) ist als Funktion der Spannung dargestellt. Die Gleichung (5) ist an die Daten angepasst. (C) Die Aktivierungskinetik des hEAG1-Kanals in der IGR1-Zelle hängt vom jeweiligen Haltepotential ab (Cole-Moore Effekt). Die Zellen wurden nach einem jeweils für 5 s angelegten Haltepotential im Bereich von  $-130$  bis  $-40 \text{ mV}$  auf eine Spannung von  $+50 \text{ mV}$  depolarisiert. Die Gleichung (7) ist an die Stromspuren angepasst. (D) Die Wahrscheinlichkeit des Zustandes  $C_{\text{langsam}}$  für einzelne Untereinheiten ( $P_{\text{slow}}$ ) kann als Funktion des Haltepotentials im Bereich von  $-130$  bis  $-40 \text{ mV}$  aus den Daten aus (C) bestimmt werden. Die resultierende Kurve beschreibt eine Boltzmann-Funktion (8).

im geöffneten Zustand befinden ( $V_n$ ), wurde als  $10.5 \text{ mV}$  bei dem Steigungsparameter  $k_n = 11.7 \text{ mV}$  berechnet.

Die in Abb. 9 C dargestellten Stromspuren stammen von derselben Melanomzelle. Die Zelle wurde nach verschiedenen negativen Vorpulsen auf eine Spannung von  $+50 \text{ mV}$  depolarisiert. Die Aktivierungskinetik ist bei einer Depolarisation auf  $+50 \text{ mV}$  von einem Haltepotential von  $-120 \text{ mV}$  aus deutlich langsamer als von  $-60 \text{ mV}$  aus (sog. Cole-Moore Effekt). Dieser Effekt kann mit Hilfe des in 2.3.4 dargestellten Aktivierungsmodells beschrieben werden.



**Abb. 10** Die Empfindlichkeit von hEAG1-Kanälen gegenüber Imipramin (nach Gavrilova-Ruch et al., 2002).

(A) [Lösung  $1_{ex}$ /Lösung  $4_{in}$ ] Blocken von hEAG-1 Strom in einer IGR1-Zelle bei verschiedenen Imipraminkonzentrationen. Die Amplitude des hEAG1-Stromes hat sich im Laufe des Experimentes reduziert (sog. „Run-down“-Effekt, Vergleich „Kontrolle“- und „Waschen“-Strom). (B) Dosis-Wirkungs-Kurven für den Block des hEAG1-Kanals in IGR1-Zellen mit Imipramin bei +50 mV (●) und +10 mV (○). Der Strom wurde am Ende des Depolarisationspulses gemessen und auf den Kontrollwert normiert. Die Hill-Gleichung ist an die Daten angepasst. (C,D) Imipramin blockt hEAG1-Kanäle in transfizierten CHO-Zellen. (C) Dosis-Wirkungs-Kurven bei verschiedenen Testspannungen. (D)  $IC_{50}$ -Werte aus den in (C) dargestellten Daten als Funktion der Spannung.

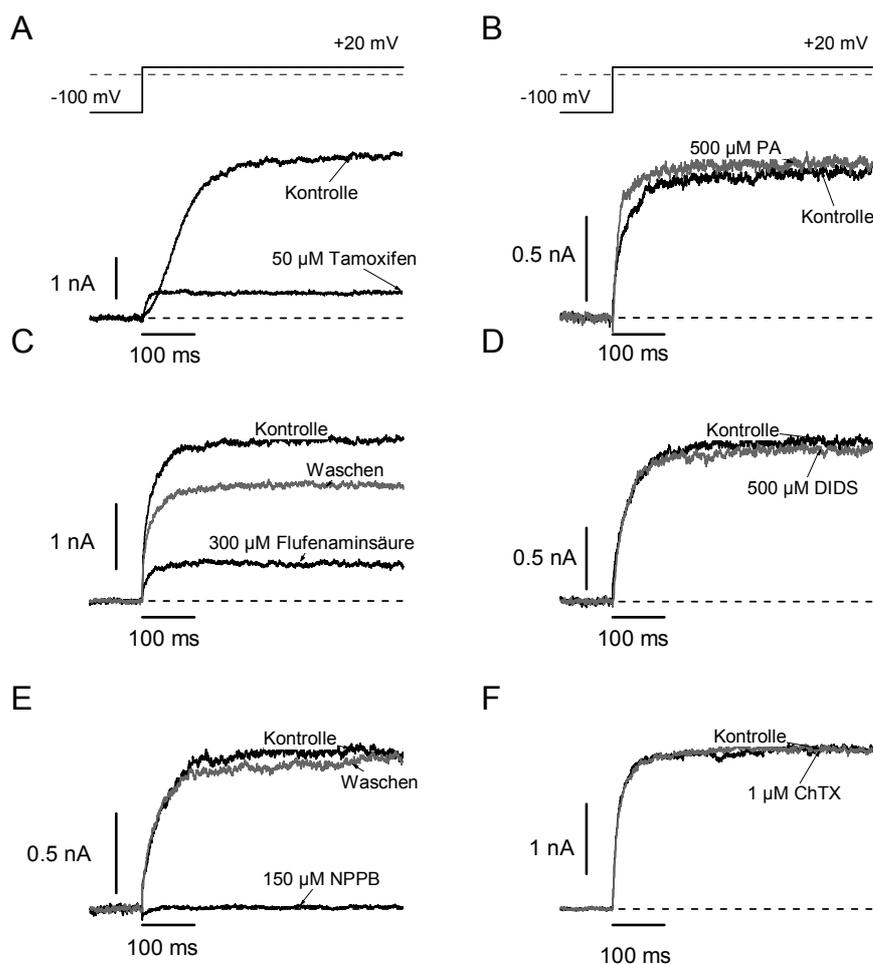
Die Gleichung (7) ist an die Stromspuren angepasst. Dabei wurden die Parameter  $a$ ,  $P_{slow}$  und  $\tau_{slow}$  angepasst, während die Zeitkonstante  $\tau_{fast}$  auf 4 ms festgelegt wurde. Der mittlere  $\tau_{slow}$ -Wert wurde als  $101.2 \pm 9.6$  ms bestimmt. Abb. 9 D zeigt die Wahrscheinlichkeit des Zustandes  $C_{langsam}$  für einzelne Untereinheiten des Kanals als Funktion des Haltepotentials im Bereich von -130 bis -40 mV. Der Zusammenhang zwischen  $P_{slow}$  und dem Haltepotential ließ sich durch eine Boltzmann-Funktion beschreiben (Gleichung 8). Die Anpassung der Gleichung (8) ergibt einen Parameter  $V_h = -82$  mV: die Spannung für halbmaximale Besetzung von  $C_{langsam}$  für einzelne Untereinheiten des Kanals.

Wegen seiner charakteristischen Abhängigkeit vom Haltepotential ist der hEAG1-Kanal auch ohne pharmakologischen Blocker leicht zu identifizieren. Spezifische Blocker

für den hEAG1-Kanal sind zur Zeit nicht bekannt (Bauer und Schwarz, 2000). Nach Literaturangaben lässt sich der hEAG1-Kanal mit typischen Kaliumkanalblockern wie TEA oder Quinidin nur in hohen Konzentrationen inhibieren (Bijlenga et al., 1998; Schönherr et al., 2002). Weinschenker und Kollegen (Weinschenker et al., 1999) zeigten, dass das trizyklische Antidepressivum Imipramin ELK-Kanäle von Nematoden *Caenorhabditis elegans* inhibiert. Höhere Imipraminkonzentrationen blockten auch den EAG1-Kanal aus der Maus.

Wir prüften, ob Imipramin als potenter Blocker von hEAG1-Kanälen wirken kann. Abb. 10 A zeigt den Block von hEAG1-Strom mit zunehmender Imipraminkonzentration. Der Block erreichte seine stabile Phase in weniger als einer Sekunde und war komplett reversibel. Die Dosis-Wirkungs-Kurve bei einer Depolarisation auf +50 mV ist in Abb. 10 B dargestellt. Die Anpassung der Hill-Gleichung ergab einen Hill-Koeffizienten von  $0.89 \pm 0.10$  und einen  $IC_{50}$ -Wert von  $3.4 \pm 0.5 \mu\text{M}$ . Der Block war spannungsabhängig: Bei einer Depolarisation auf +10 mV ergab sich ein  $IC_{50}$ -Wert von  $8.5 \pm 2.5 \mu\text{M}$ .

Wegen der schwachen Expression von hEAG1 in IGR1-Zellen hatten wir CHO-Zelllinien mit hEAG1-Kanälen transfiziert. Die Expression in transfizierten CHO-Zellen war ausreichend, um den Block bei niedrigeren Depolarisationspulsen zu untersuchen: Die mittlere Stromdichte betrug bei +60 mV  $108 \pm 22 \text{ pA/pF}$ ,  $n=35$ . Abb. 10 C stellt die Dosis-Wirkungs-Kurven bei Depolarisationspotentialen von -30 bis +50 mV dar. Abb. 10 D zeigt die  $IC_{50}$ -Werte als Funktion der Testspannung. Diese Ergebnisse weisen auf eine Spannungsabhängigkeit des Blocks von hEAG1-Kanälen durch Imipramin hin. Es ist jedoch zu bemerken, dass nicht alle Kanäle bei Spannungen unter +20 mV geöffnet waren. Bei der Anpassung der Hill-Funktion an die Daten ist eine scheinbare (apparente) Spannungsabhängigkeit des Hill-Koeffizienten zu beobachten (Tabelle 4). Die Werte des Hill-Koeffizienten werden umso kleiner, je größer die Depolarisationsspannung ist. Bei Spannungen von -30 und -10 mV sind die Werte des Hill-Koeffizienten größer als 1.00. Dies ist damit zu erklären, dass bei niedrigen Depolarisationsspannungen eine Öffnung von bisher geschlossenen Kanälen zum Imipraminblock von geöffneten Kanälen beiträgt.



**Abb. 11** Empfindlichkeit von hEAG1-Kanälen in transfizierten CHO-Zellen gegenüber verschiedenen Wirksubstanzen.

(A) [Lösung  $1_{ex}$ /Lösung  $4_{in}$ ] Block von hEAG1-Strom durch 50  $\mu$ M Tamoxifen. Die Zellen wurden nach einem für 1 s angelegten Haltepotential von -100 mV auf +20 mV depolarisiert. (B) hEAG1-Strom-Spuren vor und nach der Applikation von 500  $\mu$ M Pamonsäure. (C) Block von hEAG1-Strom bei 300  $\mu$ M Flufenaminsäure. (D) hEAG1-Strom-Spuren vor und nach der Applikation von 500  $\mu$ M DIDS. (E) Block von hEAG1-Strom durch 150  $\mu$ M NPPB. (F) hEAG1-Strom-Spuren vor und nach der Applikation von 1  $\mu$ M ChTX.

Tabelle 4 Werte für  $IC_{50}$  und Hill-Koeffizienten bei der Anpassung der Dosis-Wirkungs-Kurven bei verschiedenen Testspannungen an die Hill-Gleichung.

|                             | -30 mV          | -10 mV          | +10 mV          | +30 mV          | +50 mV          |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| $IC_{50}$ -Wert,<br>$\mu$ M | 14.5 $\pm$ 4.5  | 9.6 $\pm$ 1.2   | 4.6 $\pm$ 0.7   | 2.2 $\pm$ 0.3   | 1.7 $\pm$ 0.2   |
| Hill-Koeffizient            | 1.85 $\pm$ 0.39 | 1.32 $\pm$ 0.19 | 0.89 $\pm$ 0.11 | 0.77 $\pm$ 0.06 | 0.77 $\pm$ 0.06 |

Für die Proliferationsversuche mit IGR1-Zellen prüften wir, ob Chloridkanalantagonisten hEAG1-Kanäle inhibieren. 50  $\mu\text{M}$  Tamoxifen inhibierte  $92\pm 2\%$  ( $n=3$ ) des Stroms bei +20 mV. 300  $\mu\text{M}$  Flufenaminsäure blockierte  $73\pm 6\%$  ( $n=4$ ) des EAG-Stroms bei einer Depolarisation von +20 mV; 150  $\mu\text{M}$  NPPB blockierte  $98\pm 1\%$  ( $n=3$ ) (Abb. 11 A, C, E). Gegenüber 500  $\mu\text{M}$  Paminsäure ( $n=3$ ) und 500  $\mu\text{M}$  DIDS ( $n=3$ ) war der hEAG1-Kanal dagegen unempfindlich (Abb. 11 B, D). Charybdotoxin (ChTX), ein potenter Blocker für Calcium-aktivierte Kaliumkanäle, der im nM-Bereich wirkt, wurde hinsichtlich dieser Wirkung auch beim hEAG1-Kanal getestet. Der hEAG1-Strom war jedoch unempfindlich gegenüber ChTX in einer Konzentration bis zu 1  $\mu\text{M}$  ( $n=6$ , Abb. 11 F).

### 3.1.2 Calcium-aktivierte Kaliumkanäle

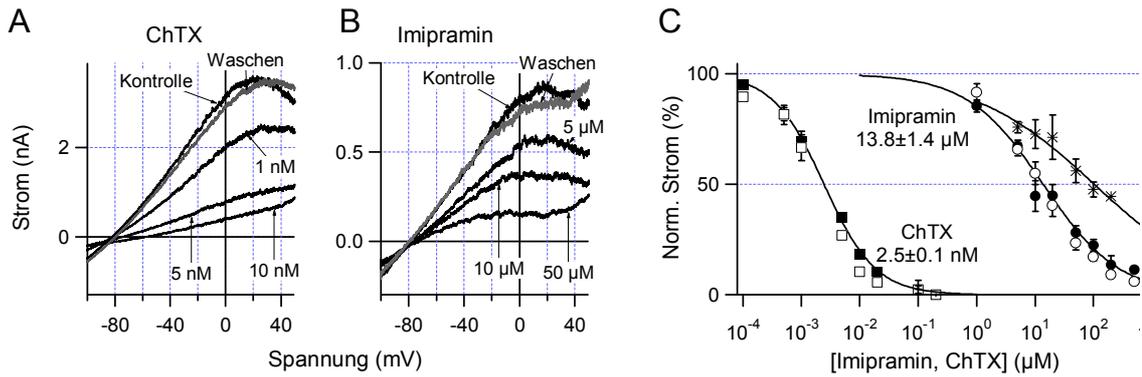
Calcium-aktivierte Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ) wurden in IGR1-Zellen bei 800 nM Calcium-Zugabe in der Pipette gemessen. Die mittlere Stromdichte betrug  $69.4\pm 12.1$  pA/pF bei +50 mV ( $n=36$ ), der  $K_{Ca}$ -Strom wurde bei allen getesteten IGR1 Zellen registriert.

ChTX erwies sich als potenter Inhibitor von  $K_{Ca}$ -Kanälen in IGR1-Zellen (Abb. 12 A). Der Block war spannungsunabhängig und komplett reversibel. Die Anpassung der Dosis-Wirkungs-Kurve mit der Hill-Gleichung ergab einen  $IC_{50}$ -Wert von  $2.5\pm 0.1$  nM und einen Hill-Koeffizienten von  $0.99\pm 0.04$  bei +50 mV (Abb. 12 C). Für den Block bei 0 mV sowie bei +20 mV wurden die gleichen Werte erzielt.

Imipramin inhibierte  $K_{Ca}$ -Kanäle in  $\mu\text{M}$ -Konzentrationen (Abb. 12 B, C). Mit einem Hill-Koeffizienten von  $0.67\pm 0.04$  und einem  $IC_{50}$ -Wert von  $13.8\pm 1.4$   $\mu\text{M}$  bei +50 und 0 mV war der Block spannungsunabhängig, bei -100 mV blockte jedoch Imipramin wesentlich schwächer. Der  $IC_{50}$ -Wert wurde betrug hier  $104\pm 23$   $\mu\text{M}$ .

$K_{Ca}$ -Kanäle der Melanomzelle zeigten eine Empfindlichkeit gegenüber 50 nM Clotrimazol, dem bekannten Blocker der  $K_{Ca}$ -Kanäle aus der IK-Gruppe:  $55\pm 5\%$  des Stromes wurde bei +50 mV geblockt; der gleiche Block ( $57\pm 5\%$ ) wurde bei 0 mV beobachtet ( $n=6$ , Abb. 13 A). Dies weist auf eine Spannungsunabhängigkeit des Blockes hin.

Apamin und d-Tubocurarin, die Blocker von  $K_{Ca}$ -Kanälen mancher SK-Typen, waren unwirksam in Konzentrationen von 100 nM ( $n=3$ ) bzw. von 200  $\mu\text{M}$  ( $n=4$ ) (Abb. 13 B, C).

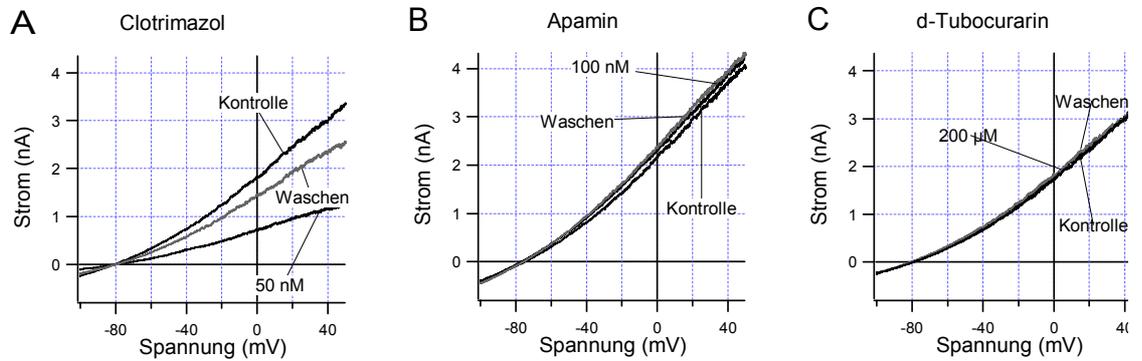


**Abb. 12** Empfindlichkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierten Kaliumkanälen in IGR1-Zellen gegenüber ChTX und Imipramin (nach Gavrilova-Ruch et al., 2002).

(A) [Lösung  $1_{\text{ex}}$ /Lösung  $5_{\text{in}}$ ] Block von  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanälen bei verschiedenen ChTX-Konzentrationen. Der Strom wurde als Antwort auf Spannungsrampen (von -100 bis +50 mV) gemessen. (B) Block von  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanälen durch Imipramin. (C) Dosis-Wirkungs-Kurven für  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanäle bei Applikation von ChTX und Imipramin. Offene Symbole stehen für die bei 0 mV gemessenen normierten Ströme, gefüllte Symbole für die bei +50 mV gemessenen normierten Ströme ( $n=3-7$ ). Die Sterne (\*) symbolisieren die bei -100 mV gemessenen Ströme bei Applikation von Imipramin ( $n=3-7$ ). Die Daten wurden für Leck- und Chloridströme nach Applikation von 200 nM ChTX korrigiert.

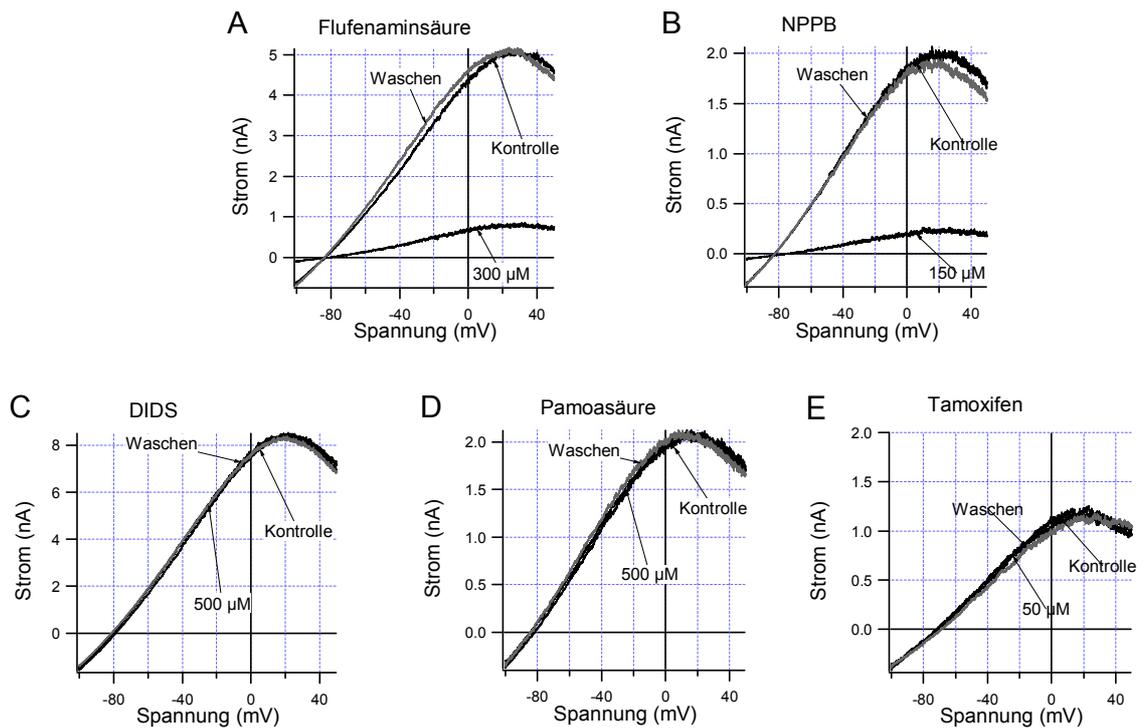
Die beschriebenen pharmakologischen Eigenschaften bestätigen, dass in IGR1-Zellen  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanal IK vorhanden ist. Dies wurde durch die RT-PCR Analyse bestätigt (Meyer et al, 1999): Die mRNA-Fragmente für hIK-, hSK1- und hSK2-Kanäle wurden nachgewiesen.

Für den Zweck der Proliferationsversuche mit IGR1-Zellen prüften wir, ob  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanäle auch gegenüber Chloridkanalblockern sensitiv sind. 300  $\mu\text{M}$  Flufenaminsäure blockte  $89 \pm 3\%$  ( $n=3$ ) des Stroms bei +50 mV, 150  $\mu\text{M}$  NPPB blockte  $87 \pm 2\%$  ( $n=3$ ) (Abb.14 A, B). Gegenüber 500  $\mu\text{M}$  DIDS ( $n=4$ ), 500  $\mu\text{M}$  Pamonsäure ( $n=8$ ) und 50  $\mu\text{M}$  Tamoxifen ( $n=3$ ) waren  $\text{K}_{\text{Ca}}$ - Kanäle unempfindlich (Abb.14 C, D, E).



**Abb. 13** Empfindlichkeit von Ca<sup>2+</sup>-regulierten Kaliumkanälen in IGR1-Zellen gegenüber verschiedenen K<sub>Ca</sub>-Blockern (nach Meyer et al., 1999).

(A) [Lösung 1<sub>ex</sub>/Lösung 5<sub>in</sub>] Block von K<sub>Ca</sub>-Kanälen mit Clotrimazol. Der Strom wurde als Antwort auf Spannungsrampen (von -100 bis +50 mV) gemessen. (B) K<sub>Ca</sub>-Ströme vor und nach der Applikation von 100 nM Apamin. (C) vor und nach der Applikation von 200 µM d-Tubocurarin.



**Abb. 14** Empfindlichkeit von Ca<sup>2+</sup>-regulierten Kaliumkanälen in IGR1-Zellen gegenüber verschiedenen Chloridkanalblockern.

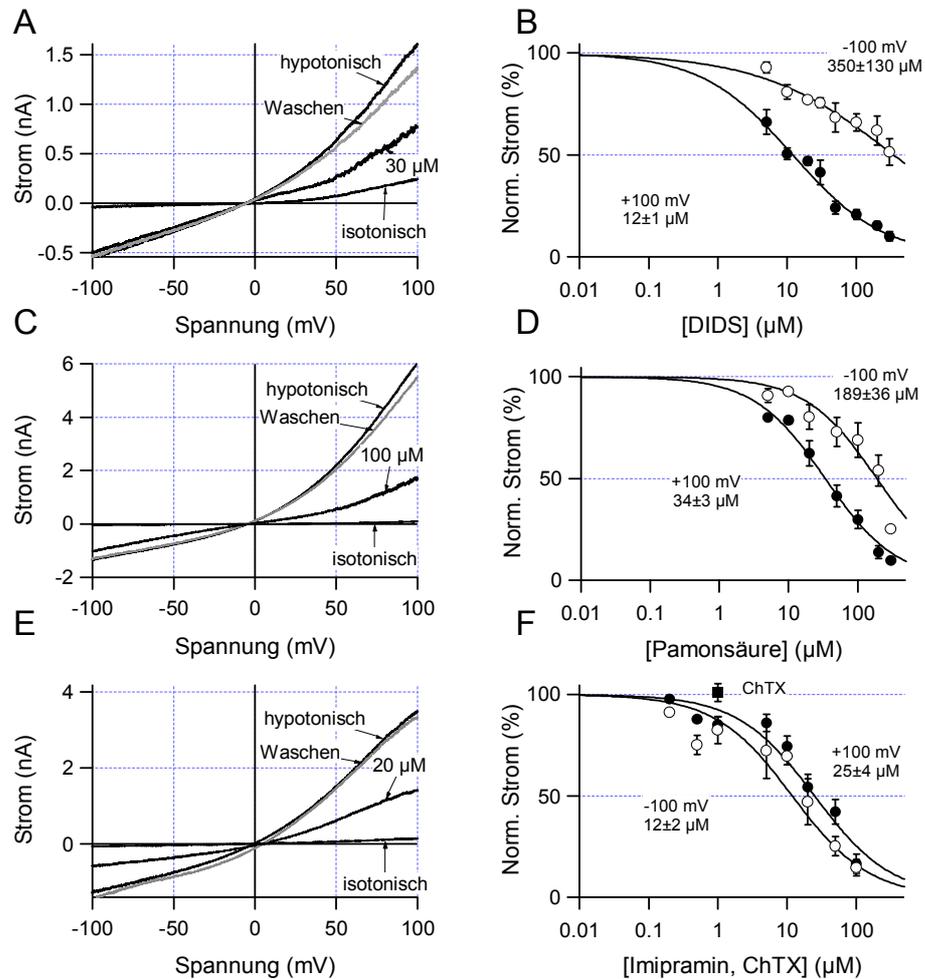
(A) [Lösung 1<sub>ex</sub>/Lösung 5<sub>in</sub>] Block von K<sub>Ca</sub>-Kanälen bei 300 µM Flufenaminsäure. (B) Block von K<sub>Ca</sub>-Kanälen bei 150 µM NPPB. (C) Die Applikation von 500 µM DIDS hat keinen Effekt, ebenso (D) die Applikation von 500 µM Pamoasäure und (E) die Applikation von 50 µM Tamoxifen.

### 3.1.3 Volumen-aktivierte Chloridkanäle

Durch intrazelluläre TEA-haltige Lösung konnten andere Ionenkanäle vollständig geblockt werden. Beim Wechsel zu einer extrazellulären hypoosmotischen Lösung wurden die  $Cl_{Vol}$ -Kanäle aktiviert. Die mittlere Stromdichte betrug dabei  $82.7 \pm 7.4$  pA/pF ( $n=69$ ) bei +100 mV.

DIDS blockte die Chloridkanäle spannungsabhängig: Mit einem Hill-Koeffizient von  $0.66 \pm 0.05$  wurden  $IC_{50}$ -Werte von  $12.1 \pm 1.4$   $\mu$ M für +100 mV und von  $350 \pm 130$   $\mu$ M für -100 mV erzielt (Abb. 15 A, B). Diesen spannungsabhängigen Charakter zeigte auch der Block durch Pamonsäure: Mit einem Hill-Koeffizienten von  $0.84 \pm 0.05$  wurden  $IC_{50}$ -Werte von  $33.9 \pm 3.0$   $\mu$ M und  $189.3 \pm 33.5$   $\mu$ M für +100 und -100 mV erzielt (Abb. 15 C, D).

Bei externer Applikation von 10  $\mu$ M Imipramin wurde mit intrazellulären TEA-haltigen Lösungen eine schnelle Stromabnahme (100% Block innerhalb von  $83 \pm 13$  Sekunden,  $n=6$ ) beobachtet. Die extrazelluläre Applikation von niedrigeren Imipraminkonzentrationen verursachte den gleichen Block sowohl mit intrazellulären TEA-haltigen Lösungen als auch mit intrazellulären  $Cs^+$ -haltigen Lösungen: 1  $\mu$ M blockte  $14 \pm 3\%$  des Stromes bei intrazellulärem TEA ( $n=3$ ),  $15 \pm 4\%$  bei intrazellulärem  $Cs^+$  ( $n=6$ ), 5  $\mu$ M blockte  $23 \pm 5\%$  bei intrazellulärem TEA ( $n=3$ ),  $21 \pm 4\%$  bei intrazellulärem  $Cs^+$  ( $n=5$ ). Mit intrazellullärer  $Cs^+$ -haltiger Lösung wurde bei externer Applikation von Imipramin der Wert für den Hill-Koeffizienten mit  $0.78 \pm 0.03$  bestimmt, der  $IC_{50}$ -Wert betrug dabei  $25.1 \pm 3.5$   $\mu$ M auf +100 mV (Abb. 15 E, F). Intrazelluläres TEA blockt Kaliumkanäle von innen. Die Applikation von extrazellulärem Imipramin verursacht die Blockade von außen. Die beobachtete 100%-ige Abnahme des  $Cl_{Vol}$ -Stroms bei Applikation von 10  $\mu$ M Imipramin mit intrazellulärer TEA-haltigen Lösungen beruht vermutlich auf diesem gleichzeitigen Block und einer darauf beruhenden Störung der osmotischen Bilanz der Zelle.



**Abb. 15** Empfindlichkeit von Volumen-aktivierten Chloridkanälen in IGR1-Zellen gegenüber DIDS, Pamonsäure und Imipramin (nach Gavrilova-Ruch et al., 2002).

Links (A, C, E) sind die Ströme dargestellt, die als Antwort auf Spannungsrampen von -100 bis +100 mV gemessen wurden. Die Ströme wurden zunächst in der extrazellulären isotonischen Lösung 6 gemessen, dann wurde zu der 23%-igen hypotonischen Lösung 7 gewechselt. Der Blocker wurde jeweils in die hypotonische Lösung 7 appliziert. Anschließend wurde die Zelle mit der Blocker-freien hypotonischen Lösung 7 gewaschen. Die Konzentration von freiem Calcium in der Pipette betrug (A, B) 50 nM in der TEA-haltigen Lösung 9 und (C) 100 nM in der Cs-haltigen Lösung 8. Rechts sind die Dosis-Wirkungs-Kurven auf +100 mV (durch die vollen Symbole) und -100 mV (durch die offene Symbole) für (B) DIDS, (D) Pamonsäure und (F) Imipramin dargestellt. Die Daten für Imipramin wurden für den Cs<sup>+</sup>-durchlässigen Kanal (ein auswärtsgerichteter Strom in der isotonischen Lösung) korrigiert. Die Unempfindlichkeit der Chloridströme auf 1  $\mu\text{M}$  ChTX ist in Abb. (F) mit dem Symbol (■) dargestellt.

### 3.1.4 Cs<sup>+</sup>-permeabler Kanal

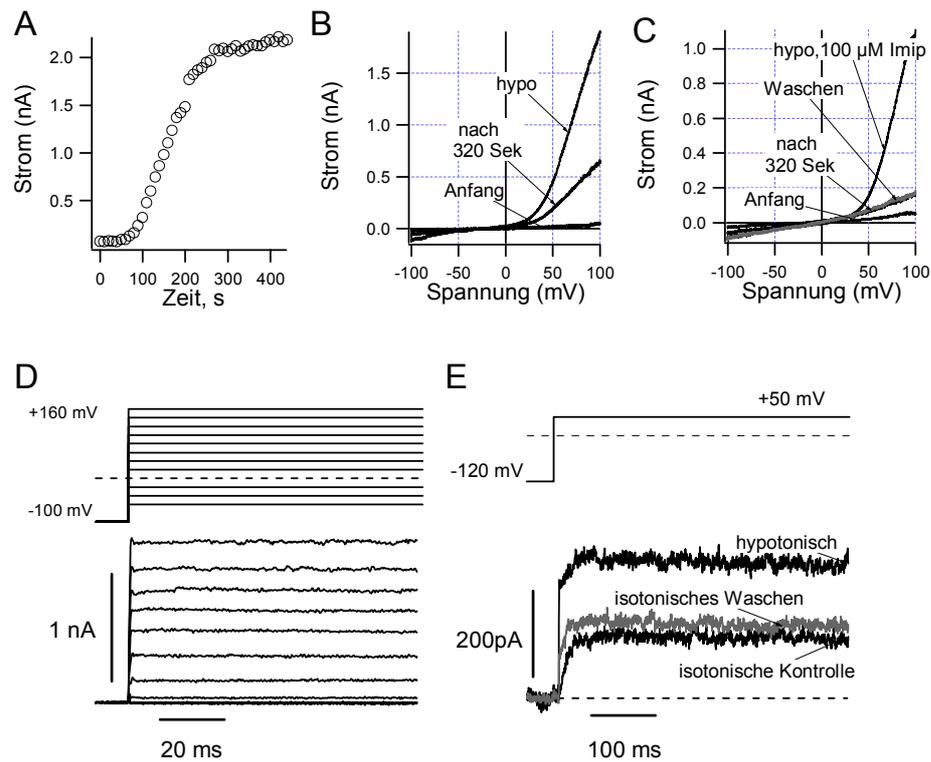
Mit einer Cs<sup>+</sup>-haltigen intrazellulären Lösung mit 100 nM Calcium ohne ATP wurde ein Cs<sup>+</sup>-durchlässiger, auswärtsgerichteter Strom beobachtet. Die Zeit bis zur 90%-igen Aktivierung des Stroms betrug  $217.12 \pm 51.44$  ms (n=7) (Abb. 16 A). Die mittlere Stromdichte betrug  $39.5 \pm 2.5$  pA/pF bei +100 mV (n=115). Der Strom konnte auch ohne intrazelluläres Calcium aktiviert werden, jedoch verlängerte sich hier die Aktivierungszeit ( $716 \pm 81$  ms, n=3). Die Aktivierungskinetik dieses Stromes unterschied sich deutlich von der des hEAG1-Kanals (Abb. 16 D).

Der Kanal nimmt vermutlich an der Regulation der osmotischen Bilanz der IGR1-Zelle teil. Die Darstellung in Abb. 16 B zeigt die Stromzunahme bei einem Wechsel zu einer extrazellulären hypoosmotischen Lösung. Die Zunahme der Stromamplitude unter hypoosmotischen Bedingungen wurde auch bei 100  $\mu$ M extrazellulärem Imipramin beobachtet (Abb. 16 C). Dies schließt aus, dass der beobachtete Strom durch hEAG1-, K<sub>Ca</sub>- oder Chloridkanäle geflossen war.

Da die auswärtsgerichtete Stromkomponente bei einem Wechsel zu einer extrazellulären hypoosmotischen Lösung auch mit Kalium-haltigen intrazellulären Lösungen beobachtet wurde (Abb. 16 E), nehmen wir an, dass es sich um einen unselektiven Kationen-durchlässigen Kanal handelt.

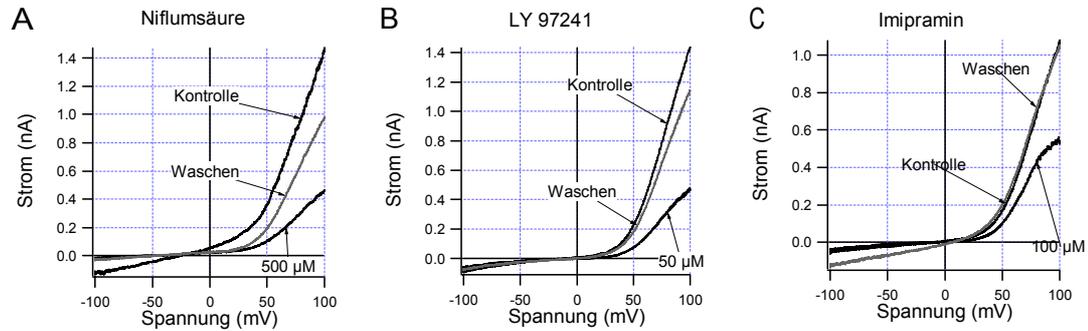
Der unselektive Kationen-durchlässige Kanal war gegenüber 500  $\mu$ M Niflumsäure ( $77 \pm 6\%$  Block bei +100 mV, n=3), 50  $\mu$ M LY 97241 ( $52 \pm 1\%$  Block bei +100 mV, n=3) und 100  $\mu$ M Imipramin ( $52 \pm 3\%$  Block bei +100 mV, n=4) empfindlich (Abb. 17 A, B, C).

100  $\mu$ M Pamonsäure (n=3), 400  $\mu$ M DIDS (n=3), 150  $\mu$ M NPPB (n=3), 300  $\mu$ M Flufenaminsäure (n=3) und 1  $\mu$ M ChTX (n=6) hatten keinen Einfluss auf den Kanal.



**Abb. 16** Der unselektive Kationen-durchlässige Kanal in IGR1-Zellen.

(A) [Lösung  $6_{ex}$ /Lösung  $8_{in}$ ] Die Strom-Spuren wurden als Antwort auf Spannungsrampen von -100 mV bis +100 mV gemessen. Dargestellt sind die Änderungen der Stromamplitude bei +100 mV unmittelbar nach dem Durchbrechen der Membran in der Ganzzell-Konfiguration. (B) Die Strom-Spuren am Anfang des Experimentes, 320 s danach und bei der Applikation der 23%-igen hypoosmotischen Lösung 7. (C) Die Aktivierung des auswärtsgerichteten Kationen-durchlässigen Stromes bei der Applikation der 23%-igen hypoosmotischen Lösung 7 mit 100  $\mu$ M Imipramin. (D) Strom-Spannungs-Abhängigkeit von auswärtsgerichteten  $Cs^+$ -permeablen Kanälen. Die Zelle wurde nach einem für 1 s angelegten Haltepotential von -100 mV auf Spannungen von -60 bis +160 mV in 20 mV-Schritten depolarisiert. (E) [Lösung  $7_{ex}$ /Lösung  $4_{in}$ ] Aktivierung des  $Cs$ -permeablen Kanals bei der Applikation einer extrazellulären 23%-igen hypoosmotischen Lösung. Die Zelle wurde nach einem für 1 s angelegten Haltepotential von -120 mV auf eine Spannung von +50 mV depolarisiert. hEAG1-Kanal und unselektive Kationen-Kanäle tragen zu der resultierenden Strom-Spur bei. Die hEAG1-Komponente ist durch ihre typische Aktivierungskinetik erkennbar.



**Abb. 17** Empfindlichkeit des Cs<sup>+</sup>-permeablen Kanals in IGR1-Zellen gegenüber verschiedenen Wirksubstanzen.

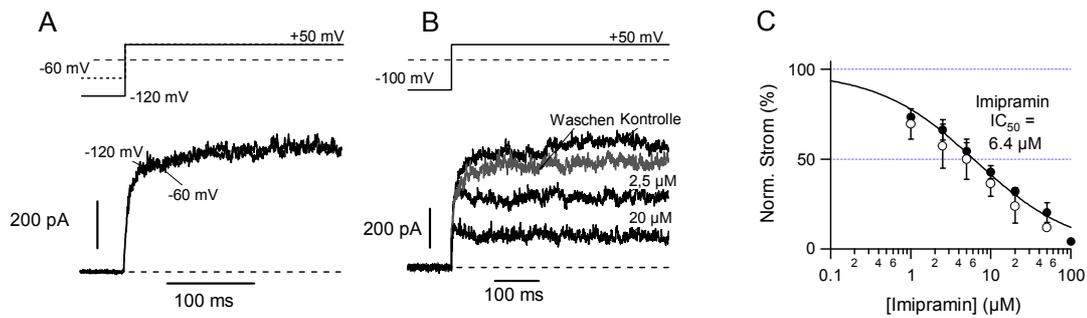
[Lösung 7<sub>ex</sub>/Lösung 8<sub>in</sub>] Die Stromspuren wurden bei Spannungsrampen von -100 mV bis +100 mV gemessen. Die Kontrolle wurde 300 s nach dem Durchbrechen der Membran in der Ganzzell-Konfiguration gemessen. (A) Block des Cs<sup>+</sup>-permeablen Kanals durch 500 µM Niflumsäure, (B) 50 µM LY 97241 und (C) 100 µM Imipramin.

### 3.2 Ionenkanäle der IGR39-Melanomzelle und ihre pharmakologischen Eigenschaften

Die Proliferationsversuche mit spezifischen Blockern für hEAG1-, K<sub>Ca</sub>- und Cl<sub>Vol</sub>-Kanäle in IGR1-Zellen sollten zeigen, welche Kanalgruppe die entscheidende Rolle für den Zellzyklusverlauf der IGR1-Zellen spielt. Ein spezifischer pharmakologischer Blocker für den hEAG1-Kanal ist jedoch noch nicht bekannt. Um zu prüfen, ob der Effekt von Proliferationsblockern für die IGR1-Zellen dem Block des hEAG1-Kanals zuzuschreiben ist, wurde nach einer Kultur von melanomalen Zellen gesucht, die kein hEAG1 exprimieren und gleichzeitig die Kanäle der K<sub>Ca</sub>- und Cl<sub>Vol</sub>-Gruppen haben. Mit solchen Zellen sollten die vergleichenden Proliferationsversuche durchgeführt werden. Die humanen melanomalen Zellen der IGR39-Linie wurden hierfür ausgewählt.

In IGR39-Zellen wurde ein von EAG verschiedener Typ eines spannungsabhängigen Kaliumkanals nachgewiesen (Meyer et al., 1999). Die Aktivierungskinetik und die Amplitude des auswärtsgerichteten Stromes hing bei diesem Kanal nicht vom Haltepotential ab (Abb. 18 A). Die mittlere Stromdichte betrug 8.0±1.1 pA/pF bei +60 mV (n=30), der Strom wurde bei 73 von 78 getesteten IGR39-Zellen registriert.

Der spannungsabhängige Kaliumkanal der IGR39-Zellen war empfindlich für Imipramin (Abb. 18 B). Die Dosis-Wirkungs-Kurve bei einer Depolarisation auf +50 mV ist in Abb. 18 C dargestellt. Die Anpassung der Hill-Gleichung ergab einen Hill-Koeffizienten von 0.72±0.07 und einen IC<sub>50</sub>-Wert von 6.4±1.2 µM. Der Block war spannungsunabhängig: Bei einer Depolarisation auf +10 mV blieb der IC<sub>50</sub>-Wert unverändert (Abb. 18 C).



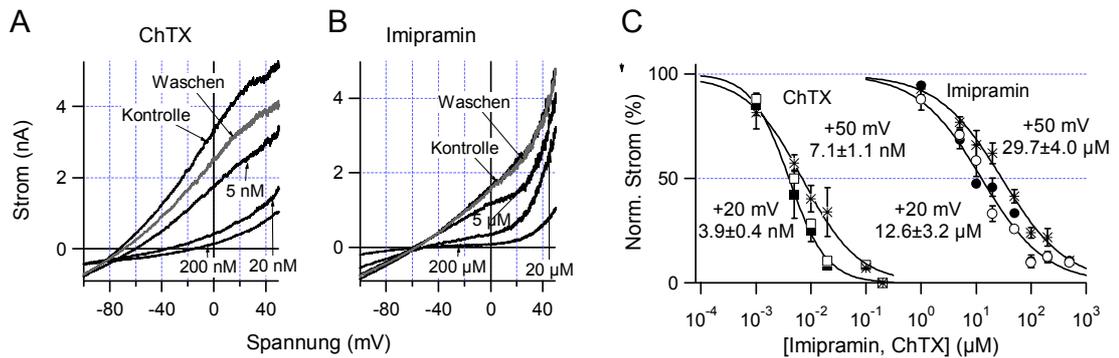
**Abb. 18** Die Empfindlichkeit von auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen in IGR39-Zellen gegenüber Imipramin.

(A) [Lösung  $1_{ex}$ /Lösung  $4_{in}$ ] Die Aktivierungskinetik des auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanals in der IGR39-Zelle ist vom jeweiligen Haltepotential unabhängig. Die Zellen wurden nach einem jeweils für 1 s angelegten Haltepotential von  $-120$  bzw.  $-60$  mV auf eine Spannung von  $+50$  mV depolarisiert. (B) Blocken von auswärtsgleichrichtendem Kalium-Strom in IGR39-Zellen bei verschiedenen Imipraminkonzentrationen. (C) Dosis-Wirkungs-Beziehung für den Block des auswärtsgleichrichtenden Kaliumkanals in IGR39-Zellen mit Imipramin bei  $+50$  mV ( $\bullet$ ) und  $+10$  mV ( $\circ$ ). Der Strom wurde am Ende des Depolarisationspulses gemessen und auf Kontrollwert bzw. „Waschen“ normiert.

Bei Befüllen der Patch-Pipette mit  $Ca^{2+}$ -Ionen ( $800$  nM) wurden Calcium-regulierte Kaliumkanäle in IGR39 Zellen aktiviert. Die mittlere Stromdichte betrug  $112.1 \pm 12.0$  pA/pF bei  $+50$  mV ( $n=56$ ). Abb. 19 A, C stellt die Empfindlichkeit der  $K_{Ca}$  – Kanäle gegenüber dem Blocker ChTX dar. Die Anpassung der Dosis-Wirkungs-Kurve mit der Hill-Gleichung ergab einen Hill-Koeffizienten von  $1.27 \pm 0.14$  und einen  $IC_{50}$ -Wert von  $3.9 \pm 0.4$  nM bei  $+20$  mV sowie bei  $0$  mV. Diese Werte sind mit denen für den ChTX-Block der  $K_{Ca}$ -Kanäle in IGR1-Zellen vergleichbar. Für den Block bei  $+50$  mV wurde jedoch ein höherer  $IC_{50}$ -Wert ( $7.1 \pm 1.1$  nM) mit einem Hill-Koeffizient  $0.86 \pm 0.10$  erzielt (Abb. 18 C). Der  $IC_{50}$ -Wert für den Block der  $K_{Ca}$ -Kanäle in IGR1-Zellen bei  $+50$  mV war statistisch signifikant kleiner ( $2.5 \pm 0.1$  nM,  $P < 0.05$ ).

Abb. 19 B, C stellt den Block der  $K_{Ca}$ -Kanäle in IGR39-Zellen durch Imipramin dar. Bei einem Hill-Koeffizient von  $0.75 \pm 0.11$  und einem  $IC_{50}$ -Wert von  $12.6 \pm 3.2$  nM bei  $+20$  mV sowie bei  $0$  mV zeigen die  $K_{Ca}$ -Kanäle der IGR39-Zellen eine den IGR1-Zellen vergleichbare Empfindlichkeit. Der  $IC_{50}$ -Wert von  $29.7 \pm 4.0$  nM für  $+50$  mV (Hill-Koeffizient  $0.74 \pm 0.06$ ) ist dagegen signifikant höher ( $P < 0.05$ ).

Die gleiche Empfindlichkeit von  $K_{Ca}$ -Kanälen auf die Applikation von ChTX und Imipramin bei  $+20$  mV und  $0$  mV lässt auf das Vorhandensein von gleichen  $K_{Ca}$ -Gruppen (IK- und SK-Kanäle) in IGR1- und IGR39-Zellen schließen. Die niedrigere Empfindlichkeit der Ströme gegenüber ChTX und Imipramin bei  $+50$  mV im Vergleich zu denen bei  $+20$  mV weist auf eine Präsenz eines zusätzlichen Kanals in IGR39-Zellen hin, der erst im Bereich höherer Spannungen öffnet.



**Abb. 19** Empfindlichkeit von  $Ca^{2+}$ -regulierten Kaliumkanälen in IGR39-Zellen gegenüber ChTX und Imipramin.

(A) [Lösung  $1_{ex}$ /Lösung  $5_{in}$ ] Block von  $K_{Ca}$ -Kanälen mit verschiedenen ChTX-Konzentrationen. Der Strom wurde bei Spannungsrampen von -100 bis +50 mV gemessen. (B) Block von  $K_{Ca}$ -Kanälen durch Imipramin. (C) Dosis-Wirkungs-Kurven für  $K_{Ca}$ -Kanäle bei Applikation von ChTX und Imipramin. Offene Symbole stehen für bei 0 mV gemessene normierte Ströme, volle Symbole für bei +20 mV gemessene. Die Sterne (\*) symbolisieren die bei +50 mV gemessenen normierten Ströme (n=3-7). Die Daten wurden für die Leck- und Chloridströme nach Applikation von 200 nM ChTX korrigiert.

Volumen-aktivierte Chloridkanäle sind ebenfalls in IGR39-Zellen vorhanden. Die mittlere Stromdichte betrug hier  $23.9 \pm 12.1$  pA/pF (n=6) bei +100 mV.  $Cl_{Vol}$ -Kanäle der IGR39-Zellen waren ebenso empfindlich gegenüber Imipramin wie die  $Cl_{Vol}$ -Kanäle in IGR1-Zellen: 50 μM Imipramin blockte  $51 \pm 2\%$  der  $Cl_{Vol}$ -Kanäle bei +100 mV,  $55 \pm 19\%$  bei -100 mV (n=3); 100 μM Imipramin blockte  $63 \pm 0.5\%$  der  $Cl_{Vol}$ -Kanäle bei +100 mV,  $67 \pm 5\%$  bei -100 mV (n=3).

Der  $Cs^+$ -permeable Kanal wurde wie bei IGR1-Zellen auch in IGR39-Zellen beobachtet. Die mittlere Stromdichte betrug  $23.2 \pm 3.8$  pA/pF bei +100 mV (n=9). Die Empfindlichkeit dieses Kanals in IGR39-Zellen gegenüber Imipramin war vergleichbar mit der Empfindlichkeit in IGR1-Zellen: 100 μM Imipramin blockte  $43 \pm 3\%$  des Stromes bei +100 mV (n=3); 50 μM Imipramin blockte  $20 \pm 4\%$  (n=3).

### 3.3 Physiologische Bedeutung von hEAG1-Kanälen in Melanomzellen

#### 3.3.1 Inhibition des Wachstums von Melanomzellen durch Ionenkanalblocker

##### 3.3.1.1 Wirkstoffstabilitätstest

Für Proliferationsversuche wurden unterschiedliche Wirkstoffe zugesetzt, d.h. in das Kulturmedium bei 37°C gegeben. Um die Wirkstoffstabilität unter diesen Bedingungen

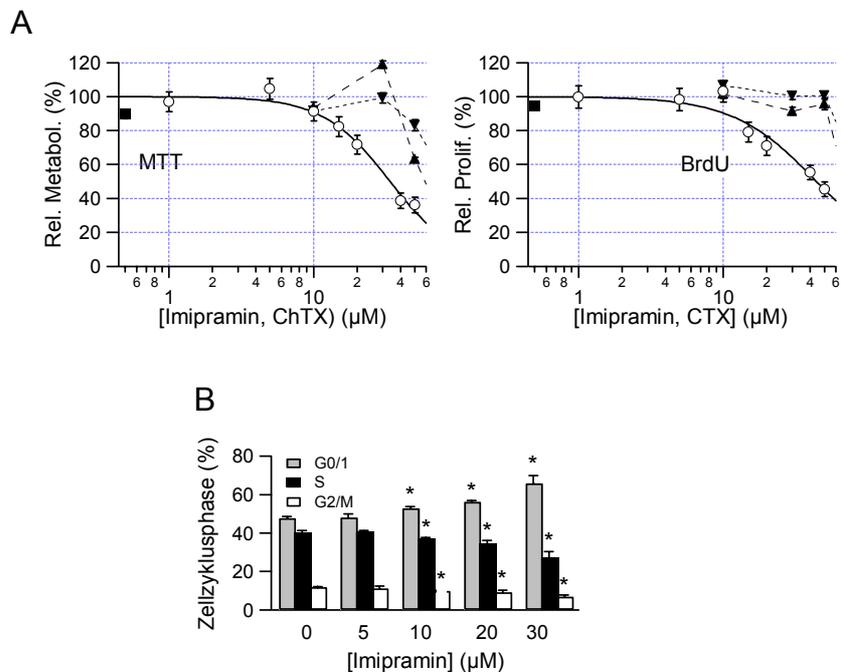
zu prüfen, lösten wir Imipramin, ChTX, Pamonsäure und DIDS in DMEM, versetzt mit dem fötalen Kälberserum (FKS), und inkubierten die Stoffe 48 Stunden bei 37°C in humider 10%-iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre. Die Aktivität der Wirkstoffe auf die Kaliumströme wurde dann mittels elektrophysiologischen Messungen festgestellt.

Wir inkubierten Imipramin als 10 µM Lösung und prüften die Wirkung auf hEAG1, der in *Xenopus*-Oozyten exprimiert wurde. Der Strom wurde mit der Methode der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gemessen. Die Badlösung wurde während des Experimentes durch DMEM ersetzt. Die Applikation des mit FKS versetzten Mediums reduzierte sofort den hEAG1 Strom. Nach ca. 20 Minuten stellte sich der ursprüngliche Strom wieder ein. Nach dieser Equilibrationsperiode applizierten wir 10 µM Imipramin. Inkubiertes Imipramin blockte 32±2% (n=4) vom hEAG1 Strom bei +20 mV; frisches Imipramin 25±6% (n=3). Die Differenz zwischen den zwei Mittelwerten war nicht signifikant (P>0.05).

ChTX wurde als 200 nM Lösung inkubiert. Die Applikation auf Oozyten, denen mRNA von mKv1.3-Kanälen injiziert wurde (Stühmer et al., 1989), ergab folgende Werte für den Block bei +30 mV: 1 nM ChTX 7.2±1.3% (n=3); 5 nM 33.5±4.0% (n=5); 10 nM 49.1±4.9% (n=6); 50 nM 66.1±7.9% (n=3). Die Applikation von frischem ChTX, das mit dem gleichen Medium verdünnt wurde, blockte den Kv1.3-Strom auf ähnliche Weise: 1 nM ChTX 8.0±3.3% (n=3); 5 nM 38.4±5.5% (n=4); 10 nM 61.3±9.1% (n=3); 50 nM 71.6±4.8% (n=3). Die Differenzen zwischen den Mittelwerten für den Block mit inkubiertem und frischem ChTX in entsprechenden Konzentrationen waren nicht signifikant (P>0.05).

Ein Stabilitätstest für Pamonsäure und DIDS wurde mittels Applikationen auf IGR1-Zellen (Patch-Clamp-Methode) durchgeführt. Pamonsäure und DIDS wurden als 1 mM Lösungen inkubiert. Bei +100 mV blockte 20 µM inkubierte Pamonsäure 24.4±1.7% (n=5) vom Volumen-aktivierten Chloridstrom, 100 µM 59.3±2.3% (n=3). 20 µM frische Pamonsäure blockte 37.7±4.9% (n=5), 100 µM 70.1±4.5% (n=4). Die Mittelwerte zeigten signifikante Differenzen (P<0.05): Die Aktivität von Pamonsäure wurde um ca. 20% während der Inkubation reduziert. 20 µM inkubiertes DIDS blockte 50.2±5.5% (n=6), 200 µM 84.1±7.8% (n=3) vom Volumen-aktivierten Chloridstrom in IGR1-Zellen, wobei frisches DIDS 53.0±1.9% (n=10, 20 µM) und 84.7±2.0% (n=6, 200 µM) blockte. Die Mittelwertdifferenz war hier nicht signifikant (P>0.05).

Imipramin, ChTX und DIDS, gelöst in DMEM mit fetalem Kälberserum, sind nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C in humider 10%-iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre stabil geblieben. Die Aktivität von Pamonsäure wurde unter diesen Bedingungen um ca. 20% reduziert.



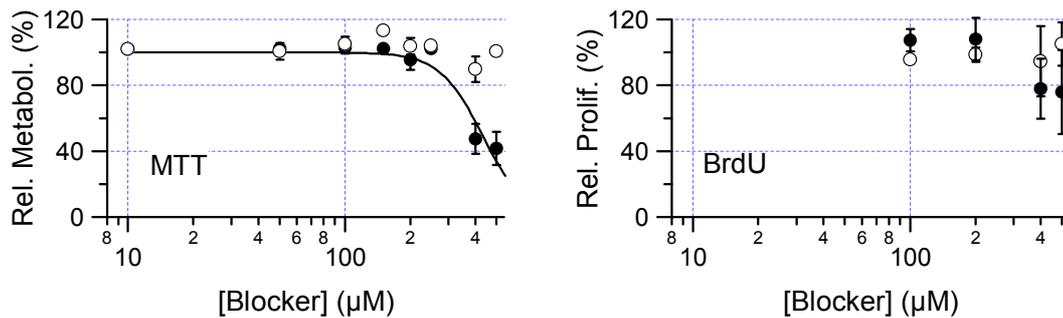
**Abb. 20** Effekt von Imipramin auf Zellproliferation, Metabolismus und Zellzyklus von IGR1-Zellen (aus Gavrilova-Ruch et al., 2002).

(A) IGR1-Zellen wurden 48 h mit den in der Abbildung bezeichneten Konzentrationen von Imipramin (○) und ChTX (■) behandelt. HEK 293 (▼) und CHO-K1 (▲) Zellen wurden ebenfalls mit Imipramin behandelt. Die Daten sind als relative Werte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Standardfehler wurden anhand von 5 unabhängigen Experimenten (jeweils 5-8 parallele Messungen für MTT –oben- und BrdU –unten-) festgelegt. Die Hill-Gleichung ist an die Daten angepasst. Der halb-maximale Effekt von Imipramin betrug 34 µM bei der MTT-Methode und 44 µM bei der BrdU-Methode (Hill-Koeffizienten 1.9 bei MTT und 1.5 bei BrdU). (B) Zellzyklusverteilung der für 24 h mit den in der Abbildung bezeichneten Imipraminkonzentrationen behandelten IGR1-Zellen. Die Sterne (\*) symbolisieren signifikante Abweichungen von der Kontrolle (P < 0.05) nach ANOVA t-Test.

### 3.3.1.2 Proliferation der IGR1-Zellen bei Applikation von verschiedenen Ionenkanalblockern

Aufgrund der pharmakologischen Eigenschaften der Ionenkanäle in IGR1-Zellen war es möglich zu untersuchen, ob der Block eines bestimmten Kanals die Proliferation der Zellen beeinflusst. Als Proliferationsparameter wurden DNA-Synthesen (BrdU-Test) und methabolische Aktivitäten der Zellen (MTT-Test) ausgewertet.

Bei einer 48-stündigen Inkubation mit 10 µM Imipramin nahm der Metabolismus der IGR1-Zellen signifikant ab. Bei einer Zugabe von 15 µM Imipramin wurde die DNA-Synthese reduziert. Eine 50%-ige Abnahme der metabolischen Aktivität entspricht einer Konzentration von 34 µM Imipramin; eine 50%-ige Abnahme der DNA-Synthese entspricht einer Konzentration von 44 µM Imipramin (Abb. 20 A). Ab 10 µM Imipramin nahm zusätzlich die Zahl der Zellen in der G0/1 Phase zu, wobei gleichzeitig die Zahl von Zellen in der S- und der G2/M-Phase reduziert wurde (Abb. 20 B). Annexin-V-FITC-Tests zeigten, dass dieser Effekt nicht einer Imipramin-induzierten Apoptose geschuldet



**Abb. 21** Effekte der Chloridkanalblocker Pamonsäure (○) und DIDS (●) auf die Proliferation der IGR1-Zellen (nach Gavrilova-Ruch et al., 2002). IGR1-Zellen wurden mit den in der Abbildung bezeichneten Konzentrationen der Chloridkanalblocker für 48 h behandelt. Die Daten sind als relative Werte in Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Standardfehler wurden anhand von 3-5 unabhängigen Experimenten festgestellt.

war (Gavrilova-Ruch et al., 2002). HEK 293 und CHO-K1 Zellen wurden ebenfalls 48 h mit Imipramin behandelt, um einen generellen zytotoxischen Einfluss dieser Substanz auszuschließen. Die Proliferation dieser Zelllinien wurde erst bei Zugabe von 50 µM Imipramin beeinflusst (Abb. 20 A). Bei Behandlung mit 100 µM Imipramin wurde eine höhere Sterblichkeitsrate in allen getesteten Zelllinien beobachtet.

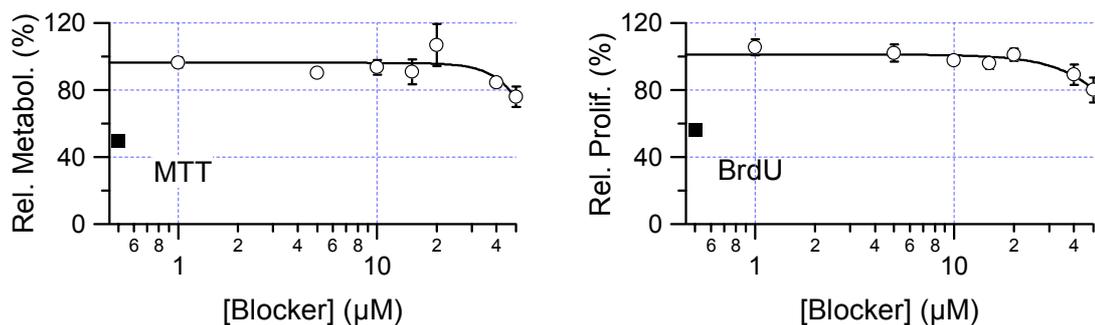
Um den Beitrag bestimmter Ionenkanäle zur Proliferation zu untersuchen, hatten wir IGR1-Zellen mit einem spezifischen Blocker für  $K_{Ca}$ -Kanäle (ChTX) und weiteren spezifischen Blockern für Chloridkanäle (DIDS und Pamonsäure) für 48 h inkubiert. Weder bei 500 nM ChTX (Abb. 20 A) noch bei 500 µM Pamonsäure (Abb. 21) wurde ein Effekt auf die metabolische Aktivität oder die DNA-Synthese beobachtet. DIDS reduzierte die metabolische Aktivität ab 250 µM; DNA-Synthese ab 400 µM (Abb. 21).

Proliferationsversuche mit ChTX, DIDS und Pamonsäure ergaben, dass  $K_{Ca}$ - und Chloridkanäle bei der Proliferation von IGR1-Zellen keine entscheidende Rolle spielen können. Der inhibierende Effekt von Imipramin auf das Wachstum der Melanomzellen lässt sich also vermutlich durch die Blockade der hEAG1-Kanäle erklären.

### 3.3.1.3 Proliferation der IGR39-Zellen bei Applikation von Imipramin und ChTX

Die Ionenkanäle der IGR39-Zellen waren empfindlich gegenüber der Wirksubstanz Imipramin: Für den spannungsabhängigen auswärtsgerichteten Kanal betrug der  $IC_{50}$ -Wert  $6.4 \pm 1.2$  µM; die  $K_{Ca}$ -Kanäle und die Chloridkanäle waren ebenso empfindlich wie die Kanäle in IGR1-Zellen (Tabelle 5).

Die metabolische Aktivität der IGR39-Zellen nahm erst nach 48-stündiger Behandlung mit 40 µM Imipramin signifikant ab. Die DNA-Synthese wurde bei dieser Konzentration ebenfalls signifikant reduziert. Eine 50%-ige Abnahme der metabolischen Aktivität entspricht einer Konzentration von 67 µM Imipramin; eine 50%-ige Abnahme



**Abb. 22** Effekte von Imipramin (○) und ChTX (■) auf die Zellproliferation und den Metabolismus der IGR39-Zellen. Die Zellen wurden mit den in der Abbildung bezeichneten Konzentrationen über 48 h behandelt. Die Standardfehler wurden anhand von 3-5 unabhängigen Experimenten festgestellt, die Hill-Gleichung ist an die Daten angepasst.

der DNA-Synthese entspricht einer Konzentration von 87 µM (Abb. 22). Die 48-stündige Inkubation von IGR39-Zellen mit 500 nM ChTX blieb ohne Effekt. Aufgrund der qualitativen Zusammensetzung der Ionenkanäle in IGR1- und IGR39-Melanomzellen (Tabelle 5) war es möglich, die Rolle der spannungsabhängigen Kaliumkanäle für die Proliferation der Melanomzellen zu untersuchen. Beide Zelllinien wurden mit Imipraminkonzentrationen im Bereich von 1 bis 50 µM 48 Stunden inkubiert. Dabei wurde ein signifikanter Unterschied im Metabolismus der IGR39-Zellen erst bei einer Behandlung mit 40 µM Imipramin beobachtet (Abb. 22).

Tabelle 5 Vergleich von Ionenkanälen und ihre Empfindlichkeit gegenüber Imipramin in IGR1- und IGR39-Zelllinien.

| Ionenkanalgruppe                              | IGR1/ Empfindlichkeit gegenüber Imipramin                  | IGR39/ Empfindlichkeit gegenüber Imipramin                       |
|---|--|--|
| EAG   | IC <sub>50</sub> = 3.4 µM bei +50 mV;<br>15 µM bei -30 mV  | nicht vorhanden  |
| spannungsabhängiger Auwärtsgleichrichter      | nicht vorhanden  | IC <sub>50</sub> = 6.4 µM (von -20 bis +50 mV)                   |
| K <sub>Ca</sub> -Kanäle                       | IC <sub>50</sub> = 13.8 µM (von -30 bis 50 mV)             | IC <sub>50</sub> = 12.6 µM (von -30 bis 20 mV)                   |
| Cl <sub>Vor</sub> -Kanäle                     | IC <sub>50</sub> = 12 µM bei -100 mV,<br>25 µM bei +100 mV | 55% Block mit 50 µM bei -100 mV, 51% Block mit 50 µM bei +100 mV |
| Cs <sup>+</sup> -durchlässiger Kationen-Kanal | 52% Block mit 100 µM bei +100 mV                           | 43% Block mit 100 µM bei +100 mV                                 |

Applikation von 500 nM ChTX reduzierte die metabolische Aktivität um 50%; DNA-Synthese um 44%.

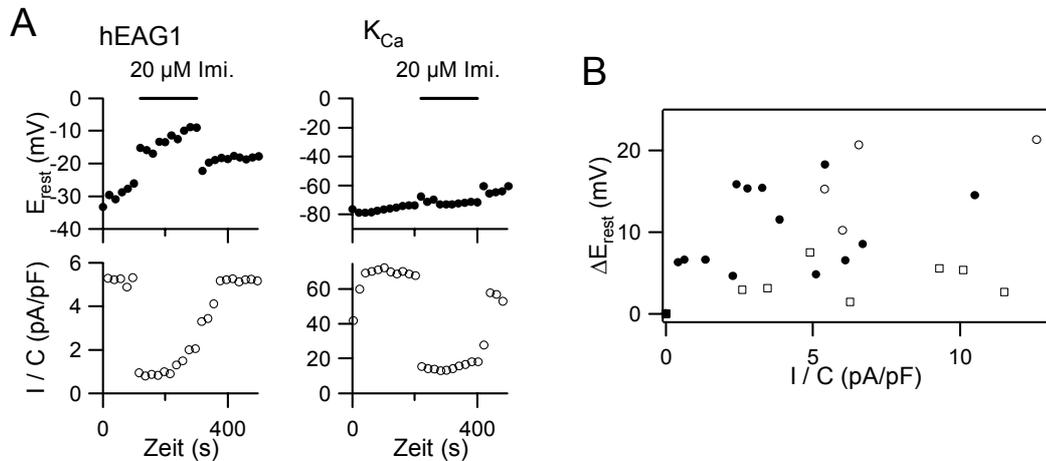
Bei IGR1-Zellen war der Effekt schon ab 10  $\mu$ M Imipramin festzustellen (Abb. 20 A). Das Vorhandensein von Imipramin-empfindlichen spannungsabhängigen Kaliumkanälen und das Vorhandensein von  $K_{Ca}$ - und  $Cl_{Vol}$ -Kanälen mit gleichen pharmakologischen Eigenschaften in diesen Zelllinien lässt vermuten, dass für die Proliferation der Melanomzellen die spannungsabhängigen EAG-Kanäle eine bedeutende Rolle spielen.

### 3.3.2 Kaliumkanäle kontrollieren das Ruhepotential von IGR1-Zellen

Das Ruhepotential der IGR1-Zellen wurde in der „Current-Clamp“-Konfiguration mit EGTA in der Pipette gemessen. Unter diesen Bedingungen waren hEAG1-Kanäle aktiv,  $K_{Ca}$ -Kanäle dagegen inaktiv. Das Potential der unsynchronisierten IGR1-Zellen betrug  $-28.4 \pm 1.4$  mV (n=45). Die mittlere Stromdichte von hEAG1 lag bei  $5.9 \pm 0.1$  pA/pF bei +60 mV (n=68). Derart unsynchronisierte Zellen zeigten folgende Zellzyklusverteilung: G0/1 48%, S 40%, G2/M 12%.

Um die mögliche Regulation von hEAG1-Strom und Membranpotential im Zellzyklus zu untersuchen, wurden die Zellen mit 1  $\mu$ M Methotrexat synchronisiert. Methotrexat inhibiert die DNA-Synthese und synchronisiert die Zellen in der G1/S-Phase (Vogel et al., 1978; Sen et al., 1990; Richardson et al., 1994). Die externe Applikation von Methotrexat hatte keinen Einfluss auf hEAG1-,  $K_{Ca}$ - oder Chloridkanäle. Nach 24-stündiger Behandlung mit 1  $\mu$ M Methotrexat sind 55% der Zellen in der G0/1-, 44% in der S- und 1% in der G2/M-Phase verblieben. Das Ruhemembranpotential betrug  $-26.2 \pm 2.3$  mV (n=37), die mittlere hEAG1-Stromdichte lag bei  $3.5 \pm 0.1$  pA/pF (n=50). 6 h nachdem Methotrexat ausgewaschen wurde, erhöhte sich der Prozentsatz der Zellen in der S- und der G2/M-Phase auf 85%. Beim Eintritt in die G2/M-Phase wurde eine Erhöhung des Membranpotentials auf  $-21.2 \pm 3.2$  mV (n=46) und eine Abnahme der hEAG1-Stromdichte auf  $1.7 \pm 0.1$  pA/pF (n=79) beobachtet. Diese Daten zeigen, dass hEAG1 zumeist in der G1-Phase exprimiert. hEAG1-Strom trägt zum Membranpotential von  $-28$  mV bei und die Stromabnahme depolarisiert beim G1/S-Übergang das Ruhepotential.

Weil Imipramin den hEAG1-Strom blockt, könnte er auch die IGR1-Zellen, die hEAG1 exprimieren, depolarisieren. Wir gaben zur Überprüfung dieser Hypothese Imipramin während der Ruhepotentialmessungen zu. Dabei schalteten wir zwischenzeitlich zur „Voltage-Clamp“-Konfiguration, um die hEAG1-Stromdichte zu

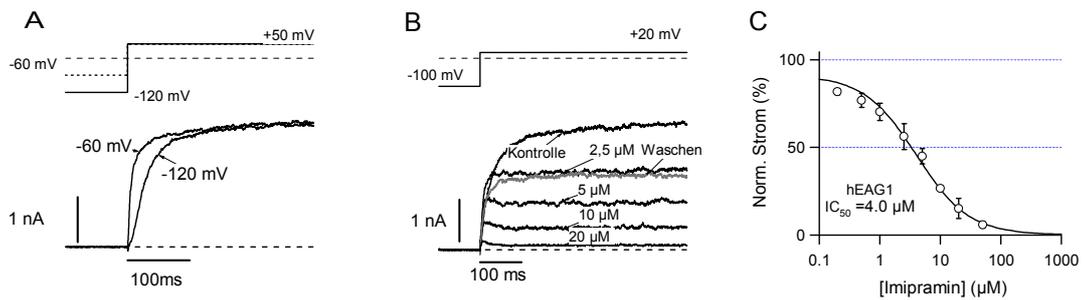


**Abb. 23** Ruhepotential der IGR1-Zellen (nach Gavrilova-Ruch et al., 2002).

(A) In IGR1 Zellen wurde der Effekt von 20  $\mu$ M Imipramin sowohl auf das Ruhepotential der Zellmembran ( $E_{rest}$ ) als auch auf eine Stromdichte ( $I/C$ ) von +50 mV gemessen. Links sind die Messungen mit der Pipettenlösung ohne  $Ca^{2+}$  dargestellt: Unter solchen Bedingungen waren hEAG1-Kanäle aktiv. Rechts sind die Daten der Experimente mit 800 nM  $Ca^{2+}$  in der Pipettenlösung dargestellt: Die  $K_{Ca}$ -Kanäle wurden aktiviert. (B) Verschiebung des Ruhepotentials bei Applikationen von 10 ( $\square$ ), 20 ( $\bullet$ ) und 50  $\mu$ M ( $\circ$ ) Imipramin als Funktion der ursprünglichen hEAG1-Stromdichte bei Depolarisation auf +50 mV. Die Messungen wurden mit der Pipettenlösung ohne  $Ca^{2+}$  durchgeführt.

bestimmen. Abb. 23 A stellt solche Experimente dar. Die Zugabe von 20  $\mu$ M Imipramin inhibierte den hEAG1-Strom und depolarisierte die Zelle ( $n=14$ ). In IGR1-Zellen, die keinen hEAG1-Strom hatten, wurde ein Effekt von Imipramin auf das Membranpotential nicht beobachtet ( $n=6$ ).

Das gleiche Experiment wurde mit 800 nM Calcium in der Pipette wiederholt. Dabei wurde der hEAG1-Strom geblockt und die  $K_{Ca}$ - Kanäle aktiviert. Abb. 23 A zeigt, dass das Membranpotential durch 20  $\mu$ M Imipramin nicht beeinflusst wurde. Die Verschiebung des Membranpotentials ( $\Delta E_{rest}$ ) gegen die hEAG1-Stromdichte bei einer Applikation von 10, 20 und 50  $\mu$ M Imipramin ist in Abb. 23 B dargestellt. Eine Korrelation zwischen  $\Delta E_{rest}$  und  $I/C$  ist zu beobachten, wenn der hEAG1-Strom effektiv geblockt wird (bei 10  $\mu$ M Imipramin).



**Abb. 24** Empfindlichkeit der hEAG1-Kanäle in transfizierten CHO-Zellen gegenüber Imipramin. (A) [Lösung 1<sub>ex</sub>/Lösung 4<sub>in</sub>] Das Vorhandensein von hEAG1-Kanälen in transfizierten CHO-Zellen ist durch die Abhängigkeit der Aktivierungskinetik vom jeweiligen Haltepotential (Cole-Moore Effekt) leicht festzustellen. Die Zellen wurden nach einem jeweils für 5 s angelegten Haltepotential von -120 bzw. -60 mV auf eine Spannung von +50 mV depolarisiert. (B) Block von hEAG1-Strom in transfizierten CHO-Zellen bei verschiedenen Imipraminkonzentrationen. Die Amplitude des hEAG1-Stromes hat sich im Laufe des Experimentes reduziert (sog. „Run-down“-Effekt). (C) Dosis-Wirkungs-Kurve für den Block des hEAG1-Kanals in transfizierten CHO-Zellen mit Imipramin bei +20 mV. Der Strom wurde am Ende des Depolarisationspulses gemessen und auf den Kontrollwert normiert.

### 3.4 Mechanismus des Imipramin-Blockes der hEAG-Kanäle

#### 3.4.1 Biophysikalische Eigenschaften des hEAG1-Kanal-Blockes durch Imipramin

Um die Empfindlichkeit von hEAG1 auf das trizyklische Antidepressivum Imipramin zu untersuchen, wurden CHO-Zellen mit hEAG1-Kanälen transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden in der Ganzzell-Konfiguration mit extrazellulärer Lösung 1 und intrazellulärer Lösung 4 gemessen. Der in Abb. 24 A dargestellte auswärtsgerichtete Kaliumstrom zeigte bei einer Depolarisation auf +20 mV die für den hEAG1-Kanal typische Abhängigkeit vom Haltepotential (sog. Cole-Moore Effekt) (Schönherr et al., 2002).

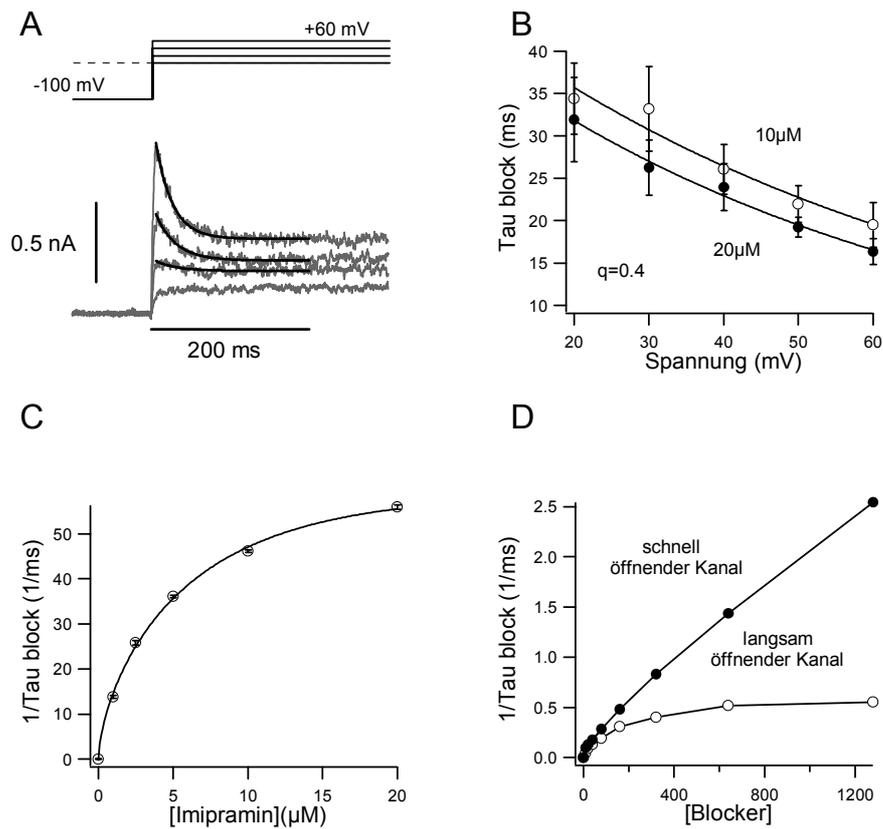
In Abb. 24 B ist der Block des hEAG1-Kanals bei einer Depolarisation auf +20 mV mit zunehmenden Imipraminkonzentrationen dargestellt. Die Anpassung der Dosis-Wirkungs-Kurve an die Hill-Gleichung ergab einen IC<sub>50</sub>-Wert von 4.0±0.5 μM bei einem Hill-Koeffizient von 0.82±0.09 (Abb. 24 C). Die in Kapitel 3.1.1 dargestellten Ergebnisse weisen auf eine Spannungsabhängigkeit des Blockes vom hEAG1-Kanal hin (Abb. 10 C, D).

Abb. 25 A stellt die hEAG1-Stromspuren bei Zugabe von 10 μM Imipramin bei Testspannungen von 0, +20, +40 und +60 mV dar. Die Kinetik der Stromabnahme wurde

aus den Stromspuren bei verschiedenen Test-Pulsen mit einer monoexponentiellen Gleichung angepasst. In Abb. 25 B sind daraus resultierende  $\tau_{\text{block}}$ -Werte bei Zugabe von 10 und 20  $\mu\text{M}$  Imipramin als Funktion der Spannung dargestellt. Die Kurven wurden der Gleichung (2) angepasst. Ausgehend von einer positiven Ladung  $z=+1$  für Imipramin in der Messlösung (pH 7.4), wurde  $q$  als effektiver Ladungstransfer vom Blocker-Molekül bestimmt. Bei einer Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Imipramin betrug der  $q$ -Wert 0.4. Das gleiche Ergebnis wurde bei der Applikation von 20  $\mu\text{M}$  Imipramin erzielt. Die  $\tau_0$ -Werte ( $\tau_{\text{block}}$  bei einem Referenzpotential von 0 mV) wurden auf 44 ms bei Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Imipramin und auf 48 ms bei Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  extrapoliert.

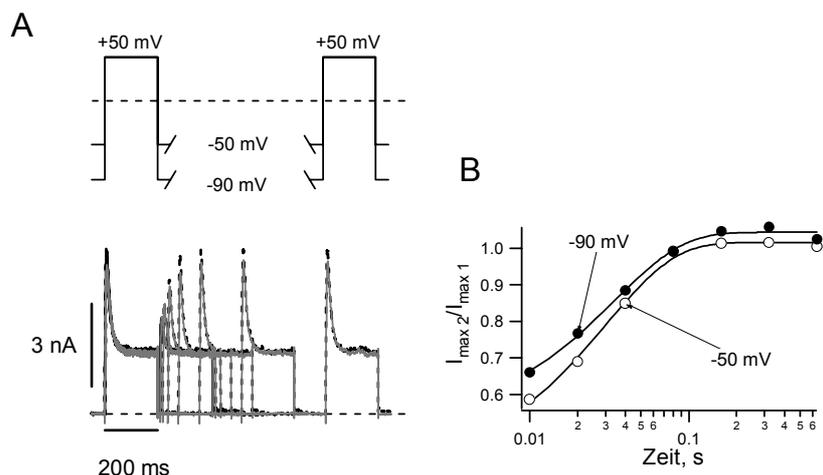
Die in Abb. 25 A dargestellten Stromspuren zeigen, dass zu Beginn des Öffnens der Kanäle (0 mV) der Block noch nicht sein Maximum erreicht hat: Der Block wird um so größer, je mehr Kanäle sich öffnen. Dies weist auf den sog. „Offen-Kanal-Block“-Mechanismus hin (Aidley und Stanfield, 1996). Für den „Offen-Kanal-Block“ ist eine positive lineare Korrelation zwischen der Block-Geschwindigkeit ( $1/\tau_{\text{block}}$ ) und der applizierten Imipraminkonzentration postuliert (Valenzuela et al., 1995). Abb. 25 C stellt eine solche Korrelation für den hEAG1-Strom in transfizierten CHO-Zellen dar. Die  $\tau_{\text{block}}$ -Werte wurden aus der Anpassung der experimentellen Stromspuren bei +50 mV an eine monoexponentielle Gleichung bestimmt. Der Wert  $1/\tau_{\text{block}}$  wurde als Funktion der applizierten Imipraminkonzentrationen dargestellt. Die Korrelation ist positiv, hat aber exponentiellen Charakter. Um dieses Ergebnis zu bewerten, haben wir mit Hilfe des PulseSim-Programmes (HEKA Elektronik) eine Simulation durchgeführt. Es wurde ein in Abb. 7 dargestelltes Aktivierungsmodell verwendet. Zusätzlich wurde ein Übergang zwischen geöffneten Zustand O und einen geblockten Zustand B eingeführt.

Abb. 25 D zeigt, dass bei sich „schnell“ öffnenden Kanälen (die Übergangsrate vom geschlossenen zum geöffneten Zustand  $\alpha$  beträgt  $10^3/\text{s}$ ) eine lineare Korrelation zwischen  $1/\tau_{\text{block}}$  und der Blocker-Konzentration besteht. Bei einer langsameren Übergangsrate zum geöffneten Zustand ( $\alpha=10^2/\text{s}$ ) stellt sich die Korrelation zwischen  $1/\tau_{\text{block}}$  und der Blocker-Konzentration exponentiell dar.



**Abb. 25** Die Blockgeschwindigkeit ( $\tau_{\text{block}}$ ) des hEAG1-Kanals in transfizierten CHO-Zellen hängt von der Test-Puls-Spannung und der Imipraminkonzentration ab.

(A) [Lösung  $1_{\text{ex}}$ /Lösung  $4_{\text{in}}$ ] Stromspuren bei Zugabe von  $10 \mu\text{M}$  Imipramin bei Test-Spannungen von 0, +20, +40 und +60 mV. Die monoexponentielle Gleichung ist an die Daten angepasst. Daraus wird  $\tau_{\text{block}}$  als Koeffizient der monoexponentiellen Gleichung bestimmt. (B)  $\tau_{\text{block}}$  bei Applikation von 10 und  $20 \mu\text{M}$  Imipramin als Funktion der Spannung ( $n=6$ ). Die Gleichung (2) ist an die Daten angepasst, daraus wird der Wert  $q$  für den effektiven Ladungstransfer vom Blocker-Molekül bestimmt. (C)  $1/\tau_{\text{block}}$  als Funktion der zugegebenen Imipraminkonzentration.  $\tau_{\text{block}}$  ist aus den Stromspuren bei einer Test-Spannung +50 mV, wie unter (A) beschrieben, bestimmt worden ( $n=5-7$ ). Eine monoexponentielle Gleichung ist an die resultierenden Daten angepasst. (D)  $1/\tau_{\text{block}}$  als Funktion der Blockerkonzentration. Die Simulation wurde mit Hilfe des Zustandsmodelles für den EAG-Kanal durchgeführt. Zwei verschiedene Übergangsraten ( $\alpha$ ) zum geöffneten Zustand wurden eingegeben. Die berechneten Daten sind für  $\alpha=10^2/\text{s}$  auf die lineare Gleichung, für  $\alpha=10^3/\text{s}$  auf die monoexponentielle Gleichung angepasst.

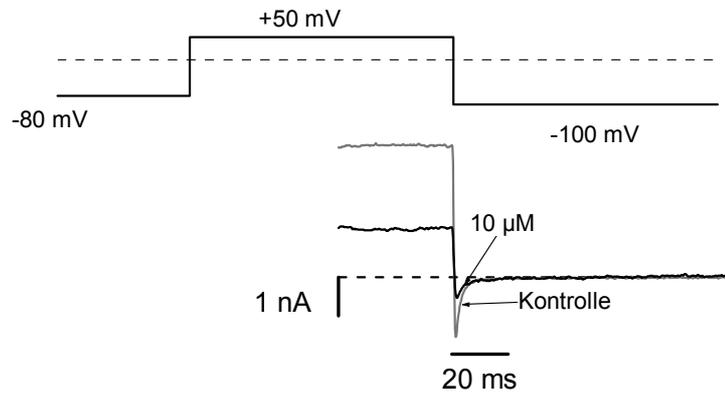


**Abb. 26** Die Rückkehrkinetik aus dem blockierten Zustand des hEAG1-Kanals bei Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  Imipramin ist unabhängig vom Haltepotential.

(A) [Lösung  $1_{\text{ex}}$ /Lösung  $4_{\text{in}}$ ] Stromspuren beim Anlegen von Doppelpulsen (Haltepotentiale -50 und -90 mV). Die Zeitdauer zwischen dem 1. und dem 2. Puls variierte von 10 bis 640 ms. (B) Dargestellt ist das Verhältnis der maximalen Stromamplitude bei dem 1. Puls und dem 2. Puls zur Zeitdauer zwischen den Pulsen. Die monoexponentiellen Gleichungen sind an die Daten aus den Messungen bei Haltepotentialen von -50 mV ( $\circ$ ) und -90 mV ( $\bullet$ ) angepasst.

Der hEAG1-Kanal gehört zu den sich „langsam“ öffnenden Kanälen. Alle Experimente mit Imipramin wurden mit extrazellulärer Lösung 1 ohne Magnesium-Zugabe durchgeführt. Die Übergangszeit zum geöffneten Zustand unter solchen Bedingungen betrug  $26.2 \pm 6.1$  ms ( $n=8$ ). Als Zeitkonstante wurde hier der  $\tau_{\text{slow}}$ -Wert angenommen. Dieser wurde wie in Abb. 9 C berechnet. Die experimentellen Daten (Abb. 25 C) entsprechen danach dem Modell eines „Offen-Kanal-Block“ für einen sich „langsam“ öffnenden Kanal. Die exponentielle Korrelation in Abb. 25 C wird durch die Überlagerung von Werten für die Aktivierungszeit des Kanals und die Block-Geschwindigkeit bei hohen Depolarisationsspannungen verursacht.

Um herauszufinden, mit welcher Geschwindigkeit Imipramin-Moleküle den Kanal verlassen, applizierten wir in Anwesenheit von 20  $\mu\text{M}$  Imipramin die Doppelpulse von einem Haltepotential von -50 mV auf die Testspannung von +50 mV mit verschiedenen Zeitabständen (Abb. 26 A). Bei einem Zeitabstand von 10 ms war die maximale Stromamplitude bei dem 1. Test-Puls deutlich größer als die des 2. Test-Pulses. Bei einem Zeitabstand von 120 ms war kein Unterschied in der Stromamplitude zwischen den zwei Pulsen zu beobachten.

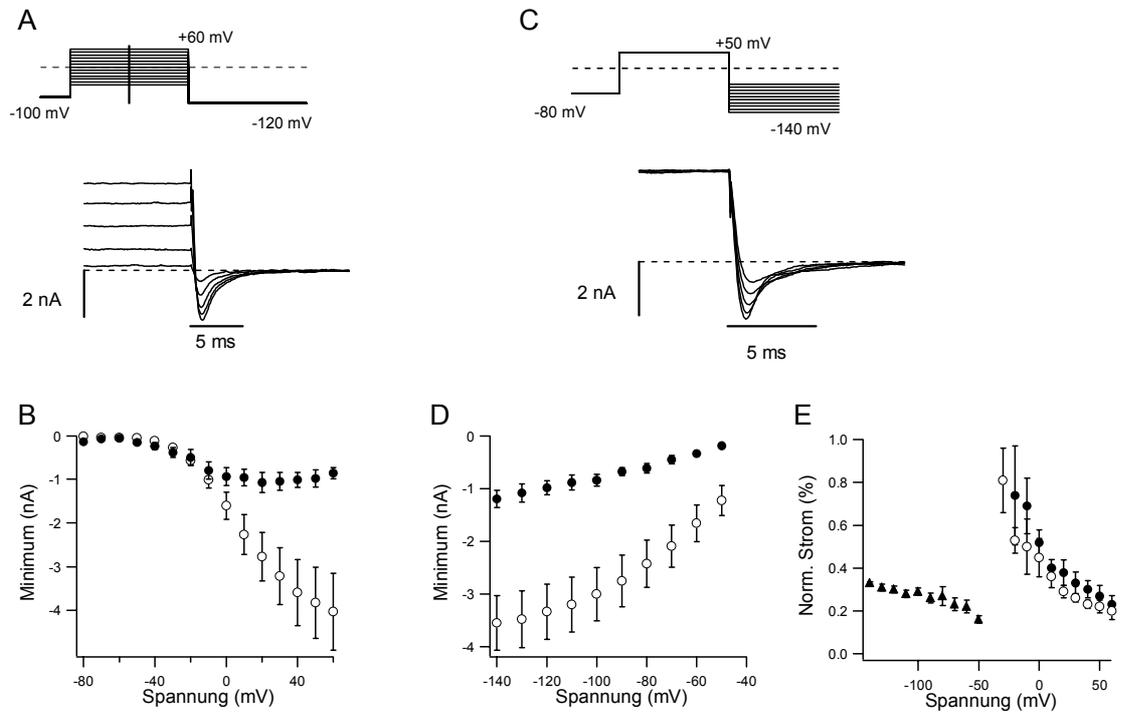


**Abb. 27** Block von hEAG1-„tail“-Strömen in transfizierten CHO-Zellen bei Zugabe von Imipramin.

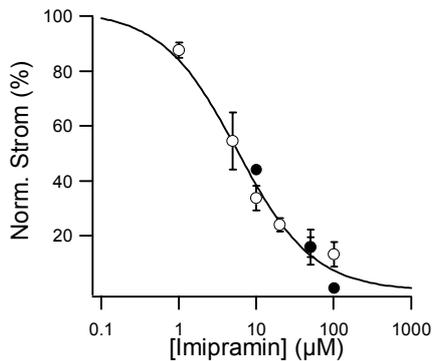
[Lösung 3<sub>ex</sub>/Lösung 4<sub>in</sub>] Bei Applikation von 10 µM Imipramin wird die Amplitude des „tail“-Stroms reduziert und die „Schließ-Phase“ verlangsamt. Die Zelle wurde von einem Membranpotential von -100 mV auf eine Spannung von +50 mV für 100 ms depolarisiert und anschließend für 100 ms bei -100 mV repolarisiert.

Die Anpassung der exponentiellen Gleichung an die Rückkehrkinetik aus blockiertem Zustand (Abb. 26 B) ergab eine Zeitkonstante von  $30.9 \pm 2.3$  ms ( $n=4$ ). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitkonstanten bei der Applikation von 5 µM ( $32.1 \pm 2.3$ ,  $n=6$ ) und 10 µM Imipramin ( $32.8 \pm 4.8$ ,  $n=4$ ) festgestellt. Dasselbe Pulsprotokoll wurde bei einem Haltepotential von -90 mV wiederholt. Die Rückkehrzeit hat sich jedoch nicht geändert. Bei Applikation von 20 µM Imipramin wurde eine Zeitkonstante von  $29.5 \pm 2.9$  ms ( $n=4$ ) bestimmt, bei Applikation von 5 µM  $35.8 \pm 4.6$  ms ( $n=6$ ), bei Applikation von 10 µM  $35.7 \pm 3.6$  ms ( $n=4$ ). Die erhaltenen Daten zeigen, dass die Dissoziationsgeschwindigkeit der Imipramin-Moleküle im hEAG1-Kanal unabhängig von der Substanzkonzentration und dem Haltepotential ist.

Die bei Repolarisation entstehenden Ströme (sog. „tail“-Ströme) wurden in der extrazellulären Lösung mit erhöhter K<sup>+</sup>-Konzentration (Lösung 3) gemessen. Bei Applikation von 10 µM Imipramin wurde die Amplitude des „tail“-Stroms auf  $27.2 \pm 5.3\%$  ( $n=5$ ) reduziert (Abb. 27). Die Zeit für das Schließen des Kanals verlängerte sich bei Zugabe von Imipramin. Die Anpassung der „Schließ“-Phase des „tail“-Stroms an eine exponentielle Gleichung ergab eine Zeitkonstante von  $1.51 \pm 0.07$  ms ( $n=24$ ) in der Kontrolle,  $1.71 \pm 0.13$  ms ( $n=17$ ) bei der Applikation von 1 µM Imipramin und  $2.35 \pm 0.16$  ms ( $n=5$ ) bei der Applikation von 10 µM Imipramin. Diese Mittelwerte sind signifikant unterschiedlich ( $P < 0.05$ ).



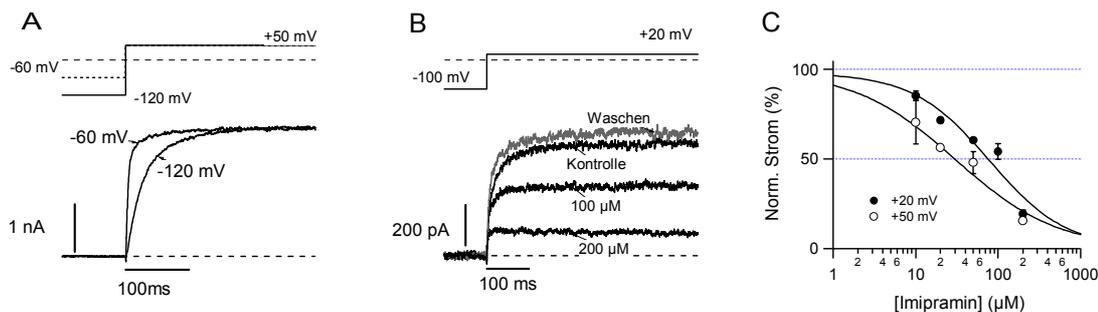
**Abb. 28** Block von hEAG1-„tail“-Strömen in transfizierten CHO-Zellen bei Zugabe von Imipramin. (A) [Lösung  $3_{ex}$ /Lösung  $4_{in}$ ] „tail“-Ströme bei verschiedenen Depolarisationspulsen. Die Zelle wurde ausgehend von einem Membranpotential von  $-100$  mV für  $1000$  ms depolarisiert und anschließend für  $100$  ms auf eine Spannung von  $-120$  mV repolarisiert. (B) Die Peak-Amplitude des „tail“-Stroms aus Messungen wie unter (A) beschrieben in der Kontrolle ( $\circ$ ) und bei Applikation von  $10$   $\mu$ M Imipramin ( $\bullet$ ). (C) „tail“-Ströme bei verschiedenen Repolarisationspulsen. Die Zelle wurde von einem Membranpotential von  $-80$  mV auf eine Spannung von  $+50$  mV für  $100$  ms depolarisiert und anschließend für  $100$  ms repolarisiert. (D) Die Peak-Amplitude des „tail“-Stroms aus Messungen wie (C) in der Kontrolle ( $\circ$ ) und bei Applikation von  $10$   $\mu$ M Imipramin ( $\bullet$ ). (E) Die „tail“-Ströme werden bei Zugabe von  $10$   $\mu$ M Imipramin ( $\bullet$ ) in gleichen Verhältnissen wie die bei der Depolarisation entstehenden Ströme ( $\circ$ ) geblockt. Die Daten wurden aus Messungen wie unter (A) beschrieben erzielt. Die „tail“-Ströme bei verschiedenen Repolarisationspulsen bei  $10$   $\mu$ M Imipramin sind nur leicht von der Spannung abhängig ( $\blacktriangle$ ). Die Daten wurden aus Messungen wie unter (C) beschrieben erzielt.



**Abb. 29** Dosis-Wirkungs-Kurven bei +50 mV für den Block der hEAG1-Ströme in *Xenopus*-Oozyten in Inside-Out (○) und Outside-Out (●) Konfigurationen. [Lösung 14<sub>ex</sub>/Lösung 15<sub>in</sub>] Es wurde jeweils ein Puls-Protokoll wie bei den Versuchen zu Abb. 24 erstellt. IC<sub>50</sub>-Werte von 5.7±1.0 µM und Hill-Koeffizienten von 0.89±0.11 wurden erzielt.

Imipramin hat eine Säurekonstante (pK<sub>a</sub>) von 9.5 und ist in Wasserlösungen bei pH 7.0 positiv geladen (Mathie et al., 1998). Die Ladung des Imipramin-Moleküls in dem transmembranalen elektrischen Feld des Kanals kann die Spannungsabhängigkeit des Blocks verursachen. Um zu untersuchen, ob der spannungsabhängige Charakter des Blocks vom spannungsabhängigen Schaltverhalten des Kanals oder von der Wechselwirkung der geladenen Imipramin-Moleküle mit dem transmembranen elektrischen Feld verursacht wird, hatten wir die Amplitude des „tail“-Stromes bei Applikation von 10 µM Imipramin in 5 Zellen unter variablen Depolarisationspulsen gemessen (Abb. 28 A, B). Die „tail“-Ströme wurden jedoch zum gleichen Prozentsatz wie die auswärtsgerichteten Ströme am Ende der Depolarisationsphase geblockt (Abb. 28 E). Bei variablen Hyperpolarisationspulsen war die Abnahme der Amplitude des „tail“-Stromes bei Applikation von 10 µM Imipramin in 5 Zellen von der Spannung nahezu unabhängig (Abb. 28 C, D, E). Dies weist darauf hin, dass nicht die positive Ladung der Imipramin-Moleküle, sondern das spannungsabhängige Schaltverhalten des Kanals einen Einfluss auf den spannungsabhängigen Charakter des Blockes hat.

Um zu prüfen, ob Imipramin-Moleküle den Kanal von der Außen- oder Innenseite der Membran blocken, wurde hEAG1 in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. Abb. 29 zeigt den Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurve bei der Imipramin-Applikation auf die Innenseite der Membran („Inside-Out“ Konfiguration) zu der auf die Außenseite der Membran („Outside-Out“ Konfiguration). Der Block war nahezu unabhängig davon, ob von der Außenseite oder von der Innenseite der Membran appliziert wurde.



**Abb. 30** Empfindlichkeit von hEAG2-Kanälen in transfizierten CHO-Zellen gegenüber Imipramin. (A) [Lösung  $1_{ex}$ /Lösung  $4_{in}$ ] Das Vorhandensein von hEAG2-Kanälen in transfizierten CHO-Zellen ist durch die Abhängigkeit der Aktivierungskinetik vom jeweiligen Haltepotential (Cole-Moore Effekt) leicht festzustellen. Die Zellen wurden nach einem jeweils für 5 s angelegten Haltepotential von  $-120$  bzw.  $-60$  mV auf eine Spannung von  $+50$  mV depolarisiert. (B) Block von hEAG2-Strom in transfizierten CHO-Zellen bei verschiedenen Imipraminkonzentrationen. (C) Dosis-Wirkungs-Kurven für hEAG2-Kanäle bei verschiedenen Test-Spannungen. Bei  $+20$  mV ( $\bullet$ ) wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von  $78.6 \pm 24.5 \mu\text{M}$  und ein Hill-Koeffizient von  $0.94 \pm 0.28$  erzielt, bei  $+50$  mV ( $\circ$ ) betrug der  $IC_{50}$ -Wert  $33.1 \pm 8.0 \mu\text{M}$ , der Hill-Koeffizient  $0.78 \pm 0.15$ .

### 3.4.2 Block des hEAG2-Kanals durch Imipramin

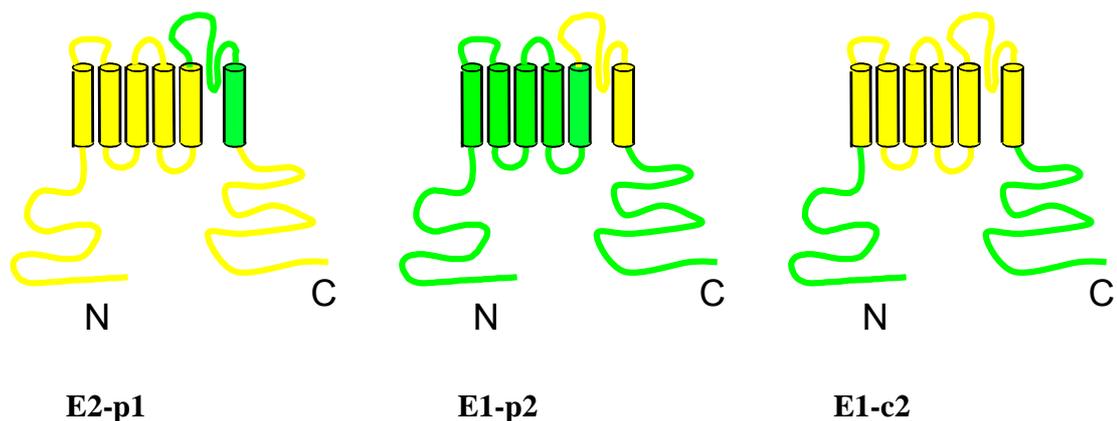
Im humanen Genom gibt es zwei Mitglieder der EAG-Subfamilie (Schönherr et al., 2002; Ju und Wray, 2002). Der hEAG2-Kanal unterscheidet sich hinsichtlich der Empfindlichkeit auf Blocker-Substanzen deutlich vom hEAG1-Kanal.

Um zu prüfen, ob sich die Empfindlichkeit des hEAG2-Kanal auf Imipramin ebenfalls von der des hEAG1-Kanals unterscheidet, wurde der hEAG2 in CHO-Zellen exprimiert. Der in Abb. 30 A dargestellte Kaliumstrom war deutlich von den Vorpulsspannungen abhängig (Schönherr et al., 2002).

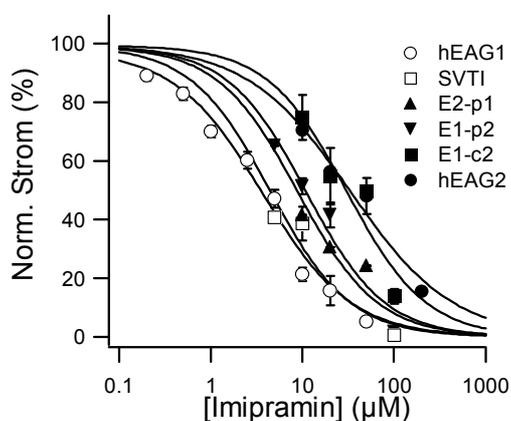
In Abb. 30 B ist der Block des hEAG2-Kanals bei einer Depolarisation auf  $+20$  mit zunehmenden Imipraminkonzentrationen dargestellt. Die Anpassung von der Dosis-Wirkungs-Kurve an die Hill-Gleichung ergab einen  $IC_{50}$ -Wert von  $78.6 \pm 24.5 \mu\text{M}$  bei einem Hill-Koeffizient von  $0.94 \pm 0.28$  (Abb. 30 C).

Die in Abb. 30 C dargestellten Daten weisen auf die Spannungsabhängigkeit des Blocks hin. Der Vergleich von  $IC_{50}$ -Werten für hEAG1- und hEAG2-Kanäle zeigt, dass bei einer Spannung von  $+50$  mV die Empfindlichkeit des hEAG1-Stromes gegenüber Imipramin um den Faktor 10 höher als die Empfindlichkeit des hEAG2-Stromes ist (Tabelle 6).

Um den molekularen Mechanismus dieses Unterschiedes zu untersuchen, wurden verschiedene Chimären verwendet (Abb. 31):



**Abb. 31** Schematische Darstellung von Chimeren E2-p1 (hEAG2-Kanal mit Porenbereich und S6-Segment von hEAG1), E1-p2 (hEAG1-Kanal mit Porenbereich und S6-Segment von hEAG2), E2-c2 (hEAG1-Kanal mit Porenbereich und S1-S6 Segmenten von hEAG2).



**Abb. 32** Dosis-Wirkungs-Kurven bei +50 mV für den Block der Ströme in den mit hEAG1- (○), Mutant SVTI- (□), Chimäre E2-p1- (▲), Chimäre E1-p2- (▼), Chimäre E1-c2- (■) und hEAG2-DNA (●) transfizierten CHO-Zellen bei Zugabe von Imipramin. Der Strom wurde am Ende des Depolarisationspulses gemessen (s. z.B. Versuche zu Abb. 24) und auf den Kontrollwert normiert.

Tabelle 6 Werte für  $IC_{50}$  und Hill-Koeffizienten bei der Anpassung der Dosis-Wirkungs-Kurven an die Hill-Gleichung.

|   | hEAG1           | SVTI            | E2-p1           | E1-c2           | E1-p2           | hEAG2           |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| $IC_{50}$ -Wert,<br>$\mu\text{M}$ ,<br>+50 mV | $3.6 \pm 0.6$   | $4.5 \pm 1.2$   | $11.0 \pm 2.7$  | $30.3 \pm 11.4$ | $8.8 \pm 2.2$   | $33.1 \pm 8.5$  |
| Hill-<br>Koeffizient,<br>+50 mV               | $0.94 \pm 0.11$ | $0.89 \pm 0.31$ | $1.02 \pm 0.27$ | $1.01 \pm 0.37$ | $0.84 \pm 0.34$ | $0.78 \pm 0.15$ |

Eine Doppelmutante vom hEAG1-Kanal (S436T•V437I) wurde auch getestet. Gessner und Kollegen zeigten, dass die Empfindlichkeit des hEAG1-Kanals gegenüber dem Blocker Clofilium und seinem Analog LY 97241 wesentlich höher als die

Empfindlichkeit von hEAG2 ist (Gessner et al., 2004). Die Empfindlichkeit der hEAG1-Mutante S436T•V437I war jedoch mit der des hEAG2-Kanals vergleichbar.

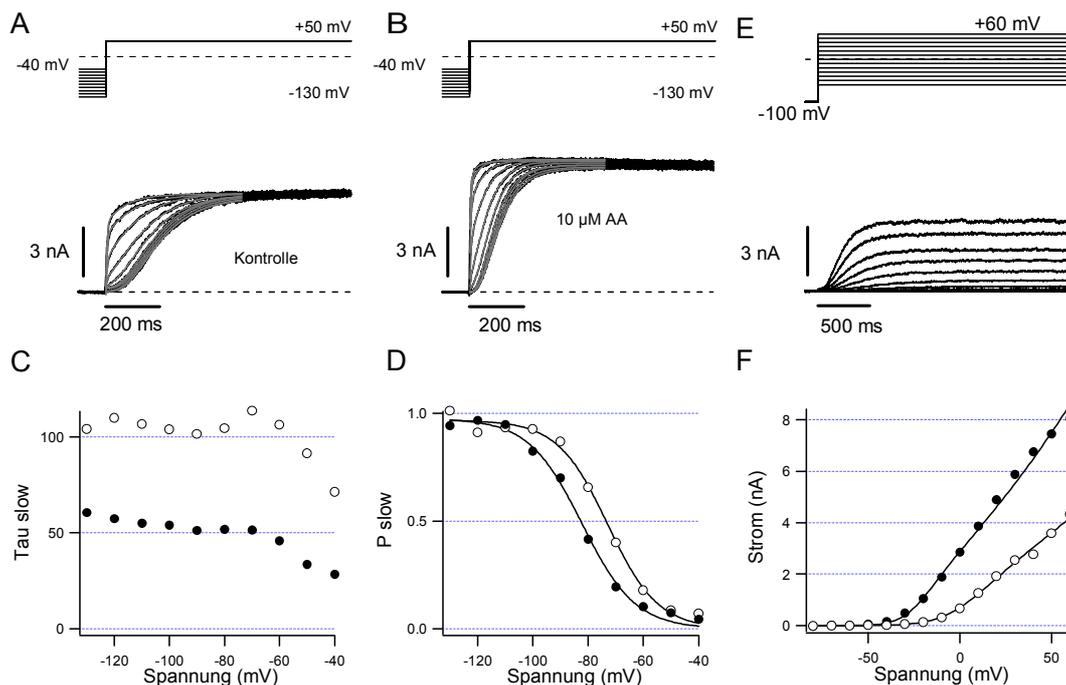
Die Empfindlichkeit von Chimären und Mutanten gegenüber Imipramin ist in Abb. 32 und in der Tabelle 6 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die S436T•V437I-Mutante eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber Imipramin hat wie ein hEAG1-Wildtyp. Die Empfindlichkeiten der Chimären E2-p1 und E1-p2 liegen zwischen den Empfindlichkeiten vom hEAG1-WT und vom hEAG2-WT. Die Empfindlichkeit von Chimäre E1-c2 gegenüber Imipramin war mit der Empfindlichkeit von hEAG2 vergleichbar.

Die ähnliche Empfindlichkeit gegenüber Imipramin bei der S436T•V437I-Mutante und dem hEAG1-WT lässt vermuten, dass Imipramin-Moleküle eine andere Bindestelle als Clofilium, Quinidin oder TBA Moleküle besitzen (Gessner et al., 2004). Die geringere Empfindlichkeit der Chimären E1-p2 und E2-p1 gegenüber Imipramin kann sowohl auf den ausgetauschten Porenbereich mit dem S6-Segment als auch auf das veränderte Schaltenverhalten der Chimären (Gessner et al., 2004) zurückgeführt werden: Die Aktivierung der Chimäre E2-p1 ist im Vergleich mit hEAG2-WT in Richtung der positiveren Spannungen stark verschoben, die Aktivierung der Chimäre E1-p2 ist im Vergleich mit hEAG1-WT in Richtung der negativeren Spannungen verschoben. Die relativ niedrige Empfindlichkeit der Chimäre E1-c2 in Vergleich zum hEAG1-WT spricht dafür, dass die Imipramin-Bindestelle im Bereich zwischen den S1- und S6-Segmenten liegt.

### 3.5 Wechselwirkung von EAG-Kaliumkanälen mit Fettsäuren

#### 3.5.1 Ungesättigte Fettsäuren aktivieren Kaliumkanäle der EAG-Subfamilie

Eine direkte Wechselwirkung mit Fettsäuren ist für viele Ionenkanäle bekannt (Meves, 1994). Die molekularen Mechanismen sowie die physiologische Bedeutung dieser Wechselwirkungen sind noch zu klären. Eine der vielen physiologischen Funktionen der Fettsäuren ist deren neuroprotektiver Effekt: Die Inhibierung der  $\text{Na}^+$ -Ströme und die gleichzeitige Aktivierung der nicht-inaktivierenden Kaliumkanäle durch Fettsäuren schützt vermutlich die Neuronen vor erhöhter Erregbarkeit (Piomelli, 1998; Colbert and Pan, 1999; Lauritzen et al., 2000). Die Wechselwirkung der in dem neuronalen Gewebe vorhandenen Kaliumkanäle der EAG-Familie mit Fettsäuren soll in diesem Zusammenhang untersucht werden.



**Abb. 33** Aktivierung von hEAG1-Kanälen in transfizierten CHO-Zellen durch AA.

(A) [Lösung  $2_{\text{ex}}$  mit  $2 \text{ mM Mg}^{2+}$ /Lösung  $4_{\text{in}}$ ] Die Zellen wurden nach einem jeweils für 5 s angelegten Haltepotential von  $-130$  bis  $-40$  mV auf eine Spannung von  $+50$  mV depolarisiert. Die Gleichung (7) ist an die Strom-Spuren angepasst. Die Werte für  $\tau_{\text{slow}}$  und  $P_{\text{slow}}$  sind daraus abgeleitet. (B) Applikation von  $10 \mu\text{M AA}$  beschleunigt die Aktivierungskinetik des Kanals. (C)  $\tau_{\text{slow}}$  in der Kontrolle ( $\circ$ ) und nach der Applikation von  $10 \mu\text{M AA}$  ( $\bullet$ ). (D)  $P_{\text{slow}}$  in der Kontrolle ( $\circ$ ) und nach der Applikation von  $10 \mu\text{M AA}$  ( $\bullet$ ). Die Gleichung (8) ist an die  $P_{\text{slow}}$ -Kurve angepasst. (E) Die Strom-Spannungs-Kennlinien sind von den gemessenen Strom-Spuren (E) abgeleitet. In der Kontrolle ( $\circ$ ) wird der Strom ab  $-10$  mV registriert. Die Applikation von  $10 \mu\text{M AA}$  verschiebt die IV-Kurve nach links: Der hEAG1-Strom wird schon ab  $-30$  mV registriert ( $\bullet$ ). Die Gleichung (5) ist an die IV-Kurven angepasst.

Ein weiterer Aspekt ist die Wirkung von verschiedenen Fettsäuren auf Krebszellen. Die Proliferation von verschiedenen Tumorzellen wird von ungesättigten Omega-6-Fettsäuren (z. B. EPA) inhibiert, wobei ungesättigte Omega-3-Fettsäuren (z.B. Linolsäure) das Wachstum von Krebszellen beschleunigen (De Vries und van Noorden, 1992). Es wird jedoch angezweifelt, ob diese Wirkung auf alle Arten von Tumor-Zellen übertragbar ist (Diggle, 2002). Generell werden cis-ungesättigte Fettsäuren, die die Bildung von freien Radikalen verursachen können, als zytotoxische Substanzen für Krebszellen betrachtet (Das, 1992; 2002; Cantrill et al., 1997).

Da die Kanäle der EAG-Familie in diversen Tumor-Zellen vorkommen und vermutlich eine wichtige Rolle für die Proliferation dieser Zellen spielen (Bianchi et al., 1998; Pardo et al., 1999), ist das Wissen über die Regulation dieser Kanäle durch Fettsäuren von Bedeutung.

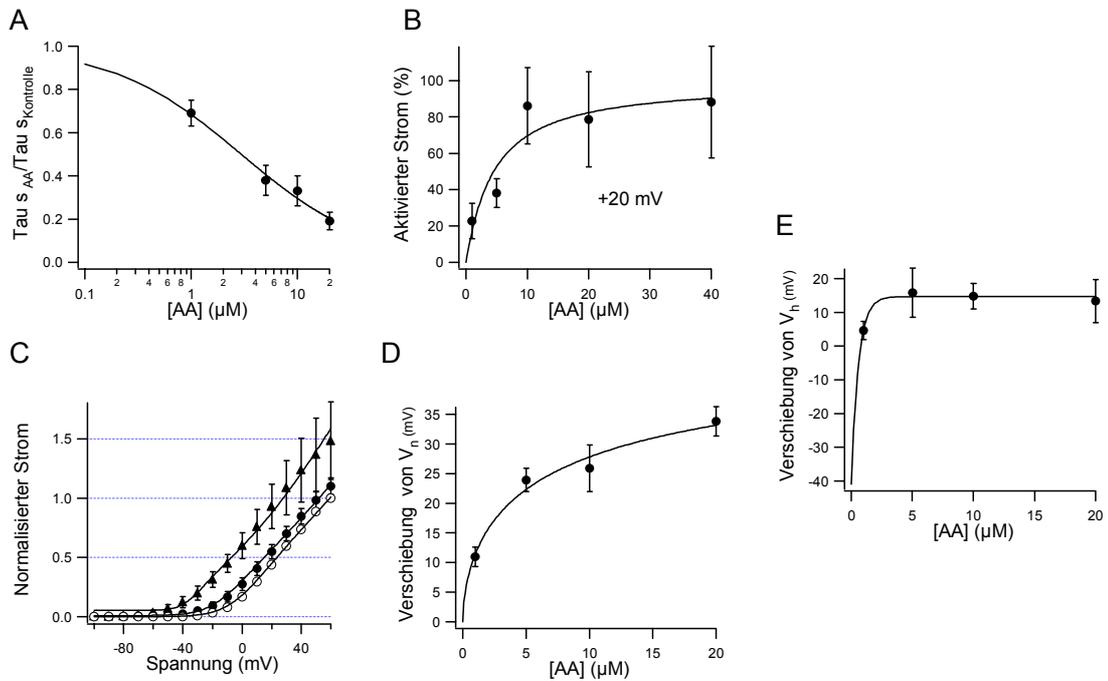
Zu Zeit ist über die Wechselwirkung von Kaliumkanälen der EAG-Familie mit Fettsäuren wenig bekannt. Die Effekte von Arachidonsäure auf den hERG1-Kanal und von Retinolsäure auf den hEAG1-Kanal sind allerdings beschrieben (Meyer und Heinemann 1999; Schledermann et al., 2001). Die untersuchten Fettsäuren erhöhen die auswärtsgerichteten Ströme in hEAG1- und hERG1-Kanälen. Der „tail“-Strom des hERG1-Kanals wurde von Arachidonsäure inhibiert.

Abb. 33 A, B stellen die Spuren von hEAG1-Strom in einer transfizierten CHO-Zelle bei Depolarisation auf +50 mV in der Kontrolle sowie bei der extrazellulären Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA dar. Bei Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA erhöhte sich der Strom am Ende der stabilen Phase um 27%. Die Aktivierungskinetik des hEAG1-Stroms kann mit der Gleichung (7) beschrieben werden. Die Zeitkonstante  $\tau_{\text{slow}}$  und die Wahrscheinlichkeit des Zustandes  $C_{\text{langsam}}$  ( $P_{\text{slow}}$ ) wurden wie unter 3.1.1 beschrieben ausgewertet. Die Abhängigkeit von  $\tau_{\text{slow}}$  und  $P_{\text{slow}}$  von dem Haltepotential ist in Abb. 33 C, D zu sehen. Bei Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA vermindern sich die Werte von  $\tau_{\text{slow}}$  und  $P_{\text{slow}}$ . In der Kontrolle betrug der mittlere Wert für  $\tau_{\text{slow}}$   $104.9 \pm 6.5$  ms, bei der Applikation von AA  $53.6 \pm 4.4$  ms. Die Anpassung der Kurven von Abb. 33 D an die Boltzmann-Gleichung (8) ergab  $V_h$ -Werte von  $-73$  mV in der Kontrolle (Steigungsparameter  $k_h = 9.1$  mV) und von  $-82$  mV ( $k_h = 9.6$  mV) bei der Applikation von AA. Die Verschiebung des  $V_h$ -Wertes in einen Bereich negativerer Spannungen deutet auf eine frühere Aktivierung der einzelnen Untereinheiten des hEAG1-Kanals bei der Applikation von AA hin. Der Effekt von AA war nach Waschen mit 5% BSA komplett reversibel.

Abb. 33 F stellt die Strom-Spannungs-Kennlinien von hEAG1-Strom in transfizierten CHO-Zellen in der Kontrolle und bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA dar. Die Anpassung der Kurven an die Gleichung (5) ergab  $V_n$ -Werte von 1.7 mV in der Kontrolle (Steigungsparameter  $k_n = 12.7$  mV) und von  $-19.2$  mV ( $k_n = 9.1$  mV) bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA. Die Verschiebung des  $V_n$ -Wertes von  $-20.9$  mV in Richtung negativerer Spannungen deutet auf eine frühere Öffnung des hEAG1-Kanals bei der Applikation von AA hin.

Die Ergebnisse gleicher Experimente mit 6 verschiedenen Zellen sind in Tabelle 8 (Spalte „2 Mg“) dargestellt.

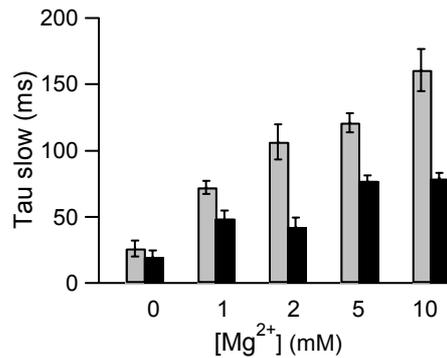
Die Erhöhung der Stromamplitude sowie die Beschleunigung der Aktivierungskinetik bei Applikation von AA wurden ebenso bei der Applikation von 1, 5 und 20  $\mu\text{M}$  AA beobachtet. Die Effekte waren konzentrationsabhängig (Abb. 34 A, B). Die Konzentrationsabhängigkeit der Verschiebung des Parameters  $V_n$  (Auswertung von IV-Kurven) in Richtung negativerer Spannungen ist in Abb. 34 C, D dargestellt.



**Abb. 34** Die Aktivierung von hEAG1-Kanälen in transfizierten CHO-Zellen durch AA hängt von der AA-Konzentration ab.

(A) Das Verhältnis der Zeitkonstanten  $\tau_{slow}$  bei Applikation von AA zur Kontrolle ist als Funktion der AA-Konzentration dargestellt.  $\tau_{slow}$ -Werte wurden bei der Anpassung von Strom-Spuren wie in Abb. 33 (A, B) anhand der Gleichung (7) abgeleitet. Die Hill-Gleichung ist an die resultierende Kurve angepasst. Der  $IC_{50}$ -Wert betrug  $2.9 \pm 0.5 \mu\text{M}$ , der Hill-Koeffizient  $0.71 \pm 0.08$ . (B) Die Erhöhung der Stromamplitude bei Depolarisation auf +20 mV bei der Applikation von AA als Funktion der AA-Konzentration. Die Anpassung der Hill-Funktion an die Daten ergab einen  $IC_{50}$ -Wert von  $4.5 \pm 1.4 \mu\text{M}$  und einen Hill-Koeffizienten von  $1.06 \pm 0.40$ . (C) Normierte IV-Kurven für 6 Zellen in der Kontrolle ( $\circ$ ), bei der Applikation von 1  $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ) und 10  $\mu\text{M}$  AA ( $\blacktriangle$ ). Die Anpassung der Kurven an die Funktion (5) ergab einen  $V_n$ -Wert von 0.2 mV ( $k_n=13.2$  mV) in der Kontrolle, einen  $V_n$ -Wert von -14.0 mV ( $k_n=12.6$  mV) bei der Applikation von 1  $\mu\text{M}$  AA und einen  $V_n$ -Wert von -35.1 mV ( $k_n=7.0$  mV) bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA. (D) Die Verschiebungen der  $V_n$ -Werte bei der Anpassung der Funktion (5) an die einzelnen IV-Kurven sind AA-konzentrationsabhängig. Die Hill-Funktion ist an die Daten angepasst. Der  $IC_{50}$ -Wert betrug  $8.1 \pm 2.2 \mu\text{M}$ , der Hill-Koeffizient  $0.61 \pm 0.4$ , der maximale Wert  $52.3 \pm 4.1$  mV. (E) Die Verschiebungen der  $V_h$ -Werte bei der Anpassung der Gleichung (8) an die einzelnen  $P_{slow}$ -Kurven sind AA-konzentrationsabhängig.

Um zu prüfen, ob die Veränderung von allen Parametern durch das frühere Öffnen des Kanals zu klären ist, hatten wir die Zellen nach dem Halten bei Vorpulsen von -130 bis -40 mV (10 mV-Schritte) auf +20, +50 und +80 mV depolarisiert. Falls es nur die Effekte der Verschiebung der Strom-Spannungs-Kennlinie bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA um 30 mV sind, sollten die  $\tau_{slow}$ -Werte bei der Applikation von AA bei +20 mV mit den  $\tau_{slow}$ -Werten bei +50 mV in der Kontrolle übereinstimmen. Das Gleiche würde für die Werte bei +50 mV bei Applikation von AA und bei +80 mV in der Kontrolle gelten. Die Messungen sind in der Tabelle 7 dargestellt. Die Daten zeigen, dass neben dem früheren Öffnen des Kanals bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA zusätzliche Mechanismen eine Rolle spielen: Die Mittelwerte bei der Applikation von AA bei +20 mV unterschieden



**Abb. 35** Die Aktivierungskonstanten  $\tau_{slow}$  für hEAG1-Kanäle in der Kontrolle (graue Balken) sowie bei der Applikation von 10  $\mu M$  AA (schwarze Balken) hängen von der externen  $Mg^{2+}$ -Konzentration ab. Die Zeitkonstanten wurden bei der Anpassung der Gleichung (7) an die Strom-Spuren, wie in Abb. 33 (A, B), abgeleitet. Die Anzahl der gemessenen Zellen bei jeder  $Mg^{2+}$ -Konzentration ist aus Tabelle 8 ersichtlich.

Tabelle 7 Aktivierung des hEAG1-Kanals in transfizierten CHO-Zellen bei verschiedenen Depolarisationspulsen.

|               | $\tau_{slow}$ bei +20 mV, ms<br>n=5 | $\tau_{slow}$ bei +50 mV, ms<br>n=5 | $\tau_{slow}$ bei +80 mV, ms<br>n=4 |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Kontrolle     | 157.5±18.2                          | 87.2±14.9                           | 52.3±6.8                            |
| 10 $\mu M$ AA | 39.0±13.6                           | 16.9±2.7                            | -                                   |

sich signifikant von den Mittelwerten bei +50 mV in der Kontrolle ( $P < 0.05$ ). Das Gleiche gilt für die Werte bei +50 mV bei der Applikation von AA und den Werten bei +80 mV in der Kontrolle.

Ein weiteres Anliegen war es zu untersuchen, ob der Effekt von AA auf hEAG1-Kanäle von der Konzentration des externen Magnesiums abhängig ist.

Aus Tabelle 8 ist zu ersehen, dass die prozentuale Stromzunahme und die Verschiebung des  $V_h$ -Wertes in Richtung negativerer Spannungen bei der Applikation von 10  $\mu M$  AA von der externen  $Mg^{2+}$ -Konzentration unabhängig sind (die Unterschiede zwischen den in Tabelle 8 dargestellten Mittelwerten sind nicht signifikant,  $P > 0.05$ ).

Die Werte für die Beschleunigung von  $\tau_{slow}$  bei der Applikation von 10  $\mu M$  AA unterscheiden sich bei verschiedenen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen in externer Lösung. Der Unterschied zwischen den  $\tau_{slow}$ -Werten in der Kontrolle zu den bei der Applikation von 10  $\mu M$  AA erhaltenen Werten ist bei 2 mM  $Mg^{2+}$  am höchsten.

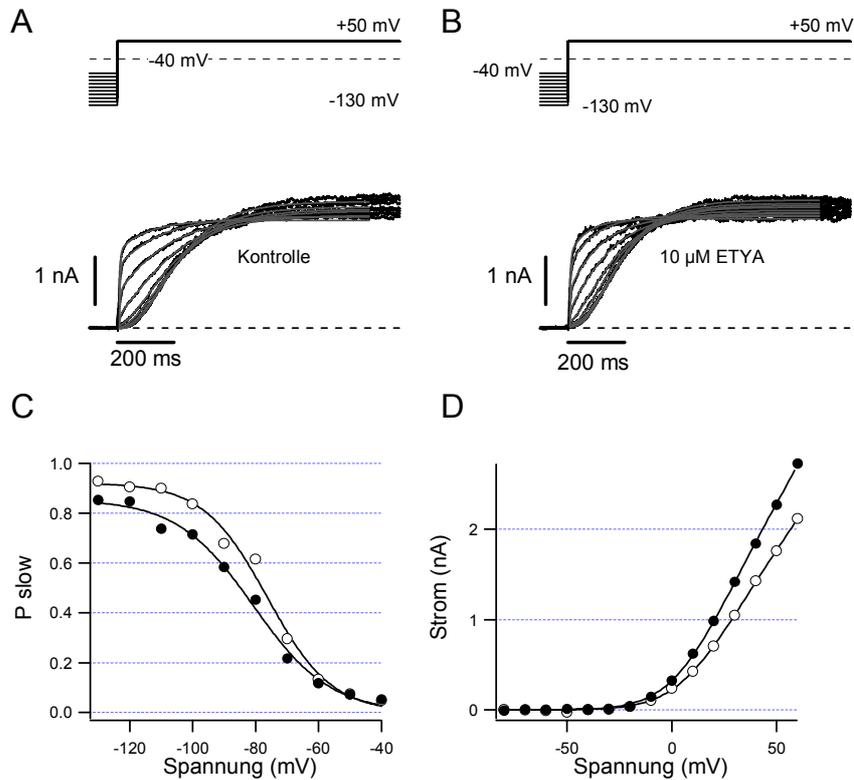
Die Abb. 35 zeigt die  $\tau_{slow}$ -Werte in der Kontrolle sowie bei Applikation von 10  $\mu M$  AA bei verschiedenen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen. Der Charakter der Abhängigkeit der Aktivierungskinetik von der  $Mg^{2+}$ -Konzentration bei der Applikation von 10  $\mu M$  AA zeigt die gleiche Tendenz wie in der Kontrolle: Die zunehmende  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen verlangsamen die Aktivierung. Bei Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  in der externen Lösung

wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den  $\tau_{\text{slow}}$ -Werten in der Kontrolle und denen bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA festgestellt ( $\tau_{\text{slow Kont.}}=26.2\pm 6.1$ ;  $\tau_{\text{slow AA}}=19.8\pm 5.1$ ;  $P>0.05$ ). Bei Zugabe von externem  $\text{Mg}^{2+}$  unterscheiden sich die  $\tau_{\text{slow}}$ -Werte in der Kontrolle und bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA signifikant ( $P<0.05$ ) (s. Abb. 35).

Tabelle 8 Aktivierung des hEAG1-Kanals in transfizierten CHO-Zellen bei Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA.

|  | 0 Mg<br>n=10 | 1 Mg<br>n=8    | 2 Mg<br>n=6    | 5 Mg<br>n=9    | 10 Mg<br>n=3   |
|--|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Erhöhung der Stromamplitude bei +20 mV, %                                      | 81.8±24.9    | 88.6±15.4      | 86.2±21.0      | 80.1±9.7       | 106.9±11.4     |
| Verschiebung des $V_n$ -wertes, mV   | -10.1±2.0    | -8.4±2.4       | -14.8±3.9      | -9.2±2.1       | -12.7±3.0      |
| Verschiebung des $V_n$ -wertes, mV   | -25.6±2.7    | -24.9±4.7      | -25.9±3.9      | -21.6±2.3      | -              |
| $\tau_{\text{slow AA}}/\tau_{\text{slow Kont.}}$ bei Depolarisation auf +50 mV | 0.76±0.05    | 0.66±0.06<br>* | 0.42±0.09<br>* | 0.64±0.03<br>* | 0.50±0.08<br>* |

\* bedeutet signifikanten Unterschied zwischen  $\tau_{\text{slow AA}}$  und  $\tau_{\text{slow Kont.}}$  ( $P<0.05$ )



**Abb. 36** Aktivierung von hEAG1-Kanälen in transfizierten CHO-Zellen durch ETYA. (A) [Lösung  $2_{\text{ex}}$  mit 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$ /Lösung  $4_{\text{in}}$ ] Die transfizierte CHO-Zelle wurde nach einem jeweils für 5 s angelegten Haltepotential von -130 bis -40 mV auf eine Spannung von +50 mV depolarisiert. Die Gleichung (7) ist an die Strom-Spuren angepasst. (B) Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ETYA beschleunigte die Aktivierungskinetik des Kanals. Die Strom-Spuren sind an die Gleichung (7) angepasst. Die Werte für die Zeitkonstante  $\tau_{\text{slow}}$  in der Kontrolle und bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ETYA sind im Text dargestellt. (C)  $P_{\text{slow}}$  ist vom Haltepotential abhängig und wird niedriger bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ETYA (●) im Vergleich zur Kontrolle (○). Die Gleichung (8) ist an die  $P_{\text{slow}}$ -Funktionen angepasst. (D) Die Strom-Spannungs-Kennlinien sind bei der Bearbeitung der gemessenen Strom-Spuren, wie in Abb.33 (E, F) beschrieben, abgeleitet.

Die Applikation von 10-20  $\mu\text{M}$  5,8,11,14-Eicosatetrainsäure (ETYA) blockt alle Enzyme, die ungesättigte Fettsäuren metabolisieren: Lipoxygenase, Cyclooxygenase, Zytochrom P-450 (Capdevila et al., 1988). Abb. 36 A, B stellen die Spuren von hEAG1-Strom in transfizierten CHO-Zellen in der Kontrolle und nach der extrazellulären Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ETYA dar. Die Applikation von ETYA verringerte die Zeitkonstante  $\tau_{\text{slow}}$  von  $132.6 \pm 18.1$  ms (Kontrolle) auf  $99.8 \pm 15.1$  ms: Die Aktivierung des Kanals wurde signifikant beschleunigt ( $P < 0.05$ ). Die Wahrscheinlichkeiten des Zustandes  $C_{\text{langsam}}$  ( $P_{\text{slow}}$ ) in der Kontrolle und bei der Applikation von ETYA sind in Abb. 36 C dargestellt. Die Anpassung der Kurven von Abb. 36 C an die Boltzmann-Gleichung (8) ergab den  $V_{\text{h}}$ -Werte von -76 mV in der Kontrolle (Steigungsparameter  $k_{\text{h}} = 10.2$  mV) und von -81 mV ( $k_{\text{h}} = 12.1$  mV) bei der Applikation von ETYA.

In Abb. 36 D sind die Strom-Spannungs-Kennlinien in der Kontrolle sowie bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ETYA dargestellt. Die Anpassung der Kurven an die Gleichung (5) ergab  $V_{\text{n}}$ -Werte von 14.3 mV in der Kontrolle (Steigungsparameter  $k_{\text{n}} = 15.3$  mV) und

von 10.9 mV ( $k_n=14.8$  mV) bei der Applikation von 10  $\mu$ M ETYA. Es wird deutlich, dass die beobachtete Erhöhung des hEAG1-Stroms, die Beschleunigung der Aktivierung und die Verschiebung des  $V_n$ -Wertes in Richtung negativerer Spannungen eine direkte Wirkung von ETYA ist.

Um zu untersuchen, ob die Applikationen anderer ungesättigter Fettsäuren gleiche Effekte wie AA und ETYA auf hEAG1-Kanäle haben, wurden cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure (EPA), cis-9,12,15-Octadecatriensäure (Linolensäure, LNA) und cis-9-Octadecensäure (Oleinsäure, OA) in einer Konzentration von 10  $\mu$ M auf transfizierte CHO-Zellen extern zugegeben. EPA und Linolensäure beschleunigten die Aktivierung, erhöhten die Stromamplitude und verschoben den  $V_n$ -Wert in Richtung negativerer Spannungen. Dabei verursachte die Applikation von 10  $\mu$ M EPA (Fettsäure mit 5 ungesättigten Bindungen) einen größeren Effekt als 10  $\mu$ M Linolensäure (Fettsäure mit 3 ungesättigten Bindungen). Der Effekt wurde geringer bei der Applikation von Oleinsäure (Fettsäure mit einer ungesättigten Bindung) (Tabelle 9). Dies zeigt, dass die Wirkung von Fettsäuren von deren Anzahl ungesättigter Bindungen abhängig ist.

Eine weitere Frage war, ob die ungesättigten Fettsäuren den hEAG1-Strom auch in anderen Zellsystemen (Melanomzellen) aktivieren können. Appliziert wurden AA, EPA, Linolensäure, Oleinsäure und ETYA in einer Konzentration von 10  $\mu$ M. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 10 dargestellt. Der Effekt ist deutlich von der Anzahl der ungesättigten Bindungen abhängig und mit dem in transfizierten CHO-Zellen vergleichbar. Der größere Effekt bei der Applikation von 10  $\mu$ M EPA in CHO-Zellen erklärt sich vermutlich durch die unterschiedliche Herkunft der Substanzen: Für die Messungen in CHO-Zellen wurde EPA als 100%-iger Wirkstoff von der Firma Sigma erworben, für die Messungen in IGR1-Zellen wurde EPA von der Firma ICN als 10 mg/ml Ethanol-Lösung bezogen.

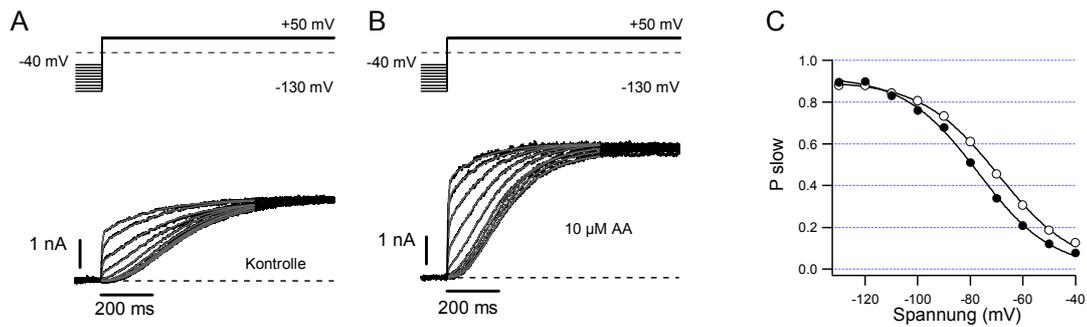
Tabelle 9 Aktivierung des hEAG1-Kanals in transfizierten CHO-Zellen bei Applikation von ungesättigten Fettsäuren in einer Konzentration von 10  $\mu$ M.

|   | AA<br>n=6      | EPA<br>n=7     | ETYA<br>n=5    | LNA<br>n=3     | OA<br>n=4 |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------|
| Erhöhung der Stromamplitude bei +50 mV, %       | 50.0±15.7      | 57.8±15.0      | 26.2±3.1       | 34.6±11.6      | 4.7±4.1   |
| Erhöhung der Stromamplitude bei +20 mV, %       | 86.2±21.0      | 123.4±45.0     | 33.7±7.7       | 26.5±11.6      | 12.8±4.0  |
| Verschiebung des $V_n$ -Wertes, mV              | -14.8±3.9      | -5.7±1.3       | -8.8±4.8       | -3.5±1.7       | -1.6±1.0  |
| Verschiebung des $V_n$ -Wertes, mV              | -25.9±3.9      | -36.5±2.6      | -9.9±1.4       | -26.3±8.1      | -1.0±0.9  |
| $\tau_{slow AA} / \tau_{slow Kont.}$ auf +50 mV | 0.42±0.09<br>* | 0.19±0.03<br>* | 0.64±0.05<br>* | 0.50±0.06<br>* | 1.1±0.30  |

Tabelle 10 Aktivierung des hEAG1-Kanals in IGR1-Zellen bei Applikation von ungesättigten Fettsäuren in einer Konzentration von 10  $\mu$ M.

|   | AA<br>n=7      | EPA<br>n=3     | ETYA<br>n=3    | LNA<br>n=5     | OA<br>n=3 |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------|
| Erhöhung der Stromamplitude bei +50 mV, %       | 34.1±9.4       | 37.6±6.0       | 18.2±2.4       | 26.0±11.6      | 11.5±3.4  |
| Erhöhung der Stromamplitude bei +20 mV, %       | 84.8±25.9      | 58.9±3.4       | 37.1±2.2       | 57.8±19.0      | 13.7±1.7  |
| Verschiebung des $V_n$ -Wertes, mV              | -16.6±2.5      | -7.9±2.1       | -9.6±1.0       | -6.7±0.8       | -2.1±1.6  |
| Verschiebung des $V_n$ -Wertes, mV              | -30.8±6.1      | -17.3±1.1      | -10.8±2.1      | -12.7±2.5      | -4.6±0.6  |
| $\tau_{slow AA} / \tau_{slow Kont.}$ auf +50 mV | 0.41±0.07<br>* | 0.64±0.07<br>* | 0.68±0.05<br>* | 0.71±0.04<br>* | 0.89±0.07 |

\* bedeutet signifikanten Unterschied zwischen  $\tau_{slow AA}$  und  $\tau_{slow Kont.}$  (P<0.05)

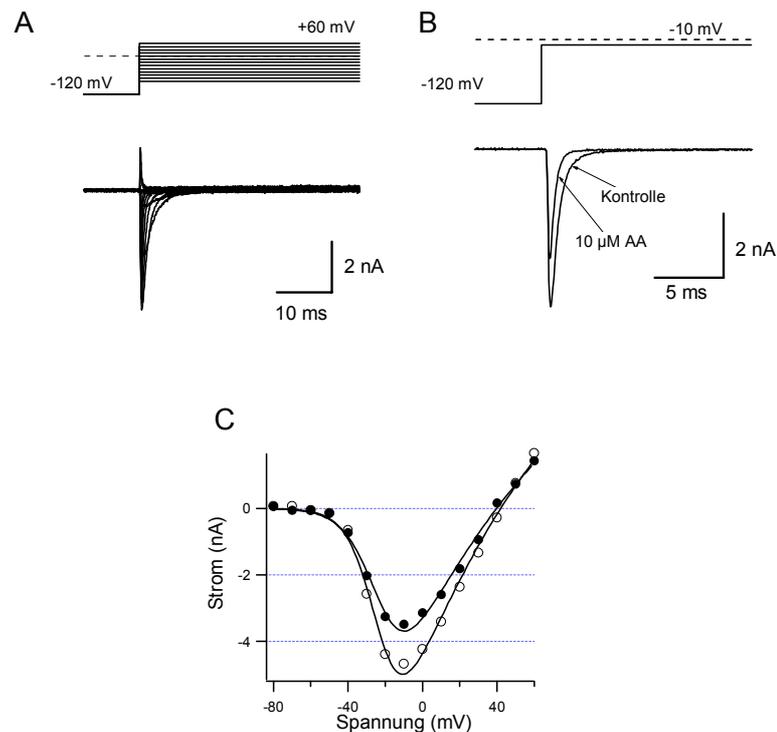


**Abb. 37** Aktivierung von hEAG2-Kanälen in transfizierten CHO-Zellen durch 10  $\mu\text{M}$  AA. (A) [Lösung  $2_{\text{ex}}$  mit 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$ /Lösung  $4_{\text{in}}$ ] Die Aktivierungskinetik des hEAG2-Stromes in transfizierter CHO-Zelle ist haltepotentialabhängig: Die Zelle wurde nach einem jeweils für 5 s angelegten Haltepotential von  $-130$  bis  $-40$  mV auf eine Spannung von  $+50$  mV depolarisiert. Die Gleichung (7) ist an die Strom-Spuren angepasst. Der mittlere Wert für die daraus bestimmte Zeitkonstante  $\tau_{\text{slow}}$  betrug  $180.6 \pm 11.9$  ms. (B) Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA beschleunigte die Aktivierungskinetik des Kanals. Der mittlere Wert für die Zeitkonstante  $\tau_{\text{slow}}$  betrug  $125.8 \pm 6.5$  ms. (C)  $P_{\text{slow}}$  ist vom Haltepotential abhängig. Die Gleichung (8) ist an die  $P_{\text{slow}}$ -Funktionen in der Kontrolle ( $\circ$ ) und bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA ( $\bullet$ ) angepasst. Bei der Anpassung wurden die  $V_{\text{h}}$ -Werte für einzelne Untereinheiten bestimmt. Der  $V_{\text{h}}$ -Wert in der Kontrolle betrug  $-69.3$  mV ( $k_{\text{h}}=14.6$  mV), der  $V_{\text{h}}$ -Wert bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA war  $-77.0$  mV ( $k_{\text{h}}=14.1$  mV).

Die Empfindlichkeit des hEAG2-Kanals auf AA wurde an transfizierten CHO-Zellen untersucht. Die Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  AA beschleunigte die Aktivierungskinetik des Kanals ( $\tau_{\text{slow AA}}/\tau_{\text{slow Kont.}}$  bei Depolarisation auf  $+50$  mV betrug  $0.51 \pm 0.08$ ), erhöhte die Stromamplitude am Ende der stabile Phase um  $73.3 \pm 11.4$  % bei  $+50$  mV und verschob den  $V_{\text{h}}$ -Wert in Richtung der negativeren Spannungen um  $5.9 \pm 1.0$  mV (Abb. 37). Die Empfindlichkeit des hEAG2-Kanals auf AA war mit der entsprechenden Empfindlichkeit des hEAG1-Kanals vergleichbar.

### 3.5.2 Der Effekt von Arachidonsäure auf die Kanäle rNav1.4 und hKv1.5

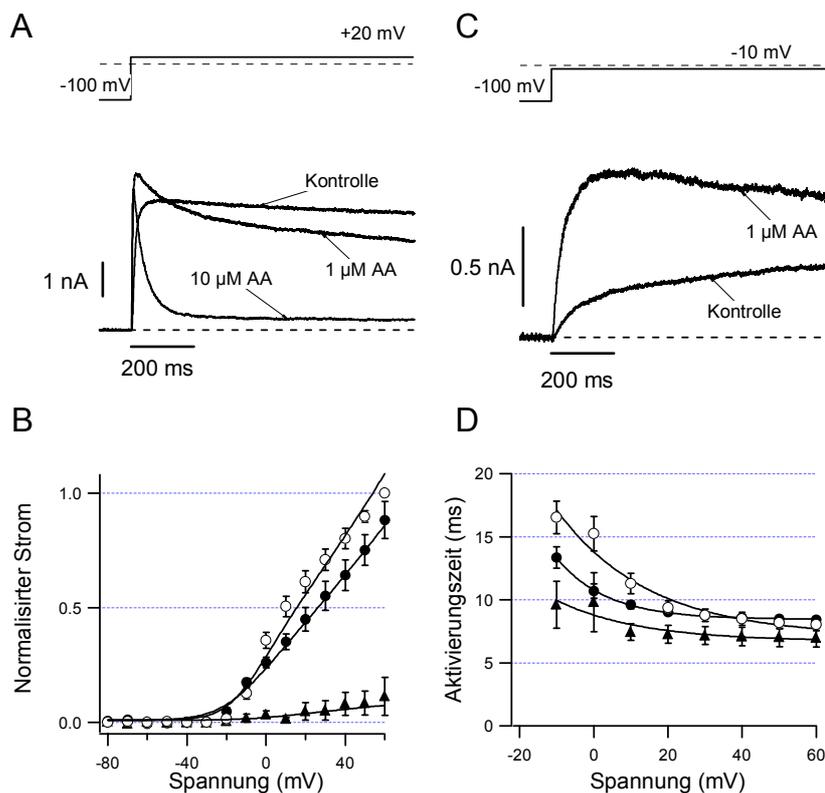
Ob die beobachtete Beschleunigung der Aktivierungskinetik sowie die Verschiebung des  $V_{\text{n}}$ -Wertes auf eine generelle Wirkung von AA auf verschiedenen Ionenkanälen schließen lässt, wurde ebenfalls untersucht. Dafür wurde 10  $\mu\text{M}$  AA auf  $\text{Na}^+$ -Kanäle der Ratte  $\mu 1$  (rNav1.4) in transfizierten HEK 293-Zellen appliziert. 10  $\mu\text{M}$  AA inhibierte den Maximalstrom der Kanäle in der dargestellten Zelle zu 39.4% (Abb. 38 B), die Aktivierung der Kanäle wurde jedoch nicht beschleunigt (Abb. 38 A, C). Die gleichen Messungen in 8 verschiedenen Zellen zeigten ebenfalls eine Reduzierung des Stromes zu  $54.5 \pm 3.7$  % und keine Verschiebung von  $V_{\text{n}}$ -Wertes der IV-Kurve ( $V_{\text{n}}=-35.1 \pm 1.9$  in Kontrolle,  $V_{\text{n}}=-34.2 \pm 2.0$  bei Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA; der Unterschied zwischen den Mittelwerten ist nicht signifikant,  $P < 0.05$ ). Unsere Daten bestätigen den Befund von



**Abb. 38** Block von  $\mu 1$ -Na<sup>+</sup>-Kanälen in transfizierten HEK 293-Zellen mit 10  $\mu$ M AA. (A) [Lösung 10<sub>ex</sub>/Lösung 11<sub>in</sub>] Strom-Spannungsabhängigkeit von  $\mu 1$ -Na<sup>+</sup>-Kanal in einer transfizierten HEK 293-Zelle. Ausgehend von einem für 60 ms angelegten Haltepotential von -120 mV wurde die Zelle auf Spannungen von -80 mV bis +60 mV in 10 mV-Schritten depolarisiert. (B) Block von  $\mu 1$ -Na<sup>+</sup>-Kanälen mit 10  $\mu$ M AA bei Depolarisationsspannung von -10 mV. (C) Strom-Spannungs-Kennlinien in der Kontrolle (○) und bei der Applikation von 10  $\mu$ M AA (●). Die maximale Stromamplitude aus den Strom-Spuren wurde wie in (A) als Funktion der Spannung dargestellt. Die Gleichung (5) ist an die IV-Kurven angepasst.

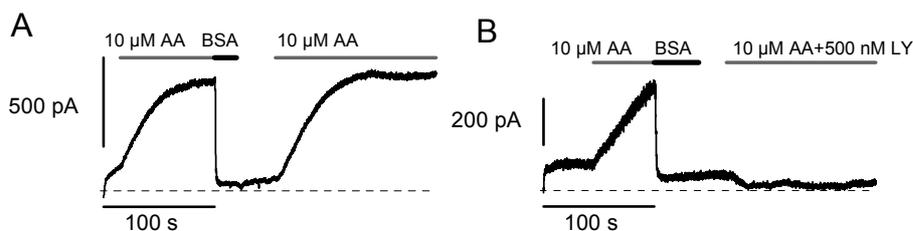
Bendahhou und Kollegen (Bendahhou et al., 1997): AA blockt den  $\mu 1$ -Kanal, ein Effekt von AA auf die Aktivierung konnte nicht beobachtet werden.

Um zu prüfen, ob die mögliche chemische Verbindung von AA und Mg<sup>2+</sup>-Ionen in unseren Lösungen den Effekt auf den EAG-Kanal beeinflusst (Brash, 2001), verglichen wir den Block von  $\mu 1$ -Na<sup>+</sup>-Kanälen durch 10  $\mu$ M AA bei 0 und 1 mM externem Magnesium. Der Effekt von AA auf diesen Kanal ist bei 4 mM externem Magnesium bereits beschrieben worden (Bendahhou et al., 1997). Der Maximalstrom wurde ohne Magnesium in externer Lösung 10 um 54.5±3.7% (n=8) reduziert, bei 1 mM Mg<sup>2+</sup> um 62.5±5.3% (n=4). Die Unterschiede zwischen den Werten sind nicht signifikant (P<0.05). Die Werte sind mit dem Ergebnis von Bendahhou und Kollegen vergleichbar: Bei 4 mM externem Magnesium wurde der Strom um 60% bei Applikation von 10  $\mu$ M AA reduziert. Daraus schließen wir, dass eine mögliche chemische Verbindung zwischen AA und Mg<sup>2+</sup>-Ionen im Konzentrationsbereich von 1-4 mM Mg<sup>2+</sup> bei 10  $\mu$ M AA keinen Effekt auf die Wechselwirkung von AA mit den Ionenkanälen hat.



**Abb. 39** Empfindlichkeit von hKv1.5-Kanälen in transfizierten CHO-Zellen gegenüber AA. (A) [Lösung  $2_{ex}$  mit 2 mM  $Mg^{2+}$ /Lösung  $4_{in}$ ] Block von hKv1.5-Strom in einer transfizierten CHO-Zelle mit 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M AA. (B) Normierte IV-Kurven für 9 verschiedene Zellen in der Kontrolle ( $\circ$ ), 5 Zellen bei der Applikation von 1  $\mu$ M ( $\bullet$ ) und 4 Zellen bei der Applikation von 10  $\mu$ M AA ( $\blacktriangle$ ). Die Gleichung (5) ist an die Daten angepasst. Der  $V_n$ -Wert in der Kontrolle betrug -10 mV ( $k_n=10.0$  mV), bei der Applikation von 1  $\mu$ M AA -14.0 mV ( $k_n=12.6$  mV) und bei der Applikation von 10  $\mu$ M AA 0.0 mV ( $k_n=13.2$  mV). (C) Die Erhöhung der Stromamplitude bei Applikation von 1  $\mu$ M AA ist bei einer Depolarisation auf -10 mV zu beobachten. (D) Die Aktivierungszeiten des hKv1.5-Kanals (die Zeit für die Erreichung von 90% des Maximums der Stromamplitude) ist als Funktion der Depolarisationsspannung dargestellt. Die Daten sind für 9 Zellen in der Kontrolle ( $\circ$ ), für 5 Zellen bei Applikation von 1  $\mu$ M AA ( $\bullet$ ) und für 4 Zellen bei Applikation von 10  $\mu$ M AA ( $\blacktriangle$ ) berechnet.

Die Wechselwirkung von nicht-inaktivierenden Kaliumkanälen der *Shaker*-Familie Kv1.5 mit Arachidonsäure (AA) wurde zuerst in der Arbeit von Honoré et al. (1994) beschrieben. Die Autoren beobachteten, dass bei Depolarisation auf +30 mV 1  $\mu$ M AA den Kv1.5-Strom aktiviert, 30  $\mu$ M AA diesen dagegen inhibiert. Wir untersuchten den Effekt von 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M AA auf den gleichen Kanal. In unseren Experimenten wurde der Kv1.5-Strom bei Depolarisation auf +20 mV sowohl von 1  $\mu$ M als auch von 10  $\mu$ M AA inhibiert. 1  $\mu$ M AA inhibierte  $19.55 \pm 3.22$  % des Stromes ( $n=4$ ) am Ende der stabilen Phase bei +20 mV, 10  $\mu$ M AA inhibierte  $79.9 \pm 2.9$  % ( $n=13$ ) (Abb. 39 A, B). Der Effekt war mit 5% BSA komplett reversibel. Der Aktivierungseffekt von 1  $\mu$ M AA auf den Kv1.5-Strom konnte in unseren Experimenten nur bei einer Depolarisation auf -10 mV beobachtet werden: Die Stromamplitude wurde bei der Applikation von AA um  $41.1 \pm 2.4$  % erhöht ( $n=4$ ) (Abb. 39 B, C). Die Aktivierungsphase



**Abb. 40** Aktivierung des hEAG1-Kanals in transfizierten CHO-Zellen durch 10  $\mu\text{M}$  AA bei einem Membranpotential von  $-30\text{ mV}$ .  
 (A) [Lösung  $2_{\text{ex}}$  mit 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$ /Lösung  $4_{\text{in}}$ ] Die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA induziert einen auswärtsgerichteten Kaliumstrom. Der Effekt ist mit 5% BSA komplett reversibel. (B) Der bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA entstandene auswärtsgerichtete Kaliumstrom kann mit 500 nM LY 97241 inhibiert werden.

des Stroms wurde dabei beschleunigt. Als Parameter der Aktivierung wurde die Zeit gewählt, die für das Erreichen von 90% des Strom-Maximums nötig war.

Bei der Applikation von 1  $\mu\text{M}$  AA wechselte die Aktivierungszeit von  $16.6 \pm 1.3\text{ ms}$  auf  $13.3 \pm 0.8\text{ ms}$  ( $n=4$ ) bei  $-10\text{ mV}$ , bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA betrug diese Zeit  $7.8 \pm 0.7\text{ ms}$  ( $n=4$ ). Die Beschleunigung der Aktivierung ist in Abb. 39 C, D dargestellt.

Die gesamte Wirkung von 1 und 10  $\mu\text{M}$  AA auf den Kv1.5 Kanal kann als bidirektionaler Effekt beschrieben werden: Die Aktivierung des Kanals wird zwar beschleunigt, die Stromamplitude wird allerdings nur bei der Spannung von  $-10\text{ mV}$  erhöht; bei Depolarisationspulsen ab  $0\text{ mV}$  wurde eine Abnahme der Stromamplituden beobachtet.

Ein ähnlicher Effekt von 5-20  $\mu\text{M}$  AA ist bei den *Shaker*-Typ-Kanälen Kv1.1 und Kv1.3 beschrieben worden: Dabei beschleunigte sich sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung der Kanäle, was zur Abnahme des Spitzen-Stroms und des Stroms am Ende der stabilen Phase führte (Gubitosi-Klug et al., 1995; Visentin und Levi, 1998).

### 3.5.3 Regulation von hEAG1-Kanälen mit Arachidonsäure bei $-30\text{ mV}$

Das gemessene Ruhepotential der unsynchronisierten IGR1-Melanomzellen betrug  $-28\text{ mV}$  (s. 3.3.2). Wir wollten untersuchen, ob die Applikation von AA auf den hEAG1-Kanal einer Zelle, die auf solche Spannung geklemmt ist, einen deutlichen Effekt hervorruft.

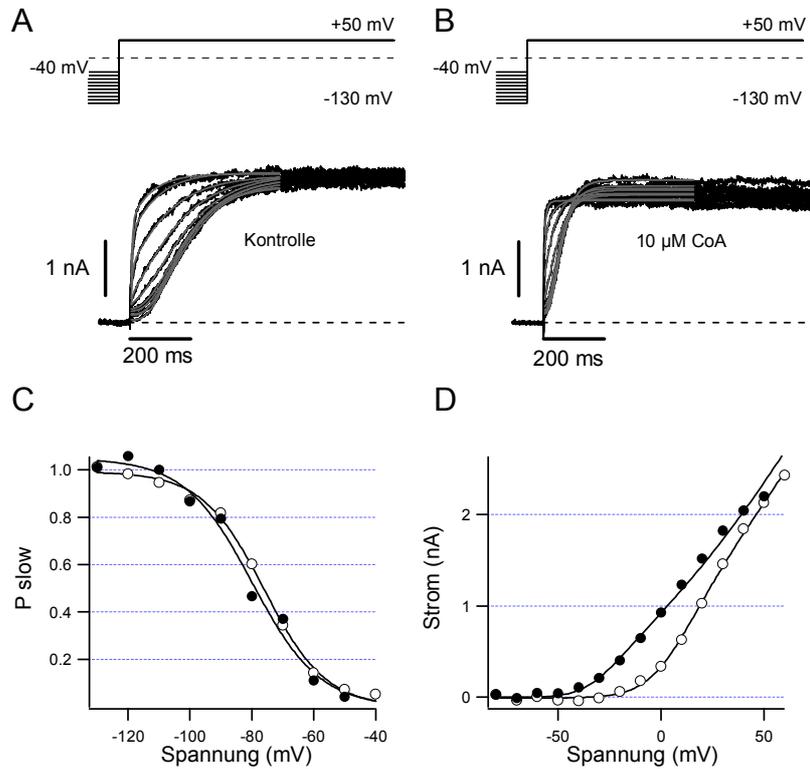
Die in Abb. 40 A dargestellten Messungen wurden mit einer transfizierten CHO-Zelle durchgeführt. Die Zelle wurde auf dem Potential von  $-30\text{ mV}$  gehalten. Ein kleiner Strom wurde am Anfang der Messung registriert. Bei Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA erhöhte sich ein auswärtsgerichteter Kaliumstrom, der mit 5% BSA inhibiert werden konnte. Um zu prüfen, ob der registrierte Strom durch den hEAG1-Kanal fließt, wiederholten wir die Messung in anderen transfizierten CHO-Zellen. Dabei konnte der bei der Applikation von

AA entstandene Strom mit der Substanz LY 97241 in einer Konzentration von 500 nM inhibiert werden (Abb. 40 B). Die Substanz LY 97241 blockt den hEAG1-Kanal in nM-Bereich (Gessner und Heinemann 2003). Die Strom-Blockade durch LY 97241 wies darauf hin, dass der beobachtete Strom tatsächlich durch den hEAG1-Kanal floss. Die in Abb. 40 dargestellten Experimente wurden 3 mal mit diesem Ergebnis wiederholt. Diese Ergebnisse zeigen, dass Applikation von 10  $\mu$ M AA bei Ruhepotential der Melanomzelle den hEAG1-Strom erhöht.

#### 3.5.4 Die Suche nach den molekularen Mechanismen der Wechselwirkung von Arachidonsäure mit EAG-Kanälen

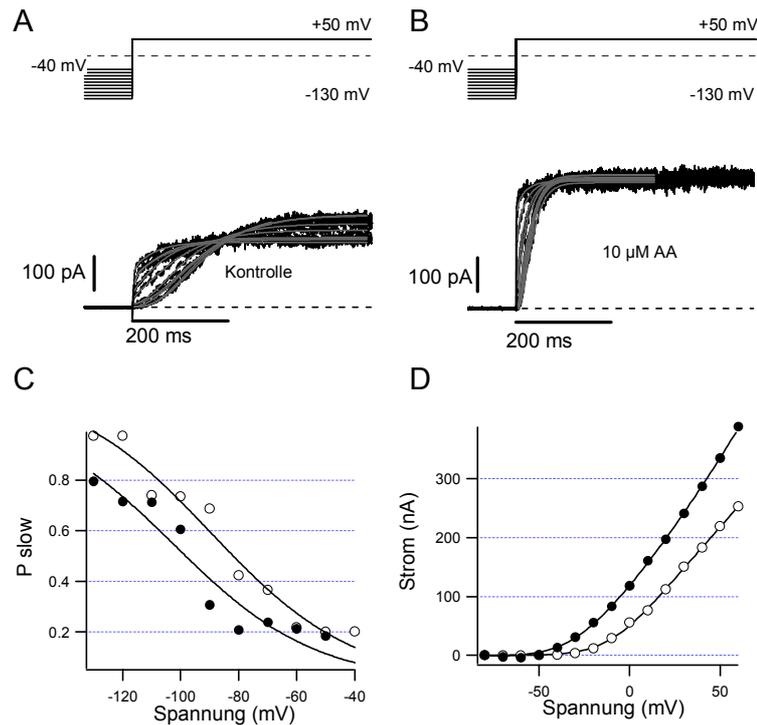
Um zu prüfen, ob die ungesättigten Fettsäuren von der äußeren oder der inneren Membranseite auf den hEAG1-Kanal einwirken, wurde das Membran-unpermeable Analog der AA – das Arachidonylkoenzym A (Arachidonyl CoA) - in einer Konzentration von 10  $\mu$ M auf transfizierte CHO-Zellen extern appliziert (Abb. 41). Die Stromamplitude bei Depolarisation von +50 mV wurde dabei nicht erhöht. Die Abnahme der Stromamplitude bei +50 mV betrug  $16.5 \pm 7.0\%$  ( $n=3$ ). Bei niedrigeren Spannungen war die Stromamplitude bei der Applikation von Arachidonyl CoA jedoch höher als in der Kontrolle: bei +20 mV betrug die Erhöhung der Stromamplitude  $22.8 \pm 7.8\%$ , bei 0 mV  $88.8 \pm 36.2\%$ . Bei den anderen Parametern hatte die Applikation von 10  $\mu$ M Arachidonyl CoA eine ähnliche Wirkung wie die Applikation von 10  $\mu$ M AA: die Verschiebung des  $V_n$ -Wertes betrug  $-4.8 \pm 1.0$  mV, der  $V_n$ -Wert wurde um  $-34.9 \pm 5.5$  mV verschoben,  $\tau_{\text{slow AA}}/\tau_{\text{slow Kont.}}$  betrug  $0.32 \pm 0.10$  bei +50 mV.

Dies lässt vermuten, dass Wechselwirkungen von Fettsäuren mit dem hEAG1-Kanal auf der Außenseite der Membran stattfinden. Um zu prüfen, ob AA von der Innen- oder der Außenseite der Membran wirkt, hatten wir hEAG1 in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. AA in einer Konzentration von 10  $\mu$ M wurde auf der inneren Seite der Oozytenmembran in der „Inside-Out“ Konfiguration appliziert (Abb. 42). Nach dem Abziehen des Patches wurde der Patch mit der Kontrolllösung gespült. Die dabei entstehende Stromamplitude wurde als Kontrolle genommen. Bei der Depolarisation auf +50 mV erhöhte die Applikation von 10  $\mu$ M AA die hEAG1-Stromamplitude um 90.0%. Die  $\tau_{\text{slow}}$  wurde von 67.3 ms auf 19.7 ms beschleunigt. Die Gleichung (8) war allerdings schwer an die  $P_{\text{slow}}$ -Werte anzupassen (Abb. 42 C). Die in Abb. 42 C dargestellten Anpassungen ergaben eine Verschiebung der  $V_n$ -Werte in Richtung der negativeren Spannungen. Die Anpassungen der Gleichung (5) an die Strom-Spannungs-Kennlinien ergaben  $V_n$ -Werte von  $-3$  mV in der Kontrolle und  $-30$  mV bei der Applikation von AA.



**Abb. 41** Aktivierung von hEAG1-Kanälen in transfizierten CHO-Zellen durch Arachidonyl CoA. (A) [Lösung  $2_{\text{ex}}$  mit  $2 \text{ mM Mg}^{2+}$ /Lösung  $4_{\text{in}}$ ] Die transfizierte CHO-Zelle wurde nach einem jeweils für 5 s angelegten Haltepotential von  $-130$  bis  $-40$  mV auf eine Spannung von  $+50$  mV depolarisiert. Die Gleichung (7) ist an die Strom-Spuren angepasst. Der mittlere Wert für die daraus bestimmte Zeitkonstante  $\tau_{\text{slow}}$  betrug  $100.2 \pm 17.5$  ms. (B) Applikation von  $10 \mu\text{M}$  Arachidonyl CoA beschleunigte die Aktivierungskinetik des Kanals. Der mittlere Wert für die Zeitkonstante  $\tau_{\text{slow}}$  betrug  $30.2 \pm 2.8$  ms. (C) Die Gleichung (8) wurde an die  $P_{\text{slow}}$ -Funktionen in der Kontrolle ( $\circ$ ) und bei der Applikation von  $10 \mu\text{M}$  Arachidonyl CoA ( $\bullet$ ) angepasst. Bei der Anpassung wurden die  $V_{\text{n}}$ -Werte für einzelne Untereinheiten bestimmt. Der  $V_{\text{n}}$ -Wert in der Kontrolle betrug  $-79.9$  mV ( $k_{\text{n}}=10.9$  mV) und bei der Applikation von Arachidonyl CoA  $-76.0$  mV ( $k_{\text{n}}=10.0$ ). (D) Die Strom-Spannungs-Kennlinien sind bei der Bearbeitung der gemessenen Strom-Spuren, wie in Abb.33 (E, F) dargestellt, abgeleitet. Die Applikation von  $10 \mu\text{M}$  Arachidonyl CoA verschiebt die IV-Kurve nach links. Die Gleichung (5) wurde an die IV-Kurven angepasst. Der  $V_{\text{n}}$ -Wert in der Kontrolle betrug  $5$  mV ( $k_{\text{n}}=11.2$  mV) und bei der Applikation von Arachidonyl CoA  $-26.1$  mV ( $k_{\text{n}}=8.5$  mV).

Nach dem Waschen mit BSA konnte der Effekt von AA nicht wiederholt werden. Die Mittelwerte für 4 unabhängige Experimente sind in der Tabelle 12 (Spalte „2 Mg“) dargestellt.



**Abb. 42** Aktivierung des in *Xenopus*-Oozyten exprimierten hEAG1 durch 10  $\mu\text{M}$  AA. (A) [Lösung 14<sub>ex</sub> mit 2 mM Mg<sup>2+</sup>/Lösung 15<sub>in</sub>] Die Messung wurde in der „Inside-Out“ Konfiguration durchgeführt. Die Gleichung (7) ist an die Strom-Spuren angepasst. Die Werte für die Zeitkonstante  $\tau_{\text{slow}}$  und für  $P_{\text{slow}}$  sind daraus abgeleitet. (B) Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA beschleunigt die Aktivierungskinetik des Kanals. (C)  $P_{\text{slow}}$ -Werte sind vom Haltepotential abhängig und sind niedriger bei Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA (●) als in der Kontrolle (○). Die Gleichung (8) ist an die  $P_{\text{slow}}$ -Funktionen angepasst. Bei der Anpassung wurden die  $V_h$ -Werte für einzelne Untereinheiten abgeleitet. Der  $V_h$ -Wert verschiebt sich in Richtung negativerer Spannungen bei Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA: Der  $V_h$ -Wert betrug in der Kontrolle  $-102.4$  mV ( $k_h=24.5$  mV) und bei Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA  $-117.7$  mV ( $k_h=12.8$  mV). Die Anpassung der Gleichung (8) an die  $P_{\text{slow}}$ -Kurven für den in Oozyten exprimierten hEAG1 ist deutlich schwieriger als an die  $P_{\text{slow}}$ -Kurven für hEAG1-Kanäle in transfizierten CHO-Zellen. (D) Die Strom-Spannungs-Kennlinien sind bei der Bearbeitung der gemessenen Strom-Spuren, wie in Abb.33 (E, F) dargestellt, abgeleitet.

Um zu prüfen, ob die Veränderung von allen Parametern durch das frühere Öffnen des Kanals zu erklären ist, hatten wir den in *Xenopus*-Oozyten exprimierten hEAG1-Kanal in „Inside-Out“ Konfiguration nach dem Halten bei Vorpulsen von  $-100$  auf  $+20$  und auf  $+50$  mV depolarisiert. Falls es nur die Effekte der Verschiebung der Strom-Spannungs-Kennlinie bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA um 30 mV sind, sollten die  $\tau_{\text{slow}}$ -Werte bei der Applikation von AA bei  $+20$  mV mit den  $\tau_{\text{slow}}$ -Werten bei  $+50$  mV in der Kontrolle übereinstimmen. Die Messungen sind in der Tabelle 11 dargestellt. Die

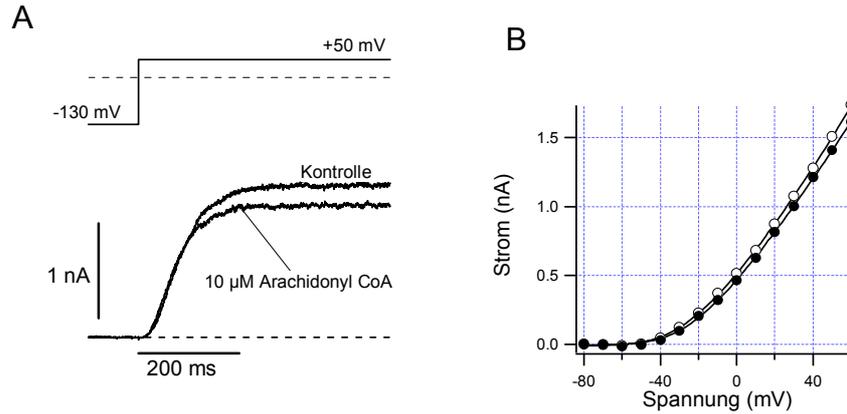
Mittelwerte bei der Applikation von AA bei +20 mV unterschieden sich nicht signifikant von den Mittelwerten bei +50 mV in der Kontrolle ( $P < 0.05$ ).

Tabelle 11 Aktivierung der in *Xenopus*-Oozyten exprimierten hEAG1 in „Inside-Out“ Konfiguration bei verschiedenen Depolarisationspulsen.

|                     | $\tau_{\text{slow}}$ bei +20 mV, ms<br>n=3 | $\tau_{\text{slow}}$ bei +50 mV, ms<br>n=3 |
|---------------------|--|--|
| Kontrolle           | 117.11±14.0                                | 79.0±12.0                                  |
| 10 $\mu\text{M}$ AA | 76.2±15.9                                  | 56.7±8.6                                   |

Bei einer Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Arachidonyl CoA in der „Inside-Out“ Konfiguration war der Effekt deutlich geringer (Abb. 43). Die Stromamplitude wurde in manchen Zellen nicht erhöht, in anderen nur wenig. Die Werte entsprachen nicht der Gauss-Verteilung. Die einzelnen geringen Erhöhungen der Stromamplitude wurden in diesem Fall als Median  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Deren Wert betrug  $1.1 \pm 6.5\%$  ( $n=7$ , bei der Depolarisationsspannung von +50 mV). Die IV-Kurven wurden in manchen Zellen nur wenig in Richtung der negativeren Spannungen, in den anderen nicht verschoben. Der ebenfalls als Median  $\pm$  Standardabweichung dargestellte Wert betrug hier  $0.0 \pm 4.9$  mV ( $n=7$ ). Die Applikation von Arachidonyl CoA in einer höheren Konzentration (40  $\mu\text{M}$ ) verstärkte die Wirkung nicht: Die als Median  $\pm$  Standardabweichung dargestellten Werte für die Erhöhung der Stromamplitude betragen  $0.0 \pm 13.1\%$  ( $n=5$ ), für die Verschiebung des  $V_h$ -Wertes  $5.8 \pm 7.2$  mV ( $n=5$ ). Die  $\tau_{\text{slow}}$ -Werte entsprachen der Gauss-Verteilung und wurden als Mittelwert  $\pm$  S.E.M. dargestellt.

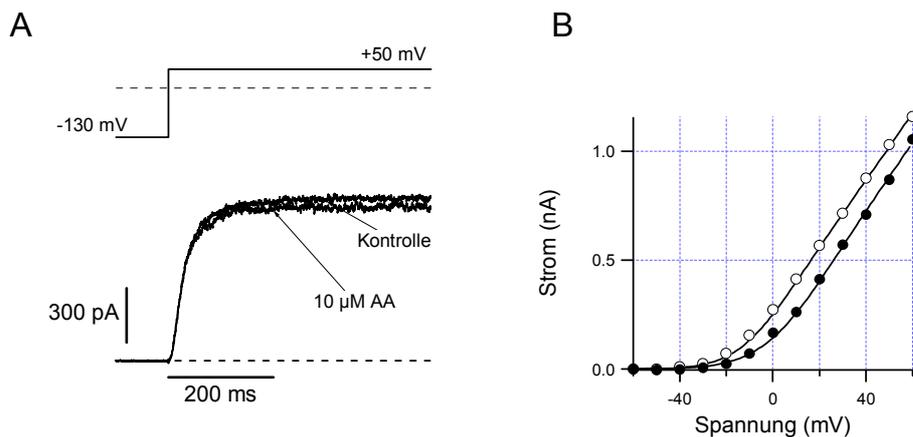
Der Unterschied zwischen den  $\tau_{\text{slow}}$ -Werten in der Kontrolle und denen bei einer Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Arachidonyl CoA war nicht signifikant ( $P > 0.05$ ):  $42.6 \pm 2.3$  ms in der Kontrolle ( $n=8$ ),  $36.3 \pm 2.5$  ms bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ( $n=7$ ). Die Mittelwerte für die Kontrolle und 40  $\mu\text{M}$  Arachidonyl CoA unterscheiden sich signifikant ( $P < 0.05$ ):  $32.6 \pm 0.8$  ms bei der Applikation von 40  $\mu\text{M}$  Arachidonyl CoA ( $n=5$ ). Das Verhältnis von  $\tau_{\text{slow}}$  bei der Applikation von 40  $\mu\text{M}$  Arachidonyl CoA zu  $\tau_{\text{slow}}$  in der Kontrolle betrug 0.76. Diese Beschleunigung der Aktivierung ist deutlich geringer als bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA:  $\tau_{\text{slow AA}} / \tau_{\text{slow Kont.}}$  betrug 0.40. Daraus lässt sich schließen, dass die Wechselwirkung des Kanals mit Fettsäuren auf der Außenseite der Membran stattfindet.



**Abb. 43** Die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Arachidonyl CoA hat keinen signifikanten Effekt auf den in *Xenopus*-Oozyten exprimierten hEAG1.

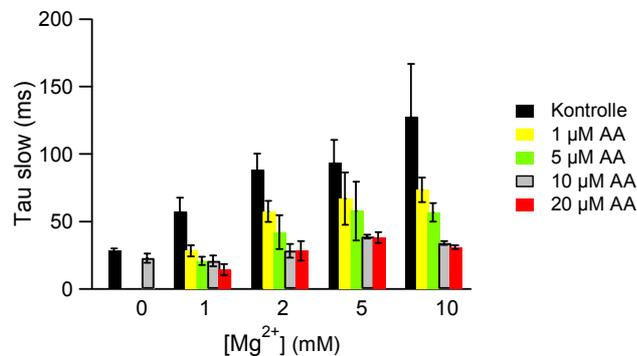
(A) [Lösung  $14_{\text{ex}}$  2 mM  $\text{Mg}^{2+}$ /Lösung  $15_{\text{in}}$ ] Die Messung wurde in „Inside-Out“ Konfiguration durchgeführt. Die Strom-Spuren bei Depolarisation auf +50 mV ausgehend von Haltepotentialen im Bereich -130 - -40 mV unterscheiden sich kaum in der Kontrolle und bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Arachidonyl CoA.

(B) Die Strom-Spannungs-Kennlinien sind bei der Bearbeitung der gemessenen Strom-Spuren, wie in Abb. 9 (A) dargestellt, abgeleitet.



**Abb. 44** Die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA bei Abwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen in extrazellulärer Lösung hat keinen Effekt auf den in *Xenopus*-Oozyten exprimierten hEAG1.

(A) [Lösung  $14_{\text{ex}}$ /Lösung  $15_{\text{in}}$ ] Die dargestellten Strom-Spuren wurden bei der Depolarisation auf +50 mV ausgehend von dem für 5 s angelegten Haltepotential von -130 mV gemessen. Die Messung wurde in „Inside-Out“ Konfiguration durchgeführt. (B) Die IV-Kurven sind bei der Bearbeitung der gemessenen Strom-Spuren, wie in Abb. 9 (A) dargestellt, abgeleitet.



**Abb. 45** Die Aktivierungskonstanten  $\tau_{\text{slow}}$  für den in *Xenopus*-Oozyten exprimierten hEAG1 in der Kontrolle sowie bei der Applikation von AA zeigen eine Abhängigkeit von externen  $\text{Mg}^{2+}$ - und AA-Konzentrationen. Die Zeitkonstanten wurden bei der Anpassung der Gleichung (7) an die Stromspuren wie in Abb. 42 (A, B) bestimmt. Die Anzahl der gemessenen Zellen bei jeder  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration ist aus Tabelle 12 und dem Text ersichtlich.

Der Effekt von applizierten AA in der „Inside-Out“ Patch-Konfiguration wurde bei 2 mM Magnesium in extrazellulären Lösungen registriert (Abb. 42). Abb. 44 stellt die Messungen bei 0  $\text{Mg}^{2+}$  dar. Es wurde kein Effekt auf hEAG1-Ströme bei einer Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA in 6 Zellen beobachtet: Die Stromamplitude war nicht erhöht, die IV-Kurven wurden nicht verschoben, die Unterschiede zwischen den  $\tau_{\text{slow}}$ -Werten in der Kontrolle ( $28.1 \pm 1.9$  ms) und denen bei einer Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA ( $22.9 \pm 3.45$  ms) waren nicht signifikant ( $P > 0.05$ ).

Bei Zugabe von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen in einer extrazellulären Lösung ab einer Konzentration von 1 mM verlangsamte sich die Aktivierungskinetik des Stromes. Die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA beschleunigte die Aktivierungskinetik und erhöhte die Stromamplitude am Ende der stabilen Phase. Der  $V_n$ -Wert wurde in Richtung negativerer Spannungen verschoben (Tabelle 12). Abb. 45 zeigt die Abhängigkeit der Aktivierungskinetik ( $\tau_{\text{slow}}$  als Parameter) von  $\text{Mg}^{2+}$ - sowie von AA-Konzentrationen. Bei zunehmender Konzentration von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen verlangsamte sich die Aktivierung, bei zunehmender Konzentration von AA wurde sie dagegen beschleunigt.

Tabelle 12 Aktivierung des in *Xenopus*-Oozyten exprimierten hEAG1 gemessen in „Inside-Out“ Konfiguration bei einer Applikation von 10  $\mu$ M AA.

|   | 1 Mg<br>n=3    | 2 Mg<br>n=4    | 5 Mg<br>n=3    | 10 Mg<br>n=3   |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Erhöhung der Stromamplitude bei +50 mV,<br>%                                      | 54.9±17.3      | 63.0±15.1      | 54.1±7.8       | 59.1±8.5       |
| Erhöhung der Stromamplitude bei +20 mV,<br>%                                      | 62.8±1.3       | 76.6±1.0       | 79.3±14.0      | 71.3±19.7      |
| Verschiebung des $V_n$ -Wertes, mV  | -13.3±7.7      | -24.4±3.0      | -28.1±9.2      | -29.4±8.0      |
| $\tau_{\text{slow AA}}/\tau_{\text{slow Kont.}}$<br>bei Depolarisation auf +50 mV | 0.47±0.07<br>* | 0.40±0.11<br>* | 0.48±0.04<br>* | 0.24±0.04<br>* |

\* bedeutet signifikanten Unterschied zwischen  $\tau_{\text{slow AA}}$  und  $\tau_{\text{slow Kont.}}$  (P<0.05)

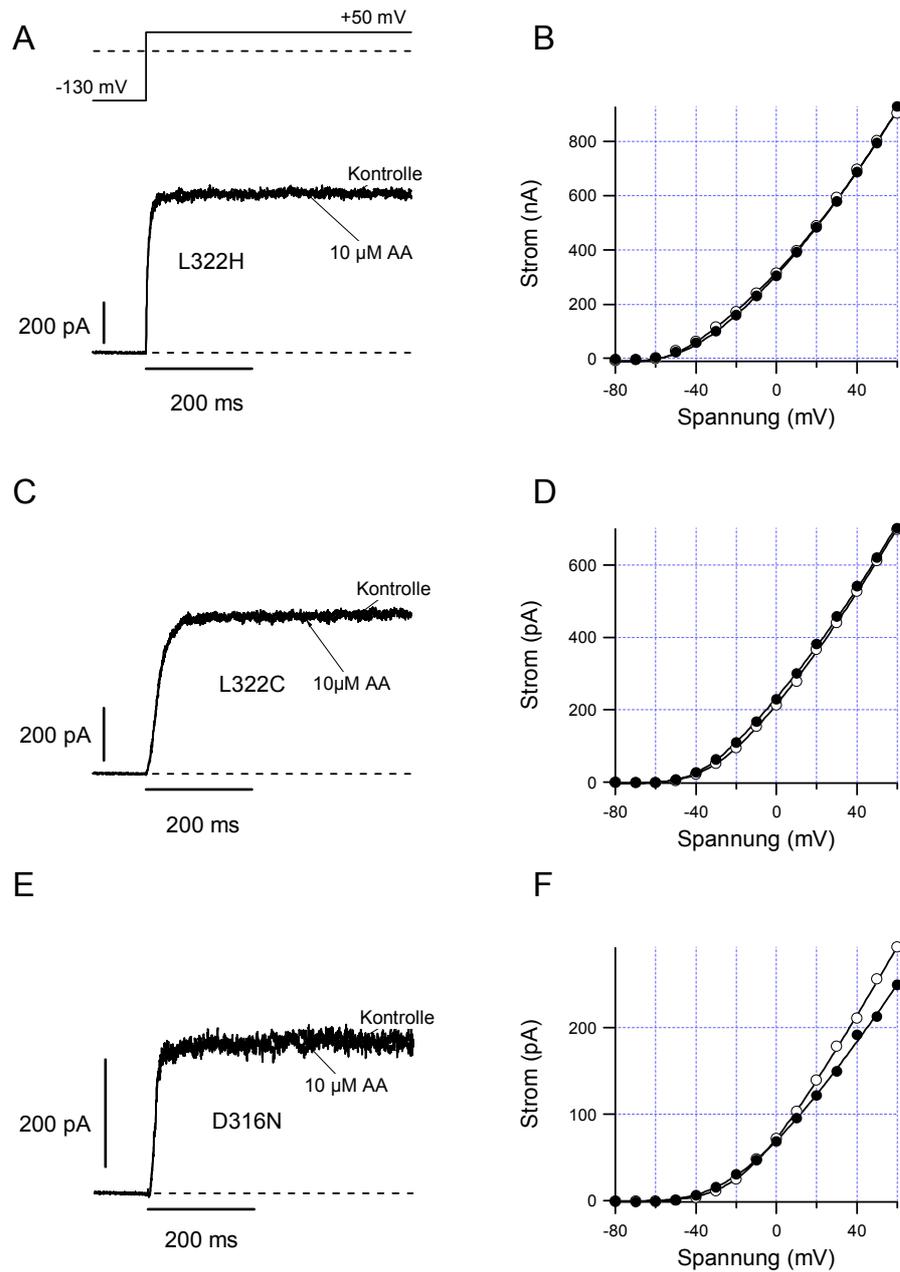
Um die molekularen Mechanismen einer solchen Magnesium-Abhängigkeit zu untersuchen, haben wir Mutanten getestet, die eine veränderte Aktivierungskinetik zeigten. Solche Mutanten waren vom EAG1-Kanal des Rindes (bEAG1) im Labor vorhanden (Schönherr et al., 1999; 2002). Der bEAG1-Kanal zeigte eine mit hEAG1 vergleichbare Aktivierung bei der Applikation von AA in „Inside-Out“-Patches bei 2 mM externem  $\text{Mg}^{2+}$  (Tabelle 13).

Tabelle 13 Aktivierung der in *Xenopus*-Oozyten exprimierten bEAG1 und bEAG1-dEAG in „Inside-Out“ Konfiguration bei einer Applikation von 10  $\mu$ M AA.

|   | bEAG1<br>n=5   | bEAG1-dEAG<br>n=4 |
|---|----------------|-------------------|
| Erhöhung der Stromamplitude bei +50 mV, %   | 46.5±21.8      | 50.4±28.9         |
| Verschiebung des $V_n$ -Wertes, mV  | -18.4±7.4      | -4.9±1.1          |
| $\tau_{\text{slow AA}}/\tau_{\text{slow Kont.}}$<br>bei Depolarisation auf +50 mV | 0.69±0.05<br>* | 0.70±0.09<br>*    |

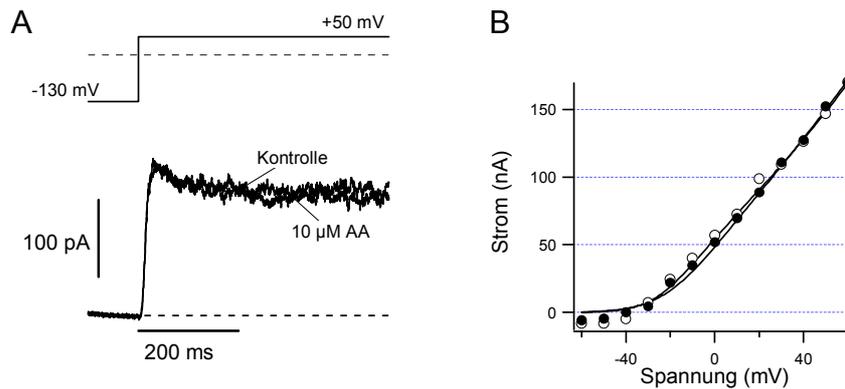
\* bedeutet signifikanten Unterschied zwischen  $\tau_{\text{slow AA}}$  und  $\tau_{\text{slow Kont.}}$  (P<0.05)

Die Mutation L322H beschleunigt die Aktivierung des bEAG-Kanals. Die Aktivierung der Mutante ist weniger abhängig von den Vorpulsspannungen und geringer empfindlich gegenüber extrazellulärem Magnesium als die des WT-bEAG-Kanals (Schönherr et al., 1999). Die Aktivierung der L322C-Mutante unterscheidet sich von der



**Abb. 46** Die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA hat keinen Effekt auf die in *Xenopus*-Oozyten exprimierte Mutanten des bEAG1-Kanals.

[Lösung 14<sub>ex</sub> mit 2 mM Mg<sup>2+</sup>/Lösung 15<sub>in</sub>] Die links (A, C, E) dargestellten Strom-Spuren wurden bei der Depolarisation auf +50 mV ausgehend von dem für 5 s angelegten Haltepotential von -130 mV gemessen. Die Messungen wurden in „Inside-Out“ Konfiguration durchgeführt. Rechts (B, D, F) sind die der Gleichung (5) angepassten IV-Kurven dargestellt. (A), (B) Mutante L322H; (C), (D) Mutante L322C; (E), (F) Mutante D316N.



**Abb. 47** Die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA hat keinen Effekt auf den in *Xenopus*-Oozyten exprimierten *Drosophila* EAG.

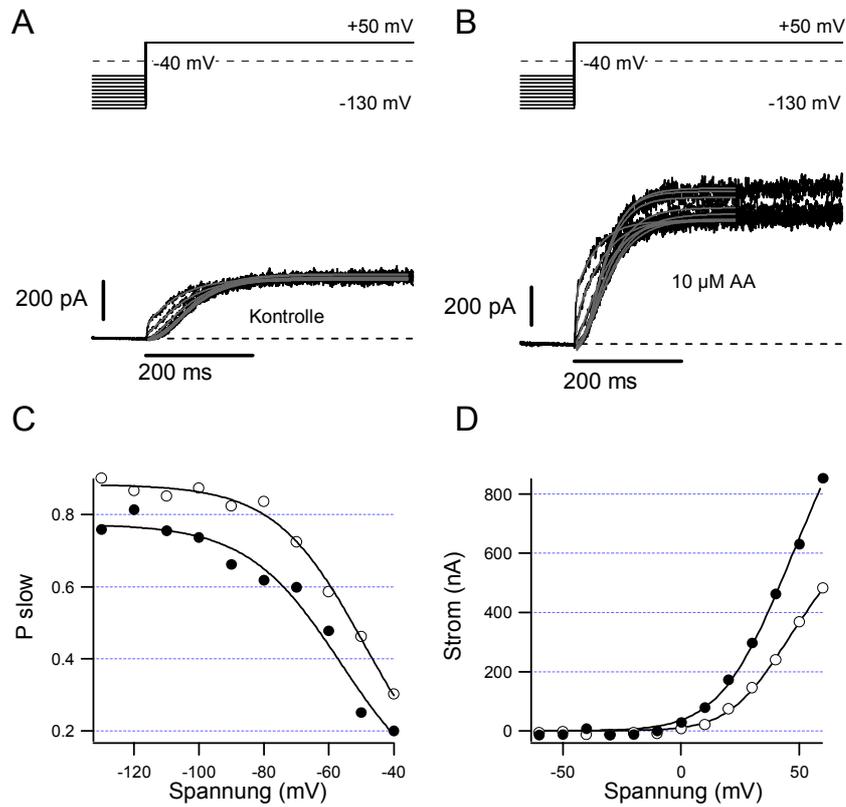
(A) [Lösung 14<sub>ex</sub> mit 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$ /Lösung 15<sub>in</sub>] Die dargestellten Strom-Spuren wurden bei der Depolarisation auf +50 mV ausgehend von dem für 5 s angelegten Haltepotential von -130 mV gemessen. Die Messungen wurden in „Inside-Out“ Konfiguration durchgeführt. (B) Die Gleichung (5) ist an die IV-Kurven angepasst.

L322H-Mutante durch eine deutlichere Vorpulsabhängigkeit (Schönherr et al., 2002), die Aktivierungskinetik von L322C ist jedoch schneller als die von WT-bEAG. Die D316N-Mutante zeigt eine deutliche Vorpulsabhängigkeit, ist jedoch von externen  $\text{Mg}$ -Konzentrationen kaum zu beeinflussen (Schönherr, persönliche Mitteilung). 10  $\mu\text{M}$  AA wurde allen Mutanten bei 2 mM externem  $\text{Mg}^{2+}$  appliziert. Die Applikation von AA hatte keinen Effekt (Abb. 46) in je 3 gemessenen Zellen jeder Mutante.

Der Grund dafür könnte die schnelle Aktivierungskinetik aller drei Mutanten sein: L322H  $\tau_{\text{slow}}=8.0\pm 1.5$  ms (n=3); L322C  $\tau_{\text{slow}}=14.6\pm 1.7$  ms (n=6); D316N  $\tau_{\text{slow}}=13.1\pm 2.2$  ms (n=8).

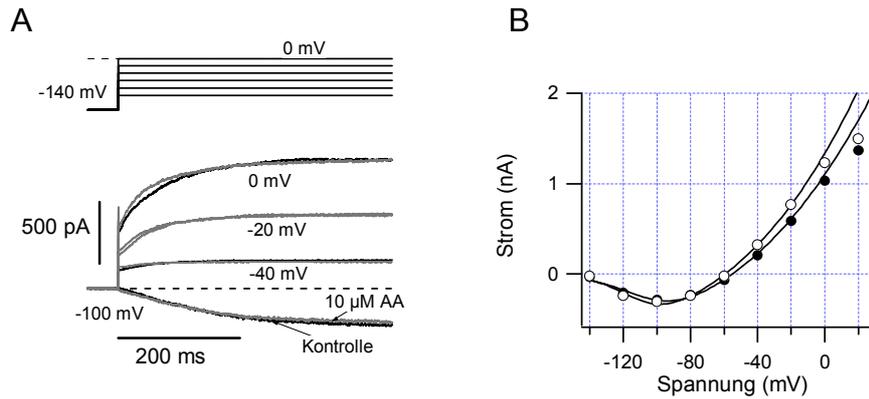
Der *Drosophila* EAG-Kanal aktiviert ebenfalls wesentlich schneller als humane und bovine Kanäle: Seine Aktivierungskonstante ist  $7.2\pm 1.9$  ms bei Depolarisation auf +50 mV (n=3; 2 mM externen  $\text{Mg}^{2+}$ ). Die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA auf den dEAG-Kanal bei 2 mM externem Magnesium hatte keinen Effekt in 5 verschiedenen Messungen (Abb. 47).

Um die Lokalisation der vermuteten Bindungsstelle mit AA zu prüfen, wurde der C-Terminus der *Drosophila*-EAG auf den bEAG1-Kanal übertragen. Die Übertragung des C-Terminus der *Drosophila*-EAG hat die Empfindlichkeit des bEAG1 auf AA nicht verändert (Abb. 48, Tabelle 13).



**Abb. 48** Die Übertragung des C-Terminus von dEAG auf bEAG1 verändert die Empfindlichkeit von bEAG1-Kanäle gegenüber 10  $\mu\text{M}$  AA nicht.

(A) [Lösung 14<sub>ex</sub> mit 2 mM Mg<sup>2+</sup>/Lösung 15<sub>in</sub>] Die Aktivierungskinetik des Stromes ist wie die beim WT bEAG1-Kanal: Die Zelle wurde nach einem jeweils für 5 s angelegten Haltepotential von -130 bis -40 mV auf eine Spannung von +50 mV depolarisiert. Die Messungen wurden in „Inside-Out“ Konfiguration durchgeführt. Die Gleichung (7) ist an die Stromspuren angepasst. Der mittlere Wert für die daraus bestimmte Zeitkonstante  $\tau_{\text{slow}}$  betrug  $50.0 \pm 1.8$  ms. (B) Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA beschleunigte die Aktivierungskinetik des Kanals. Der mittlere Wert für die Zeitkonstante  $\tau_{\text{slow}}$  betrug  $38.1 \pm 4.0$  ms. (C) Die P<sub>slow</sub>-Wert ist vom Haltepotential abhängig und ist niedriger bei Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA (●) als in der Kontrolle (○). Die Gleichung (8) ist an die P<sub>slow</sub>-Funktionen angepasst. Der V<sub>n</sub>-Wert verschiebt sich in Richtung negativerer Spannungen bei Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA: Der V<sub>n</sub>-Wert betrug in der Kontrolle -49.2 mV ( $k_n=13.6$  mV) und bei Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA -56.3 mV ( $k_n=14.4$  mV). (D) Die Strom-Spannungs-Kennlinien sind bei der Bearbeitung von den gemessenen Stromspuren, wie in Abb. 33 (E, F) dargestellt, abgeleitet. Die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA verschiebt die IV-Kurve leicht nach links.



**Abb. 49** Die Entfernung des N-Terminus macht den hEAG1-Kanal unempfindlich gegenüber der Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  AA. (A) [Lösung 14<sub>ex</sub> mit 2 mM Mg<sup>2+</sup>/Lösung 15<sub>in</sub>] Ausgehend von einem für 1 s angelegten Haltepotential von -140 mV wurde die Zelle auf Spannungen von -130 mV bis +20 mV in 20 mV-Schritten depolarisiert. Dargestellt sind die Strom-Spuren bei Depolarisationsspannungen von -100, -40, -20 und 0 mV in der Kontrolle und bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA. (B) Die hieraus resultierenden Daten (A) sind als IV-Kurven dargestellt.

Die Deletion von 2-190 Aminosäuren des hEAG1-Kanals (Entfernung des N-Terminus) hatte dagegen einen deutlichen Effekt. Die Mutante zeigte ein verändertes Schaltverhalten und war gegenüber der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA unempfindlich (Abb. 49).

## 4. Diskussion

### 4.1 Der Block von EAG-Kanälen durch Imipramin

In dieser Arbeit zeigen wir, dass das trizyklische Antidepressivum Imipramin ein potenter Blocker der humanen EAG-Kanäle ist. Bei einer Depolarisation auf +50 mV liegen die  $IC_{50}$ -Werte für den hEAG1-Kanal bei ca. 3  $\mu$ M. Der hEAG2-Kanal ist weniger empfindlich. Der  $IC_{50}$ -Wert beträgt 33.1  $\mu$ M. Die Hill-Koeffizienten von ca. 1 weisen auf eine stöchiometrische Bindung von je einem Imipramin-Molekül pro Kanal hin. Sowohl der Block des hEAG1- als auch der Block des hEAG2-Kanals ist spannungsabhängig.

Imipramin ist als potenter Blocker von ELK-Kanälen des Nematoden *Caenorhabditis elegans* und von murinen EAG1-Kanälen beschrieben (Weinshenker et al., 1999). Diese Gene wurden in *Xenopus*-Oozyten exprimiert; die Ströme wurden mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gemessen. Der Block auf +40 mV war konzentrationsabhängig: Als  $IC_{50}$ -Werte wurden 16  $\mu$ M für die ELK-Kanäle und 55  $\mu$ M für die mEAG1-Kanäle gemessen. Unsere Ergebnisse bestätigen die Stöchiometrie der Bindung von je einem Imipramin-Molekül pro EAG1-Kanal. Die mit der Patch-Clamp-Methode gemessenen  $IC_{50}$ -Werte für hEAG1-Kanäle in IGR1-Zellen und in transfizierten CHO-Zellen sind jedoch wesentlich kleiner.

Teschemacher und Kollegen stellen dar, dass hERG1-Kanäle durch Imipramin geblockt werden (Teschemacher et al., 1999). Diese Experimente wurden mit der Patch-Clamp-Methode in transfizierten CHO-Zellen durchgeführt. Die hERG „tail“-Ströme wurden bei einer Spannung von +20 mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 3.4  $\mu$ M reversibel geblockt. Dies weist darauf hin, dass hEAG1- und hERG1-Kanäle gegenüber Imipramin vergleichbar empfindlich sind, wenn die Messungen in gleichen Systemen (transfizierte CHO-Zellen) durchgeführt werden. Der erhöhte  $IC_{50}$ -Wert für mEAG1-Kanäle, gemessen von Weinshenker und Kollegen (Weinshenker et al., 1999), ist wahrscheinlich auf das dort verwendete Expressionssystem zurückzuführen. Auch andere Kanäle zeigen höhere  $IC_{50}$ -Werte, wenn anstelle der Patch-Clamp-Methode mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gemessen wird. Der Block des hERG-Kanals mit Clofilium und LY 97241, gemessen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme, zeigt beispielsweise einen um den Faktor 10 höheren  $IC_{50}$ -Wert (Suessbrich et al., 1997; Gessner und Heinemann, 2003).

Die Ergebnisse mit transfizierten CHO-Zellen sprechen für einen „Offen-Kanal-Block“-Mechanismus, bei dem Imipramin in den geöffneten Kanal eintritt. Die für den „Offen-Kanal-Block“-Mechanismus typische positive Korrelation zwischen der

Blockgeschwindigkeit und der Imipraminkonzentration hat exponentiellen Charakter. Dies ist auf die relativ „langsame“ Aktivierungszeit des hEAG1-Kanals zurückzuführen. Die Spannungsabhängigkeit des Blocks wird nicht durch die Ladung der Imipramin-Moleküle, sondern durch das Schaltverhalten des Kanals verursacht. Die Dissoziationsgeschwindigkeit des Imipramins beim hEAG1-Kanal ist von der Blocker-Konzentration unabhängig. Unsere Messungen ergaben, dass sog. „tail“-Ströme in der Kontrolle und bei der Applikation von Imipramin keinen typischen „tail-crossover“ für den „Foot-in-the-door“-Block zeigen (Valenzuela et al., 1995; Delpon et al., 1996). Die Blockkonstante beträgt ca. 30 ms. Dies stimmt mit der Aktivierungskonstante für den hEAG1-Kanal in unseren Messungen überein. Das kann der Grund dafür sein, dass die „tail“-Ströme keinen typischen „tail-crossover“ zeigen, obwohl der „Foot-in-the-door“-Block-Mechanismus nicht ausgeschlossen ist.

Um zu prüfen, ob Imipramin von der Außen- oder Innenseite der Membran den hEAG1-Kanal blockt, wurde der Wirkstoff auf die Außenseite und auf die Innenseite der *Xenopus*-Oozyten-Membran appliziert. Es wurde in beiden Fällen ein schneller, reversibler, gleich starker Block beobachtet. Dies schließt die Möglichkeit, dass das Imipramin-Molekül von beiden Seiten in den Kanal eintreten kann, nicht aus. Ein derartiger Mechanismus wurde bereits für den Imipramin-Block im Kaliumkanal des M-Typs von Cuellar-Quintero und Kollegen postuliert (Cuellar-Quintero et al., 2001). Solche Ergebnisse lassen auf die Existenz von zwei Bindestellen (auf der Innen- und auf der Außenseite der Membran) für Imipramin am hEAG1-Kanal schließen.

Der hEAG2-Kanal ist weniger empfindlich gegenüber Imipramin als der hEAG1-Kanal. Die gemessenen  $IC_{50}$ -Werte unterschieden sich um den Faktor 10 bei einer Spannung von +50 mV. Verschiedene Empfindlichkeiten der hEAG1- und hEAG2-Kanäle konnten auch für die Kaliumkanalblocker Terfenadin und Quinidin vor kurzem beschrieben werden (Ju und Wray, 2002; Schönherr et al., 2002). Wir testeten die im Labor vorhandenen Chimären von hEAG1- und hEAG2-Kanälen sowie die Doppelmutante hEAG1 S436T•V437I auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Imipramin. Gessner und Kollegen (Gessner et al., 2004) arbeiteten heraus, dass Clofilium ein potenter Blocker des hEAG1-Kanals ist. hEAG2 ist um den Faktor 150 weniger empfindlich. Zwei Aminosäuren im inneren Porenbereich von hEAG1 (S436, V437) sowie eine Aminosäure in einer seitlichen Kavität (A453) wurden als besonders wichtig für die Clofilium-Bindung in hEAG1 identifiziert. Auch Quinidin bindet wahrscheinlich in sehr ähnlicher Weise wie Clofilium (Gessner et al., 2004).

Aufgrund unserer Daten ist sicher, dass die Aminosäuren S436 und V437 keine Rolle für die Wechselwirkung des hEAG1-Kanals mit dem Imipramin-Molekül spielen.

Die Doppelmutante S436T•V437I war ähnlich empfindlich gegenüber Imipramin wie der hEAG1-Wildtyp. Dies bedeutet, dass die Bindestelle für Imipramin nicht mit der Bindestelle für Clofilium oder Quinidin übereinstimmt.

Die Porenchimären E2-p1 und E1-p2 (Abb. 31) haben eine um den Faktor 3 geringere Empfindlichkeit gegenüber Imipramin als der hEAG1-Kanal (bei Depolarisation auf +50 mV): Dies konnte sowohl auf den ausgetauschten Porenbereich als auch auf das veränderte Schaltverhalten der Chimären zurückgeführt werden. Die Empfindlichkeit der Chimäre E1-c2 war um den Faktor 10 geringer als die vom hEAG1-WT (bei Depolarisation auf +50 mV). Das spricht dafür, dass die Imipramin-Bindestelle im Bereich zwischen den Segmenten S1 und S6 liegt.

Unsere Experimente zeigen, dass Imipramin ein potenter Blocker des hEAG1-Kanals ist. Der Block ist spannungsabhängig und entspricht dem „Offen-Kanal-Block“-Mechanismus. Imipramin bindet an hEAG1-Kanal offensichtlich an anderer Stelle als die Blocker Clofilium oder Quinidin.

## 4.2 Ionenkanäle der Melanomzellen und Proliferation

### 4.2.1 Pharmakologie der Ionenkanäle in IGR1- und IGR39-Melanomzellen

Um zu untersuchen, welche Kanäle für die Proliferation der IGR1 und IGR39-Melanomzellen wichtig sind, haben wir spezifische Blocker für die in diesen Zellen vorhandenen Kanäle gesucht.

hEAG1-Kanäle sind in melanomalen IGR1-Zellen sowie in anderen Krebszellen vorhanden (Meyer und Heinemann, 1998; Meyer et al., 1999; Pardo et al., 1999; Ouadid-Ahidouch et al., 2001). In IGR39-Zellen ist dieser Kanal jedoch nicht präsent (Meyer et al., 1999). Der hEAG1-Kanal ist gegenüber Imipramin empfindlich (s.4.1). Der hEAG1-Strom kann auch von Substanzen, die als Blocker von Kanälen anderer Klassen bekannt sind (z.B. Chloridkanal Antagonist Niflumsäure und Calciumkanal Antagonist Mibefradil), inhibiert werden (Robertson et al., 1996; Liu et al., 1999). In dieser Arbeit wird dargestellt, wie empfindlich hEAG1-Kanäle auf Chloridkanalblocker wie Flufenaminsäure, NPPB und Tamoxifen sind. Bei einer Depolarisation von +20 mV konnte der hEAG1-Kanal mit 50  $\mu$ M Tamoxifen, 300  $\mu$ M Flufenaminsäure und 150  $\mu$ M NPPB fast vollständig geblockt werden.

Der in IGR39-Zellen vorhandene, spannungsabhängige, auswärtsgleichrichtende Kaliumkanal kann mit Imipramin geblockt werden. Bei Depolarisationsspannungen von -20 bis +50 mV ist der Block spannungsunabhängig, der  $IC_{50}$ -Wert betrug 6.4  $\mu$ M. Sehr

ähnliche Empfindlichkeiten gegenüber Imipramin wurden auch für verschiedene endogene Kaliumströme beschrieben, etwa für einen auswärtsgleichrichtenden Kaliumstrom in Rattenneuronen ( $IC_{50}$ -Wert 6.8  $\mu$ M) (Wooltorton und Mathie, 1993).  $IC_{50}$ -Werte von 7  $\mu$ M bei einem spannungsunabhängigen Block wurden für neuronale Kaliumströme des A- und M-Typs berichtet (Kuo, 1998; Cuellar-Quintero et al., 2001).

Calcium-regulierte Kaliumkanäle sind sowohl in IGR1- als auch in IGR39-Zellen vorhanden (Meyer et al., 1999; Nilius und Wohlrab, 1992; Nilius et al., 1993), die Identität dieser Kanäle ist aber nicht eindeutig bekannt. mRNA wurde nachgewiesen für hIK-, hSK1- und hSK2-Kanäle (Meyer et al., 1999; Dr. K. Schönherr, persönliche Mitteilung). Die Messungen in IGR1-Zellen ergaben, dass die Kanäle unempfindlich gegenüber Apamin und d-Tubocurarin sind. ChTX und Clotrimazol inhibieren die  $K_{Ca}$ -Ströme. Imipramin ist als Blocker von  $K_{Ca}$ -Kanälen in Neuronen der Wirbelsäule beschrieben worden (Kamatchi und Ticku, 1991). Terstappen und Kollegen (Terstappen et al., 2001) untersuchten den Block von hSK3 (die Apamin-insensitive  $K_{Ca}$ -Kanäle) in transfizierten CHO-Zellen mit Imipramin und anderen struktur-ähnlichen trizyklischen Antidepressiva. Alle getesteten Substanzen inhibierten den hSK3-Strom. Der  $IC_{50}$ -Wert für Imipramin betrug 44  $\mu$ M. Unsere Experimente zeigen, dass  $K_{Ca}$ -Kanäle von hIK-, hSK1- und hSK2-Gruppen mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 13  $\mu$ M im Bereich der Spannungen von -30 mV bis +20 mV gegenüber Imipramin ebenfalls empfindlich sind. Imipramin kann als potenter Blocker für  $K_{Ca}$ -Kanäle eingesetzt werden.

Die Chloridkanalblocker Flufenaminsäure und NPPB in einer Konzentration von 300  $\mu$ M und 150  $\mu$ M verursachen ebenfalls einen 90% Block der  $K_{Ca}$ -Kanäle in IGR1-Zellen.

Wie in vielen anderen Zelltypen sind auch in melanomalen Zellen Volumen-aktivierte Chloridkanäle vorhanden (Nilius et al., 1994). Die  $Cl_{Vol}$ -Kanäle in IGR1- und IGR39-Zellen zeigen ebenfalls Empfindlichkeit gegenüber Imipramin. In IGR1-Zellen liegen die  $IC_{50}$ -Werte für Spannungen von -100 und +100 mV zwischen 12 und 25  $\mu$ M. Die Empfindlichkeit von  $Cl_{Vol}$ -Kanälen gegenüber Imipramin ist zum ersten Mal in unserer Arbeit beschrieben worden (Gavrilova-Ruch et al., 2002).

#### 4.2.2 Proliferation der IGR1-Zellen

Um die Rolle der oben beschriebenen Kanalgruppen bei der Proliferation der Melanomzellen zu untersuchen, hatten wir verschiedene Wirkstoffe getestet. Um deren Effekte zu vergleichen, wurde zunächst das Ruhepotential der Zellen gemessen. In unsynchronisierten IGR1-Zellen betrug das Ruhepotential -28 mV, wenn die Messungen

mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien intrazellulären Lösung durchgeführt wurden. Unsere Messungen in IGR1-Zellen stimmen mit dem Ergebnis von Nilius und Kollegen überein: Sie ergaben bei proliferierenden IGR1-Zellen ein Ruhepotential von -20 bis -30 mV (Nilius et al., 1990).

Für den spannungsabhängigen Block von hEAG1-Kanälen wurde ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 15  $\mu\text{M}$  für das Potential -30 mV zugrunde gelegt. Auf diesem Potential wurden  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Ströme mit gleichen Imipraminkonzentrationen zu 50 % geblockt. ChTX blockt spezifisch  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanäle spannungsunabhängig mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 2.5 nM. hEAG1-Kanäle sind jedoch gegenüber 500 nM ChTX unempfindlich. Weil die Proliferation von IGR1-Zellen bei hohen ChTX-Konzentrationen nicht beeinflusst wurde, ist eine tragende Rolle von  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanälen für das Wachstum der IGR1-Zellen ausgeschlossen. Unsere Befunde stimmen mit vielen anderen Untersuchungen überein: Der Block von ChTX-empfindlichen  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanälen beeinflusst die Proliferation von verschiedenen Krebszellen nicht; der Block von spannungsabhängigen Kaliumkanälen inhibiert jedoch die Zellteilung (Lepple-Wienhues et al., 1996; Yao und Kwan, 1999; Fraser et al., 2000). Ein gemeinsamer Beitrag beider Kaliumkanaltypen für die Proliferation ist dabei jedoch nicht ausgeschlossen.

Um herauszufinden, ob der inhibierende Effekt von Imipramin auf die Proliferation von IGR1-Zellen dem Block von  $\text{Cl}_{\text{Vol}}$ -Kanälen zugeschrieben werden kann, hatten wir die Wirkstoffe Pamonsäure und DIDS eingesetzt. Beide Stoffe blocken  $\text{Cl}_{\text{Vol}}$ -Kanäle und haben keinen Effekt auf hEAG1-Kanäle. Pamonsäure reduziert den  $\text{Cl}_{\text{Vol}}$ -Strom in IGR1-Zellen mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 69  $\mu\text{M}$  bei -30 mV, DIDS mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 92  $\mu\text{M}$ . Die Proliferation von IGR1-Zellen wurde unter dem Einfluss von 500  $\mu\text{M}$  Pamonsäure nicht beeinträchtigt. Dies bestätigt, dass Chloridkanäle keine entscheidende Rolle für die Proliferation der IGR1-Zellen spielen. Der inhibierende Effekt von DIDS kann auf deren Einfluss auf intrazelluläre ATP-Konzentration zurückgeführt werden (Wundergem et al., 2001). Aufgrund unserer Ergebnisse können wir jedoch einen Beitrag der  $\text{Cl}_{\text{Vol}}$ -Kanäle zur Proliferation der IGR1-Zellen nicht vollständig ausschließen. Der inhibierende Effekt von Imipramin kann durch einen kombinierten Block von Chlorid- und Kaliumkanälen verursacht werden. Bei dem Übergang von G1 zur S-Phase des Zellzyklus nimmt das Volumen der Zelle zu: Der Efflux von KCl ist eine Voraussetzung für die spätere regulierte Abnahme des Zellvolumens, sog. RVD (regulatory volume decrease) (Nilius et al., 1996). Fatherazi und Kollegen stellen dar, dass in hematopoietischen Stammzellen (HSC) der gemeinsame Block von Chlorid- und Kaliumkanälen den RVD reduziert, wobei der einzelne Block von Chlorid- oder Kaliumströmen keinen Einfluss hat (Fatherati et al., 1994). Die Größe der

IGR1-Zellen verändert sich während der G0/S-Übergangsphase (Gavrilova-Ruch et al., 2002). Somit kann die Wirkung von Imipramin als kombinierter Blocker von  $\text{Cl}_{\text{Vol}}^-$  und  $\text{K}^+$ -Strömen nicht ausgeschlossen werden.

Ein nicht-selektiver Kationkanal mit einer Leitfähigkeit von 20 pS wurde in IGR1-Zellen beschrieben (Böhm und Nilius, 1990; Nilius und Wohlrab, 1992). Dieser Kanal öffnet sich bei Spannungen über 0 mV und ist wenig empfindlich gegenüber Imipramin. Wir vermuten, dass das Öffnen dieses Kanales bei starker Depolarisierung der Zellmembran und beim Anschwellen der Zelle stattfindet. Beim Ruhepotential der melanomalen Zelle und unter normalen osmotischen Bedingungen ist ein Beitrag dieses Kanals für die Proliferation nahezu ausgeschlossen.

Entweder der Block von hEAG1-Kanälen durch Imipramin oder ein kombiniertes Ausschalten von  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$ -Kanälen durch diesen Wirkstoff inhibiert die Proliferation von IGR1-Zellen. Imipramin ist jedoch bekannt für seinen apoptotischen Effekt in eukaryotischen Zellen (Xia et al., 1999). Der mit IGR1-Zellen durchgeführte Test ergab, dass die mit Imipramin induzierte Apoptose erst ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  nachweisbar wird (Gavrilova-Ruch et al., 2002). Dies macht einen allgemeinen zytotoxischen Effekt von Imipramin unwahrscheinlich und deutet vielmehr auf eine exklusive Rolle von hEAG1-Kanälen im Zellzyklus der IGR1-Zellen hin.

#### 4.2.3 Proliferation der IGR39 -Zellen

IGR39-Melanomzellen exprimieren keine hEAG-Kanäle und reagieren in ihrer Proliferation nicht auf niedrige Konzentrationen von Imipramin bis 20  $\mu\text{M}$ . Erst ab 40  $\mu\text{M}$  ist eine gehemmte Proliferation zu beobachten, was wahrscheinlich auf Apoptose-Effekte zurückgeht. Unsynchronisierte IGR39-Zellen haben ein Ruhepotential von -30 mV in Anwesenheit von intrazellulärem Calcium. Der spannungsabhängige auswärtsgleichrichtende Kaliumkanal ist dabei offen. Der Kanal ist gegenüber Imipramin empfindlich ( $\text{IC}_{50}$ -Wert von 6.8  $\mu\text{M}$ ). Offenbar trägt dieser Kanal nicht zu Proliferation bei. Die Empfindlichkeit von  $\text{K}_{\text{Ca}}$  und  $\text{Cl}_{\text{Vol}}^-$ -Kanälen auf Imipramin in IGR39-Zellen ist mit der in IGR1-Zellen vergleichbar.

500 nM ChTX inhibiert die Proliferation von IGR39-Zellen zu 50 %. Da ChTX ein spezifischer Blocker von  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanälen ist, tragen diese Kanäle zur Proliferation von IGR39-Zellen bei. Unsere Ergebnisse zeigen, dass bei verschiedenen Melanomzellen verschiedene Ionenkanäle zur Proliferation beitragen können.

### 4.3 hEAG1-Kanal und Zellzyklus der IGR1-Zellen

#### 4.3.1 Regulation von hEAG1-Kanälen im Laufe des Zellzyklus

Ein inhibierender Effekt von Imipramin auf die Proliferation von IGR1-Zellen kann durch den Block von hEAG1-Kanälen verursacht werden. Das Öffnen von hEAG1-Kanälen wird durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin reguliert (Schönherr et al., 2000). Dies deutet auf eine wichtige Rolle von hEAG1-Kanälen beim  $\text{K}^+$ -Efflux und der Regulation des zellulären Membranpotentials bei niedriger Konzentration von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  hin. In verschiedenen Zelltypen wurde gezeigt, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration am Anfang der G1-Phase am niedrigsten ist (Pande et al., 1996). Dabei ist die Zellmembran depolarisiert (Wonderlin und Strobl, 1996). Zu Beginn der G1-Phase reagieren viele Zellen auf Blocker von Kaliumkanälen mit einem deutlichen antiproliferativen Effekt (Wonderlin und Strobl, 1996; Klimatcheva und Wonderlin, 1999).

Um diese Hypothese zu prüfen, hatten wir IGR1-Zellen mittels Methotrexat in der G1/S-Phase blockiert. In der G1/S-Phase wurde die Dichte des hEAG1-Stromes im Vergleich zu unsynchronisierten Zellen reduziert, das Membranpotential betrug dabei -26 mV. Sechs Stunden nach dem Waschen mit Methotrexat traten die Zellen in die S/G2-Phase ein. Dabei reduzierte sich die Dichte des hEAG1-Stromes im Vergleich zu G1/S-Phase, die Zellen wurden leicht auf -21 mV depolarisiert. Dies bestätigt die Hypothese, dass hEAG1 in der G1-Phase stark exprimiert wurde und dass dieser Effekt mit einer Hypolarisation der Zellmembran einhergeht. Der Kalium-Efflux und die Hypolarisation der Zellmembran sind wichtige Voraussetzungen für das Eintreten in die spätere G1-Phase des Zellzyklus (Dubois und Rouzaire-Dubois, 1993; Wonderlin und Strobl, 1996).

Die Rolle von hEAG1-Kanälen in der G1-Phase der Brustkarzinomzellen MCF-7 wurde von Ouadid-Ahidouch und Kollegen untersucht (Ouadid-Ahidouch et al., 2001). Ihre Experimente ergaben, dass in der G0/G1-Phase synchronisierte Zellen im Vergleich zu Zellen in der späteren G1-Phase depolarisiert sind und dass die Dichte der hEAG1-Ströme reduziert ist. Die Menge von hEAG1 mRNA in diesen Zellen erhöht sich in der G0/G1-Phase, erreicht das Maximum während der G1-Phase und reduziert sich in der S-Phase im Vergleich zur unsynchronisierten Zellen. Die Kaliumkanalblocker TEA und Astemizol inhibieren sowohl hEAG1-Ströme als auch die Proliferation, während andere Kaliumkanäle der MCF-7 Zellen, sowohl  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte als auch ATP-sensitive, unempfindlich gegenüber TEA sind.

Diese Daten und unsere Ergebnisse verdeutlichen, dass der hEAG1-Strom am Anfang der G1-Phase am höchsten ist. Nimmt im Laufe der G1-Phase die Calcium-Konzentration zu, wird der hEAG1-Strom herunterreguliert. Brüggemann und Kollegen erarbeiteten, dass in *Xenopus*-Oozyten die Aktivierung des „mitosis-promoting-factor“ den exprimierten hEAG1 inhibiert (Brüggemann et al., 1997). Die Reorganisation von Zytoskelett-Elementen während der M-Phase verändert die elektrophysiologischen Eigenschaften des hEAG1-Kanals in transfizierten CHO-Zellen (Camacho et al., 2000).

#### 4.3.2 Regulation des Zellzyklus durch den hEAG1-Kanal

Der hEAG1-Kanal kann am Anfang der G1-Phase eine wichtige Rolle für den Zellzyklus spielen.

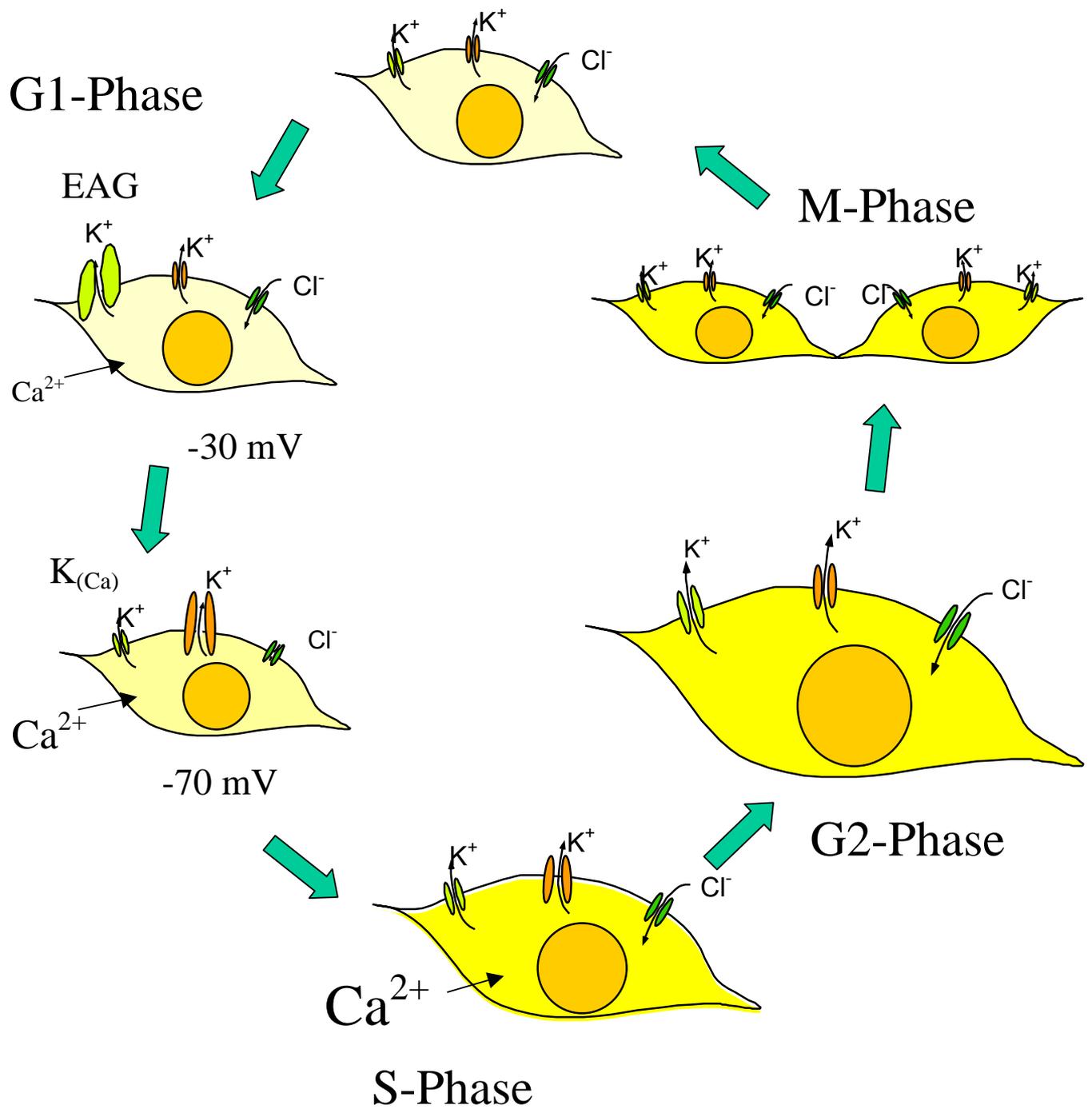
Aufgrund der bisherigen Ergebnisse unserer Experimente schlagen wir folgende Interpretation der Rolle des hEAG1-Kanals in IGR1-Zellen vor (Abb. 50): Die Zellen in der frühen G1-Phase exprimieren hEAG1-Kanäle in höherer Dichte. Der Efflux von  $K^+$  hyperpolarisiert die Zelle und erleichtert einen  $Ca^{2+}$ -Influx. Der Mechanismus von dem durch die Hyperpolarisation induzierten  $Ca^{2+}$ -Influx in IGR1-Zellen wurde bereits von Nilius und Kollegen beschrieben (Nilius et al., 1993). Die Zunahme von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  reduziert hEAG1-Ströme (Stansfeld et al., 1996; Schönherr et al., 2000) und aktiviert parallel  $K_{Ca}$ -Kanäle. Das Öffnen von  $K_{Ca}$ -Kanälen führt zu einer weiteren Hyperpolarisation der Zelle. Diese Rückkopplungsregulation von  $K_{Ca}$ -Kanälen wurde ebenfalls von Nilius und Kollegen eingehend untersucht. Der Weg des  $Ca^{2+}$ -Influx in IGR1-Zellen blieb damals jedoch unklar (Nilius et al., 1993).

Die Rolle von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  im Zellzyklus ist bekannt. Die nicht tumoralen Zellen benötigen hohe  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen im Wachstumsmedium beim Übergang von der G1 zur S-Phase, während der S-Phase und am Ende der Mitose (Santella, 1998). Der Mangel von  $Ca^{2+}$  synchronisiert die Zellen in der G1-Phase (Whitfield et al., 1979). Der  $Ca^{2+}$ -Influx während des Zellzyklus ist mit dem Wechsel vom Membranpotential und der Aktivität von  $K_{Ca}$ -Kanälen gekoppelt (Wonderlin und Strobl, 1996; Kamouchi et al., 1999). Krebszellen können sich jedoch mit wenig  $Ca^{2+}$  im Medium teilen (Takuwa et al., 1995). Krebszellen zeigen weniger Abhängigkeit von einer wechselnden Konzentration von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  (Binggeli et al., 1994). Solche Zellen hyperpolarisieren leicht in der G1-Phase von  $-20$  auf  $-40$  mV, dies geschieht früher als bei nicht krebsartigen Vorgängern. Das Membranpotential von Krebszellen bleibt dann unverändert während der restlichen Phasen des Zellzyklus (Binggeli et al., 1994).

Dies unterstützt die Hypothese, dass Tumorzellen bei einer niedrigen Konzentration von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  hyperpolarisieren können. Solche Mechanismen erklären sich durch die spezifische Zusammensetzung der Ionenkanäle (Strobl et al., 1995). Es gibt Berichte über die Rolle von spannungsabhängigen Kaliumkanälen im Verlauf des Zellzyklus bei diversen Krebszellen (Lepple-Wienhues et al., 1996; Yao und Kwan, 1999; Fraser et al., 2000). In IGR1-Zellen kann der hEAG1-Kanal ein solcher spannungsabhängiger Kanal sein, der die initiale Hyperpolarisation bei niedriger Konzentration von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  am Anfang der G1-Phase erlaubt. Dies geschieht auch, wenn die  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanäle ausgeschaltet sind, z.B. bei Applikation von ChTX.

Ein anderer Aspekt ist die Wechselwirkung von hEAG-Kanälen mit den Molekülen, die im Zellzyklus eine wichtige Rolle spielen. Die Wechselwirkung des *Drosophila* EAG-Kanals mit  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängiger Proteinkinase II (CaMK II) ist nachgewiesen (Wang et al., 2002; Sun et al., 2003). Sun und Kollegen zeigten, dass EAG-Kanäle einen stabilen Komplex mit CaMKII bilden. Dies führt zu der Aktivierung von CaMKII. Zudem ist die Aktivierung von CaMKII unabhängig von Calmodulin und der Autophosphorylierung.  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin spielt eine Rolle beim Binden von CaMKII an EAG. Jedoch bleibt der Komplex in Anwesenheit von Calmodulin weiter stabil. CaMKII bleibt aktiv, auch wenn die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration niedrig ist. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass EAG-Kanäle unter niedriger intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine wichtige Rolle in der Zelle spielen. Die Aktivierung von CaMKII im EAG-CaMKII Komplex ist ein wichtiger Regulationsschritt für den Zellzyklusverlauf (Santella et al., 1998).

Inwieweit hEAG-Kanäle auf den Zellzyklusverlauf von Krebszellen einwirken, kann zukünftig an nativen Tumoren erforscht werden. Sollten hEAG-Kanäle häufig in Tumorzellen vorkommen, wäre zu untersuchen, ob das Inhibieren von hEAG-Kanälen die Tumor-Entwicklung hemmt oder sogar verhindert. Wenn dies bestätigt wird, kann Imipramin in Zukunft für therapeutische Zweck eingesetzt werden. Der Block von hEAG-Kanälen in Krebszellen kann die Entwicklung von Tumoren hemmen. Die Präsenz von derartigen Kanälen in Krebszellen kann auf die Bösartigkeit der Tumore hinweisen.



**Abb. 50.** Vermutliche Regulation von Ionenkanälen in IGR1-Zellen im Laufe des Zellzyklus (schematische Darstellung). Die unterschiedlichen Calciumkonzentration in der Zelle wird durch die Intensivität der gelben Farbe dargestellt.

#### 4.4 Aktivierung von EAG-Kanälen durch ungesättigte Fettsäuren

##### 4.4.1 Wirkung von Arachidonsäure auf Kv1.5 und hEAG-Kanäle

Für viele Kaliumkanäle ist eine Regulation durch Fettsäuren bekannt (Meves, 1994). Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv- oder *Shaker*-Typ-Kanäle) werden durch Fettsäuren inhibiert (Villarreal und Schwarz; 1996). Andere, z.B. Calcium-regulierte BK-Kanäle, einwärtsgerichtete  $K_{ir}$ -Kanäle, auswärtsgerichtete Kaliumkanäle des Herzens und der glatten Muskulatur oder nicht-inaktivierende Hintergrundkanäle in pyramidalen Neuronen werden durch ungesättigte Fettsäuren aktiviert (Wallert et al., 1991; Petrou et al., 1995; Colbert und Pan, 1999; Liu et al., 2001; Clarke et al., 2002).

Wir untersuchten den Effekt von AA auf den Natriumkanal Nav1.4. AA blockt den Kanal, hat aber keinen Einfluss auf die Aktivierungskinetik. Dies bestätigt das Ergebnis von Bendahhou und Kollegen (Bendahhou et al., 1997). Unsere Messungen sowohl in Abwesenheit als auch in Präsenz von  $Mg^{2+}$  zeigten, dass  $Mg^{2+}$ -Ionen die Wirkung von AA auf den Kanal nicht beeinflussen.

Der Kaliumkanal Kv1.5 wurde ebenfalls durch AA geblockt. Die Applikation von AA in Konzentrationen von 1 und 10  $\mu M$  führte zur Abnahme der Stromamplitude bei Depolarisationspulsen positiver als 0 mV. Bei einer Spannung von -10 mV beobachteten wir die Aktivierung des Stromes. Bei Applikation von 30  $\mu M$  AA wurde die normalisierte Leitfähigkeit des Kanals um 16 mV in Richtung der negativeren Spannungen verschoben. Dies deutet auf eine frühe Öffnung des Kanals hin. Unsere Experimente bestätigten den Befund von Honoré und Kollegen (Honoré et al., 1995). Die Autoren zeigten einen „Offen-Kanal“-Block von Kv1.5-Kanälen bei einer Applikation von 30 und 100  $\mu M$  AA. Sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung des Kanals waren beim Block spannungsabhängig.

Die Beschleunigung der Aktivierung und die gleichzeitige Beschleunigung der Inaktivierung durch 5-20  $\mu M$  AA ist bei den Kv1.1, Kv1.2 und Kv1.3-Kanälen beobachtet worden (McEvoy et al., 1995; Gubitosi-Klug et al., 1995; Poling et al., 1996; Visentin und Levi, 1998). Die Kv-Kanäle wurden nach dem früheren Öffnen von AA blockiert. Dieser Mechanismus entspricht dem „Offen-Kanal“-Block (Gubitosi-Klug et al., 1995; Honoré et al., 1995; Visentin und Levi, 1998).

Kv- und EAG-Kanäle haben eine ähnliche Struktur: Sie bestehen aus vier Untereinheiten mit dem typischen Aufbau aus 6 Transmembrandomänen. Das positiv geladene vierte Segment funktioniert als ein Spannungssensor (Silverman et al., 2003).

Die ähnliche Struktur von Kv- und EAG-Kanälen lässt vermuten, dass beide Kanäle ähnlich empfindlich auf verschiedene Substanzen reagieren können.

In dieser Arbeit zeigen wir, dass Arachidonsäure hEAG1- und hEAG2-Kanäle in transfizierten CHO-Zellen nicht blockt, sondern aktiviert. Dabei erhöht sich die Stromamplitude, während die Zeitkonstante  $\tau_{\text{slow}}$  und die Wahrscheinlichkeit des Zustandes  $C_{\text{langsam}}$  ( $P_{\text{slow}}$ ) reduziert wird; die Strom-Spannungs-Kennlinie verschiebt sich in Richtung der negativeren Spannungen, was ein früheres Öffnen des Kanals andeutet.

In Rahmen der sog. Oberflächen-Potential Theorie (Hille, 2001) könnte die negativ geladene Arachidonsäure das elektrische Feld der Membran verändern. Dies könnte zudem die Bewegung des S4-Segments beeinflussen. Auf solche Weise öffnet sich der Kanal bei Applikation von AA früher als in der Kontrolle: Die Strom-Spannungs-Kennlinie verschiebt sich um 30 mV in Richtung der negativeren Potentiale. Solche Effekte wurden ebenfalls bei Applikation von Fettsäuren auf Kv-Kanäle beobachtet: Beim Kv1.3-Kanal wurde die Strom-Spannungs-Kennlinie bei Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA um 9 mV verschoben (Visentin und Levi, 1998). 3  $\mu\text{M}$  Docosahexaensäure (DHA) verursachte Verschiebungen des  $V_n$ -Wertes bei einer Leitfähigkeits-Spannungs-Kennlinie um 6 mV (Poling et al., 1996). Der Effekt des früheren Öffnens bei Applikation von Fettsäuren ist auch für BK-Kanäle beschrieben worden (Devor und Frizzell, 1998; Deson et al., 2000). Bei  $\text{Na}^+$ -Kanälen wurde jedoch eine Aktivierung durch die Applikation von AA nicht beobachtet (Bendahhou et al., 1997).

Um zu untersuchen, ob die Verschiebung der Strom-Spannungs-Kennlinie um 30 mV bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA alle Aktivierungseffekte bei hEAG1-Kanälen erklärt, behandelten wir CHO-Zellen mit Vorpulsen von -130 mV bis -40 mV in 10 mV-Schritten und depolarisierten sie anschließend auf +20, +50 und +80 mV. Die  $\tau_{\text{slow}}$ -Werte bei der Applikation von AA bei +20 mV sollten danach mit den  $\tau_{\text{slow}}$ -Werten bei +50 mV in der Kontrolle übereinstimmen. Das Gleiche sollte für Werte von +50 mV bei der Applikation von AA und von +80 mV in der Kontrolle gelten. Unsere Messungen zeigen jedoch, dass dies bei hEAG1-Kanälen in CHO-Zellen nicht der Fall ist. Das Reduzieren der Zeitkonstante  $\tau_{\text{slow}}$  bei der Applikation von AA in CHO-Zellen kann somit durch die Veränderung des elektrisches Feldes im Rahmen der Oberflächen-Potential Theorie nicht erklärt werden.

Warum verursacht AA einen „Offen-Kanal“-Block bei Kv-Kanälen, bei hEAG-Kanälen jedoch nicht? Folgende Unterschiede in den Poren von hEAG- und Kv-Kanälen können die Ursache dafür sein. Erstens unterscheiden sich die Kanäle in der Signatursequenz des Selektivitätsfilters: Die Signatursequenz von Kv-Kanälen wird von Aminosäuren GYG gebildet, die Signatursequenz von hEAG-Kanälen dagegen von

GFG. Zweitens haben hEAG-Kanäle einen längeren Loop zwischen S5-Segment und Pore als Kv-Kanäle. Eine amphipatische Helix ist nur bei hEAG-Kanälen präsent (Liu et al., 2002; Pardo-Lopez et al., 2002; Torres et al., 2003). Diese Unterschiede können ein Grund für verschiedene Empfindlichkeiten auf AA sein, wenn sich die AA-Bindestelle im Porenbereich von Kv- und hEAG-Kanälen befindet.

#### 4.4.2 Wirkung von verschiedenen ungesättigten Fettsäuren auf den hEAG1-Kanal

Die Erhöhung der Stromamplitude, Reduzierung der Zeitkonstante  $\tau_{\text{slow}}$  und der Wahrscheinlichkeit des Zustandes  $C_{\text{langsam}}$  ( $P_{\text{slow}}$ ) sowie die Verschiebung der Strom-Spannungs-Kennlinie in Richtung der negativeren Spannungen wurden bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ETYA bei hEAG1-Kanäle beobachtet. ETYA inhibiert die Metabolisierung von AA durch Lipooxygenase, Cyclooxygenase und Zytochrom P-450 Enzyme. Dies weist darauf hin, dass es eine direkte Wechselwirkung zwischen den EAG-Kanälen und der Fettsäure gibt.

hEAG1-Kanäle können auch durch andere ungesättigte Fettsäuren (EPA, Linolensäure) aktiviert werden. Unsere Experimente in IGR1- und in transfizierten CHO-Zellen verdeutlichen, dass dieser Effekt von der Zahl der ungesättigten Bindungen abhängt: Säuren mit 4 oder 5 ungesättigten Bindungen sind wirksamer als Säuren mit 1-3 ungesättigten Bindungen. Solche Korrelationen wurden bei allen Parametern beobachtet: bei der Erhöhung der Stromamplitude, bei der Beschleunigung der Aktivierungszeit und bei der Verschiebung der Strom-Spannungs-Kennlinie in Richtung der negativeren Spannungen. Die Abhängigkeit von  $P_o$  (die Wahrscheinlichkeit für den geöffneten Zustand) von der Zahl der ungesättigten Bindungen der applizierten Fettsäuren wurde bereits für BK-Kanäle in GH<sub>3</sub>-Zellen beschrieben (Denson et al., 2000). Peterson und Kollegen zeigten, dass die Wirkung von Fettsäuren als Elektronen übertragende Substanzen auf Disulfidbindungen der Ionenkanäle ebenfalls von der Anzahl der ungesättigten Bindungen abhängt (Peterson et al., 1996).

#### 4.4.3 Mechanismus der Arachidonsäure-Wirkung auf den hEAG1-Kanal

Die Acyl Koenzyme A sind unpermeable Analoge von Fettsäuren. Die Applikation von Acyl CoA in „Inside-Out“ Patches auf BK-Kanäle in CH<sub>3</sub>-Zellen und auf Kaliumkanäle in Zellen der glatten Muskulatur deutet darauf hin, dass die Wechselwirkung von Fettsäuren mit diesen Kanälen auf der zytosolischen Seite der Membran stattfindet (Petrou et al., 1994, 1995; Denson et al., 2000). Poling und Kollegen zeigten jedoch,

dass die Applikation von DHA in Membran-„Outside-Out“-Patches in Fibroblasten einen wesentlich größeren Effekt als die zytosolische Applikation in „Inside-Out“-Patches erzeugte (Poling et al., 1996).

Der Aktivierungseffekt bei hEAG1-Kanälen nach einer Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Arachidonyl CoA auf die Oozytenmembran in der „Inside-Out“ Konfiguration war deutlich geringer als nach einer Applikation von 10  $\mu\text{M}$  AA in gleicher Konfiguration. Dies impliziert, dass für die Aktivierung des hEAG1-Kanals ein Zugang von Fettsäuren zur Außenseite der Membran nötig ist.

In unseren Experimenten mit CHO-Zellen beschleunigte die externe Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Arachidonyl CoA die Aktivierungskinetik von hEAG1-Kanälen. Die Strom-Spannungs-Kennlinie wurde dabei in Richtung der negativeren Spannungen verschoben. Diese Effekte waren mit denen bei einer Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  AA vergleichbar. Die Stromamplitude bei einer Depolarisation auf +50 mV wurde jedoch durch die Applikation von Arachidonyl CoA nicht erhöht. Die geringe Erhöhung der Stromamplitude bei niedrigeren Depolarisationspotentialen kann auf die Verschiebung der Strom-Spannungs-Kennlinie zurückgeführt werden. Dies lässt vermuten, dass das frühere Öffnen des Kanals und die Zunahme der Stromamplitude zwei unabhängige Effekte sind. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Wechselwirkung von hEAG1-Kanälen mit AA ein Zugang zu beiden Membranseiten nötig ist.

Der Effekt von AA auf Kv1.1-Kanäle ist in der Arbeit von Gubitosi-Klug et al. (1995) beschrieben. AA beschleunigte sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung der Kanäle. Diese Effekte sind denen von AA auf andere Kv1.x-Kanäle vergleichbar. Im Gegensatz zu Kv1.5 und Kv1.3 wurde bei Kv1.1-Kanälen die Strom-Spannungs-Kennlinie des Peak-Stroms jedoch nicht verschoben. Gubitosi-Klug und Gross (1996) berichteten später über die Wirkung von Ethyl Arachidonat auf diese Kanäle. Dabei beschleunigte sich die Aktivierungszeit ohne die Zunahme der Stromamplitude, zudem wurde eine Verschiebung von 10-20 mV in Richtung der negativeren Spannungen der Strom-Spannungs-Kennlinie beobachtet. Dies bestätigt unsere Vermutung, dass die Änderungen von Parametern wie Aktivierungszeit, Erhöhung der Stromamplitude und Verschiebung der Strom-Spannungs-Kennlinie bei der Applikation von Fettsäuren und Ethanol-Derivaten unabhängige Prozesse sind.

Devor und Frizzell zeigten, dass die Applikation von AA auf  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige BK-Kanäle in T84-Zellen den Zustand  $C_{\text{langsam}}$  beeinflusst (Devor und Frizzell, 1998). Für diesen Kanal ist ein Modell mit zwei langsam geschlossenen Zuständen ( $C_{\text{langsam}}$ ), einen schnellen geschlossenen Zustand ( $C_{\text{schnell}}$ ) und einen geöffneten Zustand beschrieben werden. Die Autoren stellen dar, dass nur die Zeitkonstanten des Übergangs zwischen

langsamen geschlossenen Zuständen beschleunigt werden. Die Zeitkonstante für den Übergang zwischen  $C_{\text{schnell}}$  und geöffneten Zustand werden von AA nicht beeinflusst.

EAG-Kanäle werden in zwei Schritten aktiviert: Der Kanal geht vom geschlossenen Zustand  $C_{\text{langsam}}$  erst in den geschlossenen Zustand  $C_{\text{schnell}}$ , dann in den geöffneten Zustand über. Beim Auswerten unserer Daten vom hEAG1-Kanal stellten wir eine Beschleunigung des Übergangs von  $C_{\text{langsam}}$  nach  $C_{\text{fast}}$  fest. Der Übergang vom Zustand  $C_{\text{langsam}}$  nach  $C_{\text{schnell}}$  wurde als "langsame Gating" des Kanals bezeichnet (Terlau et al., 1996). EAG unterscheidet sich von Kv-Kanälen durch den sog. Cole-Moore Effekt: eine deutliche Abhängigkeit der Aktivierungskinetik vom Haltepotential.  $Mg^{2+}$ -Ionen verlangsamen die Aktivierung. Um zu prüfen, ob AA das "langsame Gating" beeinflusst, hatten wir Messungen unter verschiedenen Konzentrationen von externen  $Mg^{2+}$  durchgeführt.

Die Charakteristiken der  $Mg^{2+}$ - und AA-Effekte auf die Aktivierungskinetik von hEAG1-Kanälen wurde in „Inside-Out“ Patches (*Xenopus*-Oozyten) und in Ganz-Zell-Konfiguration (CHO-Zellen) untersucht. Eine allgemeine Tendenz ist in beiden Fällen zu beobachten:  $Mg^{2+}$ -Ionen verlangsamen die Aktivierung, AA dagegen beschleunigt sie. Die Wirkungen von  $Mg^{2+}$ -Ionen und von AA sind jeweils konzentrationsabhängig. Es wäre denkbar, dass der Effekt von AA auf einer Verdrängung der  $Mg^{2+}$ -Ionen beruht. Dies ist aber offenbar nicht der Fall, da AA-Effekte in CHO-Zellen auch in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  zu beobachten waren: Die Stromamplitude war erhöht, die Wahrscheinlichkeit des Zustandes  $C_{\text{langsam}}$  ( $P_{\text{slow}}$ ) wurde reduziert, die Strom-Spannungs-Kennlinie wurde nach links verschoben. Die Aktivierungszeit ( $\tau_{\text{slow}}$ ) wurde jedoch nicht signifikant reduziert, d.h. die beschleunigende Wirkung von AA beruht auf einer Verschiebung des Gleichgewichtes von  $C_{\text{langsam}}$  nach  $C_{\text{schnell}}$ , nicht auf einer Beschleunigung des Überganges. In Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen wurde  $\tau_{\text{slow}}$  bei Applikation von AA reduziert: der Übergang von  $C_{\text{langsam}}$  nach  $C_{\text{schnell}}$  wurde beschleunigt.

In „Inside-Out“-Patches von Oozyten wurde AA auf der zytosolischen Seite der Membran appliziert. Durch diese Applikation wollten wir klären, ob AA von der Innen- oder Außenseite der Membran wirkt. Es bestand ein Unterschied zwischen den Effekten von AA in CHO-Zellen und in „Inside-Out“-Patches: In „Inside-Out“-Konfigurationen wurde in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen in der extrazellulären Lösung kein Effekt durch die AA-Applikation beobachtet. Bei Zugabe von externen  $Mg^{2+}$  wurde die Aktivierungszeit ( $\tau_{\text{slow}}$ ) beschleunigt, die Stromamplitude war erhöht, Strom-Spannungs-Kennlinie wurde nach links verschoben.

Um den Effekt von AA auf das „langsame Gating“ in Präsenz von externen  $Mg^{2+}$ -Ionen zu untersuchen, verwendeten wir im Labor vorhandene bEAG1-Mutanten.

Mutationen wurden im S4-Segment eingeführt. Die Mutation L322H beschleunigt die Aktivierung des bEAG-Kanals. Die Aktivierung der Mutante ist weniger abhängig von den Vorpulsspannungen und weniger empfindlich gegenüber extrazellulärem Magnesium als die des WT-bEAG-Kanals: Die Aktivierungskinetik des L322H-Kanals bei 10 mM  $[Mg^{2+}]_o$  ist mit der von WT-bEAG bei 0 mM  $[Mg^{2+}]_o$  vergleichbar (Schönherr et al., 1999). Die Aktivierung der L322C-Mutante unterscheidet sich von der L322H-Mutante durch eine deutlichere Vorpulsabhängigkeit (Schönherr et al., 2002), die Aktivierungskinetik von L322C ist jedoch schneller als die von WT-bEAG. Die D316N-Mutante zeigt eine deutliche Vorpulsabhängigkeit, ist jedoch durch externe Mg-Konzentrationen kaum zu beeinflussen (Schönherr, persönliche Mitteilung).

Alle getesteten bEAG1-Mutanten waren unempfindlich gegenüber einer AA-Applikation, gemessen in „Inside-Out“ Konfiguration bei 2 mM externem  $Mg^{2+}$ . Dies bedeutet, dass bei verändertem Gating, d.h. bei dem schnelleren Übergang von  $C_{\text{langsam}}$  nach  $C_{\text{schnell}}$  kein Effekt von AA zu beobachten war.

Das *Drosophila*-Homolog des EAG-Kanals (dEAG) hat ebenfalls eine schnellere Aktivierungszeit als hEAG- oder bEAG-Kanäle. Der Kanal war gegenüber AA unempfindlich (gemessen in „Inside-Out“ Konfiguration bei 2 mM externen  $Mg^{2+}$ ).

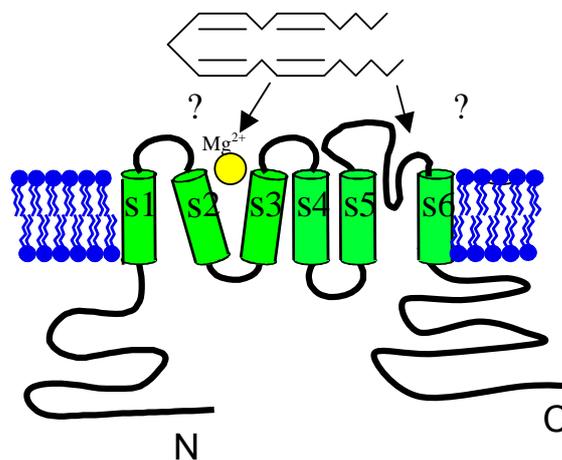
Unsere Experimente mit bEAG1-Mutanten und dEAG-Kanal bestätigen die Vermutung, dass Applikation von AA den Prozess des „langsamen Gatings“ beeinflusst.

Um die Wirkungsweise von AA am EAG-Kanal zu charakterisieren, verwendeten wir wiederum mutierte Kanäle: Der C-Terminus von EAG-Kanäle spielt eine wichtige Rolle in der Interaktion von Untereinheiten (Ludwig et al., 1997). Die Übertragung vom C-Terminus des dEAG-Kanals in bEAG1 hat die Empfindlichkeit des Kanals nicht verändert. Die Deletion des N-Terminus bewirkte eine Unempfindlichkeit des hEAG1-Kanals gegenüber AA. Der N-Terminus des EAG1-Kanals spielt eine wichtige Rolle für das sog. „langsame Gating“ (Terlau et al., 1997). Bei der Deletion des N-Terminus verliert der Kanal die Fähigkeit zum „langsamen Gating“ und kommt schnell in einen geöffneten Zustand. Unsere Experimente zeigen, dass die Applikation von AA in „Inside-Out“-Patches auf diese Kanäle keine Wirkung hat.

AA bindet an unterschiedlichen Stellen in diversen Ionenkanälen. Hamilton und Kollegen zeigten, dass die Bindungsstelle von AA in der Pore des hK1-Kanals liegt (Hamilton et al., 2003). Die Bindungsstelle bei  $K_{ir}3.x$ -Kanälen befindet sich ebenso in der Poren-Region (Rogalski und Chavkin, 2001). Die Bindungsstelle des TREK-2 Kanals befindet sich im C-Terminus (Kim et al., 2001). Die Wechselwirkung von AA mit dem N-Terminus ist für den ROMK-Kanal beschrieben worden (Macica et al., 1998). Gubitosi-

Klug und Gross (1996) zeigten, dass Mutationen im N-Terminus des Kv1.1 Kanals die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung beeinflussen.

Aufgrund unserer Befunde können wir folgende Hypothese formulieren: AA bindet von außen an den hEAG1-Kanal und beeinflusst den Mechanismus des „langsamen Gatings“. Verliert der Kanal die Fähigkeit zum „langsamen Gating“ durch die Deletion des N-Terminus, ist dieser Effekt durch AA nicht zu beobachten. In Präsenz von externen  $Mg^{2+}$  ist der Effekt von AA dagegen deutlicher zu beobachten. Die Bindestelle von  $Mg^{2+}$  befindet sich zwischen den Segmenten S2 und S3 (Silvermann et al., 2000). Ob AA die gleiche Bindestelle besetzt oder an anderen Bereichen bindet, ist noch nicht geklärt (Abb. 51). Die Bindung von AA beschleunigt den Übergang des Kanals von Zustand  $C_{\text{langsam}}$  in den  $C_{\text{schnell}}$  Zustand.



**Abb. 51** Mögliche Bindestellen für Arachidonsäure am hEAG1-Kanal (schematische Darstellung).

#### 4.4.4 Physiologische Rolle von Aktivierung der hEAG-Kanäle durch Fettsäuren

Es ist bekannt, dass Arachidonsäure die Proliferation von Krebszellen beschleunigt (Hughes-Fulford et al., 2001; Razanamahefa et al., 2000). Daher stellt sich die Frage, ob die Aktivierung von hEAG1-Kanälen durch AA-Applikation während des Zellzyklus ebenfalls zur Proliferation beitragen kann. Unsere Experimente verdeutlichen, dass bei einem Ruhepotential der melanomalen Zellen von -30 mV die Applikation von AA hEAG1-Kanäle aktiviert. Die Rolle von hEAG1-Kanälen im Zellzyklusverlauf der melanomalen IGR1-Zellen wurde bereits diskutiert. hEAG-Kanäle kommen in vielen Krebszellen vor (Pardo et al., 1999). Der proliferative Effekt von AA in verschiedenen Krebszellen könnte auf die Aktivierung der Kaliumkanäle zurückgeführt werden. Es gibt

jedoch Hinweise, dass AA auch durch andere Mechanismen die Proliferation von Krebszellen beeinflusst. Beispielsweise ist eine potenzierende Rolle von AA auf MAPK Enzyme ist von Denys et al. (2002) beschrieben worden.

## **5. Zusammenfassung**

Unsere Arbeit verdeutlicht, dass hEAG-Kanäle eine wichtige Rolle in Krebszellen spielen. Der in melanomalen IGR1-Zellen vorhandene hEAG1-Kanal wird im Laufe des Zellzyklus reguliert. Der Kanal selbst spielt für die Regulation des Zellzyklus eine wichtige Rolle. Wir vermuten, dass in der frühen G1-Phase bei niedriger Konzentration von intrazellulärem Calcium der hEAG1-Kanal die Zelle hyperpolarisiert und dabei den initialen Influx von Calcium in die Zelle erlaubt. Dadurch wird der weitere Zellzyklusverlauf gesichert.

Unsere Experimente mit Imipramin zeigen, dass dieser Wirkstoff die Proliferation von IGR1-Zellen inhibiert. Da die spezifischen Blocker auf andere in den Zellen vorhandene Kanäle keinen derartigen Einfluss haben, ist der Block des hEAG1-Kanals als Ursache für die Inhibierung der Proliferation sehr wahrscheinlich.

Experimente mit ungesättigten Fettsäuren ergaben, dass hEAG-Kanäle im Gegensatz zu Kv-Kanälen nicht geblockt, sondern aktiviert werden. Dieser Effekt ist von der Zahl der ungesättigten Bindungen in den Fettsäuren abhängig. Es handelt sich um eine direkte Wechselwirkung des Kanals mit der ungesättigten Fettsäure. Fettsäuren binden von außen an den hEAG-Kanal und beeinflussen so den Mechanismus des „langsamen Gatings“.

Weiter stellen wir dar, dass Arachidonsäure den hEAG1-Kanal bei Ruhepotential der Zelle aktiviert. Wenn die Rolle des hEAG1-Kanals für den Zellzyklus der Melanomzelle in Betracht gezogen wird, kann dies den potenzierenden Effekt von Arachidonsäure auf die Proliferation mancher Krebszelltypen erklären.

## 6. Referenzen

1. Ackerman M.J. 1998. The long QT syndrom: ion channel diseases of the heart. *Mayo Clin. Proc.* **73**:250-269
2. Aidley D.J., Stanfield P.R. 1996. Ion Channels. Molecules in Action. Cambridge University Press, Cambridge, UK
3. Bauer C.K., Schwarz J.R. 2001. Physiology of EAG K<sup>+</sup> channels. *J. Membrane Biol.* **182**:1-15
4. Bendahhou S., Cummins T.R., Agnev W.C. 1997. Mechanism of modulation of the voltage-gated skeletal and cardiac muscle sodium channels by fatty acids. *Am.J. Physiol. Cell Physiol.* **272**:C592-600
5. Bertl A., Bihler H., Reid J.D., Kettner C., Slayman C.L. 1998. Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K<sup>+</sup> channel, DUK1 (TOK1), in situ. *J. Membrane Biol.* **162**:67-80
6. Bianchi L., Wible B., Arcangeli A., Tagliatela M., Morra F., Castaldo P., Crociani O., Rosati B., Faravelli L., Olivotto M., Wanke E. 1998. *herg* encodes a K<sup>+</sup> current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells? *Cancer Res.* **58**:815-822
7. Biel M., Zong X., Hofmann F. 1999. Cyclic nucleotide gated channels. *Adv. Sec. Mess. Phosph.* **33**:231-249
8. Binggeli R., Weinstein R.C., Stevenson D. 1994. Calcium ions and the membrane potential of tumor cells. *Cancer Biochem. Bioph.* **14**:201-210
9. Böhm T., Nilius B. 1990. Ion channels in human melanoma cells. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.* **415** (Suppl.1): R36
10. Brash A.R. 2001. Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J. Clin. Invest.* **107**:1339-1345
11. Brüggemann A., Pardo L.A., Stümer W., Pongs O. 1993. *Ether à go-go* encodes a voltage-gated channel permeable to K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> and modulated by cAMP. *Nature* **365**:445-448
12. Brüggemann A., Stühmer W., Pardo L.A. 1997. Mitosis-promoting factor-mediated supression of a cloned delayed rectifier potassium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:537-542
13. Cabral J.H.M., Lee A., Cohen S.L., Chait B.T., Li M., MacKinnon R. 1998. Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channels N Terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell* **95**:649-655

14. Capdevila J., Gil L., Orellana M., Marnett L.J., Mason J.I., Yadagiri P., Falck J.R. 1998. Inhibitors of cytochrome P-450-dependent arachidonic acid metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 261:257-263
15. Camacho J., Sánchez A., Stühmer W., Pardo L.A. 2000. Cytoskeletal interactions determine the electrophysiological properties of human EAG potassium channels. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.* 441:167-174
16. Cantrill R.C., Ells G.W., De Marco A.C., Horrobin D.F. 1997. Mechanisms of the selective cytotoxic actions of certain essential fatty acids. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 400A:539-544
17. Chen H., Gordon D., Heinemann S.H. 2000. Modulation of cloned skeletal muscle sodium channels by the skorpion toxins LqhII, LqhIII, and Lqh $\alpha$ IT. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.* 439:423-432
18. Chen M.-L., Hoshi T., Wu C.-F. 1996. Heteromultimeric interactions among K channel subunits from *Shaker* and *eag* families in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 17:535-542
19. Clapman D.E. 1999. More pieces of the K<sup>+</sup> ion channel puzzle. *Nature Structural Biology* 6:807-810
20. Clark A.J. 1933. *The Mode of Action of Drugs on Cells*. Edward Arnold, London, UK
21. Clarke A.L., Petrou S., Walsh J.V.Jr., Singer J.J. 2002. Modulation of BK(Ca) channel activity by fatty acids: structural requirements and mechanisms of action. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283:C1441-1453
22. Colbert C.M., Pan E. 1999. Arachidonic acid reciprocally alters the availability of transient and sustained dendritic K<sup>+</sup> channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 19:8163-8171
23. Cole K.S., Moore J.W. 1960. Potassium ion current in the squid giant axon: dynamic characteristic. *Biophys. J.* 1:1-14
24. Cuellar-Quintero J. L., Garcia D.E., Cruzblanca H. 2001. The antidepressant imipramin inhibits the M-type K<sup>+</sup> current in rat sympathetic neurons. *Neuroreport* 12:2195-2198
25. Das U.N. 1992. Gamma-linolenic acid, arachidonic acid and eicosapentaenoic acid as potential anticancer drugs. *Nutrition* 6:429-434
26. Das U.N. 2002. Estrogen, statins, and polyunsaturated fatty acids: similarities in their actions and benefits – is there a common link? *Nutrition* 18:178-188

27. Delpon E., Valenzuela C., Pérez O., Franqueza L., Gay P., Snyders D.J., Tamargo J. 1996. Mechanism of block of a human cloned potassium channel by the enantiomers of a new bradycardic agent: S-16257-2 and S-16269-2. *Brit. J. Pharmacol.* **117**:1293-1301
28. Denson D.D., Wang X., Worrel R.T., Eaton D.C. 2000. Effects of fatty acids on BK channels in GH<sub>3</sub> cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**:C1211-1219
29. Denys A., Hichami A., Khan N.A. 2002. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid modulate MAP kinase enzyme activity in human T-cells. *Mol. Cell. Biochem.* **232**:143-148
30. Devor D.C., Frizzell R.A. 1998. Modulation of K<sup>+</sup> channels by arachidonic acid in T84 cells.II. Activation of Ca<sup>2+</sup>-independent K<sup>+</sup> channel. *Am. J. Physiol.* **274**:C149-160
31. De Vries C. E., van Noorden C.I. 1992. Effects of dietary fatty acid composition on tumor growth and metastasis. *Anticancer Res.* **12**:1513-1522
32. Diggle C.P. 2002. In vitro studies on the relationship between polyunsaturated fatty acids and cancer: tumour or tissue specific effects? *Prog. Lipid Res.* **41**:240-253
33. Doyle D.A., Cabral J.M., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280**:69-77
34. Dubois J.-M., Rouzair-Dubois B. 1993. Role of potassium channels in mitogenesis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**:1-21
35. Dubin A.E., Liles M.M., Harris G.L. 1998. The K<sup>+</sup> channel gene ether à go-go is required for the transduction of a subset of odorants in adult *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* **13**:5603-5613
36. Dumont J.N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin).I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* **136**:153-180
37. Engeland B., Neu A., Ludwig J., Roeper J., Pongs O. 1998. Cloning and functional expression of rat ether à go-go-like K<sup>+</sup> channel genes. *J. Physiol.* **513**:647-654
38. Fatherazi S., Izutzu K.T., Wellner R.B., Belton C.M.1994. Hypotonically activated chlorid current in HSC cells. *J. Membrane Physiol.* **142**:181-193
39. Fedida D. 1997. Gating charge and ionic currents associated with quinidine block of human Kv1.5 delayed rectifier channels. *J. Physiol.* **499**: 661-675
40. Fink M., Lesage F., Duprat F., Heurteaux C., Reyes R., Fosset M., Lazdunski M. 1998. A neuronal two P domain K<sup>+</sup> channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J.* **17**:3297-3308

41. Fraser S.P., Grimes J.A., Djamgog M.B. 2000. Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines. *Prostate* **44**:61-76
42. Frederickson, C.J. Suh, S.W., Silva, D., Frederickson, C.J. Thompson, R.B. 2000. Importance of zinc in the central nervous system: The zinc-containing neuron. *J. Nutr.* **130**:1471S-1483S
43. Frings S., Brüll N., Dzeja C., Angele A., Hagen V., Kaupp B., Baumann A. 1998. Characterization of *ether à go-go* channels present in photoreceptors reveals similarity to  $K_{Kx}$ , a  $K^+$  current in rod inner segments. *J. Gen. Physiol.* **111**:583-599.
44. Gavrilova-Ruch O., Schönherr K., Gessner G., Schönherr R., Klapperstück T., Wohlrab W., Heinemann S.H. 2002. Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *J. Membrane Biol.* **188**:137-149
45. Ganetzky B., Wu C.-F. 1983. Neurogenetic analysis of potassium currents in *Drosophila*: Synergistic effects of neuromuscular transmission in double mutants. *J. Neurogenet.* **1**:17-28
46. Gessner G., Heinemann S.H. 2003. Inhibition of hEAG1 and hERG1 potassium channels by clofilium and its tertiary analog LY97241. *Brit. J. Pharmacol.* **138**:161-171
47. Gessner G., Zacharias M., Bechstedt S., Schönherr R., Heinemann S.H. 2004. Molecular determinants for high-affinity block of human EAG potassium channels by antiarrhythmic agents. *Mol. Pharmacol.* **65** (in press)
48. Griffith L.C., Wang J., Zhong Y., Wu C.-F., Greenspan R.J. 1994. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and potassium channel subunit eag similarly affect plasticity in *Drosophila*. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:10044-10048
49. Grissmer S., Dethlefs B., Wasmuth J.J., Goldin A.L., Gutman G.A., Cahalan M.D., Chandy K.G. 1990. Expression and chromosomal localisation of a lymphocyte  $K^+$  channel gene. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:9411-9415
50. Gubitosi-Klug R.A., Yu S.P., Choi D.W., Gross R.W. 1995. Concomitant acceleration of the activation and inactivation kinetics of the human delayed rectifier  $K^+$  channel (Kv1.1) by  $Ca^{2+}$ -independent phospholipase  $A_2$ . *J. Biol. Chem.* **270**:2885-2888
51. Gubitosi-Klug R.A., Gross R.W. 1996. Fatty acid ethyl esters, nonoxidative metabolites of ethanol, accelerate the kinetics of activation of the human brain delayed rectifier  $K^+$  channel, Kv1.1. *J. Biol. Chem.* **271**:32519-32522
52. Jonas P. 1995. Fast application of agonists to isolated membrane patches. In: Single-Channel Recording, 2nd Ed. Eds. Sakmann B., Neher E. Plenum Press, New York, USA. p.231-243

53. Hamill O.P., Marty E., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.* **391**:85-100
54. Hamilton K.L., Syme C.A., Devor D.C. 2003. Molecular localisation of the inhibitory arachidonic acid binding site to the pore of hIK1. *J. Biol. Chem.* **278**:16690-16697
55. Hanahan D., Weinberg R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70
56. Herzberg J.M., Trudeau M.C., Robertson G.A. Transfer of rapid inactivation and sensitivity to the class III antiarrhythmic drug E-4031 from HERG to M-eag channels. *J. Physiol.* **511**:3-14
57. Hesketh R. 2002. Oncogenes and tumour suppressor genes. In: Oxford Textbook of Oncology, 2nd Ed. Volume 1. Eds. Souhami R.L., Tannock I., Hohenberger P., Horiot J.-C. University Press, Oxford, UK. p.15-32
58. Hille B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd Ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, USA
59. Honoré E., Barhanin J., Attali B., Lesage F., Lazdunski M. 1994. External blockade of the major cardiac delayed-rectifier K<sup>+</sup> channel (Kv1.5) by polyunsaturated fatty acids. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:1937-1944
60. Hoshi T., Zagotta W.N., Aldrich R.W. 1994. Shaker potassium channel gating I: transitions near the open state. *J. Gen. Physiol.* **103**: 249-278
61. Hughes-Fulford M., Chen Y., Tjandrawinata R.R. 2001. Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis* **22**:701-707
62. Kamatchi G.L., Ticku M.K. 1991. Tricyclic antidepressants inhibit Ca<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> efflux in cultured spinal cord neurons. *Brain Res.* **545**:59-65
63. Kamiya K., Mitcheson J.S., Yasui K., Kodama I., Sanguinetta M.C. 2001. Open channel Block of HERG K<sup>+</sup> channels by vesnarinone. *Mol. Pharmacol.* **60**:244-253
64. Kamouchi M., Droogmans G., Nilius B. 1999. Membrane potential as a modulator of the free intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in agonist-activated endothelial cells. *Gen. Physiol. Biophys.* **18**:199-208
65. Kariya K., Koyama S., Nakashima S., Oshiro T., Morinaka K., Kikuchi A. 2000. Regulation of complex formation of POB1/epsin/adaptor protein complex 2 by mitotic phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **275**:18399-18406
66. Kim Y., Gnatenco C., Bang H., Kim D. 2001. Localization of TREK-2 K<sup>+</sup> channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pH<sub>i</sub>. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.* **442**:952-960

67. Kogteva G.S., Bezuglov V.V. 1998. Unsaturated fatty acids as endogenous bioregulators. *Biochemistry (Moscow)* **63**:2-72
68. Kuo C.-C. 1998. Imipramin inhibition of transient  $K^+$  current: an external open channel blocker preventing fast inactivation. *Biophys. J.* **12**:2845-2857
69. Lázár-Molnár E., Hegyesi H., Tóth S., Falus A. 2000. Autocrine und paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* **12**:547-554
70. Lauritzen I., Blondeau N., Heurteaux C., Widmann C., Romey G., Lazdunski M. 2000. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J.* **19**:1784-1793
71. Lees-Miller J.P., Duan Y., Teng G.Q., Duff H.J. 2000. Molecular determinant of high affinity dofetilide binding to HERG1 expressed in *Xenopus* Oocytes: involvement of S6 sites. *Mol. Pharmacol.* **57**:367-374
72. Lepple-Wienhues A., Berweck S., Bohmig M., Leo C.P., Meyling B., Garbe C., Wiederholt M. 1996.  $K^+$  channels and the intracellular calcium signal in human melanoma cell proliferation. *J. Membrane Biol.* **151**:149-157
73. Lesage F., Lazdunski M. 2000. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* **279**: F793-801
74. Li G., Herlyn M. 2000. Dynamics of intracellular communication during melanoma development. *Mol. Med. Today* **6**:163-169
75. Liu J.H., Bijlenga P., Fischer-Lougheed J., Occhiodoro T., Kaelin A., Bader C.R., Bernheim L. 1998. Role of inward rectifier  $K^+$  current and of hyperpolarization in human myoblast fusion. *J. Physiol.* **510**:467-476
76. Liu J.H., Bijlenga P., Occhiodoro T., Fischer-Lougheed J., Bader C.R., Bernheim L. 1999. Mibefradil (Ro 40-5967) inhibits several  $Ca^{2+}$  and  $K^+$  currents in human fusion-competent myoblasts. *Brit. J. Pharmacol.* **126**:245-250.
77. Liu Y., Liu D., Heath L., Meyers D.M., Krafte D.S., Wagoner P.K., Silvia C.P., Yu W., Curran M.E. 2001. Direct activation of an inwardly rectifying potassium channel by arachidonic acid. *Mol. Pharmacol.* **59**:1061-1068
78. Liu J., Zhang M., Jiang M., Tseng G.-N. 2002. Structural and functional role of the extracellular S5-P linker in the HERG potassium channel. *J. Gen. Physiol.* **120**:723-737
79. Ludwig J., Terlau H., Wunder F., Brüggemann A., Pardo L.A., Marquardt A., Stümer W., Pongs O. 1994. Functional expression of rat homologue of the voltage-gated *ether à go-go* potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the *Drosophila* channel and its mammalian counterpart. *EMBO J.* **13**:4451-4458

80. Ludwig J., Weseloh R., Karschin C., Liu Q., Netzer R., Engeland B., Stansfeld C., Pongs O. 2000. Cloning and functional expression of rat eag2, a new member of the *ether à go-go* family of potassium channels and comparison of its distribution with that of eag1. *Mol. Cell. Neurosci.* **16**:59-70
81. Macica C.M., Yang Y., Lerea K., Hebert S.C., Wang W. 1997. Role of the NH<sub>2</sub> terminus of the cloned renal K<sup>+</sup> channel, ROMK1, in arachidonic acid -mediated inhibition. *Am.J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* **274**:F175-181
82. MacKinnon, R., Cohen, S.L., Kuo, A., Lee, A. und Chait, B.T. 1998. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science* **280**:106-109.
83. Maingret F., Patel A.J., Lesage F., Lazdunski M., Honoré E. 1999. Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J. Biol. Chem.* **274**:26691-26696
84. Mathie A., Woollorton J.R., Watkins C.S. 1998. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen. Pharmacol.* **30**:13-24
85. McEvoy M.P., Owen D.G., Garrat J.C. 1995. Effects of arachidonic acid on the cloned potassium channel mKv1.2 in CHO cells. *J. Physiol.* **487**:193P
86. Meves H. 1994. Modulation of ion channels by arachidonic acid. *Prog. Neurobiol.* **43**:175-186
87. Meyer R., Heinemann S.H. 1998. Characterization of an eag-like potassium channel in human neuroblastoma cells. *J. Physiol.* **508**:49-56
88. Meyer R., Schönherr R., Gavrilova-Ruch O., Wohlrab W., Heinemann S.H. 1999. Identification of *ether à go-go* and calcium-activated potassium channels in human melanoma cells. *J. Membrane Biol.* **171**:107-115
89. Mitcheson J.S., Chen J., Lin M., Culberson C., Sanguinetti M. 2000. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:12329-12333
90. Monje F., Pardo L.A., Sánchez A., Camacho J., Stuhmer W. 2002. Inactivating properties in human EAG channels. *Biophys. J.* **82**:230a
91. Neef A. 1999. Modulation spannungsabhängiger Konformationsänderungen des Kaliumkanals bEAG1. Diplomarbeit an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Physikalisch-Astronomische Fakultät
92. Nilius B., Böhm T., Wohlrab W. 1990. Properties of a potassium-selective ion channel in human melanoma cells. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.* **417**:269-277
93. Nilius B., Wohlrab W. 1992. Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells. *J. Physiol.* **445**:537-5484

94. Nilius B., Schwarz G., Droogmans G. 1993. Control of intracellular calcium by membrane potential in human melanoma cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **265**:C1501-1510
95. Nilius B., Sehrer J., Viana F., De Greef C., Raeymaekers K., Eggermont J., Droogmans G. 1994. Volume-activated Cl<sup>-</sup> currents in different mammalian non-exitable cell types. *Pflügers Arch.* **428**:364-371
96. Nilius B., Eggermont J., Voets T., Droogmans G. 1996. Volume-activated Cl<sup>-</sup> currents. *Gen. Pharmacol.* **27**:1131-1140
97. Occhiodoro T., Bernheim L., Liu J.-H., Bijlenga P., Sinnreich M., Bader C.R., Fischer-Lougheed J. 1998. Cloning of a human *ether à go-go* potassium channel expressed in myoblast at the onset of fusion. *FEBS Lett.* **434**:177-182
98. Ouadid-Ahidouch H., Bourhis X.L., Roudbaraki M., Toillon R.A., Delcourt P., Prevarskaya N. 2001. Changes in the K<sup>+</sup> current-density of MCF-7 cells during progression through the cell cycle: possible involvement of the h-ether à go-go K<sup>+</sup> channel. *Receptor. Channel.* **7**:345-356
99. Pande G., Kumar N.A., Manogaran P.S. 1996. Flow cytometric study of changes in the intracellular calcium during the cell cycle. *Cytometry* **24**:55-63
100. Papazian D. 1999. Activation of voltage-dependent potassium channels. *Curr. Top. Membr.* **46**: 29-46
101. Pardo L.A., Brüggemann A., Camacho J., Stühmer W. 1998. Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K<sup>+</sup> channels. *J. Cell Biol.* **143**:767-775
102. Pardo L.A., del Camino D., Sánchez A., Alves F., Brüggemann A., Beckh S., Stümer W. 1999. Oncogenic potential of EAG K<sup>+</sup> channels. *EMBO J.* **18**:5540-5547
103. Pardo-Lopez L., Zhang M., Liu J., Jiang M., Possani L.D., Tseng G.-N. 2002. Mapping the binding site of a human *ether-a-go-go*-related gene-specific peptide toxin (ErgTx) to the channel's outer vestibule. *J. Biol. Chem.* **277**:16403-16411
104. Pena T.L., Rane S.G. 1999. The fibroblast intermediate conductance K<sub>Ca</sub> channel, FIK, as a prototype for the cell growth regulatory funktion of the IK channel family. *J. Membrane Biol.* **172**:249-257
105. Peterson D.A., Peterson D.C., Archer S.L., Weir E.K. 1996. Accelerated disulfide reduction with polyunsaturated fatty acids: a mechanism of ionic channel modulation. *Redox Rep.* **2**:263-265
106. Pettersson O.A., Olsson P., Lindstrom P., Sjoberg S., Carlsson J. 1993. Penetration and binding of L- and D-carboranylalanine in human melanoma spheroids. *Melanoma Res.* **3**:369-376

107. Petrou S., Ordway R.W., Hamilton J.A., Walsh J.V.Jr., Singer J.J. 1994. Structural requirements for charged lipid molecules to directly increase or suppress K<sup>+</sup> channel activity in smooth muscle cells. *J. Gen. Physiol.* **103**: 471-486
108. Petrou S., Ordway R.W., Kirber M.T., Dopico A.M., Hamilton J.A., Walsh J.V.Jr., Singer J.J. 1995. Direct effects of fatty acids and other charged lipids on ion channel activity in smooth muscle cells. *Prostag. Leukotr. Ess.* **52**:173-178
109. Piomelli D. 1996. Arachidonic Acid in Cell Signalling. Springer, New York, USA
110. Piro E.T., Shen L., Huang X.-Y. 1999. Purification of an EH domain-binding protein from rat brain that modulates the gating of the rat *ether à go-go* channel. *J. Biol. Chem.* **274**:33677-33683
111. Poling J.S., Vicini S., Rogawski M.A., Salem N.Jr. 1996. Docosahexaenoic acid block of neuronal voltage-gated K<sup>+</sup> channels: subunit selective antagonism by zinc. *Neuropharmacology* **35**: 969-982
112. Pongs O. 1999. Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Lett.* **452**:31-35
113. Rane S.G. 2000. The growth regulatory fibroblast IK channel is the prominent electrophysiological feature of rat prostatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **269**: 457-563
114. Razanamahefa L., Prouff S., Bardon S. 2000. Stimulatory effect of arachidonic acid on T-47D human breast cancer cell growth is associated with enhancement of cyclin D1 mRNA expression. *Nutr. Cancer* **38**:274-280
115. Rettig J., Heinemann S.H., Wunde R F., Lorra C., Parcej D.N., Dolly J.O., Pongs O. 1994. Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of beta-subunit. *Nature* **369**:289-294.
116. Reimann F., Ashcroft F.M. 1999. Inwardly rectifying potassium channels. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:503-508
117. Richardson V.B., Littlefield L.G., Sayer A.M., Peterson P.T. 1994. Cell-cycle-stage specificity of the methotrexate block as resolved by X-ray-induced chromosome damage. *Cytogenet. Cell Genet.* **66**:126-128
118. Robertson G.A., Warmke J. W., Ganetzky B. 1996. Potassium currents expressed from *Drosophila* and mouse *eag* cDNAs in *Xenopus* oocytes. *Neuropharmacology* **35**: 841-850
119. Rogalski S.L., Chavkin C. 2001. Eicosanoids inhibit the G-protein-gated inwardly rectifying potassium channel (Kir3) at the Na<sup>+</sup>/PIP<sub>2</sub> gating site. *J. Biol. Chem.* **276**: 14855-14860

120. Rolf S., Haverkamp W., Borggreffe M., Musshoff U., Eckardt L., Mergenthaler J., Snyders D.J., Pongs O., Speckmann E.J., Breithardt G., Madeja M. 2000. Effects of antiarrhythmic drugs on cloned cardiac voltage-gated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **362**:22-31
121. Saganich M.J., Machado E., Rudy B. 2001. Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K<sup>+</sup> channels in brain. *J. Neurosci.* **21**: 4609-4624
122. Sánchez-Chapula J.A., Navarro-Polanco R.A., Culberson C., Chen J., Sanguinetti M.C. 2002. Molecular determinants of voltage-dependent human ether-a-go-go related gene (HERG) K<sup>+</sup> channel block. *J. Biol. Chem.* **277**:23587-23595
123. Santella L. 1998. The role of calcium in the cell cycle: facts and hypotheses. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **244**:317-324
124. Satyamoorthy K., Bogenrieder T., Herlyn M. 2001. No longer a molecular black box-new clues to apoptosis and drug resistance in melanoma. *Trends in Molecular Medicine* **7**:191-194
125. Schledermann W., Wulfsen I., Schwarz J.R., Bauer C.K. 2001. Modulation of rat *erg1*, *erg2*, *erg3* and HERG K<sup>+</sup> currents by thyrotropin-releasing hormone in anterior pituitary cells via the native signal cascade. *J. Physiol.* **532**:143-163
126. Schönherr R., Heinemann S.H. 1996. Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *J. Physiol.* **493**:635-642
127. Schönherr R., Hehl S., Terlau H., Baumann A., Heinemann S.H. 1999. Individual subunits contribute independently to slow gating of bovine EAG potassium channels. *J. Biol. Chem.* **274**:5362-5369
128. Schönherr R., Löber, K., Heinemann, S. 2000. Inhibition of human *ether à go-go* potassium channels by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *EMBO J.* **19**:3263-3271
129. Schönherr R., Gessner G., Löber K., Heinemann S.H. 2002. Functional distinction of human EAG1 and EAG2 potassium channels. *FEBS Lett.* **514**:204-208
130. Schönherr R., Mannuzzu L.M., Isacoff E.Y., Heinemann S.H. 2002a. Conformational switch between slow and fast gating modes: allosteric regulation of voltage sensor mobility in the EAG K<sup>+</sup> channel. *Neuron* **35**:935-949
131. Sen S., Erba E., D'Incalci M. 1990. Synchronisation of cancer cell lines of human origin using methotrexate. *Cytometry* **11**:595-602
132. Sewing, S., Roeper, J., Pongs, O. 1996. Kv beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits. *Neuron* **16**: 455-463

133. Shen M.-R., Droogmans G., Eggermont J., Voets T., Ellory J.C., Nilius B. 2000. Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells. *J. Physiol.* **529**:385-394
134. Shi W., Wymore R.S., Wang H.-S., Pan Z., Cohen I.S., McKinnon D., Dixon J.E. 1997. Identification of two nervous system-specific members of the *erg* potassium channel gene family. *J. Neurosci.* **17**:9423-9432
135. Silverman W.R., Tang C.-Y., Mock A.F., Huh K.-B., Papazian D.M. 2000. Mg<sup>2+</sup> modulates voltage-dependent activation in ether à go-go potassium channels by binding between transmembrane segments S2 und S3. *J. Gen. Physiol.* **116**:663-677
136. Silverman W.R., Roux B., Papazian D.M. 2003. Structural basis of two-stage voltage-dependent activation in K<sup>+</sup> channels. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:2935-2940
137. Smith P.L., Baukowitz T., Yellen G. 1996. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* **379**: 833-836
138. Snyders D.J., Tamkun M.M., Bennett P.B. 1993. A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart. Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J. Gen. Physiol.* **101**:513-543
139. Strobl J.S., Wonderlin W.F., Flynn D.C. 1995. Mitogenic signal transduction in human breast cancer cells. *Gen. Pharmacol.* **26**:1643-1649
140. Stansfeld C.E., Röper J., Ludwig J., Weseloh R.M., Marsh S.J., Brown D.A., Pongs O. 1996. Elevation of intracellular calcium by muscarinic receptor activation induces a block of voltage-activated rat ether à go-go channels in a stably transfected cell line. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:9910-9914
141. Stühmer, W., Ruppersberg, J.P., Schroter, K.H., Sakmann, B., Stocker, M., Giese, K.P., Perschke, A., Baumann, A., Pongs, O. 1989. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J.* **8**:3235-3244
142. Stühmer W., Terlau H., Heinemann S.H. 1992. In: Practical Electrophysiological Methods. Eds. Kettenmann H., Grantyn R. Wiley -Liss, New York, USA. p.121-125
143. Sun X.X., Hodge J.J., Zhou Y., Nguyen M., Griffith L.C. 2003. The eag potassium channel binds and locally activates CaMKII. *J. Biol. Chem.* **279**:10206-10214
144. Suessbrich H., Schönherr R., Heinemann S.H., Lang F., Busch A.E. 1997. Specific block of cloned *Herg* channels by clofilium and its tertiary analog LY9724. *FEBS Lett.* **414**:435-438
145. Takuwa N., Zhou W., Takuwa Y. 1995 Calcium, calmodulin and cell cycle progression. *Cell. Signal.* **7**:93-104

146. Tang C.-Y., Schulters C.T., Jiménez R.M., Papazian D.M. 1998. Shaker and ether à go-go K<sup>+</sup> channel subunits fail to coassemble in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* **75**:1263-1270
147. Tang C.-Y., Bezanilla F., Papazian D.M. 2000. Extracellular Mg modulates slow gating transitions and the opening of *Drosophila* ether à go-go potassium channels. *J. Gen. Physiol.* **115**:319-337
148. Teschemacher A.G., Seward E.P., Hancox J.C., Witchel H.J. 1999. Inhibition of the current of heterologously expressed HERG potassium channels by imipramin and amitriptyline. *Brit. J. Pharmacol.* **128**:479-485
149. Terlau H., Ludwig J., Steffan R., Pongs O., Stühmer W., Heinemann S.H. 1996. extracellular Mg<sup>2+</sup> regulates activation of rat eag potassium channel. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.* **432**:301-312
150. Terlau H., Heinemann S.H., Stühmer W., Pongs O., Ludwig J. 1997. Amino terminal-dependent gating of the potassium channel rat eag is compensated by a mutation in the S4 segment. *J. Physiol.* **502**:537-543
151. Terstappen G.C., Pula G., Carignani C., Chen M.X., Roncarati R. 2001. Pharmacological characterisation of the human small conductance calcium-activated potassium channel hSK3 reveals sensitivity to tricyclic antidepressants and antipsychotic phenothiazines. *Neuropharmacology* **40**:772-783
152. Torres A.M., Bansal P.S., Sunde M., Clarke C.E., Bursill J.A., Smith D.J., Bauskin A., Breit S.N., Campbell T.J., Alewood P.F., Kuchel P.W., Vandenberg J.I. 2003. Structure of the HERG K<sup>+</sup> channel S5P extracellular linker. *J. Biol. Chem.* **278**:42136-42148
153. Trudeau M.C., Warmke J.W., Ganetzky B., Robertson G.A. 1995. HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* **269**:92-95
154. Valenzuela C., Delpon E., Tamkun M., Tamargo J., Snyders D.J. 1995. stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. *Biophys.J.* **69**:418-427
155. Vergara C., Latorre R., Marrion N.V., Adelman J.P. 1998. Calcium-activated potassium channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**:321-329
156. Villarreal A., Schwarz T.L. 1996. Inhibition of the Kv4 (Shal) family of transient K currents by arachidonic acid. *J. Neurosci.* **16**:2522-2531
157. Villikka K., Pyrhonen S. 1996. Cytokine therapy of malignant melanoma. *Ann. Med.* **28**:227-233
158. Visentin S., Levi G. 1998. Arachidonic acid-induced inhibition of microglial outward-rectifying K<sup>+</sup> current. *Glia* **22**: 1-10

159. Vogel W., Schwepp W., Sigwarth I. 1978. Comparison of thymidine, fluorodeoxyuridine, hydroxyurea und methotrexate blocking at the G1/S phase transition of the cell cycle studied by replication patterns. *Hum. Genet.* **45**:193-198
160. Wallert M.A., Ackerman M.J., Kim D., Clapham D.E. 1991. Two novel cardiac atrial K<sup>+</sup> channels, I<sub>K,AA</sub> and I<sub>K,PC</sub>. *J. Gen. Physiol.* **989**:21-939
161. Wang S., Liu S., Morales M.J., Strauss H.G., Rasmusson R.L. 1997. A quantitative analysis of the activation and inactivation kinetics of HERG expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **502**:45-60
162. Wang Z., Wilcon G.F., Griffith L.C. 2002. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates and regulates the *Drosophila* eag potassium channel. *J. Biol. Chem.* **277**:24022-24029
163. Warmke J.W., Drysdale R., Ganetzky B. 1991. A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science* **252**:1560-1562
164. Warmke J.W., Ganetzky B. 1994. A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:3438-3442
165. Wei A., Jegla T., Salkoff L. 1996. Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* **35**:805-829
166. Weinshenker D., Wie A., Salkoff L., Thomas J.H. 1999. Block of an ether-à-go-go-like K<sup>+</sup> channel by imipramin rescues egl-2 excitation defects in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **19**:9831-9840
167. Welch D.R., Goldberg S.F. 1997. Molecular mechanisms controlling human melanoma progression and metastasis. *Pathobiology* **65**:311-330
168. Whitfield J.F., Boyton A.L., Mac Manus J.P., Sikorska M., Tsang B.K. 1979. The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP. *Mol. Cell. Biochem.* **27**:155-179
169. Wondergem R., Gogng W., Monen S.H., Dooley S.N., Gonce J.L., Conner T.D., Houser M., Ecay T.W., Ferslew K.E. 2001. Blocking swelling-activated chlorid current inhibits mouse liver cell proliferation. *J. Physiol.* **532**:661-672
170. Wonderlin W.F., Strobl J.S. 1996. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J. Membrane Biol.* **154**:91-107
171. Wooltorton J.R.A., Mathie A. 1993. Block of potassium currents in rat isolated sympathetic neurones by tricyclic antidepressants and structurally related compounds. *Brit. J. Pharmacol.* **110**:1126-1132
172. Wooltorton J.R.A., Mathie A. 1995. Potent block of potassium currents in rat isolated sympathetic neurons by the uncharged form of amitriptyline and related tricyclic compounds. *Brit. J. Pharmacol.* **116**:2191-2200

173. Xia Z., Lundgren B., Bergstrand A., DePierre J.W., Nässberger L. 1999. Changes in the generation of reactive oxygen species and in the mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the antidepressants imipramin, clomipramin, and citalopram and the effects on these changes by Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub>. *Biochem. Pharmacol.* **57**:1199-1208
174. Xu X., Lee K.S. 1996. Dual effect of arachidonic acid on ATP-sensitive K current of coronary smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **270**:H1957-1962
175. Yamagishi T., Ishii K., Taira N. 1995. Antiarrhythmic and bradycardic drugs inhibit currents of cloned K<sup>+</sup> channels, Kv1.2 and Kv1.4. *Eur. J. Pharmacol.* **281**:151-159
176. Yao X., Kwan H.-Y. 1999. Activity of voltage-gated K<sup>+</sup> channels is associated with cell proliferation and Ca<sup>2+</sup> influx in carcinoma cells of colon cancer. *Life Sci.* **65**:55-62
177. Yellen G. 1998. The moving parts of ion channels. *Q. Rev. Biophys.* **31**:239-296
178. Zagotta W.N., Hoschi T., Dittman J., Aldrich R.W. 1994a. *Shaker* potassium channel gating II: transitions in the activation pathway. *J. Gen. Physiol.* **103**:279-319
179. Zagotta W.N., Hoschi T., Aldrich R.W. 1994b. *Shaker* potassium channel gating III: evaluation of kinetic models for activation. *J. Gen. Physiol.* **103**:321-362
180. Zufall F., Shepherd G.M., Barnstable C.J. 1997. Cyclic nucleotide gated channels as regulators of CNS development and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**:404-412

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 20 April 2004

Oxana Gavrilova-Ruch

## Lebenslauf

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>Name:</b>          | Oxana Gavrilova-Ruch  |
| <b>Geburtsdatum:</b>  | 16.05.70  |
| <b>Geburtsort:</b>    | Moskau  |
| <b>Familienstand:</b> | verheiratet   |
| 1977-1987             | Mittelschule in Moskau  |
| 1987-1992             | Studium an der Lomonossow-Universität<br>Moskau<br>Abschluss: Diplombiologin                  |
| 1992-1996             | Doktorandin am Institut für Biomedizinische<br>Probleme Moskau<br>Abschluss: Dr. rer. nat/VAK |
| 1997                  | Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut<br>für Luft- und Raumfahrtmedizin, DLR Köln       |
| 1998-2004             | Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der FSU<br>Jena  |

Jena, den 20 April 2004

Oxana Gavrilova-Ruch

## Publikationen

Gavrilova O.N., Gabova A.V., Sergejeva G.I., Tairbekov M.G. 1995. Effect of altered gravity on the culture of the unicellular eukaryote *Bursaria truncatella* (Ciliophora). *Aviakosmicheskaja i Ekologicheskaja Meditsina* 29:34-39

Gabova A.V., Gavrilova O.N., Sergejeva G.I., Tairbekov M.G. 1995. Biomechanical aspects of food vacuole formation by the ciliate *Bursaria truncatella* under altered gravity. *Aviakosmicheskaja i Ekologicheskaja Meditsina* 29:40-46

Tairbekov M.G., Gabova A.V., Gavrilova O.N. 1997. Growth and functioning of unicellular organisms in conditions of altered gravity. *Biology Bulletin* 24:206-211

Hemmersbach R., Bromeis B., Wilczek M., Neubert J., Tairbekov M., Gavrilova O., Rieder N., Send W., Mulisch M. 1998. Morphology and physiology of *Loxodes* after cultivation in space. *ESA-SP 1222*:119-126

Tairbekov M., Hemmersbach R., Gavrilova O. 1998. Gravisensitivity of cells of several types. *J. Gravit. Physiol.* 5:P115-116

Block I., Freiberger N., Gavrilova O., Hemmersbach R. 1999. Putative gravireception mechanisms of protists. *Adv. Space Res.* 24:877-882

Publikationen zum Thema der Dissertation:

Meyer R., Schönherr R., Gavrilova-Ruch O., Wohlrab W., Heinemann S.H. 1999. Identification of *ether á go-go* and calcium-activated potassium channels in human melanoma cells. *J. Membrane Biol.* 171:107-115

Gavrilova-Ruch O., Schönherr K., Gessner G., Schönherr R., Klapperstück T., Wohlrab W., Heinemann S.H. 2002. Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *J. Membrane Biol.* 188:137-149

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. Stefan H. Heinemann in der Arbeitsgruppe Molekulare und zelluläre Biophysik an der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stefan H. Heinemann für die Überlassung des Themas sowie das ständige Interesse an meiner Arbeit. Von besonderem Wert waren die vielen anregenden Diskussionen, denen ich oft neue Denkansätze für meine Arbeit entnehmen konnte.

Nicht weniger Dank gilt PD Dr. Roland Schönherr für die großzügige Unterstützung bei den Schreiben der Dissertation und bei den molekularbiologischen Arbeiten. Mein besonderer Dank gilt Dr. Kristina Schönherr und Dr. Guido Gessner für die Unterstützung und konstruktiven Gespräche zum bearbeiteten Thema.

Für ihre hilfsbereite und freundliche Unterstützung bei der Arbeit im Labor möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bei Angela Roßner und Steffi Arend bedanken. Ihrem unkomplizierten Engagement verdanke ich die Einarbeitung und Durchführung der verschiedensten Arbeitstechniken.

Für ihre Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit möchte ich mich bei Gudrun Albrecht herzlich bedanken.

Für ihre kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit möchte ich mich bei Dr. Solveig Hehl, Dr. Malle Soom, Ulrike Ziechner, Dr. Alfred Hansel, Stefan Jung, Enrico Leopold bedanken. Weiterhin danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das angenehme und anregende Arbeitsklima.

Ausserdem möchte ich meinem Ehemann Bernd Ruch für seine Geduld und ständige Unterstützung auch in schwierigen Phasen danken.