



Hochschule Anhalt

Anhalt University of Applied Sciences

Fachbereich Angewandte Biowissenschaften
und Prozesstechnik

**UV-vis Spektroskopie als Methode zur Online-Expositionskontrolle
sicherheitspharmakologischer Patch Clamp Messungen
am hERG Ionenkanal**

Masterarbeit

**zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science (M. Sc.)**

Martina Wotsch

Matrikel-Nr.: 4063665
Studiengang: Pharmatechnik

1. Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Mägert
2. Gutachter: Dr. T. Danker

Datum der Abgabe: 18.09.2017

Diese Arbeit wurde am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut (NMI) an der Universität Tübingen, in der Abteilung Elektrophysiologie durchgeführt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Erstellung meiner Masterarbeit begleitet und unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht hierbei an Herr Dr. Timm Danker, der mir diese Arbeit am NMI ermöglicht und mich stets sehr gut unterstützt und betreut hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Mägert bedanken, der mich seitens der Hochschule Anhalt betreut hat.

Ich danke herzlich allen meinen Kollegen aus der Abteilung der Elektrophysiologie, die mir während meiner Arbeit geholfen haben, insbesondere Herrn Dominik Loser und Frau Birgitta Noll für die Unterstützung im Labor und Herrn Frank Machnow für die Hilfe bei der Bearbeitung der Kunststoffbox und deren Halterung.

Ich bedanke mich außerdem bei Moritz Schollbach und Johannes Hampp für die Unterstützung bei der Auswertung der Spektrometerdaten über Jupyter Notebook. Darüber hinaus danke ich besonders Johannes Hampp für die Hilfestellung bezüglich \LaTeX , für das Korrekturlesen und die allgemeine Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums und für die Unterstützung bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die Masterarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Das bearbeitete Thema wurde nicht schon früher im Rahmen einer anderen Arbeit behandelt und/oder anderswo als Prüfungsarbeit eingereicht.

Ort:

Datum:

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Symbole und Formelzeichen	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Bibliographische Beschreibung	VIII
Abstract	VIII
Abstract (Deutsch)	IX
1 Einleitung	1
2 Aufgabenstellung	3
3 Stand des Wissens und der Technik	4
3.1 Ionenkanäle	4
3.2 Kardiale Ionenkanäle	5
3.3 Kardiale Sicherheitspharmakologie	8
3.4 Die CiPA-Initiative	10
3.5 Patch Clamp Technik	11
3.6 UV-vis Spektroskopie	13
4 Methoden	15
4.1 Zellkultur	15
4.1.1 Passagieren der Mutterkultur	15
4.1.2 Vorbereiten der Arbeitskulturen	16
4.1.3 Ernten der Zellen (zum Patchen)	17
4.2 UV-vis-Detektor	18
4.2.1 Aufstellen und Anschließen	18
4.2.2 Herstellen von Testlösungen	18
4.2.3 Ermittlung der Absorptionsmaxima	19
4.2.4 Inbetriebnahme des UV-Vis-Spektrometers	20
4.2.5 Integration der Durchflusszelle in den Patch Clamp Aufbau	23
4.2.6 Patch Clamp Technik und UV-vis-Detektor	25
4.3 Patch Clamp Technik	26
4.3.1 Herstellung der Patchpipetten	26

4.3.2	Herstellen der verwendeten Pufferlösungen	27
4.3.3	Aufbau des Messstandes	28
4.3.4	Aufbau und Funktionsweise des Perfusionssystems	31
4.3.5	Durchführung der Patch Clamp Messungen	33
4.3.6	Offset-Abgleich und Kapazitäts-Kompensationen	36
4.3.7	Verwendetes Pulsprotokoll	37
4.4	Sicherheitspharmakologische Messungen am hERG-Ionenkanal	39
4.5	Erstellung einer Kalibrationskurve für das Spektrometer	40
4.6	Auswertung der Messdaten der sicherheitspharmakologischen Experimente	41
5	Ergebnisse	42
5.1	UV-vis-Detektor	42
5.1.1	Ermittlung der Absorptionsmaxima	42
5.1.2	Inbetriebnahme des UV-Vis-Spektrometers	45
5.1.3	Integration der Durchflusszelle in den Patch Clamp Aufbau	45
5.2	Patch Clamp Technik	48
5.2.1	Pharmakologische Messungen mit Online-Expositionskontrolle	48
5.2.2	Aufnahme der Kalibriergeraden	53
5.2.3	Auswertung der Daten der Kalibriermessungen	55
6	Diskussion	58
6.1	UV-vis-Detektor	58
6.1.1	Inbetriebnahme	58
6.1.2	Kalibrierung	59
6.1.3	Verbesserungsmöglichkeiten	61
6.2	Sicherheitspharmakologische Messungen am hERG-Ionenkanal	62
7	Schlussfolgerung	64
	Literatur	65
	Anhang	A1

Abkürzungsverzeichnis

Bezeichnung	Beschreibung
IC ₅₀	Konzentration, die die maximale Stromantwort zu 50 % inhibiert
CHO	Chinese Hamster Ovary
CiPA	Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay
EKG	Elektrokardiogramm
hERG	human Ether-a-go-go Related Gene
ICH	International Committee on Harmonization
LQTS	Long QT-Syndrom
NMI	Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TdP	Torsade de Pointes
UV	Ultraviolettstrahlung
vis	visible (sichtbares Licht)

Symbole und Formelzeichen

Bezeichnung	Beschreibung
ε	Molare Absorptionsfähigkeit
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
M	Molarität
AU	Absorbance Units
b	Breite
C, c	Konzentration
Ca	Calcium
Cl	Chlor
h	Hill-Koeffizient
I	Strom
K	Kalium
l	Liter
M	Molekulargewicht
m	Masse
min	Minuten
mOsm	Milliosmolarität
mV	Millivolt
Na	Natrium
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunden
V	Volumen

Abbildungsverzeichnis

1	Das ventrikuläre Aktionspotential und beteiligte kardiale Ionenkanalströme	6
2	Schematische Darstellung des hERG-Ionenkanals	7
3	Auswirkung der verlängerten Repolarisation	8
4	Schematische Darstellung eines Einstrahl-UV-vis-Spektrometers	13
5	Zellen vor (A) und nach (B) Zugabe der Accutase	15
6	Erster Versuchsaufbau	21
7	Zweiter Versuchsaufbau	21
8	Messkammer für erste Tests	22
9	Einbau der Durchflusszelle in eine schwarze Kunststoffbox	23
10	Letzter Versuchsaufbau	24
11	Halterung für die Durchflusszelle	24
12	Microforge	26
13	Manueller Patch Clamp Aufbau	29
14	Messkammer man. Patch Clamp Aufbau	30
15	Schematischer Aufbau der Halterung für die Patchpipette	31
16	Perfusionssystem	32
17	Schritte zur Erreichung der Whole-cell-Konfiguration.	33
18	Manuelles Patchen: Schritt 1	34
19	Manuelles Patchen: Schritt 2	34
20	Manuelles Patchen: Schritt 3	35
21	Pulsprotokoll, typische Stromantwort und Strom-Zeit-Kurve	37
22	UV-vis-Spektrum von Terfenadin	43
23	UV-vis-Spektrum von Quinidin	43
24	UV-vis-Spektrum vom Blank	44
25	UV-vis-Spektrum von Nifedipin	44
26	Langzeitmessung mittels Blank zur Beobachtung des Drifts in der Basislinie	46
27	1. Strom-Zeit-Diagramm (oben) kombiniert mit UV-vis-Signal (unten)	48
28	Strom-Zeit-Diagramm kombiniert mit UV-vis: Zellen 2 & 3	49
29	Dosis-Wirkungs-Kurve von Messschema 1	50
30	Beispiel für eine schlechte Messung	50
31	Messung Messschema 3 an einer zweiten und dritten Zelle	51
32	Dosis-Wirkungs-Kurve von Messschema 3	52
33	Beispiel Kalibrierkurve (1)	53
34	Beispiel Kalibrierkurve (2)	54
35	Aufnahme Kalibrierkurve (1)	54
36	Aufnahme Kalibrierkurve (2)	55

37	Nachbearbeitung des Signals schematisch dargestellt für Kalibriermessung (1)	56
38	Datenpunkte der Kalibrierungsmessungen 1 und 2 und daraus berechnete Kalibrierkurve	57
39	Kalibriergeraden	57

Tabellenverzeichnis

1	Peakerkennung am UV-vis-Spektrometer (Perkin Elmer)	20
2	Parameter für die Herstellung der Pipetten	26
3	Zusammensetzung des extrazellulären Puffers	27
4	Zusammensetzung des intrazellulären Puffers	28
5	Eingestellte Parameter am UV-vis-Detektor	39
6	Verwendete Messschemata	39
7	Ergebnisse der Ermittlung der Absorptionsmaxima: Terfenadin	42
8	Ergebnisse der Ermittlung der Absorptionsmaxima: Quinidin	42
9	Ergebnisse des UV-vis-Detektors (1)	49
10	Ergebnisse des UV-vis-Detektors (2)	51
11	Ergebnisse der Kalibrierung (1)	55
12	Ergebnisse der Kalibrierung (2)	56
13	Vergleich der Spektrometer-Daten	59
14	Vergleich der Ergebnisse aus den sicherheitspharmakologischen Messungen	62
15	Auflistung der verwendeten Software	A1
16	Zusammensetzung des Mediums für die Zellkultur	A1
17	Auflistung der verwendeten Gebrauchsmaterialien	A1
18	Auflistung der Geräte für den manuellen Patch Clamp Stand	A2
19	Auflistung der verwendeten Geräte	A3
20	Auflistung der verwendeten Substanzen	A4

Bibliographische Beschreibung

Wotsch, Martina. „UV-vis Spektroskopie als Methode zur Online-Expositionskontrolle sicherheitspharmakologischer Patch Clamp Messungen am hERG Ionenkanal“. Masterarbeit an der Hochschule Anhalt, Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik. 2017. 83 Seiten.

Abstract

For drug development safety pharmacological measurements are mandatory. The potassium ion channel coded by the so-called human Ether-a-go-go Related Gene (hERG) (“hERG ion channel”) is particularly important. Blockage of this cardiac ion channel can trigger potentially fatal arrhythmias. The Patch Clamp technique provides a method to test and measure effects on the hERG ion channel. Since new substances often have poor physicochemical properties, inaccurately or erroneously assumed concentrations can lead to false decisions about potential new drug candidates. Based on the publication of Rast und Guth [22], an UV-vis detector for online monitoring was integrated into an existing manual Patch Clamp system. Subsequently, the UV-vis detector was tested during safety pharmacological patch clamp measurements on the hERG ion channel. Quinidine was used as test substance to block the hERG channel current. Dose-response curves for quinidine were generated, IC_{50} values and Hill coefficients were determined. The obtained values matched with results found in literature. The current vs. time plot data of the safety pharmacological measurements was correlated with the signal of the UV-vis detector. From these measurements, the point in time at which the substance was released into the cells’ measurement chamber could be observed. Data from the UV-vis detector was collected to create a calibration curve. No reliable calibration curve could be created to carry out a quantification of the substance’s concentration in the online exposure measurements. Severe noise and baseline drift were present due to disturbances of the UV-vis detector. Suggestions for improvements for the setup are given to improve the online quantitative measurement of the substances’ concentrations using the UV-vis detector.

Abstract (Deutsch)

Bei der Erforschung neuer Wirkstoffe für Arzneimittel sind sicherheitspharmakologische Messungen Pflicht. Der durch das sogenannte human Ether-a-go-go Related Gene (hERG) kodierte Kalium-Ionenkanal („hERG-Ionenkanal“) spielt dabei eine besondere Rolle. Eine Blockade dieses Kanals kann zu lebensbedrohlichen Arrhythmien führen. Die Patch Clamp Methode bietet eine Möglichkeit zur Erfassung der Effekte auf den hERG-Ionenkanal. Da die zu testenden Substanzen meist schlechte physikochemische Eigenschaften aufweisen, können ungenaue oder falsche Annahmen über die Substanz-Konzentrationen zu falschen Entscheidungen über potentielle neue Wirkstoff-Kandidaten führen. Der Veröffentlichung von Rast und Guth [22] folgend wurde daher ein Analysesystem in Form eines UV-vis-Detektors zur online-Expositionskontrolle in ein bestehendes manuelles Patch Clamp System integriert. Anschließend wurde der UV-vis-Detektor bei sicherheitspharmakologischen Patch Clamp Messungen am hERG-Ionenkanal getestet. Als den hERG-Ionenkanal blockierende Substanz wurde Quinidin verwendet. Es wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt, IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten ermittelt. Die erhaltenen Werte fanden mit Literaturangaben Übereinstimmung. Die Strom-Zeit-Diagramme der sicherheitspharmakologischen Messungen wurden mit Signalen des UV-vis-Detektors korreliert. Aus diesen Daten war ein Schluss auf den Zeitpunkt der Substanzzugabe in die Messkammer der Zellen möglich. Es wurden Daten für die Erstellung einer Kalibrierkurve für das Spektrometer erhoben. Es konnte keine zuverlässige Kalibriergerade erstellt werden, um eine Quantifizierung der Substanzkonzentration bei den online-Expositionsmessungen durchzuführen. Durch Störungen des UV-vis-Detektors waren starkes Rauschen und ein Drift der Basislinie vorhanden. Verbesserungsvorschläge für das Setup werden genannt, um die Quantifizierung der Substanzkonzentrationen mit Hilfe des UV-vis-Detektors zu ermöglichen.

1 Einleitung

Das Thema der pharmakologischen Sicherheit spielt bei der Entwicklung von Medikamenten eine sehr große Rolle. Dennoch kommt es, trotz weit fortgeschrittener Technik, während den klinischen Studien noch immer zu kritischen unerwarteten Nebenwirkungen. Dies zeigt ein Beispiel aus dem Jahre 2016, in dem sechs Männer während einer Arzneimittelprüfung in Phase I der klinischen Studien ins Krankenhaus eingeliefert werden mussten [5].

Gerade, wenn neue Medikamente in den klinischen Phasen große Probleme verursachen, wird es kompliziert und teuer. Daher ist es umso wichtiger, neue Wirkstoffe bereits in präklinischen Studien auf vorhersagbare, insbesondere aber auch auf unvorhersehbare Nebenwirkungen zu untersuchen. Besonders die Auswirkungen auf die zentralen Organe wie Gehirn oder auf das Herz sind von großer Bedeutung.

Ein bekanntes Antihistaminikum, welches es beispielsweise durch die heutigen präklinischen Studien nicht in die klinischen Phasen geschafft hätte, ist Terfenadin.

Terfenadin war das weltweit erste Antihistaminikum ohne schläfrig machende Nebenwirkungen. Es musste allerdings vom Markt zurückgezogen werden, weil es bei Patienten eine Verlängerung des sogenannten QT-Signals verursachte und teilweise tödliche Torsade de Pointes (TdP), also Herzarrhythmien mit sich brachte [20].

Das Herz generiert seinen Herzschlag über ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Faktoren selbst und ist somit auch für kleine Störungen durch fremde Substanzen anfällig. In den relativ kleinen Phase III der bei Terfenadin durchgeführten klinischen Studien wurde Terfenadin als Auslöser für ventrikuläre Arrhythmien nicht erkannt, mit schwerwiegenden und kostspieligen Folgen. Die Untersuchung der Beeinflussung des Herzschlages gehört heute zur Standardkontrolle von neuen Wirkstoffen und fällt in den Bereich der Elektrophysiologie. Die TdP-verursachende Wirkweise von Terfenadin war, dass es den Strom des sogenannten „human Ether-a-go-go Related Gene (hERG)“-Ionenkanals blockiert hatte und somit für die Verlängerung des QT-Signals verantwortlich war [20].

Der hERG-Ionenkanal ist einer der wichtigsten Ionenkanäle im Herzen und wird spätestens seit dem Erscheinen der Richtlinie S7B der International Committee on Harmonization (ICH) im Jahre 2005 standardmäßig in pharmakologischen Tests untersucht. Auch eine kürzlich vorgestellte Initiative zur Einschätzung des Risikos von TdP („CiPA“) bezieht den hERG-Kanal wegen seiner Bedeutsamkeit in ihre Assays mit ein.

Es gibt Forschungs-Abteilungen, die sich eigens mit dem hERG-Ionenkanal auseinandersetzen, weil dieser von so großer Bedeutung ist. Dies ist allerdings auch gerechtfertigt, da die Wahrscheinlichkeit für neue Substanzen, einen der Ionenkanäle im Herzen zu beeinflussen, relativ hoch ist. Der hERG-Ionenkanal beispielsweise besitzt eine relativ große hydrophobe Pore und zeigte sich in der Vergangenheit anfällig gegenüber Histamin-Antagonisten [7]. Da Rhythmusstörungen am Herzen tödlich verlaufen können, sind ausführliche elektrophysiologische Tests in der präklinischen Phase obligatorisch. Als „Goldstandard“ bei sicherheitspharmakologischen Messungen hat sich die von Bert Sakmann und Erwin Neher entwickelte „Patch Clamp Technik“ bewährt und wird heute sowohl manuell als auch mit automatisierten Modellen in der Sicherheitspharmakologie angewendet [7, 24].

Als Grundlage dieser Arbeit diente die Veröffentlichung von Rast und Guth [22]. Die Substanzen, die normalerweise bei sicherheitspharmakologischen Messungen angewendet werden, besitzen meist schlechte physikochemische Eigenschaften, wie beispielsweise eine schlechte Löslichkeit. Zudem bleiben viele Substanzen an den Flächen der Pipettenspitzen, Schläuche oder Gefäßwänden, haften, sodass die tatsächliche Konzentration während den Messungen aktuell schwer vorhersagbar ist. Es müssen mehrere Messungen einer Konzentration durchgeführt werden, um genaue Ergebnisse erhalten zu können. Daher würde eine sorgfältige Überwachung der Konzentrationen bei sicherheitspharmakologischen Messungen die Validität der Daten der Patch Clamp Experimente unterstützen [22]. Rast und Guth [22] verwendeten deswegen ein UV-Spektrometer, um Echtzeitmessungen während des Patch Clamp Experiments durchzuführen und die aktuelle Substanzkonzentration während der Messung zu quantifizieren. Dafür führten sie turbidometrische Messungen durch, um eine valide Kalibrierung der UV-vis-Messung erhalten zu können. Sie erstellten eine Kalibriergerade von Verapamil und haben gezeigt, dass ihre Methode während den Patch Clamp Messungen funktioniert.

2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, entsprechend der Veröffentlichung von Rast und Guth [22] ein spektroskopisches Analyse-System in Form eines UV-vis-Detektors in einen bestehenden manuellen Patch Clamp Stand einzubauen und eine online-Messung zur Expositionskontrolle durchzuführen. Das Verfahren sollte mit sicherheitspharmakologische Messungen am sogenannten human Ether-a-go-go Related Gene (hERG)-Ionenkanal getestet werden.

3 Stand des Wissens und der Technik

3.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind komplexe Strukturen, die durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran verlaufen und somit eine Art Pore bilden. Sie sind aus helikalen Strukturen und Transmembranproteinen aufgebaut und ermöglichen den Transport von Ionen durch die semipermeable Zellmembran. Es werden pro Kanal Transportraten von bis zu $1 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^8$ Ionen/Sekunde erreicht. Ionenkanäle tragen wesentlich zur Leitfähigkeit der Membran bei, da sie zwar für geladene Teilchen passierbar sind, nicht aber für Wassermoleküle. Pro μm^2 Membranfläche können sich je nach Typ des Kanals oder Zelltyp 1 bis $>1\,000$ Ionenkanäle befinden. Dabei ist die Funktion des jeweiligen Kanaltyps entscheidend, in welchem Bereich der Zellmembran er zu finden ist [18].

Für Lokalisation und auch die Regulation der Ionenkanäle sind die Proteinuntereinheiten verantwortlich, aus denen der Ionenkanal aufgebaut ist. Ionenkanäle sind i.d.R. auch nicht für alle Ionen gleichermaßen durchlässig, sondern sind für Ionensorten spezifisch. Die Einteilung der Ionenkanäle erfolgt somit oftmals nach ihrer Ionenselektivität (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) und werden dann je nach Typ weiter untergliedert. Eine weitere Einteilungsmöglichkeit der Ionenkanäle ist, sie nach der Art ihrer Regulation zu unterscheiden. Ionenkanäle können in spannungsgesteuerte, rezeptorgekoppelte, ligandengesteuerte oder komplex regulierte (z.B. durch Phosphorylierung) Kanäle eingeteilt werden [18].

Zur Unterscheidung von Ionenkanälen hat sich eine bestimmte Nomenklatur etabliert. Der Kurzname eines Ionenkanals setzt sich aus dem Kanalproteinnamen, der aus der Ionenselektivität und dem Regulator des Kanals besteht, sowie der Zahl der Familie und des Typs, zusammen. Ein Beispiel für die Nomenklatur wäre der Kanal $\text{K}_{\text{Ca}1.3}$. Diese Abkürzung steht für einen Kaliumkanal, der Ca-reguliert ist und Familie 1, Typ 3 angehört. Zudem gibt es eine bestimmte Bezeichnung für die Ströme der Ionenkanäle. Der Strom wird mit einem „I“ bezeichnet, während ein tiefgestellter Index die Ionensorte bezeichnet (z.B. I_{K} für Kaliumstrom) [3].

Ionenkanäle lassen allerdings nicht die ganze Zeit Ionen durch die Membran passieren. Sie befinden sich in einem ständigen Wandel zwischen dem offenen und dem geschlossenen Zustand, was auch als „Gating“ bezeichnet wird. Die Offen- bzw. Geschlossenzeiten unterscheiden sich je nach Kanal und können von wenigen Millisekunden bis einige Sekunden lang sein. Die sogenannte „Offenwahrscheinlichkeit“ nimmt einen Wert zwischen 0 und 1 ein und zeigt die Stärke des Ionenflusses an. Tendiert die Offenwahrscheinlichkeit gegen 1, heißt das, dass der Kanal im statistischen Mittel eher geöffnet ist. Die Ionen können die Membran nur dann passieren, wenn der Kanal offen ist. Die Ionenströme mehrerer Kanäle werden zu einem sogenannten „makroskopischen Strom“ aufsummiert. Dieser Strom ist messbar und ist das Produkt aus dem Einzelkanalstrom, der Anzahl der Ionen-

kanäle und der Offenwahrscheinlichkeit. Die Offenwahrscheinlichkeit hängt bei den durch Spannung gesteuerten Ionenkanälen zu einem großen Teil vom Membranpotenzial ab [18].

Es gibt einige Ionenkanäle, die von hoher pharmakologischer Relevanz sind. Dazu zählen z.B. Kalzium-, Kalium- oder auch Natriumkanäle. Viele der spannungsabhängigen Kanäle spielen bei der Behandlung von Krankheiten eine Rolle. Sie werden zum Beispiel bei kardialen Arrhythmien, Hypertonie, Epilepsie, Schmerzen oder auch bei Diabetes mellitus gezielt verändert oder stellen Ziele von Therapeutika dar [3]. Auf die besondere Rolle der kardialen Ionenkanäle wird im nächsten Kapitel genauer eingegangen.

3.2 Kardiale Ionenkanäle

Ionenkanäle sind essentiell für die Funktionalität des Herzens, wie den Herzrhythmus oder auch der Kontraktilität des Herzmuskels. Durch die Öffnung bzw. Schließung unterschiedlichster Ionenkanäle entstehen sogenannte Transmembranpotenziale. Die Veränderungen der Permeabilität der Ionen und der Leitfähigkeit ermöglicht die Entstehung des sogenannten Aktionspotenzials und die Kontraktion des Herzmuskels [19].

Eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung des Aktionspotenzials spielen dabei spannungsgesteuerte Ionenkanäle. Wie der Name schon sagt, werden diese Kanäle in Abhängigkeit von der Spannung an der Membran entweder geöffnet oder geschlossen. Eine Depolarisation des Ruhemembranpotenzials führt zunächst zur Öffnung spannungsgesteuerter Na^+ -Kanäle. Die Permeabilität der Membran für Na^+ -Ionen wird erhöht, und es entsteht ein einwärts gerichteter Strom, bis ein Maximum erreicht wird. Innerhalb weniger ms nach der Depolarisation wechseln die Na^+ -Kanäle bereits wieder in den inaktiven Zustand, und spannungsgesteuerte K^+ -Kanäle werden geöffnet. Dies sorgt dafür, dass das Membranpotenzial wieder auf seinen Ausgangswert zurückkehrt (Repolarisation). Im Gegensatz zu Nervenzellen ist dieser Vorgang im Herzen wesentlich komplexer, da außerdem noch spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle involviert sind. Diese Kanäle sind für einen langsamen Einwärtstrom verantwortlich, und erzeugen eine sogenannte „Plateuphase“ im Aktionspotenzial [20]. Das ventrikuläre Aktionspotenzial wird also von mehreren Ionenströmen bestimmt, es entstehen unterschiedliche Phasen während des Aktionspotenzials.

In Abbildung 1 sind die vier Phasen des Aktionspotenzials, die einwärts gerichteten Ströme (Depolarisation) blau und die auswärts gerichteten (Repolarisation) rot dargestellt. Das Aktionspotenzial ist aus der schnellen Depolarisation (Phase 0), der frühen Repolarisation (Phase 1), der Plateau-Phase (Phase 2), der schnellen Repolarisation (Phase 3) und dem Ruhemembranpotenzial/der erneuten Depolarisation (Phase 4) zusammengesetzt [10, 19].

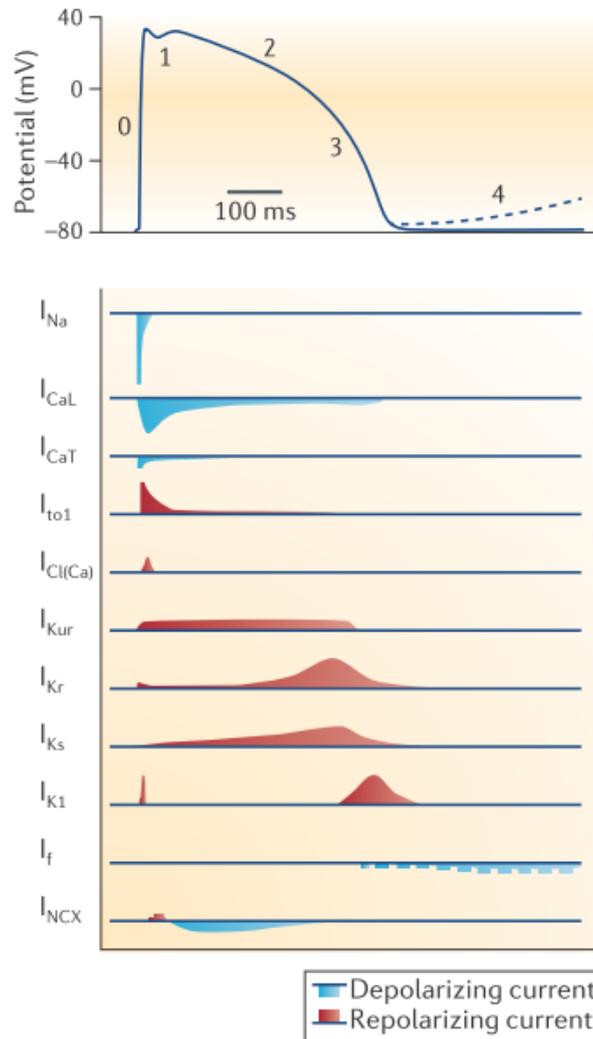


Abbildung 1: Das ventrikuläre Aktionspotential (oben) und beteiligte kardiale Ionenkanalströme (unten) (nach [10])

Die entscheidenden Ionenkanäle sind hierbei die bereits genannten Na^+ -Kanäle (auch als $Nav1.x$ bezeichnet), Ca^{2+} -Kanäle ($Cav1.x$ -Kanäle) und K^+ -Kanäle ($Kv1.x$ -Kanäle). Die K^+ -Kanäle haben eine besonders wichtige Rolle inne, da sie über die Repolarisation die Dauer des kardialen Aktionspotenzials und somit auch die Dauer der Kontraktion bestimmen. Die Repolarisation erfolgt durch den Ausstrom der K^+ -Ionen. Eine Blockade des $Kv11.1$ -Stroms (auch unter dem Namen hERG-Strom oder I_{Kr} bekannt) gilt als hauptverantwortlicher Mechanismus für die durch Medikation ausgelöste verzögerte Repolarisation bzw. ein verlängertes QT-Signal. Diese wiederum werden mit Torsade de Pointes (TdP) in Verbindung gebracht [2, 10, 19]. Der hERG - Kanal steht daher im besonderen Fokus bei sicherheitspharmakologischen Studien und wird im Folgenden näher erläutert.

Der hERG-Kanal besteht aus Poren-bildenden Untereinheiten und akzessorischen Proteinen. Der Kanal besitzt drei unterschiedliche Zustände, wie in Abbildung 2 dargestellt.

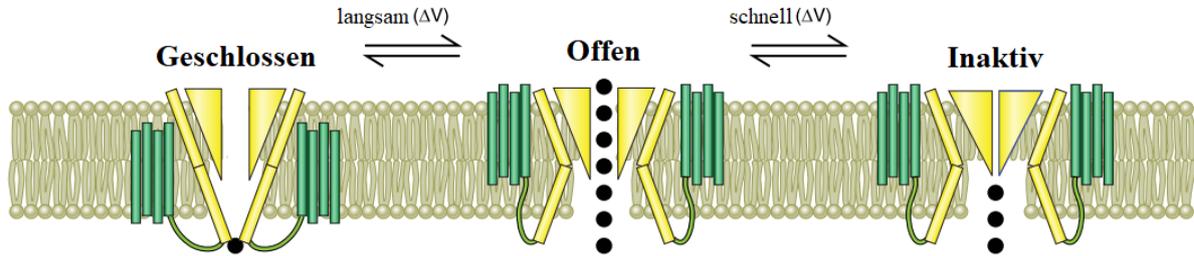


Abbildung 2: Schematische Darstellung des hERG-Ionenkanals (modifiziert, nach [24])

Der Kanal ist entweder offen, geschlossen, oder inaktiv. Der Übergang von einem Zustand in den nächsten ist spannungsabhängig. Der Wechsel vom geschlossenen in den offenen Zustand erfolgt dabei langsamer als der Wechsel zwischen dem offenen und dem inaktiven Zustand [24]. Jeder Subtyp des Kanals besitzt eine eigene Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik und steuert somit seinen eigenen Beitrag zu verschiedenen Phasen der Repolarisierung bei. Die unterschiedlichen Kinetiken sorgen dafür, dass die Repolarisierung relativ schnell und sicher abläuft. Während der Endphase der Repolarisation schließen sich die Kanäle langsam und bleiben so für eine gewisse Zeit offen, auch nachdem das Membranpotential auf das ruhende (diastolische) Niveau zurückgekehrt ist. Dies verhindert auch eine erneute, zu früh eintretende Depolarisation der Zelle. Werden die Kv-Kanäle gehemmt, kommt es zur Verlängerung der Plateauphase des Aktionspotenzials oder zu einer verlängerten Dauer des QT-Intervalls [19, 24]. Wird die Aktivität des Kv11.1/hERG-Kanals vermindert z.B. durch Medikamente oder Mutationen oder kommt es zu Fehlfunktionen der Kaliumkanäle, besteht ein erhöhtes Risiko für Arrhythmien, sogenannten TdP [19]. Herzrhythmusstörungen sind für viele Todesfälle verantwortlich. Daher ist es umso wichtiger, potenzielle neue Wirkstoffkandidaten in sicherheitspharmakologischen Studien verlässlich auf mögliche Nebenwirkungen oder tödliche Dosen zu untersuchen, um Risiken für die klinischen Studien auszuschließen und Entwicklungskosten zu verringern [10].

3.3 Kardiale Sicherheitspharmakologie

Ionenkanäle sind im Wesentlichen verantwortlich für die Funktion des Herzens wie den Herzrhythmus und die Kontraktilität. Sie stellen daher attraktive Ziele für Therapeutika bei Herzkrankheiten dar, sind gleichzeitig aber auch ein empfindlicher Auslöser unerwünschter Nebenwirkungen durch andere Substanzen oder Medikamente. Die frühzeitige und effiziente Bewertung der kardialen Gesundheitsrisiken in sicherheitspharmakologischen Studien ist essentiell, um die Entwicklung neuer Wirkstoffkandidaten erfolgreich voranzutreiben. Der Fokus liegt dabei auf der Vermeidung von tachyarrhythmischen Störungen des Herzschlages wie dem TdP.

Torsade de Pointes werden mit der Verzögerung der Repolarisation des Aktionspotenzials in Verbindung gebracht und im Elektrokardiogramm (EKG) über eine Verlängerung des QT-Intervalls beobachtet [10]. Das QT-Intervall ist der Bereich im EKG zwischen dem QRS-Komplex und dem Ende der T-Welle (= Repolarisation).

Der Zusammenhang zwischen einer verlangsamten Repolarisation des Aktionspotenzials und dem Auftreten von TdP ist in Abbildung 3 dargestellt.

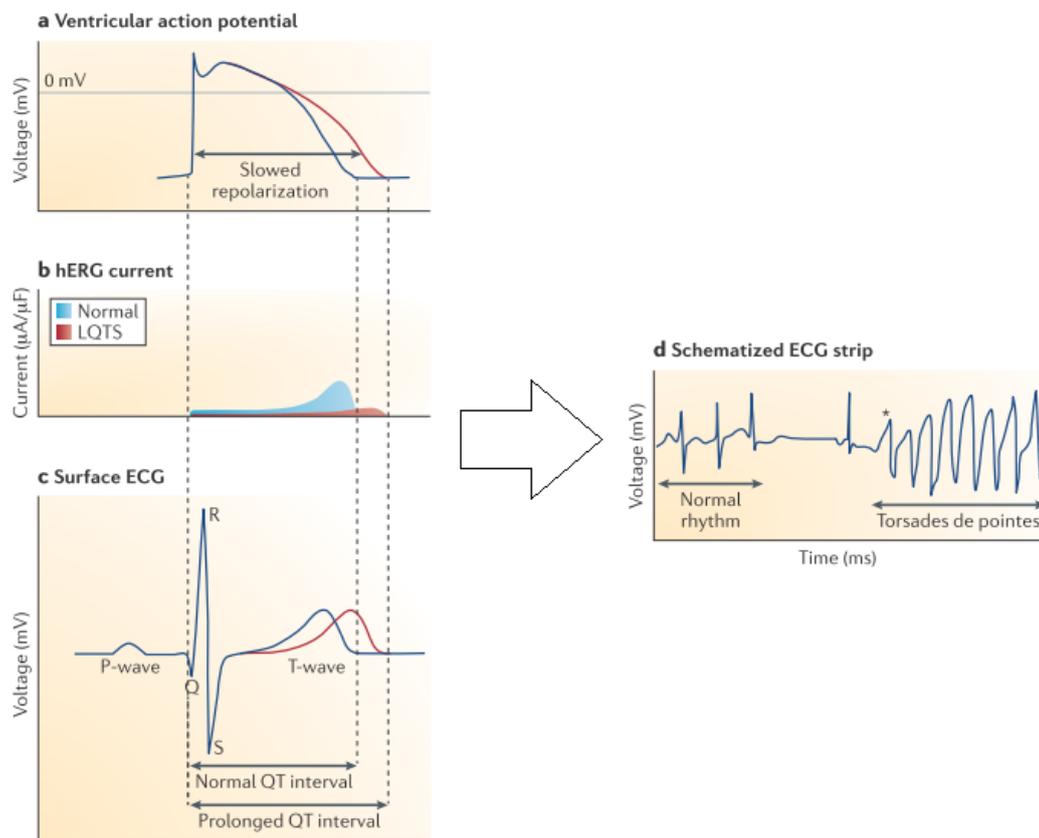


Abbildung 3: Auswirkung der verlängerten Repolarisation auf das QT-Signal (modifiziert, nach [10])

Durch eine Verringerung des Ausgangsstromes wird die ventrikuläre Repolarisation verlangsamt (a). Ursache dafür wäre beispielsweise die Verringerung des hERG-Stromes (b), die entweder durch ein Medikament oder durch pathologische Veränderungen des Kalium-Kanals (z.B. Long QT-Syndrom (LQTS)) verursacht werden kann. Durch die verzögerte ventrikuläre Repolarisation kommt es zu einer Verlängerung des QT-Intervalls (c). Folglich kann es zur kontinuierlichen Dysregulation der Repolarisationsphase kommen. Noch vor Ende der T-Welle kann es zu einem vorzeitigen Herzschlag kommen, der letztendlich TdP initiiert.

Nachdem Ende des 20. Jahrhunderts einige Medikamente vom Markt zurückgenommen werden mussten, weil sie mit tödlichen Herzrhythmusstörungen in Verbindung gebracht wurden, wurden vom International Committee on Harmonization (ICH) Richtlinien zur Beurteilung des Potenzials für Verlängerungen des QT-Intervalls erlassen. Die 2005 herausgegebenen Richtlinien beinhalteten neue Strategien zur präklinischen (S7b) und klinischen (E14) Bewertung eines Risikos für TdP. Dabei konzentrierte man sich vor allem auf den repolarisierenden Kaliumstrom I_{K_r} , den zugrundeliegenden Kanal hERG und das QT-Intervall [10, 19]. Es muss beachtet werden, dass nicht alle Substanzen, die den hERG-Kanal blockieren, auch zur Verlängerung des QT-Intervalls führen. Mit dieser Vorgehensweise konnten zwar einige neue Wirkstoffe, die ein TdP-Risiko zeigten, frühzeitig erkannt werden. Das Aktionspotenzial setzt sich jedoch aus einer Reihe von komplex-interagierenden Ionenkanälen zusammen. Daher sollte die gesamte Funktionsweise in Betracht gezogen werden, um die Weiterentwicklung vielversprechender Substanzen nicht fälschlicherweise zu stoppen.

3.4 Die CiPA-Initiative

Erst kürzlich wurde eine neue Initiative ins Leben gerufen, die sich zur Einschätzung des Risikos von TdP nicht allein auf den hERG-Kanal stützt. Das sogenannte Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay (CiPA)-Modell will zur Beurteilung von Risiken der durch Pharmaka ausgelösten Rhythmusstörungen mehrere elektrophysiologische Methoden heranziehen. Zudem sollen potenzielle neue Wirkstoffe in die Kategorien „geringes, mittleres und hohes proarrhythmisches Risiko“ eingeteilt werden.

Die zwei Hauptpunkte der CiPA-Initiative lauten [1, 19]:

- Betrachtung von Substanz-Wirkungen in vitro, unter Einbeziehung mehrerer kardialer Ionenkanäle und einer in silico Rekonstruktion des ventrikulären Aktionspotenzials
- Bestätigung der Ergebnisse mit menschlichen, von Stammzellen-abgeleiteten Kardiomyozyten (hSC-CMs) unter Verwendung von Patch Clamp-Verfahren, Multielektroden-Arrays oder spannungssensitiven Farbstoffen

In der ersten Phase der klinischen Studien werden auch weiterhin EKGs durchgeführt werden. EKGs stellen einen wesentlichen Bestandteil der Sicherheitsbewertung eines Arzneimittels dar. Sie sollen die Abwesenheit von unvorhergesehenen elektrophysiologischen Wirkungen (z.B. durch einen Metaboliten verursacht) sowie der Erfassung anderer unerwünschter elektrophysiologischer Wirkungen (z.B. einer AV-Knotenblockade) sicherstellen [10]. Nach CiPA sollte nicht nur die Blockade des hERG-Kanals betrachtet werden. Es wurden sieben Ionenkanäle wegen ihrer besonderen Rolle bei der Ausformung des ventrikulären Aktionspotenzials und aufgrund verschiedener sicherheitspharmakologischer Erfahrungswerte ausgewählt. Zur Bestimmung und Messung der Ströme dieser Ionenkanäle werden automatisierte Patch Clamp-Systeme vorgeschlagen [10].

Die CiPA-Initiative stellt eine Gemeinschaftsarbeit dar, die von pharmazeutischen, regulatorischen und forschenden Einrichtungen getragen wird. Ziel ist es, ein Assay zu erarbeiten, welches vielversprechende neue Wirkstoffkandidaten nicht mehr vorzeitig und fälschlicherweise aus der Medikamentenforschung ausschließt. Zudem soll die Abhängigkeit von Surrogatmarkern im späteren Verlauf der Arzneimittelentwicklung verringert und eine schnelle, effiziente Entwicklung von neuen, sicheren Medikamenten ermöglicht werden [1, 10, 19].

3.5 Patch Clamp Technik

Die Spannungsklemm-Technik (engl. „voltage clamp“), auf der die moderne Patch Clamp Technik beruht, wurde bereits Ende der dreißiger Jahre von K. S. Cole und H.J. Curtis entwickelt. Die beiden Forscher konnten mit Hilfe der Spannungsklemme nachweisen, dass die Membranleitfähigkeit einer Nervenzelle bei Erregung erhöht wird. Verantwortlich für die elektrischen Signale waren Ionenströme. Unklar war zum damaligen Zeitpunkt, welche und ob die Ionen passiv durch die Poren flossen oder von Transportproteinen („Carrier“) durch die Membran geschleust wurden. Die Carrier-Theorie wurde allerdings später von A. Hodgkin und A. Huxley widerlegt. Die beiden vermuteten spannungsabhängige und ionenselektive Kanäle und entwickelten Gleichungen, mit denen sich bereits Aktionspotentiale beschreiben ließen. Der Durchbruch zum Nachweis dieser Kanäle gelang letztendlich B. Sakmann und E. Neher, die für ihre Arbeit 1991 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie erhielten [16].

Neher und Sakmann gelang es, die Aktivität einzelner Ionenkanäle zu beobachten, indem sie die extrem kleinen Einzelkanalströme von dem bisher störenden Hintergrundrauschen isolierten. Mit ihrer in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelten Patch Clamp Technik leisteten die beiden Forscher einen revolutionären Beitrag. Mit der verbesserten Spannungsklemm-Technik war es nun möglich, Analysen zu biophysikalischen Eigenschaften der Ionenkanäle, Messungen zur Einzelkanalleitfähigkeit, ihrer Schaltkinetik und der Regulation der Kanäle durchzuführen. Die Technik ermöglichte die Aufklärung von Wirkungsweisen von Botenstoffen, Pharmaka und auch Toxinen [3, 16].

Im Patch Clamp Verfahren wird eine sehr feine Glaspipette verwendet, welche auf die Membran einer Zelle aufgesetzt wird. Ziel dabei ist, einen kleinen Flecken („Patch“) elektrisch von der Umgebung zu isolieren. Durch Anlegen eines Unterdruckes wird das kleine Membranareal in die Pipettenöffnung gesaugt. Durch die Interaktion der Zellmembran mit der Pipettenoberfläche („Seal“) entsteht ein hoher Abdichtungswiderstand im $G\Omega$ -Bereich („Gigaseal“). Dies sorgt für eine Reduktion des Hintergrundrauschens und sogenannter „Leckströme“. Dadurch werden rechteckige Strompulse von Einzelkanälen sichtbar, die sich aus den Offen- Ionenleitenden und Geschlossenenzuständen ableiten [3, 16].

Mit der Weiterentwicklung der Patch Clamp Technik wurden verschiedene Konfigurationen zum Patchen entdeckt. Man unterschied nun zwischen dem Aufsetzen der Pipette auf die Membran („Cell-attached“-Konfiguration), der Unterbrechung der Membran unter der Pipette („Whole-Cell“-Konfiguration) und weiteren Möglichkeiten der Zellmembran-Anordnung. Entsprechend der jeweiligen Messanordnung können nun Ströme bei einer vorgegebenen Klemmspannung („Patch Clamp“) durch die gepatchte Membran gemessen werden. Um sogenannte „Ganzzellströme“, d.h. über die gesamte Zellmembran gemessene Ionenströme zu erfassen, verwendet man die Whole-Cell-Konfiguration.

Diese wird über die Cell-attached-Konfiguration erreicht, indem man die Membranwand durch kurzes Ansaugen durchbricht. Dadurch wird die Ganzzelleableitung ermöglicht, die dazu verwendet wird, die Gesamtleitfähigkeit einer Zelle zu beurteilen. Die Gesamtleitfähigkeit setzt sich aus den Einzelkanälen der Membran zusammen. Die Ionenkanäle lassen sich mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren, über Ionensubstitutionsexperimente oder auch mit Spannungsprotokollen genauer untersuchen und dienen somit der Analyse der Gesamtleitfähigkeit [3, 16].

Für die Untersuchung von Ionenkanälen gilt die Patch Clamp Technik mittlerweile als „Goldstandard“ [7, 24].

3.6 UV-vis Spektroskopie

UV-vis-Spektroskopie ist ein weit verbreitetes optisches Verfahren, welches bei vielen Analysemethoden zur Detektion verwendet wird (z.B. bei Flüssigchromatographie wie HPLC-Systemen). UV-vis-Spektrometer können auch eigenständig als Analysensystem eingesetzt werden, wie z.B. bei enzymatischen Analysen. UV-vis ist eine Abkürzung und steht für „ultraviolett“ und „visible“ (engl. „sichtbar“). Die Bezeichnung leitet sich daraus ab, dass UV-vis-Spektroskopie im Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichts (etwa 800 nm bis 400 nm) und des ultravioletten Lichts (etwa 400 nm bis 100 nm) eingesetzt wird. UV-vis-Spektroskopie wird bei Flüssigkeiten oder gelösten Substanzen verwendet, um deren Absorptionsspektren zu messen. Genauer gesagt betrachtet man in der Absorptionsspektroskopie die Wechselwirkung des Lichts mit den Elektronen der Verbindung bzw. Substanz.

Mit dem Lambert-Beerschen-Gesetz lässt sich die UV-vis-Spektroskopie in den meisten Fällen beschreiben, wenn niedrig konzentrierte Lösungen untersucht werden. Es besagt, dass sich die Absorption A (einheitenlos oder mit AU (Absorbance Units) angegeben) einer Substanz aus dem Produkt der molaren Absorptionsfähigkeit (ε [$M^{-1}cm^{-1}$]), der Breite der Küvette (b ; meist 1 cm) und der Konzentration der Lösung (c [M]) ergibt:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Bei den UV-vis-Spektrometern können drei verschiedene Arten unterschieden werden. Es gibt

- Einstrahlspektrometer (Monochromator und Photodetektor)
- Zweistrahlspektrometer (Monochromator, Spiegeln zur parallelen Messung von Probe und Referenz und Photodetektor)
- Simultane Spektrometer (Photodioden-Array-Detektor)

Abbildung 4 zeigt die schematische Darstellung eines einfachen Einstrahl-Spektrometers.

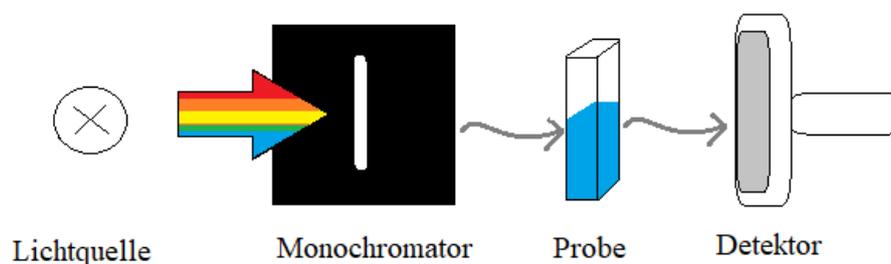


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Einstrahl-UV-vis-Spektrometers (eigene Darstellung, nach [17])

Als Lichtquelle dient z.B. eine Deuterium- oder Wolframlampe. Die Strahlungsintensität sollte bei Messungen möglichst konstant sein und gebündeltes polychromatisches Licht aussenden, damit das Lambert-Beersche-Gesetz seine Gültigkeit behält. Deuterium- und Wolframlampen zählen zu den sogenannten Kontinuumstrahlern, da Strahlung gleichzeitig über einen ganzen Frequenzbereich emittiert wird (polychromatisches Licht). Der Monochromator wählt bestimmte Wellenlängen aus und erzeugt so aus dem polychromatischen monochromatisches Licht. Die Probe besteht aus einem Probengefäß, welches mit der zu messenden Flüssigkeit befüllt ist. Als Probengefäß dient, je nach Anwendungszweck, eine Küvette aus Glas, Plastik oder Quarz. Zur Detektion der Absorption werden Quantendetektoren, seltener auch Thermidetektoren eingesetzt [6, 17].

Beim Zweistrahl-Spektrometer wird der Lichtstrahl zusätzlich über Spiegel aufgetrennt, was die gleichzeitige Messung einer Referenz und der Probe erlaubt. Daher ist diese Art des Spektrometers etwas genauer als die Einstrahl-Variante. Das simultan-messende Absorptionsspektrometer besitzt keinen solchen „Splitter“ und Monochromator, sondern einen Diodenarraydetektor um die Absorption bei allen Wellenlängen zur gleichen Zeit erfassen zu können. Das Simultan-Spektrometer ist damit das effizienteste und schnellste Gerät, je nach Verwendungszweck reichen allerdings auch die einfacheren Spektrometer-Varianten [17].

Mittels UV-vis-Spektroskopie lassen sich sowohl qualitative als auch quantitative Daten zur Probe gewinnen. Wichtig dabei ist jedoch, dass das Lösungsmittel, in dem die zu messende Substanz gelöst wird, vom Gerät erfasst und als sogenannter „Blank“ definiert wird, da auch die Lösungsmittel Licht absorbieren. Des Weiteren sollte für quantitative Untersuchungen eine Kalibrierkurve erstellt werden, um eine genaue Messung erhalten zu können. Dafür werden das reine Lösungsmittel sowie Lösungen der zu untersuchenden Substanz mit bekannten Konzentrationen gemessen (externe Standardkalibrierung). Eine Kalibrierung sollte auch dann durchgeführt werden, wenn chemische Reaktionen mittels dem UV-vis-Spektrometer erfasst werden sollen [17].

Die UV-vis-Spektroskopie lässt sich sehr gut einsetzen, um Flüssigkeiten oder Lösungen von Substanzen zu messen. Übersättigte Lösungen oder Suspensionen sind eher ungeeignet, da die ungelösten Partikel das Licht zerstreuen und somit Messungen verfälschen. Wie bereits erwähnt absorbiert auch das Lösungsmittel, in dem die zu untersuchende Substanz gelöst ist. Man sollte darauf achten, dass der Absorptionsbereich des Lösungsmittels nicht im Bereich der Probesubstanz liegt. Für das Signal-Rauschverhältnis bei spektroskopischen Analysen gilt außerdem die Faustregel, dass das Messsignal etwa drei mal so hoch sein sollte wie das Untergrundrauschen des Geräts, um eine problemfreie Messung zu ermöglichen [17].

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Passagieren der Mutterkultur

Als Zelllinie wurde die „hERG-Duo“-Linie, humane Spezies des Ionenkanals, vom Zelltyp Chinese Hamster Ovary (CHO) verwendet. Kultiviert wurde in T75-Zellkulturflaschen. Die Kultivierung erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt in feuchter Atmosphäre und unter kontrollierten Bedingungen. Vor dem Passagieren der Zellen wurden die im Kühlschrank gelagerten, benötigten Substanzen in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das Passagieren der Zellen erfolgte montags, mittwochs und freitags unter sterilen Bedingungen.

Nachdem die Zellen aus dem Inkubator genommen wurden, wurde zunächst unter dem Mikroskop der Zellkulturrasen überprüft. Der Rasen sollte eine 80 %ige Konfluenz nicht überschreiten, sowie keine Verfärbungen oder Fremdkörper aufweisen, da dies auf eine Verunreinigung der Zellkultur hinweisen könnte. Unter sterilen Bedingungen wurde anschließend das alte Medium am Rand des Zellkulturrasens abgesaugt. 10 ml Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) wurden in eine hintere Ecke der T75-Flasche pipettiert und zur Reinigung über den Zellrasen laufen gelassen, indem man die Flasche vorsichtig hin- und herschwenkte. Dann wurde auch das PBS am Rand des Rasens wieder abgesaugt. Im Anschluss wurden 1 000 µl Accutase zugegeben und durch Kippbewegungen auf der Oberfläche des Zellrasens verteilt. Die Accutase wurde etwa 10 min bei Raumtemperatur einwirken gelassen. Nach der Einwirkzeit wurde unter dem Mikroskop geprüft, ob sich die Zellen abgerundet hatten (siehe Abbildung 5).

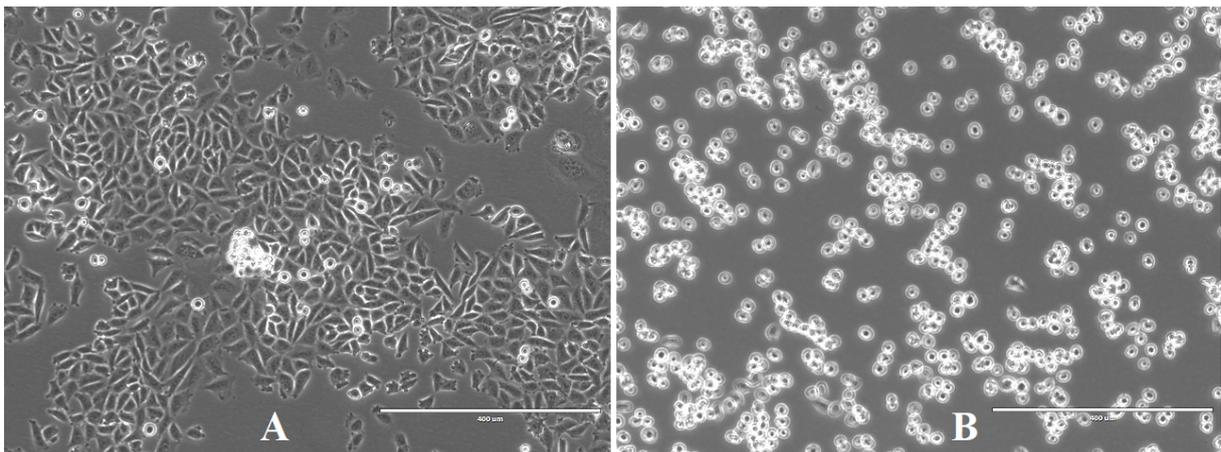


Abbildung 5: Zellen vor (A) und nach (B) Zugabe der Accutase

Durch Klopfen am Flaschenrand ließen sich noch nicht gelöste Zellen vom Flaschenboden lösen, was durch Schlierenbildung am Boden erkennbar wurde. Mit der Zugabe von 9 ml Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle 16 im Anhang) wurden die Zellen vom Boden abgespült. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren (ca. 10x) wurden die Zellen resuspendiert und anschließend in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Eine Neubauer-Zählkammer wurde vorbereitet, indem man ein Deckgläschen anhauchte und anschließend über Druckanwendung und leichtes Verschieben auf der Neubauer-Zählkammer befestigte. Von der Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und an den Rand des Deckgläschen pipettiert, unter dem sich die Suspension selbstständig verteilte. Die 4 Quadrate der Zählkammer wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und anschließend die benötigte Menge an Zellen errechnet.

Ausgesät wurde wie folgt:

- Für 2 Tage Kultivierungszeitraum: $0,450 \times 10^6$ Zellen pro T75-Flasche
- Für 3 Tage Kultivierungszeitraum: $0,150 \times 10^6$ Zellen pro T75-Flasche

Bevor die Zellen in eine neue T75-Flasche pipettiert wurden, wurden je 14 ml frisches Medium pro T75-Flasche für 2 Tage bzw. 20 ml für 3 Tage vorgelegt. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Schwenken in dem vorgelegten Medium in der Flasche verteilt und anschließend in den Inkubator gelegt.

4.1.2 Vorbereiten der Arbeitskulturer

Die Vorbereitung der Arbeitskulturer für das Patchen erfolgte parallel zum Passagieren der Mutterkulturer. Nachdem die Anzahl der Zellen über die Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde, konnte äquivalent zum Ansatz der Mutterkulturer eine Arbeitskulturer in T25-Flaschen angesetzt werden.

Ausgesät wurde hierzu wie folgt:

- Für 1 Tag Kultivierungszeitraum: $0,450 \cdot 10^6$ Zellen pro T25-Flasche
- Für 2 Tage Kultivierungszeitraum: $0,150 \cdot 10^6$ Zellen pro T25-Flasche
- Für 3 Tage Kultivierungszeitraum: $0,050 \cdot 10^6$ Zellen pro T25-Flasche

Für einen Kultivierungszeitraum von 1 bis 2 Tagen wurden jeweils 5 ml Medium vorgelegt, für 3 Tage je 7 ml pro T25-Flasche.

4.1.3 Ernten der Zellen (zum Patchen)

Die Arbeitsschritte für die Vorbereitung der Arbeitskultur zum Patchen konnten außerhalb der Sterilbank durchgeführt werden. Die benötigten Substanzen wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Nachdem der Zellrasen unter dem Mikroskop überprüft wurde, konnte das Medium verworfen werden. Anschließend wurden 2 ml PBS an den Rand des Zellrasens hinzupipettiert und dann durch Schwenken der Flasche auf dem Zellrasen verteilt. Das PBS wurde verworfen und nachfolgend 0,5 ml Accutase auf die Zellen pipettiert. Durch Kippbewegungen wurde die Accutase auf dem Zellrasen verteilt und anschließend 10 min einwirken gelassen. Nach 10 min wurde unter dem Mikroskop geprüft, ob sich die Zellen abgerundet hatten. Anschließend wurden die Zellen mit 2,5 ml extrazellulärer Puffer ab gespült und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 2 min bei 1300 rpm. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert oder abpipettiert. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml extrazellulärem Puffer resuspendiert.

4.2 UV-vis-Detektor

4.2.1 Aufstellen und Anschließen

Vor dem Aufstellen und Anschließen des UV-vis-Detektors wurde die Lieferung der Durchflusszelle und des Detektors überprüft. Zum Anschließen des Detektors an den bereits vorhandenen Verstärker wurde zusätzlich ein Cinch auf BNC Adapter benötigt. Bei der Durchflusszelle fehlten die Ferrule. Beide Gegenstände waren am NMI vorhanden und der Zusammenbau der Geräte konnte gestartet werden.

Von dem bei der Durchflusszelle mitgelieferten Teflonschlauch wurden je zwei mal ca. 30 cm lange Stücke abgeschnitten und die Ferrule und Nuten an je ein Ende aufgesteckt. Die Nuten wurden anschließend in die Durchflusszelle geschraubt, wobei ein Schlauch nun den Durchflusszelleneingang und der andere den -ausgang bildete. Nachfolgend wurden die Lichtwellenleiter mit je einem Ende an die SMA-Konnektoren der Durchflusszelle geschraubt und mit dem anderen Ende an den Ein- bzw. Ausgang am UV-vis-Detektor. Für die ersten Tests (als „Test“ ist die Beobachtung des Messsignals bei unterschiedlichen Lösungen gemeint) wurde eine Spritze genutzt, um Flüssigkeit durch die Durchflusszelle zu drücken bzw. zu ziehen. Im späteren Verlauf wurde eine Peristaltikpumpe verwendet, um einen gleichmäßigeren Fluss zu erhalten.

Der UV-vis-Detektor wurde über den Integratorausgang mit dem Cinch-Kabel und dem Cinch auf BNC Adapter mit dem A/D-Eingang des Verstärkers des Patch Clamp Aufbaus (EPC 10) verbunden und zuletzt ans Stromnetz angeschlossen. Über die Einstellungen der Protokolle in der Patchmaster-Software konnte nun das Signal des UV-vis-Detektors in der Software beobachtet werden.

4.2.2 Herstellen von Testlösungen

Um den UV-vis-Detektor testen zu können, wurden Testlösungen mit unterschiedlichen Substanzen hergestellt. Mengen und Volumina für Stammlösungen wurden, auch im späteren Verlauf der Arbeit, immer mittels den nachfolgenden Formeln berechnet. Die benötigte Substanzmenge wurde mit der Formel $m = M \cdot c \cdot V$ berechnet. Als Lösungsmittel diente Dimethylsulfoxid, da die zu lösenden Substanzen hydrophob waren. Die Menge an benötigtem Lösungsmittel wurde nach Einwaage der Substanz über die Formel $V_{\text{Ist}} = m_{\text{Ist}} \cdot V_{\text{Soll}} / m_{\text{Soll}}$ berechnet. Meist wurde ca. 1 ml an Stammlösung hergestellt. Für die Ermittlung der benötigten Volumina an Stammlösung für die verdünnten Lösungen wurde die Formel $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$ herangezogen. Zur Verdünnung der Stammlösungen wurde extrazellulärer Puffer verwendet, da die Lösungen später im Patch Clamp Experiment Anwendung finden sollten. Als Kontrolllösung ohne Substanzzugabe („Blank“) wurde ebenfalls extrazellulärer Puffer verwendet, der mit 0,1 % Dimethylsulfoxid versetzt wurde.

Für die Tests mit dem UV-vis-Detektor wurden Substanzen gewählt, die bereits dafür bekannt waren, den hERG-Ionenkanal zu blockieren. Als erste Substanz wurde Terfenadin gewählt. Terfenadin war unter dem Namen Seldane[®] und Teldane[®] bekannt und fand als Antihistaminikum Anwendung [7]. Es musste jedoch vom Markt genommen werden, als bekannt wurde, dass Terfenadin TdP auslösen und zum Tod führen kann [4, 7]. Terfenadin hat ein Molekulargewicht von 471,685 g/mol [15]. Es wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 5 mM hergestellt. Aus der Terfenadin-Stammlösung wurden für die Messungen Lösungen mit den Konzentrationen 10 μ M und 100 μ M hergestellt.

Neben Terfenadin wurde Quinidin für weitere Tests ausgesucht. Quinidin (auch: Chinidin) findet bei Herzrhythmusstörungen Anwendung. Die molare Masse von Quinidin beträgt 324,424 g/mol [14]. Es wurde eine 10 mM Stammlösung hergestellt. Zur Messung mit dem UV-vis-Detektor wurde die Stammlösung auf 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M und 100 μ M verdünnt.

Als dritte und letzte Substanz wurde Nifedipin ausgesucht, da es sich bei dieser Substanz um eine farbige Verbindung handelt (gelbe Farbe). Bei Nifedipin handelt es sich um einen Calcium-Kanal-Blocker. Es wird bei Bluthochdruck und Angina Pectoris eingesetzt. Das Molekulargewicht von Nifedipin beträgt 346,339 g/mol [13]. Es wurde eine 10 μ M Stammlösung angesetzt, aus der Verdünnungen mit den Konzentrationen 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M hergestellt wurden.

4.2.3 Ermittlung der Absorptionsmaxima

Die Ermittlung der Absorptionsmaxima, besonders im extrazellulären Puffer, war für die Messungen mit dem UV-vis-Detektor essentiell. Der UV-vis-Detektor für den manuellen Patch Clamp Aufbau konnte immer nur eine bestimmte Wellenlänge messen. Eine gleichzeitige Messung verschiedener Wellenlängen war nicht möglich, das Ändern der Wellenlänge brauchte etwas Zeit und führte automatisch zur Nullpunktsetzung („Autozero“). Eine Wellenlängenänderung während einer Messung war demnach nicht durchführbar.

Um die Absorptionsmaxima der drei genannten Substanzen innerhalb des extrazellulären Puffers zu ermitteln wurden Spektren über einen Wellenlängenbereich aufgenommen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem Lambda Bio+ UV-vis-Spektrometer von Perkin Elmer. Als Messgefäße dienten Einmal-Küvetten (Halbmikro, PS von ratiolab). Es wurden Spektren über den Wellenlängenbereich von 200 nm bis 600 nm aufgenommen. Der Aufnahmemodus war „Extinktion“. Die sonstigen Einstellungen für die Peakerkennung sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die verschiedenen Einstellungen beeinflussten nicht die Aufnahmen, sondern nur die Anzahl der vom Programm ermittelten Peaks. Als erstes wurde die Kontrolllösung („Blank“, extrazellulärer Puffer mit 0,1 % Dimethylsulfoxid) gemessen und innerhalb des Gerätes als „Blank“ definiert. Anschließend wurden die Terfenadin- (10 μ M und 100 μ M) und die Quinidin-Testlösungen (10 μ M und 100 μ M) gemessen. Da am Spektrometer

Tabelle 1: Peakerkennung am UV-vis-Spektrometer (Perkin Elmer)

Automat. Erkennung	ja
Neuerkennung im Zoom	ja
Minimale Peakhöhe (1. Einstellung)	0,20
Minimale Peakhöhe (2. Einstellung)	0,01
Minimale Peakhöhe (3. Einstellung)	1
Peaks sortieren nach...	Wellenlänge
Minimale Peakbreite (1. Einstellung)	5 nm
Minimale Peakbreite (2. Einstellung)	1 nm
Minimale Peakbreite (3. Einstellung)	5 nm
Peaks markieren	nein

kein Drucker vorhanden war, wurden die Ergebnisse des ersten Durchlaufs nur schriftlich notiert. Die Spektren des zweiten und dritten Durchlaufs wurden abfotografiert. Im zweiten Durchlauf wurden Terfenadin- und Quinidin-Testlösungen mit Konzentrationen von $50 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ gemessen. Im dritten Durchlauf wurden Testlösungen von Nifedipin und Quinidin mit den Konzentrationen $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ mehrfach gemessen sowie Spektren vom Blank aufgenommen.

4.2.4 Inbetriebnahme des UV-Vis-Spektrometers

Für erste Tests mit dem Spektrometer wurde ein neues Protokoll in der Patchmaster-Software angelegt. Über den Verstärker des Patch Clamp Aufbaus konnte anschließend das Signal des Detektors angezeigt werden. Für allererste Tests mit dem neuen Gerät wurde mit Hilfe einer Spritze Wasser und der Blank zunächst durch die Durchflusszelle gedrückt. Um einen gleichmäßigeren Fluss zu erhalten wurde die Spritze am Ausgang der Durchflusszelle montiert und die Flüssigkeiten durch das System gezogen. Als Testlösungen dienten die vorher beschriebenen Lösungen von Quinidin und Nifedipin. Der erste Versuchsaufbau (ohne Spritze) ist in Abbildung 6 dargestellt.

Im Testverlauf stellte sich heraus, dass der Detektor bzw. die Durchflusszelle empfindlich auf Änderungen der Lichtverhältnisse reagiert. Daher sollte die Durchflusszelle von externen Lichteinflüssen abgeschirmt werden. Als kurzfristige Lösung diente hierbei die Umwicklung der Durchflusszelle mit Alufolie. Zusätzlich wurde die Spritze durch eine Peristaltikpumpe ersetzt, um einen gleichmäßigeren Fluss zu erhalten und unabhängig vom begrenzten Spritzenvolumen zu werden. Die Durchflusskammer wurde schräg aufgehängt, um die Wahrscheinlichkeit zu verringern, dass Luftblasen im Strahlengang hängen blieben. Der zweite Versuchsaufbau ist in Abbildung 7 dargestellt.

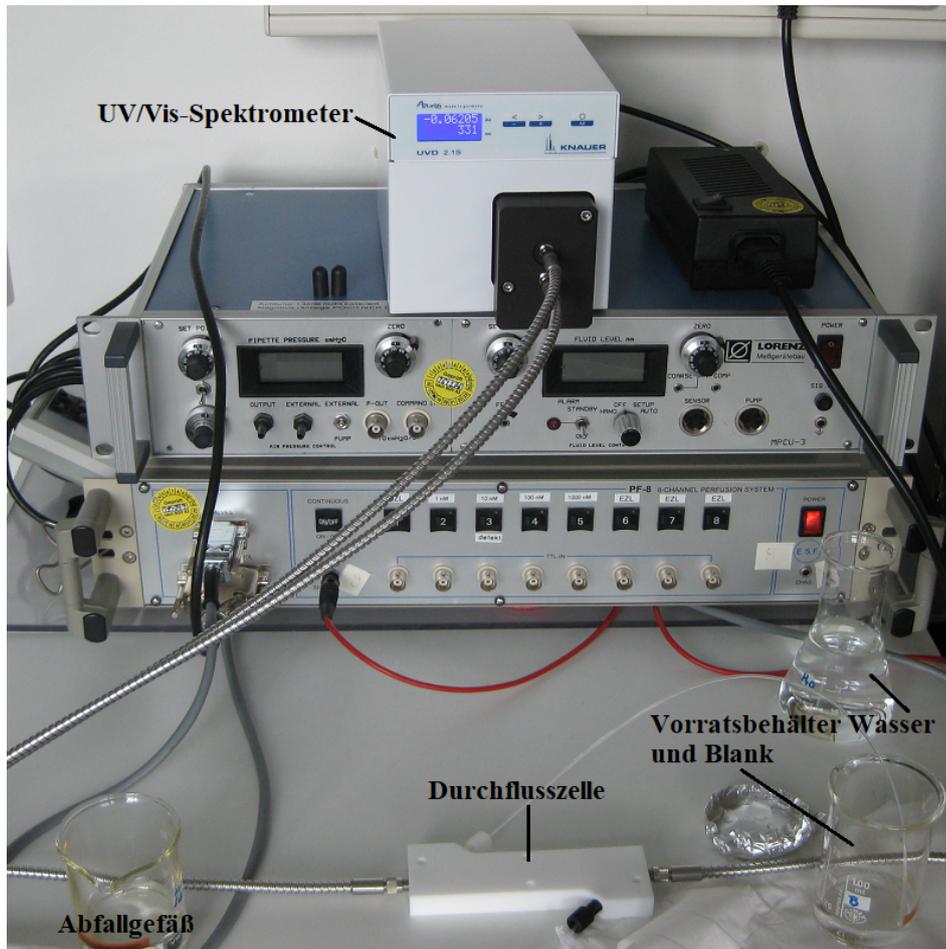


Abbildung 6: Erster Versuchsaufbau

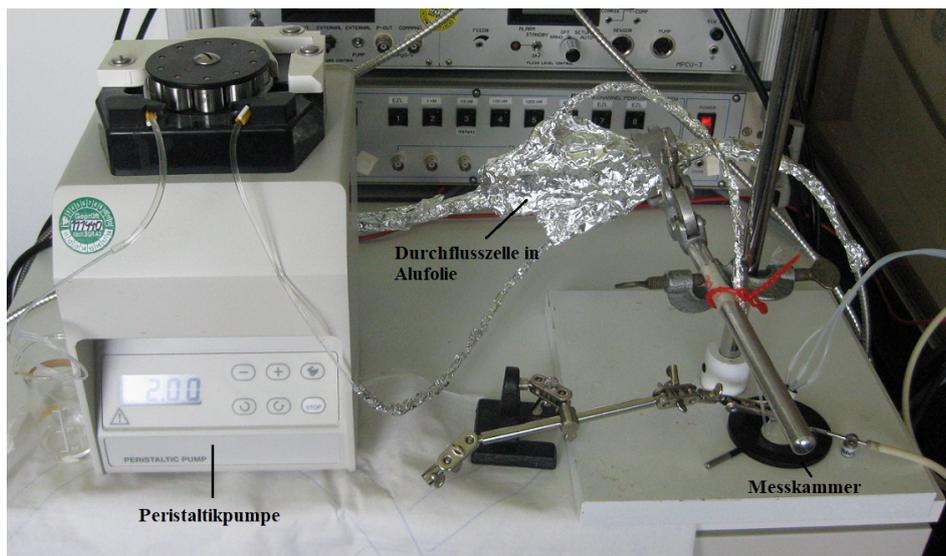


Abbildung 7: Zweiter Versuchsaufbau

In Abbildung 8 ist die Messkammer zu sehen. Der Schlaucheingang der Durchflusszelle führte nun nicht mehr direkt in ein Vorratsgefäß, sondern wurde in eine Messkammer eingebracht, die auch mit einem Perfusions- und einem Absaugsystem verbunden war. Die Flussgeschwindigkeit der Pumpe wurde auf einen Wert von $-2,00$ rpm eingestellt, wobei das Vorzeichen die Flussrichtung bezeichnet (Saugvorgang). Zur Reinigung und zur Entfernung möglicher Luftblasen wurde die Durchflusszelle mit 1 M Natronlauge und anschließend mit viel Wasser gespült. Für eine bessere Durchmischung der Testlösungen und zur Entfernung von Luftblasen wurden alle Flüssigkeiten für ca. 20 s bis 30 s in ein Ultraschallbad gestellt. Es wurden verschiedene Einstellungen am UV-vis-Detektor ausprobiert, um das Rauschen der Basislinie zu verringern.

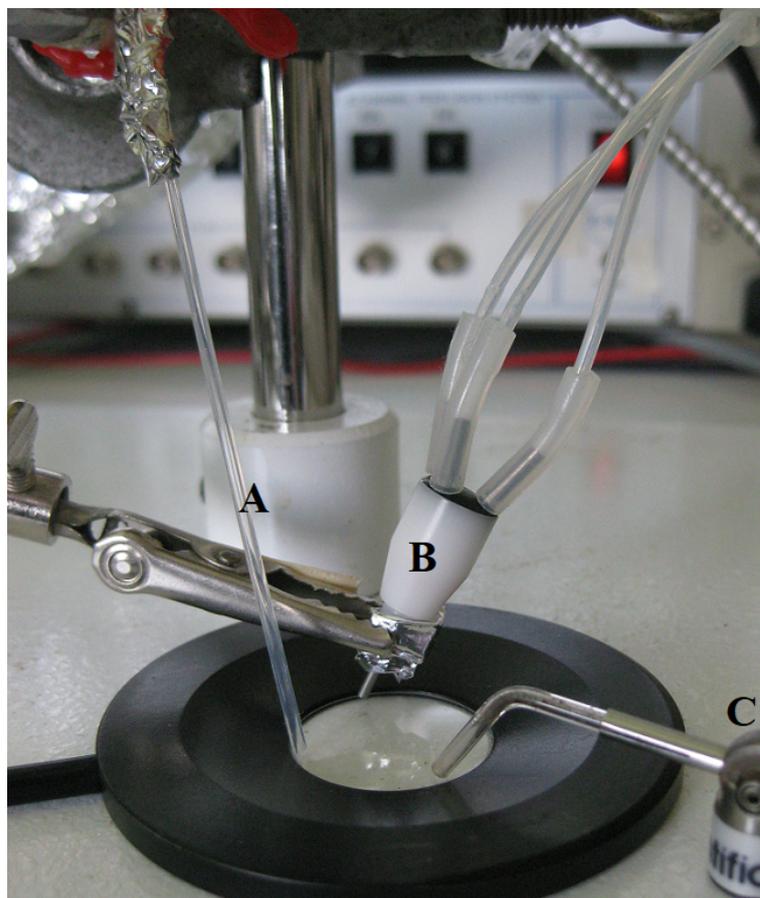


Abbildung 8: Messkammer für erste Tests. (A) Eingang zur Durchflusszelle. (B) Zulaufvorrichtung des Perfusionssystems. (C) Absaugvorrichtung

4.2.5 Integration der Durchflusszelle in den Patch Clamp Aufbau

Um die Durchflusszelle noch besser vor Lichteinflüssen abzuschirmen und zur besseren Handhabung wurde die Durchflusszelle in eine schwarze Kunststoffbox eingebaut. An vier Schrauben wurde die Durchflusszelle befestigt, wie in Abbildung 9 dargestellt.

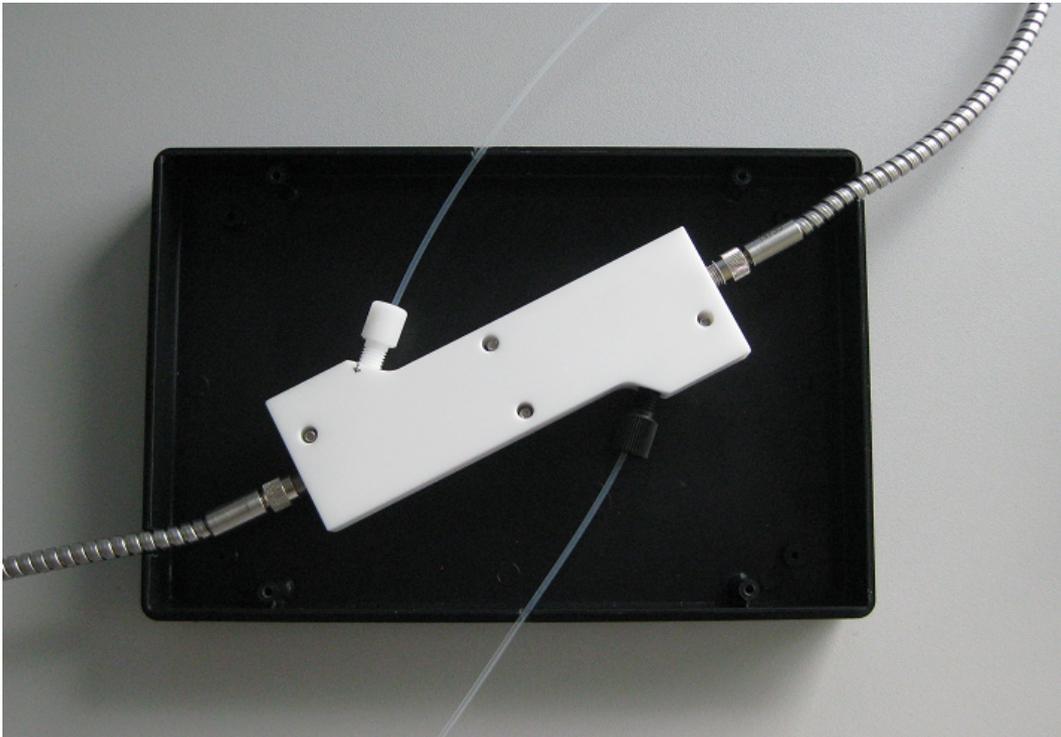


Abbildung 9: Einbau der Durchflusszelle in eine schwarze Kunststoffbox zum Schutz vor Lichteinflüssen

Die Schräglage wurde wieder gewählt, damit die Wahrscheinlichkeit, dass Blasen im Strahlengang hängen blieben, verringert wurde. Festhängende Blasen, die durch Klopfen an die Durchflusszelle entfernt werden können, wandern durch die schräge Aufhängung in Richtung Ausgang. Für eine noch bessere Abschirmung vor Licht wurde die Durchflusszelle vor dem Einbau in die Kunststoffbox mit Alufolie umwickelt.

Abbildung 10 zeigt den letzten Stand der Testserie mit der Durchflusszelle und dem UV-vis-Detektor vor der Integration in den Patch Clamp Aufbau. Um die Kunststoffbox in den manuellen Patch Clamp Stand einzubauen wurde eine flexible Halterung gebaut, sodass die Box an einem Stativ leicht zu befestigen und auch wieder abzunehmen war. Die Halterung wurde extra so gebaut, dass sie im Falle, dass die Box durch eine andere mit anderen Abmessungen ersetzt werden müsste, angepasst werden könnte (siehe Abbildung 11).

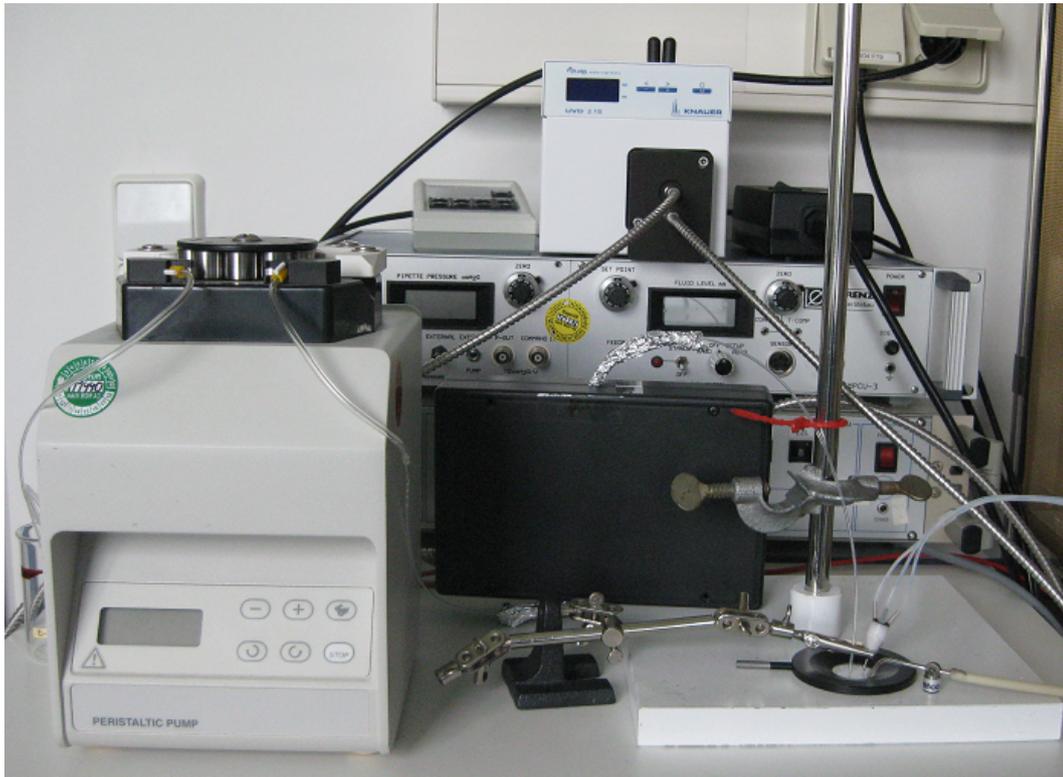


Abbildung 10: Letzter Versuchsaufbau vor der Integration des UV-vis-Detektors in den Patch Clamp Stand

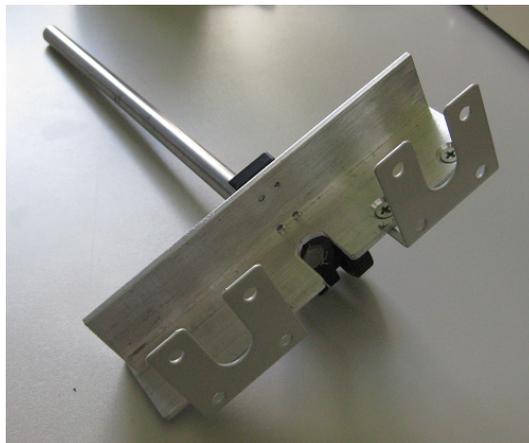


Abbildung 11: Halterung für die Durchflusszelle

Nachdem die ersten Tests abgeschlossen und das Gerät und die Software auf Patch Clamp Messungen vorbereitet wurden, wurde die Durchflusszelle innerhalb der schwarzen Box in den faradayschen Käfig verlegt. Nur die Peristaltikpumpe, das zugehörige Abfallgefäß und der UV-vis-Detektor selbst blieben aus Platzgründen außerhalb des Käfigs. Der UV-vis-Detektor war nun bereit für Tests zusammen mit Patch Clamp.

4.2.6 Patch Clamp Technik und UV-vis-Detektor

Zunächst wurde der UV-vis-Detektor am Patch Clamp Stand mit einer „Simulationszelle“ getestet. Dieses elektronische Zellmodell simulierte biologische Zellen und sorgte für ein lineares Signal bei der Stromantwort, sodass zunächst nur das Signal des Detektors eingestellt und begutachtet werden konnte. Um die Basislinie des Spektrums zu beobachten, wurde das System über mehrere Stunden mit extrazellulärem Puffer laufen gelassen.

Da Luftblasen im System, insbesondere innerhalb des Strahlengangs der Durchflusszelle, das Signal des UV-vis-Detektors beträchtlich stören können, wurden mit verschiedenen Lösungen und Detergenzien experimentiert. Ziel dabei war es, durch Durchleiten der Detergenzien die Luftblasen in Schläuchen und der Durchflusszelle zu zerstören und dadurch ein weniger gestörtes Ausgangssignal zu erhalten.

Zunächst wurde 1 M Natronlauge getestet, da diese auch zum Reinigen der Durchflusszelle empfohlen wird. Daneben wurde ein Detergenz namens „QClean“ angewendet, welches normalerweise bei der Reinigung von automatisierten Patch Clamp Systemen Anwendung findet. Für ein weiteres Experiment wurden das QClean und destilliertes Wasser unter Rühren für 20 min erhitzt, um die Flüssigkeiten vom gelösten Sauerstoff zu befreien. Die abgekühlten Flüssigkeiten wurden ebenfalls am Detektor getestet. Als letztes getestetes Detergenz fand 50 %-iges Isopropanol Anwendung. Bei manchen Spülvorgängen wurde gleichzeitig versucht, Luftblasen durch die Maximierung der Fließgeschwindigkeit (48 rpm, Symbol „Hase“ an der Pumpe) aus dem Strahlengang zu entfernen.

Nach Durchführung der Tests am UV-vis-Detektor wurde unter Verwendung der Patch Clamp Technik zu sicherheitspharmakologischen Messungen mit hERG-Zellen übergegangen.

4.3 Patch Clamp Technik

4.3.1 Herstellung der Patchpipetten

Die benötigten Pipetten zum Patchen wurden mit Hilfe eines Pipettenziehgerätes („Puller“) selbst hergestellt. Hierzu wurden Pipettenrohlinge vom Typ GB 150 TF-10 verwendet. Ein Pipettenrohling wurde in den Puller eingespannt und mit Hilfe eines Magneten so justiert, dass die entstehenden Pipetten etwa die gleiche Länge hatten. Es wurden die in Tabelle 2 dargestellten Geräte-Parameter verwendet. Durch Drücken der Taste „Pull“ wurde die Patchpipette erzeugt.

Tabelle 2: Parameter für die Herstellung der Pipetten

Programmnummer	Heat	Pull	Pressure	Velocity	Time
55	550	-	500	26	250

Anschließend wurden die Pipetten mit Hilfe einer Microforge feuerpoliert, d.h. die Pipette wurde mit Hilfe eines Mikroskops nahe an einen Draht herangeführt und dieser anschließend über Durchleitung von Strom erhitzt (siehe Abbildung 12). Durch diesen Vorgang schmolz die Pipettenspitze leicht an. Das Feuerpolieren diente der Glättung und Verkleinerung der Öffnung an der Pipettenspitze, um den Widerstand der Pipette zu erhöhen. Über diese Methode konnten an der Patch-Pipette elektrische Widerstände im Bereich von $2\text{ M}\Omega$ bis $3,5\text{ M}\Omega$ erreicht werden.

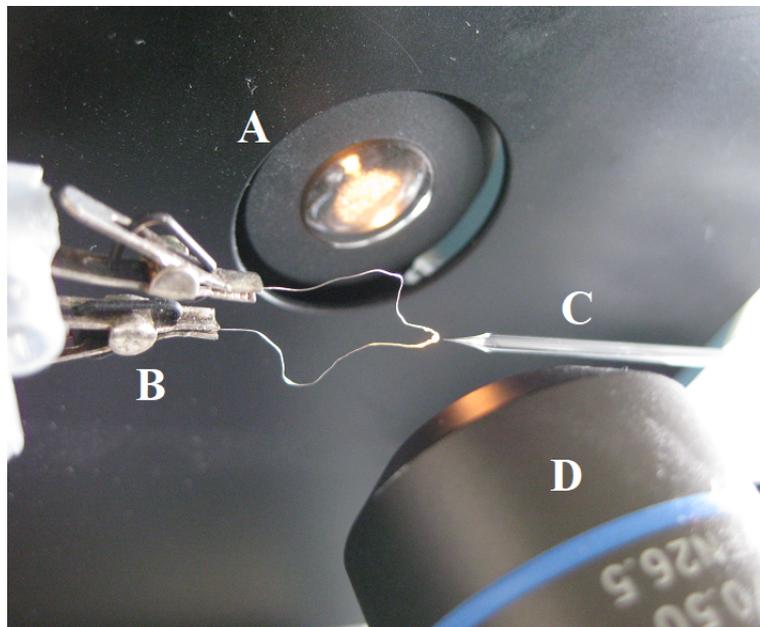


Abbildung 12: Microforge zum Feuerpolieren der Patchpipetten. (A) Lichtquelle, (B) heißer Draht, (C) Patchpipette, (D) Objektiv

4.3.2 Herstellen der verwendeten Pufferlösungen

Als Umgebungssubstanz für die Zellen wurde extrazellulärer Puffer für hERG-Zellen hergestellt und verwendet. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des extrazellulären Puffers

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
NaCl	58,44	145
KCl	74,56	4
D-Glukose	180,16	10
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	203,3	1
HEPES	238,3	10
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	147,02	2
Saccharose	342,3	1

Die Substanzen wurden nacheinander in einem Wägeschiffchen auf einer Präzisionswaage eingewogen und in einen 5l Messbecher gegeben. Anschließend wurden unter Rühren etwa 4,5l destilliertes Wasser hinzugegeben und ein paar Minuten gewartet, bis sich die Substanzen gelöst hatten. Mit Hilfe eines pH-Meters wurde der pH-Wert ermittelt und mit 1 M und 10 M Natronlauge ein pH-Wert von 7,40 eingestellt. Die Lösung wurde anschließend in einen 5,0l Messkolben überführt. Der Kolben wurde mit destilliertem Wasser auf die Markierung aufgefüllt und die Lösung anschließend wieder in den Messbecher überführt. Die Lösung wurde weiter gerührt, während erneut der pH-Wert gemessen wurde. Sobald der pH-Wert richtig eingestellt war, wurde anschließend die Osmolarität mehrmals gemessen. Mehrere Messungen wurden durchgeführt, da das Gerät nach dem Einschalten Ungenauigkeiten aufweisen könnte. Die Osmolarität wurde bei Bedarf mit Saccharose auf (305 ± 5) mOsm eingestellt. Zum Schluss wurde die Lösung für eine längere Haltbarkeit unter einer Sicherheitswerkbank in 5 Schraubverschlussflaschen sterilfiltriert und anschließend im Kühlschrank bei 4 °C bis 8 °C gelagert.

Der intrazelluläre Puffer, der zum Befüllen der Patch-Pipette genutzt wurde, wird auf äquivalente Art und Weise hergestellt, nur die Zusammensetzung variiert leicht (siehe Tabelle 4). Das K₂ATP wird normalerweise kurz vor der Benutzung des Puffers zugegeben und dient der Stabilisierung. In dieser Arbeit wurde jedoch auf die Zugabe dieser Substanz verzichtet. Da während der Arbeit kein Bedarf bestand, neuen intrazellulären Puffer herzustellen, wurde bereits vorhandener Puffer verwendet (Sophion hERG DUO B, pH 7,20, 293 mOsm 27.10.2016, BN). Vor Benutzung des intrazellulären Puffers wurden der pH-Wert und die Osmolarität nochmals überprüft und bei Bedarf eingestellt. Der pH-Wert sollte bei 7,20 liegen und wurde mit 1 M KOH-Lösung eingestellt. Die Osmolarität sollte bei (293 ± 5) mOsm liegen und wurde bei Bedarf mit Saccharose eingestellt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des intrazellulären Puffers

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [mM]
KOH	56,11	250
EGTA	380,35	80
KCl	74,56	120
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	147,02	5,374
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	203,3	1,75
HEPES	238,3	10
Saccharose	342,3	1
K ₂ ATP	619,4	400

4.3.3 Aufbau des Messstandes

Bei der Patch Clamp Technik handelt es sich um ein empfindliches Verfahren. Es werden sehr kleine elektrische Signale gemessen. Die Abstände zwischen Patchpipette, Zelle und Glasboden der Messzelle sind gering. Daher müssen einige Vorkehrungen getroffen werden, um überhaupt eine Messung durchführen zu können.

Damit die geringen Messsignale nicht von Hintergrundrauschen oder dem sogenannten Netzbrummen, überlagert wurden, befand sich der Messaufbau in einem faradayschen Käfig. Das Netzbrummen wird vom öffentlichen Spannungsnetz erzeugt und könnte sich ohne den Käfig auf die Kabel des Messstandes übertragen und so die Messungen stören. Es befanden sich daher alle Gerätschaften, außer der Peristaltikpumpe des UV-vis-Detektors und dem Detektor selbst, innerhalb des faradayschen Käfigs. Weiterhin können auch Schwingungen jeder Art das Experiment negativ beeinflussen, daher standen die meisten Bestandteile des Messaufbaus auf einem schwingungsgedämpften Tisch (siehe Abbildung 13). Dies führte dazu, dass sich mögliche Schwingungen oder andere Erschütterungen gleichmäßig verteilen oder gedämpft wurden. Relativbewegungen wurden dadurch unterbunden. Für die Durchführung und Beobachtung der Patch Clamp Experimente befand sich ein inverses Mikroskop auf dem schwingungsgedämpften Tisch [16].

Ein von einer Steuereinheit bedienbarer Mikromanipulator diente der Einstellung der Fokusebene über die z-Achse. Das Bild des Mikroskops wurde via Kamera auf den PC übertragen. Ein weiterer 2-Achsen Mikromanipulator diente zur Bestimmung der Position der Messkammer. Die Halterung der Messkammer war ebenfalls mit dem Tisch verbunden. Die Messkammer ließ sich dadurch in Relation zum Mikroskop entlang der x- und y-Achse verstellen. Ein dritter, ebenfalls durch die Steuereinheit bedienbarer Mikromanipulator diente der Verstellung der Patchpipette.

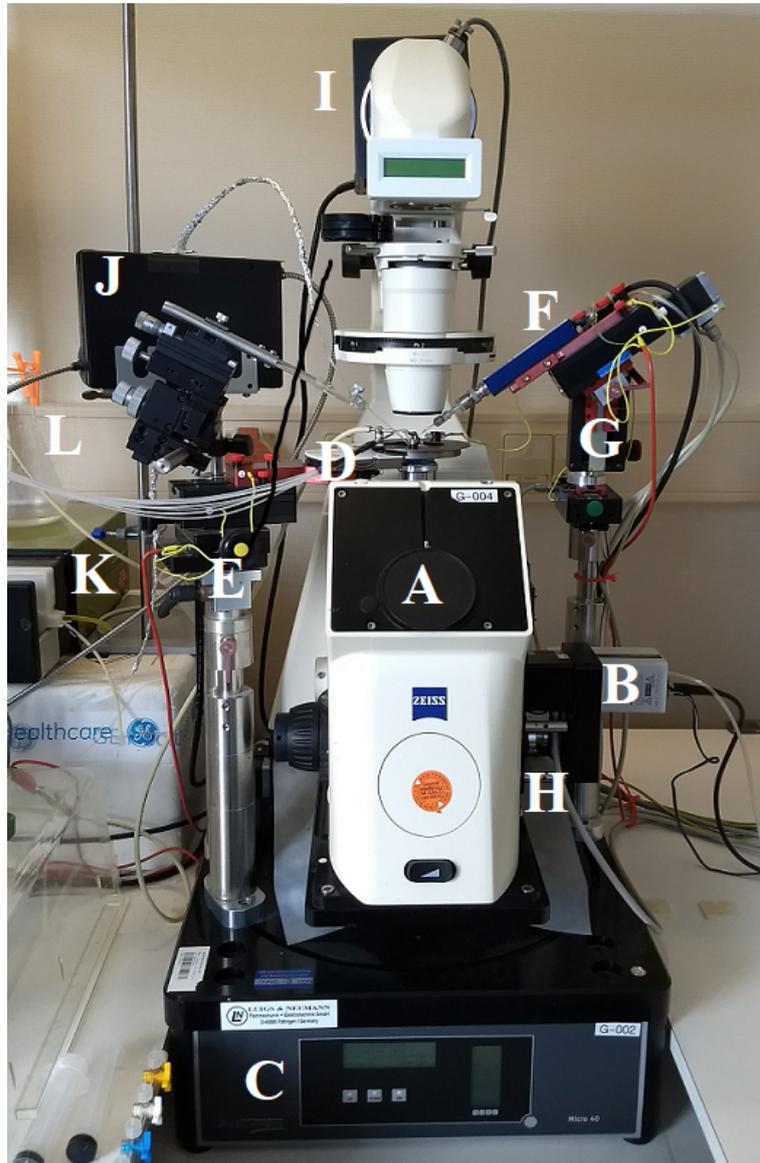


Abbildung 13: Manueller Patch Clamp Aufbau. (A) Inverses Mikroskop, (B) Kamera, (C) Schwingungsgedämpfter Tisch, (D) Messkammer, (E) Manueller 2-Achsen Mikromanipulator für die Messkammer, (F) Patch Clamp Vorverstärker, (G) 3-Achsen Mikromanipulator für die Patchpipette, (H) 1-Achsen Mikromanipulator für das Mikroskop, (I) Beleuchtungseinheit, (J) Durchflusszelle in schwarzer Box, (K) Peristaltikpumpe des Ablaufs, (L) Ablaufgefäß

An die Halterung der Patchpipette war ein Vorverstärker sowie ein System zur Druckregulation angeschlossen (siehe Abbildung 14). Auch dieser 3-Achsen-Mikromanipulator war mit dem schwingungsgedämpften Tisch verbunden. Die Peristaltikpumpe für den Ablauf, das Ablaufsammelgefäß sowie das Stativ, an dem die Durchflusszelle in ihrer schwarzen Box befestigt war, befanden sich nicht auf dem schwingungsgedämpften Tisch.



Abbildung 14: Messkammer des manuellen Patch Clamp Aufbaus.
 (A) Messkammer, (B) Patchpipette, (C) Patchpipettenhalterung mit Anschluss an Druckregulation, (D) Referenzelektrode, (E) Absaugvorrichtung, (F) Zugang zur Durchflusszelle, (G) Zulaufvorrichtung des Perfusionssystems

Abbildung 14 zeigt den Messkammeraufbau. Der Messkammereinsatz wurde mit extrazellulärem Puffer gefüllt. In diesen wurden der Zulauf des Perfusionssystems, der Teflonschlauch der zur Durchflusszelle führte sowie die Patchpipette und die Referenzelektrode eingetaucht. Die Referenzelektrode diente der Erdung der Flüssigkeit in der Messkammer und war über ein Kabel mit dem Vorverstärker verbunden. Bis auf den Teflonschlauch des UV-vis-Detektors konnten alle Zu- und Abläufe magnetisch an einer Grundplattform befestigt werden. Der Teflonschlauch wurde über eine separate Halterung fixiert. Das Absaugröhrchen wurde knapp über die Flüssigkeit justiert. Dadurch wurde nur Flüssigkeit abgesaugt, sobald die Flüssigkeit in der Messkammer eine bestimmte Höhe erreicht hatte. Eine genaue Menge an Flüssigkeit, die sich in der Messkammer befand, wurde jedoch nicht festgelegt. Es musste entsprechend darauf geachtet werden, dass der Teflonschlauch des UV-vis-Detektors sich immer im Puffer befand und keine Luft einzog. Die Halterung für die Patchpipette enthielt ein System zur Druckregulation. Es konnte manuell ein Unter- oder Überdruck eingestellt werden. Eine schematische Darstellung der Halterung für die Patchpipette findet sich in Abbildung 15.

Die Patchpipette, die vor Anbringung an der Halterung mit intrazellulärem Puffer befüllt wurde, wurde über einen chlorierten Silberdraht gestülpt. Über den Silberdraht war der Puffer mit einem Vorverstärker, der sich oberhalb der Halterung befand, verbunden. Der Vorverstärker wandelte den erfassten Strom in ein Spannungssignal um und übertrug das Signal auf den Verstärker des Patchsystems (EPC 10). Dieser war mit dem Messcomputer verbunden und gab das verstärkte Signal an die Patchmaster-Software weiter.

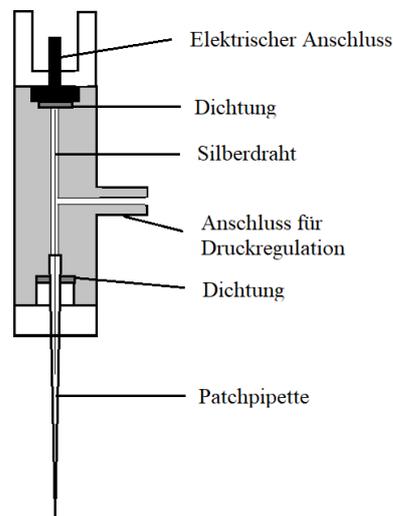


Abbildung 15: Schematischer Aufbau der Halterung für die Patchpipette (eigene Darstellung, nach [16])

4.3.4 Aufbau und Funktionsweise des Perfusionssystems

Um pharmakologische Messungen durchführen zu können wurde ein Perfusionssystem verwendet. Das verwendete Perfusionssystem am manuellen Patch Clamp Aufbau ist in Abbildung 16 dargestellt. Als Vorratsgefäße für die Lösungen dienten 20 ml Spritzen, die über Teflon- bzw. Silikonschläuche zu einem gemeinsamen Ausgang eines Manifolds führten. Anfangs wurde ein 3-Kanal-System verwendet, im späteren Verlauf wurde auf ein 6-Kanal-System gewechselt. Die Schläuche wurden durch Quetschventile geführt, um die Steuerung mit dem Bedienelement zu ermöglichen (siehe (B) in Abbildung 16). Die Schläuche mündeten an einem Glasröhrchen, welches über eine magnetische Halterung an der Messkammer befestigt werden konnte.

Zu Beginn mussten die Flüssigkeit mit einem passenden Kolben der Spritzen durch die Schläuche gedrückt werden, bis keine Luft mehr in den Schläuchen enthalten war. Danach flossen die Lösungen bei Aktivierung ihres jeweiligen Quetschventiles von der Schwerkraft getrieben von alleine. Vor jeder Benutzung musste sichergestellt werden, dass die Schläuche luftblasenfrei waren, da Luftblasen die Messungen stören konnten.

Über die Steuerungseinheit konnte nun durch Gedrückthalten der jeweiligen Nummer für das Quetschventil Flüssigkeit in die Messkammer geleitet werden. Es war auch möglich, eine „Feststelltaste“ zu aktivieren, bei der durch einmaliges Drücken der Taste das Ventil an- bzw. ausgeschaltet wurde. Außerdem wurde sichergestellt, dass alle Quetschventile funktionierten und gleichmäßig Flüssigkeit heraustropfte.



Abbildung 16: Verwendet Perfusionssystem. (A) Vorratsgefäße in Form von Spritzen, (B) Steuerungseinheit

Es wurden immer die gleichen Spritzen für gleich konzentrierte Lösungen verwendet. War dies nicht möglich oder es wurden anders konzentrierte Lösungen genutzt, wurden die Spritzen und die Schläuche vor ihrer Benutzung mit Wasser durchgespült.

4.3.5 Durchführung der Patch Clamp Messungen

Zur Vorbereitung auf die Patch-Clamp Messungen in Kombination mit dem UV-vis-Detektor wurde die Durchflusszelle einige Minuten mit 50 %-igem Isopropanol gespült. Danach wurde einige Minuten extrazellulärer Puffer durch die Durchflusszelle geleitet und der UV-vis-Detektor eingeschaltet. Während die Durchflusszelle gespült wurde und der Detektor warm lief wurden die Zellen wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben vorbereitet. Im Anschluss daran wurde die Messkammer mit ca. 1 ml extrazellulärem Puffer befüllt. Ein paar hundert μl der Zellsuspension wurden mit dem extrazellulärem Puffer in der Messkammer vermischt. Die Zellsuspension wurde ca. 5 min ruhen gelassen, damit sich die Zellen absetzen konnten. Das Absaugröhrchen wurde anschließend so justiert, dass ein wenig von der Suspension und nicht abgesetzte Zellen eingesaugt wurden, jedoch noch genug Flüssigkeit in der Messkammer verblieb. Die Pumpe des UV-vis-Detektors wurde ausgeschaltet und der Teflonschlauch der Durchflusszelle luftblasenfrei in die Flüssigkeit in der Messkammer eingeführt.

Nun wurde eine Patchpipette mit Hilfe einer 1 ml-Spritze mit intrazellulärem Puffer befüllt. Auf die Spritze wurde dafür eine dünne Kapillare und ein Sterilfilter aufgesteckt. Oftmals entstanden beim Befüllen Blasen, insbesondere in der Pipettenspitze, welche durch leichtes Schnipsen gegen die Pipette entfernt wurden. Die befüllte Pipette wurde über den chlorierten Silberdraht in die Halterung eingesetzt, festgeschraubt und ein leichter Überdruck angelegt. Der Überdruck sollte eine Verschmutzung der Pipettenspitze verhindern sowie die Vermischung des intrazellulären und extrazellulären Puffers entgegen wirken. Über das Steuermodul wird die Pipette nun in die Zellsuspension eingetaucht und konnte mit Hilfe des Mikroskops beobachtet werden.

Vor Beginn der Messungen wurde der Aufzeichnungsmodus der Patchmaster-Software auf den sogenannten „Whole-Cell“-Modus umgeschaltet. Bei diesem Modus wird die gesamte Membran der Zelle berücksichtigt, es handelt sich hierbei um eine Ganzzellmessung.

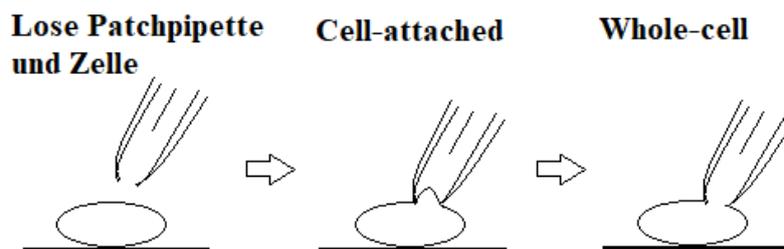


Abbildung 17: Schritte zur Erreichung der Whole-cell-Konfiguration. Durch Annäherung der Patchpipette an die Zelle entsteht zunächst eine Cell-attached-Konfiguration. Durch Ansaugen der Membran kann die Whole-cell-Konfiguration erreicht werden (eigene Darstellung, nach [16])

Über das Steuermodul wird das Mikroskop auf die Zellen fokussiert und die Patchpipette via Mikromanipulator vorsichtig an die Zellen herangeführt. Sobald sich die Pipette in der Nä-

he einer geeigneten Zelle befand, wurde ein sogenannter „Offset-Abgleich“ durchgeführt, um das Verstärker-Ausgangssignal zunächst auf Null zu setzen. Der Offset-Abgleich und die nachfolgenden Kompensationen werden in Kapitel 4.3.6 näher erläutert. Der erste Schritt des manuellen Patchens ist in Abbildung 18 dargestellt.

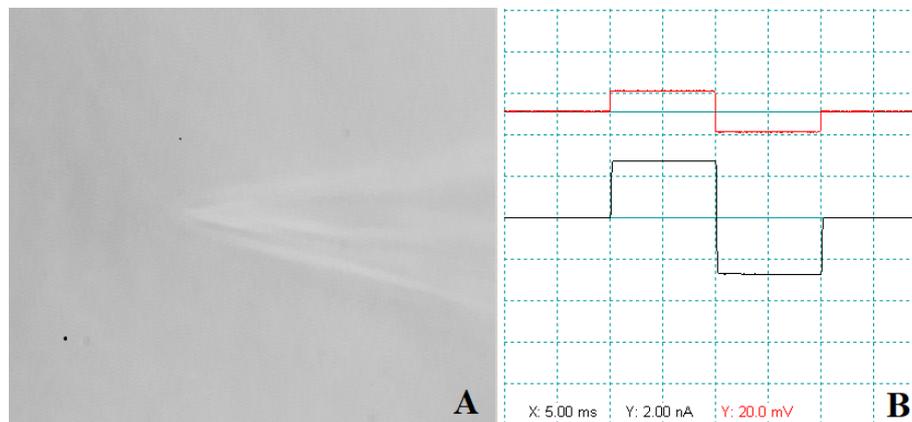


Abbildung 18: Manuelles Patchen: Schritt 1. (A) Videoübertragung vom Mikroskop, (B) Kommandospannungspuls (rot) und Stromantwort (schwarz) am Oszillator

Die rote Kurve in Abbildung 18 B zeigt den 10 mV Kommandospannungspuls, bestehend aus einem doppeltem Rechteckpuls mit einem positiven und einem negativen Spannungssprung. Die schwarze Kurve stellt die Stromantwort dar. Durch Annäherung der Patchpipette an die Zelle wurde die Stromantwort zunehmend kleiner. In dieser Position der Pipette wurde der Überdruck entfernt. Es kam zu einer Änderung des Widerstandes, welche über eine Verringerung der Stromantwort beobachtet werden konnte. Erfolgte hierbei bereits die Ausbildung eines „Seals“, verringerte sich die Stromantwort so weit, bis eine fast flache Linie entstand (siehe Abbildung 19).

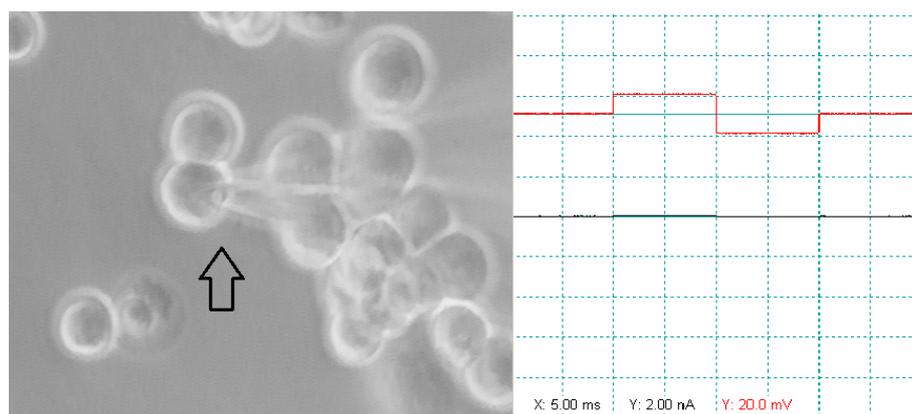


Abbildung 19: Manuelles Patchen: Schritt 2. Der Pfeil zeigt auf die zu patchende Zelle

Geschah dies nicht von selbst, wurde ein Unterdruck an die Pipette angelegt, bis sich die Kurve genug abgeflacht hatte und via Videoübertragung ein Kontakt zwischen Zelle und Patchpipette sichtbar

war. Anstelle der Spannungssprünge wurden nun kapazitive Transienten sichtbar, die auf einen erfolgreichen Seal hindeuteten. Der elektrische Widerstand zwischen der Pipette und der Zellmembran stieg hierbei auf über $1\text{ G}\Omega$ an, das sogenannte „Gigaseal“ wurde erreicht. Über eine Programmfunktion wurde anschließend eine Kapazitätskompensation („C-fast-Abgleich“) durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.6). Diese Konfiguration wird auch „Cell-attached“-Konfiguration genannt. Um in die Whole-cell-Konfiguration überzugehen wurde die Membranspannung zunächst von 0 mV auf -70 mV verringert. Diese Spannung entspricht in etwa dem Ruhemembranpotenzial der Zelle. Durch erneutes Anlegen von Unterdruck wurde die Zellmembran durchbrochen. Sichtbar wurde der Durchbruch der Membran über das Auftauchen neuer kapazitiver Transienten (Abbildung 20).

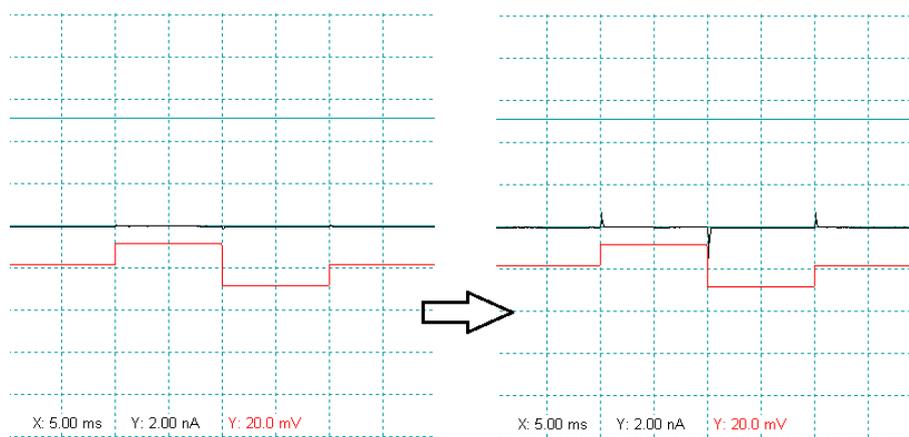


Abbildung 20: Manuelles Patchen: Schritt 3. Der Durchbruch der Membran ist durch Auftauchen kapazitiver Transienten in der Stromantwort (schwarz) erkennbar

Das Cytoplasma wird in diesem Zustand mit der Pipettenlösung ausgetauscht. Hierdurch bekommt man zwar eine bestimmte Zusammensetzung des Zellinneren, muss sich aber bewusst sein, dass keine natürliche Zusammensetzung mehr besteht [16]. Es erfolgte eine erneute Kompensation der Transienten (C-slow-Abgleich).

4.3.6 Offset-Abgleich und Kapazitäts-Kompensationen

Wie im vorangehenden Kapitel 4.3.5 erläutert wurde, waren mehrere Kompensationen notwendig, um Messungen an den Zellen durchführen zu können. Zunächst gab es das sogenannte „Offsetpotenzial“. Diese Potenziale stammen weder von der Zelle noch vom Kommandopotenzial. Sie entstehen entlang der Messkette zwischen Silberdraht, Pipettenlösung, extrazellulärem Puffer und der Erdung [16]. Um Verfälschungen zu verhindern sollte der Offset korrigiert werden. Es kann sonst zu Abweichungen zwischen dem tatsächlichen und dem angezeigten Potenzial der Zellmembran kommen. Beim Offset-Abgleich wird derjenige Wert als Nullpunkt definiert, an dem zwischen extrazellulärem Puffer und Pipette kein Strom fließt [16]. Der Offset-Abgleich wurde immer zu dem Zeitpunkt durchgeführt, bei dem die Patchpipette sich bereits in unmittelbarer Nähe zur Zelle befand.

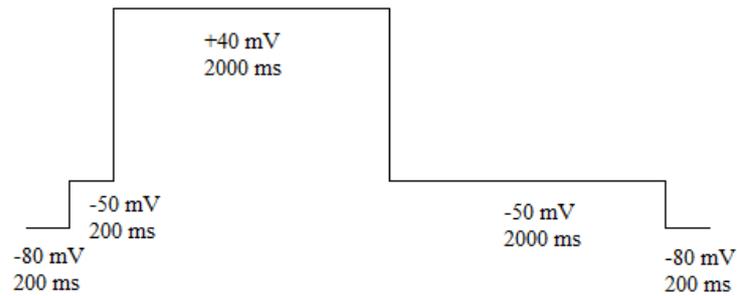
Zusätzlich zum Offset-Abgleich mussten die sogenannten „kapazitiven Artefakte“ oder auch „kapazitiven Transienten“ kompensiert werden. Kapazitive Artefakte entstehen durch Veränderungen der Kommandospannung und der damit verbundenen Ladungsänderung der Pipetten- und Zellkapazität [16]. Die Artefakte können die Messungen durch momentane Ausfälle des für die Spannung zuständigen Regelkreises stören. Um dies zu verhindern wurden sogenannte „Kapazitätskompensationen“ (C-Kompensationen) durchgeführt.

An Pipette bzw. Zelle wird eine Spannung aufgebaut, die über einen Verstärker amplifiziert, stabilisiert und differenziert wird. Es fließt ein kapazitiver Strom, getrieben durch die Änderung in der Pipetten- bzw. Zellkapazität. Die kapazitiven Artefakte werden dadurch kompensiert, dass der transiente Strom in einen zweiten Regelkreis eingespeist und über einen zusätzlichen Eingang in die Pipette geleitet wird. Durch diesen Vorgang tauchte der transiente Strom nicht mehr als Signal im Strom-Spannungs-Wandler auf, und die transienten Artefakte waren nicht mehr sichtbar [16].

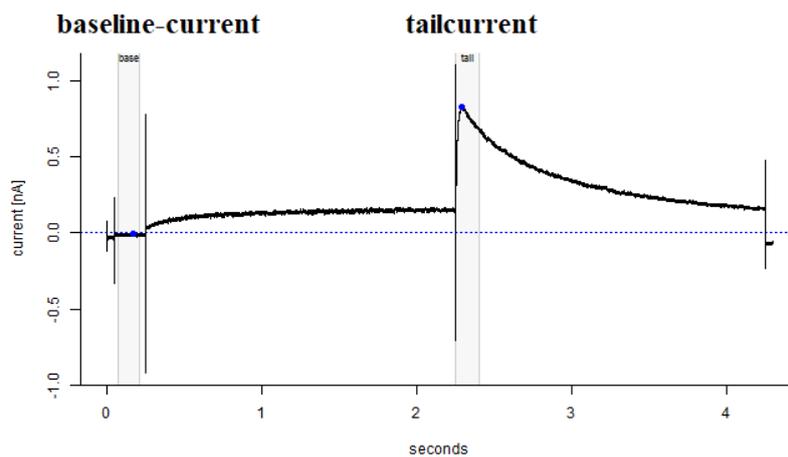
Um sowohl die Artefakte von der Patchpipette als auch von der Zelle selbst zu kompensieren wurden zwei unterschiedliche Mechanismen für die Kompensation verwendet. Die C-fast-Funktion diente dabei der Kompensation schneller kapazitiver Ströme an der Pipette. Die C-slow-Funktion sollte langsame Ströme kompensieren, welche die Zellmembran in der Whole-cell-Konfiguration aufluden. Als Parameter zur Einstellung der Kompensation dienen Zeitkonstanten und Amplituden. Es wurden die voreingestellten Parameter in der Software für die Kompensationen übernommen.

4.3.7 Verwendetes Pulsprotokoll

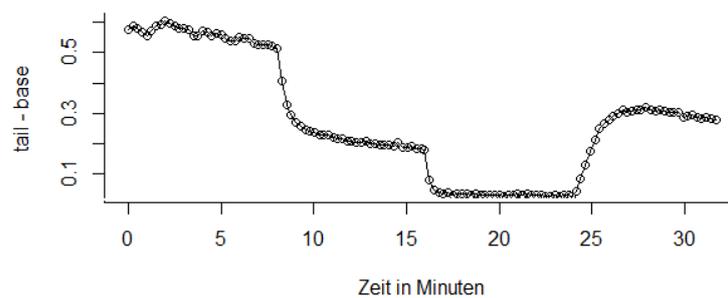
Zur elektrischen Stimulation der hERG-Ionenkanäle wurde in der Patchmaster-Software ein Pulsprotokoll definiert. Das verwendete Protokoll ist in Abbildung 21a dargestellt.



(a) Pulsprotokoll



(b) Typische Stromantwort des hERG-Ionenkanals



(c) Beispiel einer Strom-Zeit-Kurve bei Zugabe einer den hERG-Kanal blockierenden Substanz

Abbildung 21: Pulsprotokoll, typische Stromantwort und Strom-Zeit-Kurve

Abbildung 21 zeigt das verwendete Pulsprotokoll, die typische Stromantwort des hERG-Ionenkanals und ein Beispiel für ein Strom-Zeit-Diagramm.

Wie in Kapitel 4.3.5 bereits erwähnt das Haltepotential auf -70 mV gestellt. Das gezeigte Pulsprotokoll (Abbildung 21a) wurde alle 15 s durchgeführt. Zu Beginn wurde ein Spannungssprung auf -80 mV durchgeführt, diese Spannung wurde für 200 ms gehalten. Es folgte ein Sprung auf -50 mV für 200 ms („baseline-current“, siehe Abbildung 21b). Für die Depolarisation wurde die Spannung für 2000 ms auf 40 mV erhöht. In diesem Schritt wechseln die hERG-Ionenkanäle vom offenen in den inaktiven Zustand. Für die Repolarisation wurde die Spannung anschließend für 2000 ms wieder auf -50 mV gesenkt. In dieser Zeit können sich die Ionenkanäle von der Inaktivierung erholen. Es folgt ein Wechsel vom inaktiven zurück in den offenen Zustand. Die Kanäle werden anschließend langsam geschlossen. Das Protokoll wurde mit einem Spannungssprung auf -80 mV für 200 ms beendet. In dieser Phase kann der sogenannte „tailcurrent“ (siehe Abbildung 21b) beobachtet werden [7, 22].

Abbildung 21b stellt die Stromantwort des hERG-Ionenkanals dar. Dieser Verlauf ist typisch für diesen Ionenkanal und sieht immer gleich aus. Der mit „base“ markierte Strom bei ca. 0,1 s wird auch Leckstrom genannt. Da zu diesem Zeitpunkt die Ionenkanäle noch nicht geöffnet sind, muss dieser Strom einen anderen Ursprung haben. Um den baseline-Strom bei den Berechnungen zu berücksichtigen wird der Leckstrom vom eigentlichen hERG-Strom-Maximum, dem „peak tail current“, in der Abbildung bei ca. 2,3 s als „tail“ markiert, abgezogen [7]. Aus diesen „korrigierten“ hERG-Strömen wurden anschließend Strom-Zeit-Diagramme erstellt. Ein Beispieldiagramm ist in Abbildung 21c zu sehen. Der Strom nimmt bei ca. 8 min und 17 min ab, da zu diesen Zeitpunkten den hERG-Kanal blockierende Substanz zugegeben wurde.

4.4 Sicherheitspharmakologische Messungen am hERG-Ionenkanal

Es wurde die konzentrationsabhängige Wirkung von Quinidin auf den hERG-Ionenkanal untersucht. Gleichzeitig sollte die tatsächliche Exposition während der Messung über den UV-vis-Detektor erfasst werden. Für den UV-vis-Detektor und dessen Peristaltikpumpe wurden die in Tabelle 5 gezeigten Parameter verwendet.

Tabelle 5: Eingestellte Parameter am UV-vis-Detektor

Wellenlänge	TC (Zeitkonstante)	A-Out (Analog-Ausgang)	Pumpe
331 nm	1,0 s	1 V, 1 AU	-1,50 rpm

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zu Beginn der Messung wurden die Zellen in extrazellulärem Puffer gebracht. Als Kontrolllösung während den Messungen diente extrazellulärer Puffer, der mit 0,1 % Dimethylsulfoxid versetzt wurde. Von Quinidin wurde eine 10 mM Stammlösung angesetzt, als Lösungsmittel diente hierbei Dimethylsulfoxid. Ausgehend von der Stammlösung wurden Lösungen verschiedener Konzentrationen hergestellt. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch für ca. 20 s bis 30 s in ein Ultraschallbad gestellt und geschwenkt, um grobe Luftblasen zu entfernen und für eine gute Durchmischung zu sorgen.

Es wurden drei unterschiedliche Schemata bei den sicherheitspharmakologischen Messungen angewendet. Die Anzahl an Durchläufen („Sweeps“) wurde hierbei je nach angewendeten Schema variiert. Die Schemata sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Verwendete Messschemata

	Blank	Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4
Schema 1					
Ungefähre Expositionsdauer [min]	5	5	5	5	5
Anzahl Sweeps	20	20	20	20	20
Schema 2					
Ungefähre Expositionsdauer [min]	10	10	3	–	–
Anzahl Sweeps	40	40	12	–	–
Schema 3					
Ungefähre Expositionsdauer [min]	8	8	8	–	–
Anzahl Sweeps	32	32	32	–	–

Die Länge eines Sweeps betrug 4,3 s (entsprechend dem Pulsprotokoll), das Sweep-Intervall lag bei 15,0 s, d.h. erst 15 s nach Beendigung eines Pulsprotokolls wurde eine neue Pulssequenz zur erneuten Stimulation der Zelle gestartet.

In Schema 1 wurden 5 Messungen an einer Zelle durchgeführt. Bei der ersten Messung wurde hierbei die Kontrolllösung („Blank“, extrazellulärer Puffer mit 0,1 % Dimethylsulfoxid) gemessen. Bei den folgenden Messungen wurden unterschiedlich stark konzentrierte Lösungen von Quinidin gemessen, beginnend bei der niedrigsten (Konz. 1). Es wurden Lösungen mit Konzentrationen von 0,1 μM , 0,3 μM , 1 μM und 3 μM gemessen.

Für Schema 2 wurden für den Blank und die niedrigen Konzentrationen (0,1 μM oder 0,3 μM) eine längere Expositionsdauer gewählt, die zweite Konzentration war zehnmal so hoch konzentriert wie die erste Lösung und wurde daher nur kurz gemessen (1 μM und 3 μM). Es wurden jeweils die Konzentrationen 0,1 μM und 1 μM oder 0,3 μM und 3 μM zusammen an einer Zelle gemessen. Im Anschluss daran wurde zur Untersuchung des Drifts der Basislinie nochmal die Kontrolllösung aufgenommen.

Messschema 3 ist ähnlich zu Schema 2. Allerdings wurden höhere Quinidin-Konzentrationen verwendet (1 μM oder 10 μM). Die Expositionsdauer war bei allen verwendeten Konzentrationen gleich.

4.5 Erstellung einer Kalibrationskurve für das Spektrometer

Um eine Quantifizierung der Substanzen bei der Online-Expositionskontrolle der sicherheitspharmakologischen Messungen zu ermöglichen sollten unterschiedlich konzentrierte Lösungen von Quinidin gemessen und eine Kalibrationskurve erstellt werden. Es wurden Quinidin-Lösungen mit den Konzentrationen 0,1 μM , 0,3 μM , 0,5 μM , 0,7 μM , 1 μM , 3 μM und 10 μM hergestellt. Wie bei den sicherheitspharmakologischen Messungen wurde die Durchflusszelle zunächst mit 50 %-igem Isopropanol gespült und nachfolgend mit extrazellulärem Puffer laufen gelassen. Die Messung wurde anschließend mit einer Aufnahme vom Blank gestartet. Jede Messung dauerte ca. 5 min. Nach dem Puffer wurde mit der Aufnahme der niedrigsten Konzentration begonnen. Nach jeder Quinidin-Lösung erfolgte eine erneute Aufnahme des Blanks. Jede Konzentration wurde drei Mal hintereinander aufgenommen. In einer Messung wurden die Konzentrationen von 0,1 μM bis 0,7 μM erfasst. In einer weiteren Messung wurden die Konzentrationen 1 μM und 10 μM . Die Daten der Kalibrierungsmessungen wurden mit Python in Jupyter Notebook ausgewertet*. Es wurde die Bibliothek `scipy.optimize.curve_fit` verwendet. Die Messdaten wurden interpoliert und mit Hilfe eines Savitzky-Golay-Filters geglättet.

* mit Hilfe von J. Hampp und M. Schollbach

4.6 Auswertung der Messdaten der sicherheitspharmakologischen Experimente

Die Auswertung der Messdaten der hERG-Messungen erfolgte mittels R in RStudio [21].

Über R wurden die Daten der Patchmaster-Software eingelesen. Mittels der Daten wurden Diagramme erstellt, die den hERG-Strom sowie das Signal des Detektors gegen die Zeit aufzeigen. Um die konzentrationsabhängige Wirkung von Quinidin auf den hERG-Ionenkanal zu verdeutlichen, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven aus den ermittelten Daten erstellt. Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven wurden die Hill-Koeffizienten und der IC_{50} -Wert ermittelt. Bei der Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Kurven wurden die Stromantworten bei Substanzapplikation auf die Stromantworten der Kontrollmessung normalisiert.

Zur Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurven wurde folgende Gleichung herangezogen:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{1}{1 + (C/IC_{50})^h}$$

I	Stromantwort bei einer bestimmten Konzentration [nA]
I_{\max}	Stromantwort zum Ende der Kontrollphase [nA]
C	Konzentration der applizierten Substanz [μM]
IC_{50}	Konzentration welche die maximale Stromantwort zu 50% inhibiert [μM]
h	Hill-Koeffizient (Steilheit der Kurve)

Die Formel war in den verwendeten Paketen in R enthalten und wurde bei entsprechendem Befehl in RStudio automatisch angewendet [23].

Zur Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven wurde der normalisierte Strom (Angabe in %) wurde gegen die logarithmisch skalierte Konzentration (Angabe in μM) aufgetragen. Die Datenpunkte zeigen den Mittelwert, die Fehlerbalken den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) bzw. \pm SEM.

5 Ergebnisse

5.1 UV-vis-Detektor

5.1.1 Ermittlung der Absorptionsmaxima

Für die Ermittlung der Absorptionsmaxima von Terfenadin, Quinidin und Nifedipin innerhalb des extrazellulären Puffers wurden Spektren über einen Wellenlängenbereich von 200 nm bis 600 nm aufgenommen. Die ersten Messungen mit Terfenadin- und Quinidin-Testlösungen (jeweils 10 μM und 100 μM) wurden nur schriftlich dokumentiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 7: Ergebnisse der Ermittlung der Absorptionsmaxima: Terfenadin

Konzentration	100 μM	100 μM	10 μM
Wellenlänge	272 nm	282 nm	246 nm
Absorption	0,140	-0,020	-0,004

Tabelle 8: Ergebnisse der Ermittlung der Absorptionsmaxima: Quinidin

100 μM				
Wellenlänge	250 nm	261 nm	273 nm	331 nm
Absorption	1,080	0,861	1,120	0,479
10 μM				
Wellenlänge	245 nm	250 nm	257 nm	332 nm
Absorption	-0,003	0,337	0,144	0,042

Laut Literatur sollte Terfenadin ein Absorptionsmaximum bei 260 nm besitzen [12, 15]. Wie in Tabelle 7 dargestellt zeigte das Spektrometer in diesem Bereich allerdings große Schwankungen, welche später in den Bildern der nächsten Messungen noch deutlich werden. Auch Quinidin zeigte in diesem Bereich undeutliche Signale. Quinidin sollte laut Literatur Absorptionsmaxima im Bereich von 230 nm, 280 nm und 336 nm besitzen [12, 14]. Im Bereich unter 300 nm waren keine deutlichen Maxima erkennbar, es traten die gleichen undeutlichen Signale wie bei Terfenadin auf (zur Verdeutlichung siehe Abbildung 23). Lediglich das bei 331 nm gefundene Maximum stimmt mit der Literatur überein. Da die Messungen, insbesondere von Terfenadin, jedoch nicht eindeutig waren wurden die Messungen mit neu hergestellten Lösungen wiederholt.

Im zweiten Durchlauf wurden Terfenadin- und Quinidin-Testlösungen mit Konzentrationen von $50\ \mu\text{M}$ und $100\ \mu\text{M}$ gemessen.

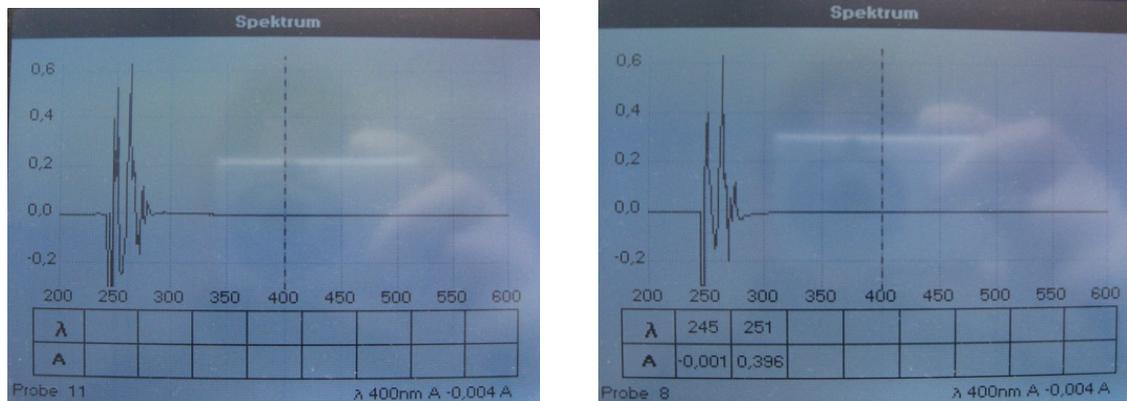
(a) $50\ \mu\text{M}$ -Lösung(b) $100\ \mu\text{M}$ -Lösung

Abbildung 22: UV-vis-Spektrum von Terfenadin

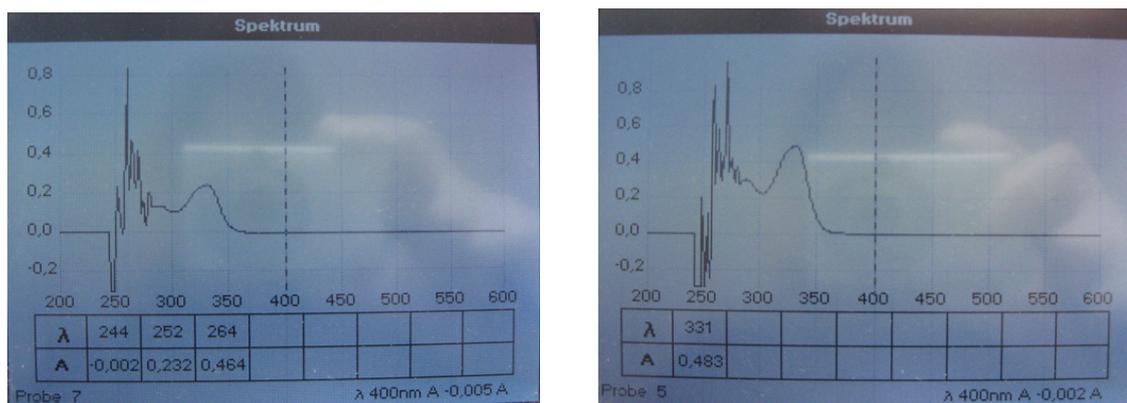
(a) $50\ \mu\text{M}$ -Lösung(b) $100\ \mu\text{M}$ -Lösung

Abbildung 23: UV-vis-Spektrum von Quinidin

Sowohl in Abbildung 22 als auch in Abbildung 23 ist eine verrauschte Absorption im Bereich von etwa $240\ \text{nm}$ bis $280\ \text{nm}$ zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass in diesem Bereich eventuell Bestandteile des extrazellulären Puffer die Messungen stören und somit keine eindeutige Ermittlung eines Absorptionsmaximum möglich ist. Da Terfenadin allerdings nur in diesem Bereich absorbiert wurde diese Substanz für weitere Messungen ausgeschlossen. Das Absorptionsmaximum von Quinidin bei $331\ \text{nm}$ konnte hingegen bestätigt werden. Sowohl die $50\ \mu\text{M}$ Lösung als auch die $100\ \mu\text{M}$ zeigten deutliche Absorptionsmaxima bei $331\ \text{nm}$.

Im dritten Durchlauf wurden Testlösungen von Nifedipin und Quinidin mit den Konzentrationen $1\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$ und $100\ \mu\text{M}$ gemessen. Außerdem wurden Spektren vom Blank (extrazellulärer

Puffer mit 0,1% Dimethylsulfoxid) aufgenommen, die in Abbildung 24 dargestellt sind.

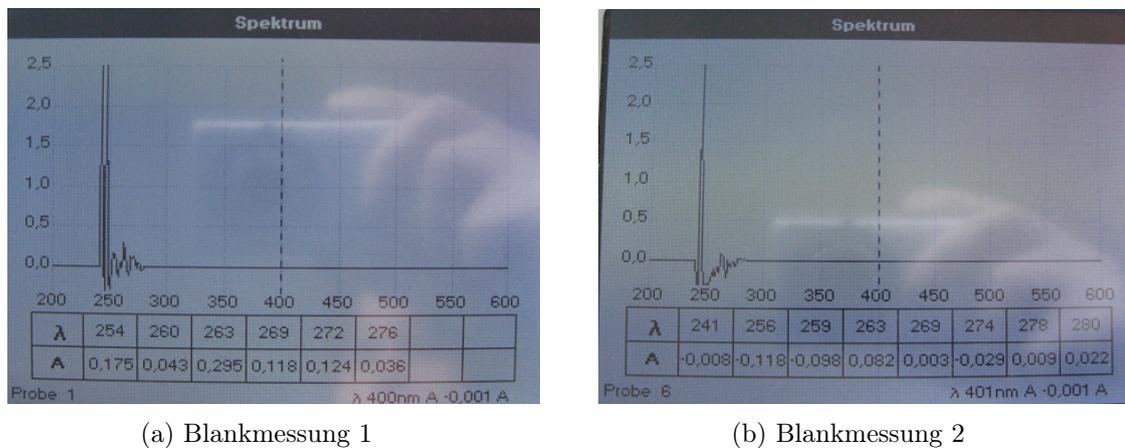


Abbildung 24: UV-vis-Spektrum vom Blank

Die Spektren bestätigen die Annahme, dass die Absorption im Wellenbereich von 240 nm bis 280 nm vom extrazellulären Puffer stammen und die Ermittlung eines Absorptionsmaximums nicht möglich ist. Die aufgenommenen Spektren von Quinidin entsprechen den Ergebnissen von Abbildung 23 und werden daher nicht nochmal graphisch aufgeführt.

Als dritte Substanz wurde Nifedipin wegen seiner gelben Farbe untersucht. Nifedipin sollte Absorptionsmaxima im Bereich von 240 nm und 335 nm besitzen [12, 13]. Wie in Abbildung 25 dargestellt, konnte auch hier das Spektrum im vorderen Bereich nicht ermittelt werden.

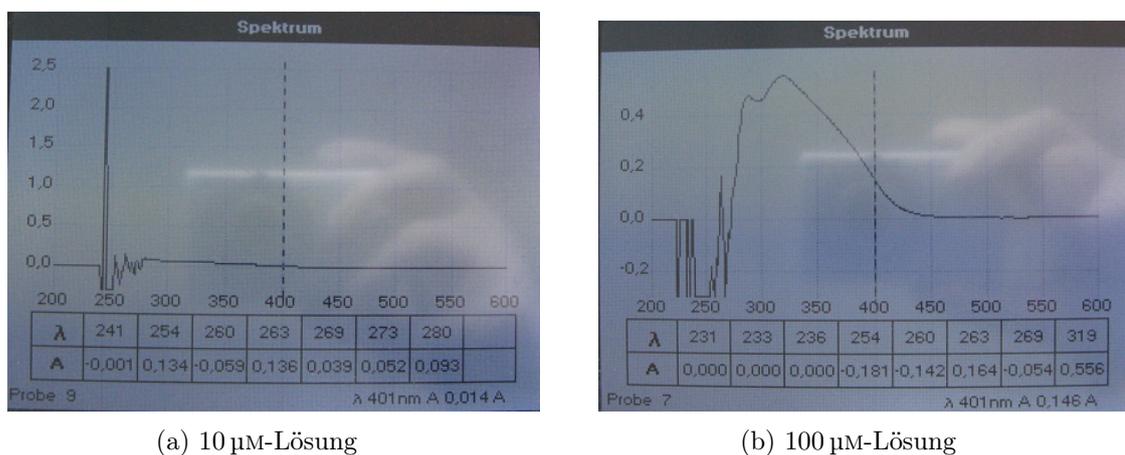


Abbildung 25: UV-vis-Spektrum von Nifedipin

Das Maximum bei 335 nm konnte für die 100 μ M Lösung bestätigt werden. Bei 10 μ M ist eine leichte Absorption erkennbar, diese ist jedoch nicht eindeutig zuordenbar. Bei der 1 μ M Lösung war keine Absorption erkennbar, weshalb hier auf eine Abbildung verzichtet wurde.

5.1.2 Inbetriebnahme des UV-Vis-Spektrometers

Für erste Tests mit dem Spektrometer wurden die gleichen Testlösungen verwendet, die auch für die Ermittlung der Absorptionsmaxima benutzt wurden. Erste Messversuche bei einer Wellenlänge von 260 nm zeigten überhaupt keine Signalveränderungen. Ein möglicher Defekt bei den Lichtwellenleitern konnte ausgeschlossen werden. Anschließend wurde vermutet, dass die Durchflusszelle auf Änderung der Lichtverhältnisse reagiert. Eine sorgfältige Umwicklung der Durchflusszelle mit Alufolie zeigte eine deutliche Verbesserung. Beim Ausgangs-Signal am Detektor traten wesentlich weniger Schwankungen auf als zuvor. Allerdings war auffällig, dass sich das Signal bei Änderungen der Druckverhältnisse (z.B. beim Ein- und Ausschalten der Pumpe) stark veränderte. Um für einen gleichmäßigeren Fluss zu sorgen wurde die Spritze zum Durchziehen der Flüssigkeiten durch eine Peristaltikpumpe ersetzt. Der Detektor reagierte weiterhin immer noch auf das Ein- bzw. Ausschalten der Pumpe, das Ausgangssignal war jedoch bei gleichmäßigerem Fluss merklich ruhiger.

Ein Test mit Nifedipinlösungen (10 μM und 100 μM , $\lambda = 319 \text{ nm}$) zeigte, dass der Detektor sinnvolle Messsignale liefern konnte. Auch Messungen mit Quinidin (1 μM , 10 μM und 100 μM) waren erfolgreich und zeigten deutliche den Konzentrationen zuordenbare Signale. Die 100 μM Lösung ging dabei über das mögliche Maximum hinaus, sodass das Ausgabesignal noch angepasst werden musste. Da die sicherheitspharmakologischen Messungen jedoch bei niedrigeren Konzentrationen durchgeführt werden sollten, stellte dies kein Problem dar. Außerdem fiel bei den Testmessungen auf, dass ein in seiner Stärke variierender Drift, d.h. ein ständiger Anstieg bzw. ständiges Absinken der Basislinie des Detektors vorhanden war, der auch durch Spülvorgänge mit Wasser oder Natronlauge weiterhin auftrat.

5.1.3 Integration der Durchflusszelle in den Patch Clamp Aufbau

Um die Durchflusszelle noch besser vor Lichteinflüssen abzuschirmen und zur besseren Handhabung wurde die Durchflusszelle in eine schwarze Plastikbox eingebaut. Nach Einschalten des Detektors wurde jedoch deutlich, dass die Abschirmung von Licht durch die Kunststoffbox alleine nicht reichte, da wieder starke Schwankungen zu beobachten waren. Die Mitte der Kunststoffbox, an der beide Teile zusammengesteckt wurden, bestand aus dünnerem Plastik als die restliche Hülle. Daher wurden diese Stellen sowie die Ausgänge der Lichtwellenleiter und der Teflonschläuche mit schwarzem Gewebepapier abgeklebt. Dies zeigte zwar eine Verbesserung des Messsignals, reichte allerdings noch nicht aus. Daher wurde die Durchflusszelle in der Box, sowie etwa 15 cm der außerhalb der Box liegenden Schläuche mit Alufolie umwickelt. Diese Variante lieferte das beste Ergebnis bezüglich der Abschirmung.

Ein erneuter Testdurchlauf mit Quinidinlösungen (1 μM und 10 μM) zeigte unterschiedlich hohe, reproduzierbare Signale bei Substanzzugabe. Die Flussgeschwindigkeit der Peristaltikpumpe wurde

auf $-1,50$ rpm festgelegt. Dieser Wert stellte sich als guter Kompromiss heraus, da bei dieser Geschwindigkeit die Lösungen innerhalb der Messzelle weiterhin relativ schnell ausgetauscht wurden, gleichzeitig jedoch nicht mehr so viel Flüssigkeit bei einer Messung verbraucht wurde als zuvor.

Mittlerweile konnten zwar sinnvolle Peaks der Testsubstanzen beobachtet werden, ein Problem stellte jedoch immer noch der Drift der Basislinie dar. Es wurde ein 2,5 h langer Testdurchlauf durchgeführt, in welchem allein die Basislinie mit extrazellulärem Puffer als Fließmittel beobachtet wurde. Am Anfang dieser Messung befand sich vermutlich eine Luftblase im Strahlengang der Durchflusszelle, was sich durch ein extrem hohes Signal von über $2,0$ AU am Detektor bemerkbar machte. Nach 50 min sank das Signal auf etwa $-0,6$ AU ab, nachdem die Luftblase vermutlich weggespült worden war. Nach der gesamten Laufzeit konnte beobachtet werden, dass zwar immer noch ein Drift vorhanden war, dieser sich jedoch nach 95 min deutlich abgeflacht hatte (siehe Abbildung 26).

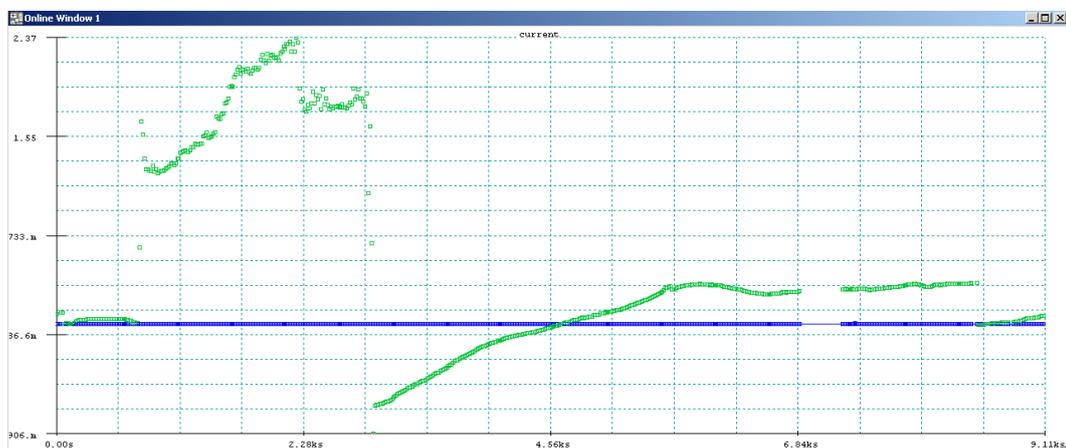


Abbildung 26: Langzeitmessung mittels Blank zur Beobachtung des Drifts in der Basislinie

Dies legt die Vermutung nahe, dass es besser für das System wäre, es kontinuierlich laufen zu lassen und weder Pumpe noch UV-vis-Detektor während den Messungen abzuschalten. Mit dem aktuellen Messaufbau gestaltete sich dies allerdings schwierig, da die Vorratsgefäße im Perfusionssystem relativ geringe Volumina fassten. Der Detektor wurde meistens vor oder während dem Ernten der Zellen angeschaltet und dann bis zum Ende des Versuchstages nicht mehr abgeschaltet.

Bei einer weiteren Messung zur Untersuchung des Driftproblems viel außerdem auf, dass die Basislinie manchmal wellenförmig verlief. Es wurde vermutet, dass der regelmäßige wellenförmige Verlauf durch die Bewegung der Peristaltikpumpe verursacht wurde. Dies würde auch zu der am Anfang festgestellten Druckempfindlichkeit des Systems passen. Es wurde vermutet, dass das System besonders empfindlich auf Druckschwankungen reagiert, wenn Luftblasen im Strahlengang der Durchflusszelle enthalten waren.

Um dieses Problem zu lösen wurde versucht, das System vor Versuchsbeginn mit Detergenzien zu spülen, um die Bildung von Luftblasen im Strahlengang zu verhindern und bestehende Luftblasen zu zerstören. Zunächst wurde 1 M Natronlauge getestet, was keine deutliche Verbesserung des Drifts mit sich brachte. Auch QClean zeigte weder Verbesserung beim Drift, noch bei der wellenförmigen Form der Linie. Auch die erhitzten Lösungen zeigten keine deutlich erkennbare Wirkung. Erst beim Spülen mit 50 %-igem Isopropanol wurde ein Unterschied sichtbar. Vor allem an den Schläuchen rund um die Pumpe, die nicht mit Alufolie umwickelt waren, zeigte sich, dass beim Spülen mit Isopropanol die Luftblasen verschwanden und auch keine neuen gebildet wurden. Sobald man allerdings wieder den extrazellulären Puffer als Fließmittel verwendete, zeichneten sich neue Blasen an den Innenwänden der Schläuche ab. Das Spülen mit Isopropanol verringerte also das Problem mit den Luftblasen nur temporär.

5.2 Patch Clamp Technik

5.2.1 Pharmakologische Messungen mit Online-Expositionskontrolle

Es wurde die konzentrationsabhängige Wirkung von Quinidin auf den hERG-Ionenkanal untersucht. Gleichzeitig wurde die Exposition während der Messung über den UV-vis-Detektor kontrolliert.

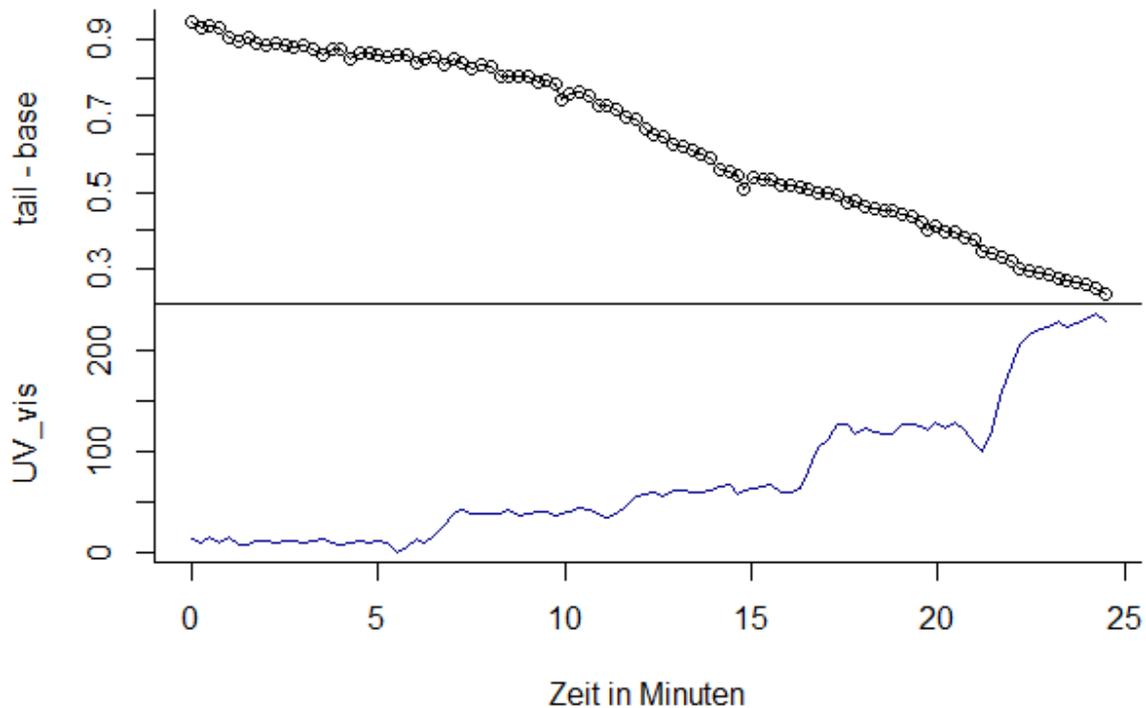


Abbildung 27: 1. Strom-Zeit-Diagramm (oben) kombiniert mit UV-vis-Signal (unten)

Abbildung 27 zeigt Messschema 1, bei dem der Blank und vier Konzentrationen ($0,1\ \mu\text{M}$, $0,3\ \mu\text{M}$, $1\ \mu\text{M}$ und $3\ \mu\text{M}$) an einer Zelle gemessen wurden. Man sieht deutlich, dass der Detektor selbst die niedrigste Konzentration gut erfasst und ein deutliches Signal wiedergab (untere, durchgezogene Kurve). Die Zugabe der nächsthöheren Konzentration ist gut durch ein erhöhtes Signal des UV-vis-Detektors erkennbar. Der Strom der Zelle nahm erst bei Zugabe von der $0,3\ \mu\text{M}$ Lösung deutlicher ab (obere, durch Punkte gezeichnete Kurve).

Bei dem gezeigten Bild handelt es sich um die erste durchgeführte Messung. Die Messdaten des UV-vis-Detektors zeigen ein deutliches, rauscharmes Signal. Dies änderte sich allerdings bereits bei der zweiten Messung.

Wie in Abbildung 28a dargestellt, wurde das Rauschen der Basislinie bei der zweiten Messung bereits stärker.

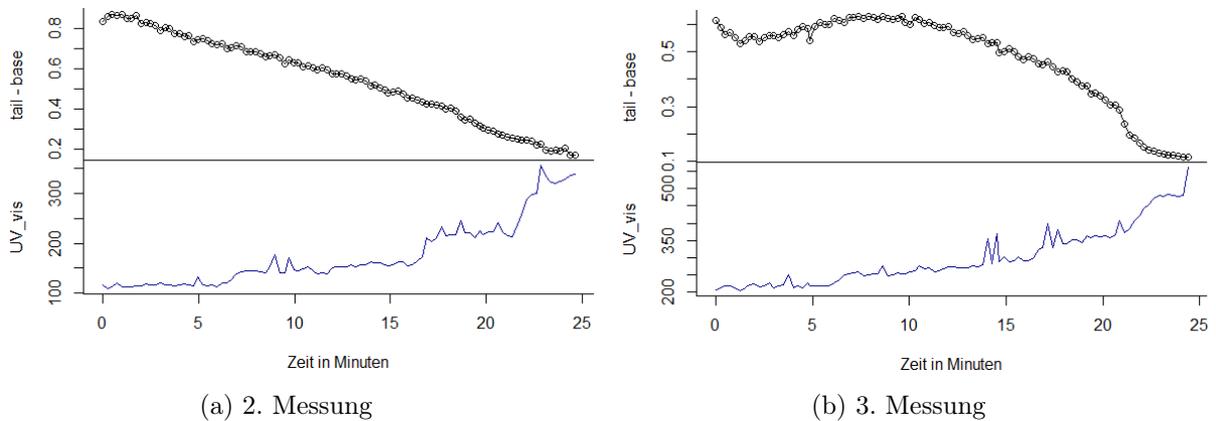


Abbildung 28: Strom-Zeit-Diagramm kombiniert mit UV-vis: Zellen 2 & 3

Bei der dritten Messung (siehe Abbildung 28b) konnte man dann bereits den Übergang der $0,1 \mu\text{M}$ Lösung auf die $0,3 \mu\text{M}$ Lösung nicht mehr erkennen. Es wird vermutet, dass sich während der Messung Luftblasen im Strahlengang der Durchflusszelle gebildet hatten, welche das vermehrte Rauschen verursachten. Dies könnte passieren, wenn die Flüssigkeit aus dem Teflonschlauch in den Strahlengang übergeht. Der Strahlengang hat einen größeren Durchmesser als der Teflonschlauch; die Flüssigkeit erfährt also einen Druckabfall in dem Moment, in dem sie am Strahlengang ankommt. Dadurch können Luftblasen entstehen. Agglomerierte Zellhaufen sowie Staub oder andere Verschmutzungen könnten ebenfalls ein Problem bei Messungen darstellen.

Aus den Messungen wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt, welche in Abbildung 29 dargestellt ist. Bei der Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve wurden Messungen von 5 Zellen zusammengefasst. An jeder Zelle wurde je eine Messung des Blanks und vier Konzentrationen ($0,1 \mu\text{M}$, $0,3 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ und $3 \mu\text{M}$) durchgeführt. Der IC_{50} -Wert beschreibt die Konzentration einer Substanz, bei der 50 % des Stroms der Zelle inhibiert werden. Für Quinidin ergab sich ein IC_{50} -Wert von $0,511 \mu\text{M}$ und ein Hill-Koeffizient von $0,7283$. Für das Signal des UV-vis-Detektors ergaben sich die in Tabelle 9 dargestellten Werte. Der Mittelwerte stellen die Signalhöhe abzüglich der Basislinie dar.

Tabelle 9: Ergebnisse des UV-vis-Detektors (1)

Konzentration	Mittelwert des erhaltenen Signals [mV]
$0,1 \mu\text{M}$	28,37
$0,3 \mu\text{M}$	50,14
$1 \mu\text{M}$	113,26
$3 \mu\text{M}$	215,76

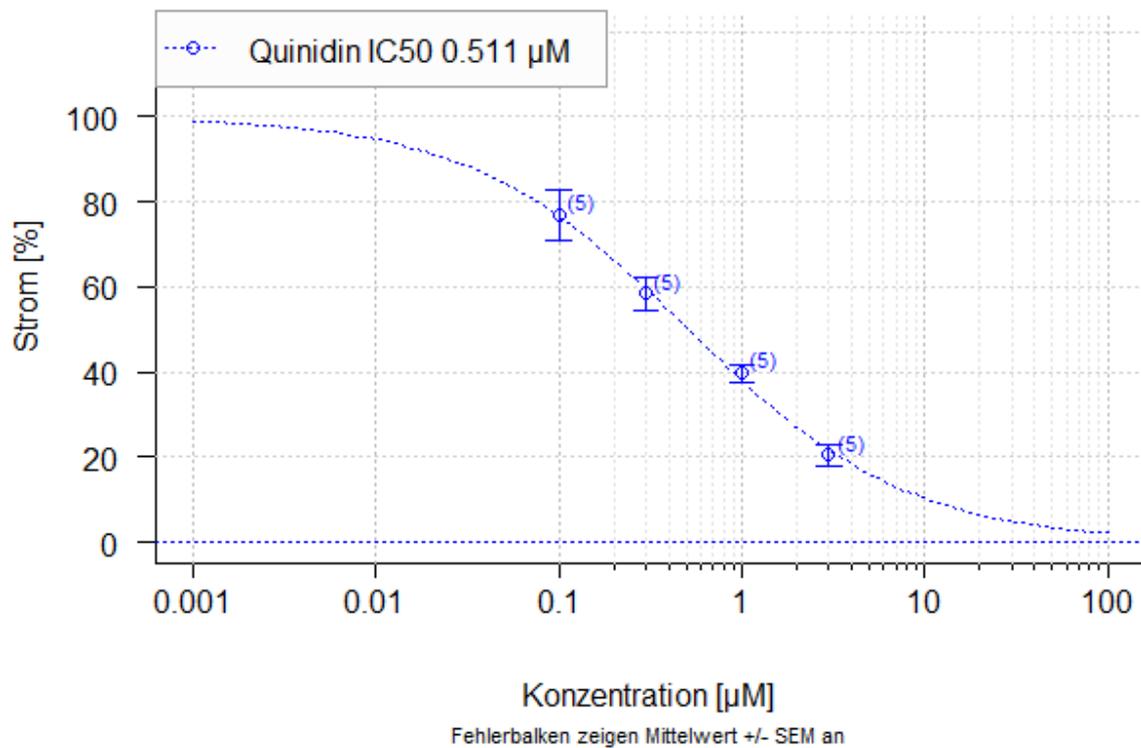


Abbildung 29: Dosis-Wirkungs-Kurve von Messschema 1

Die Messungen mit dem zweiten Messschema (zwei Konzentrationen pro Zelle bei längerer Expositionsdauer, vgl. Kapitel 4.4) haben leider nicht gut funktioniert. Die Zellen ließen sich zwar patchen, der Zellstrom hatte allerdings einen zu starken „run down“ (siehe Abbildung 30a).

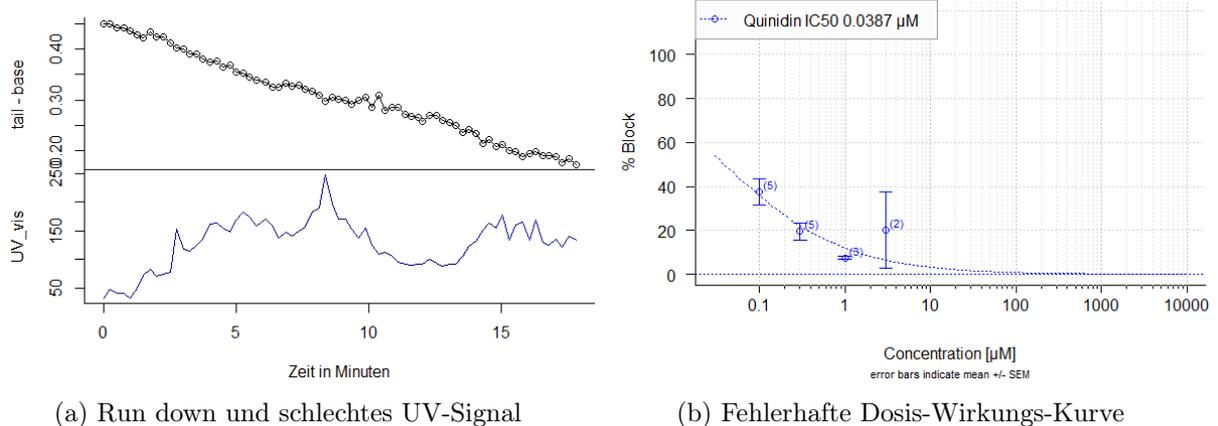


Abbildung 30: Beispiel für eine schlechte Messung

Aus mangelnder Erfahrung wurde erst bei der Auswertung bemerkt, dass der run down Effekt zu stark war um die Daten nutzen zu können. Run down bedeutet, dass der Zellstrom kontinuierlich ohne

Substanzeinwirkung abnimmt und sich kein etwa gleichbleibender Wert für den Strom einstellt. Als Folge dieses Effekts waren die meisten erhaltenen IC_{50} -Werte extrem niedrig (im Bereich von einigen nM, siehe Abbildung 30b). Zudem ging die sigmoide Form der Dosis-Wirkungs-Kurve verloren. Ebenfalls in Abbildung 30a zu erkennen ist das schlechte Signal des UV-vis-Detektors. Manchmal kam es vor, dass das Rauschen und der Drift der Basislinie so groß war, dass es nicht möglich war, die Zeitpunkte der Substanz-Zugaben zu erkennen.

Abbildung 31 zeigt Messungen an zwei Zellen, an denen jeweils der Blank, eine $1\ \mu\text{M}$ - und eine $10\ \mu\text{M}$ -Lösung gemessen wurde.

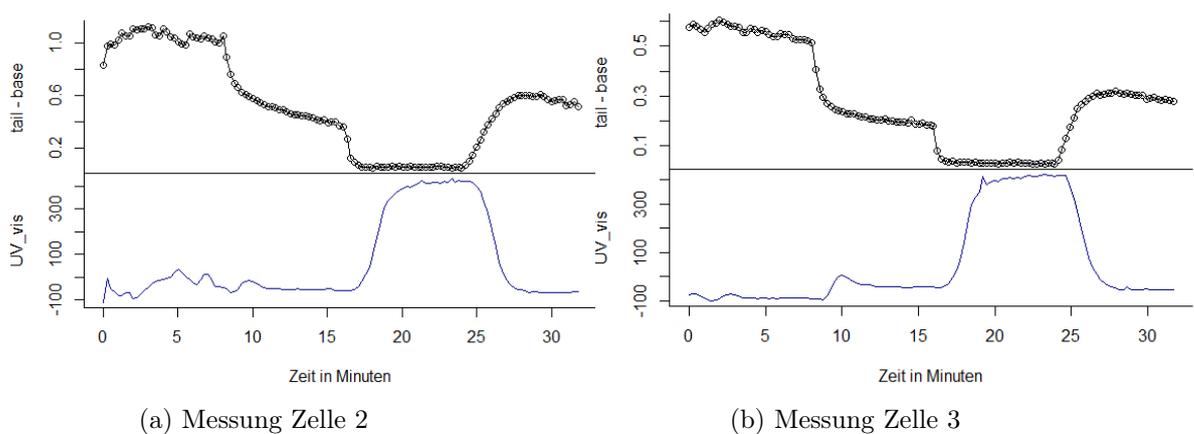


Abbildung 31: Messung Messschema 3 an einer zweiten und dritten Zelle

Auch hier war der Zusammenhang zwischen Substanzzugabe, Detektor-Signal (untere Kurve) und Verringerung des hERG-Stroms (obere Kurve) gut zu erkennen. In der ersten Messung (Abbildung 31a) war das Messsignal am Anfang etwas unruhig, sodass die Zugabe der $1\ \mu\text{M}$ -Lösungen schwer zu erkennen war. Bei der zweiten Messung (Abbildung 31b) war das Signal deutlicher und man erkannte eindeutig den Wechsel von der Blank-Messung zur Zugabe der $1\ \mu\text{M}$ -Lösung. Aus den beiden Messungen wurde ebenfalls eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt, die in Abbildung 32 abgebildet ist.

Tabelle 10: Ergebnisse des UV-vis-Detektors (2)

Konzentration	Mittelwert des erhaltenen Signals [mV]
$1\ \mu\text{M}$	48,78
$10\ \mu\text{M}$	499,54

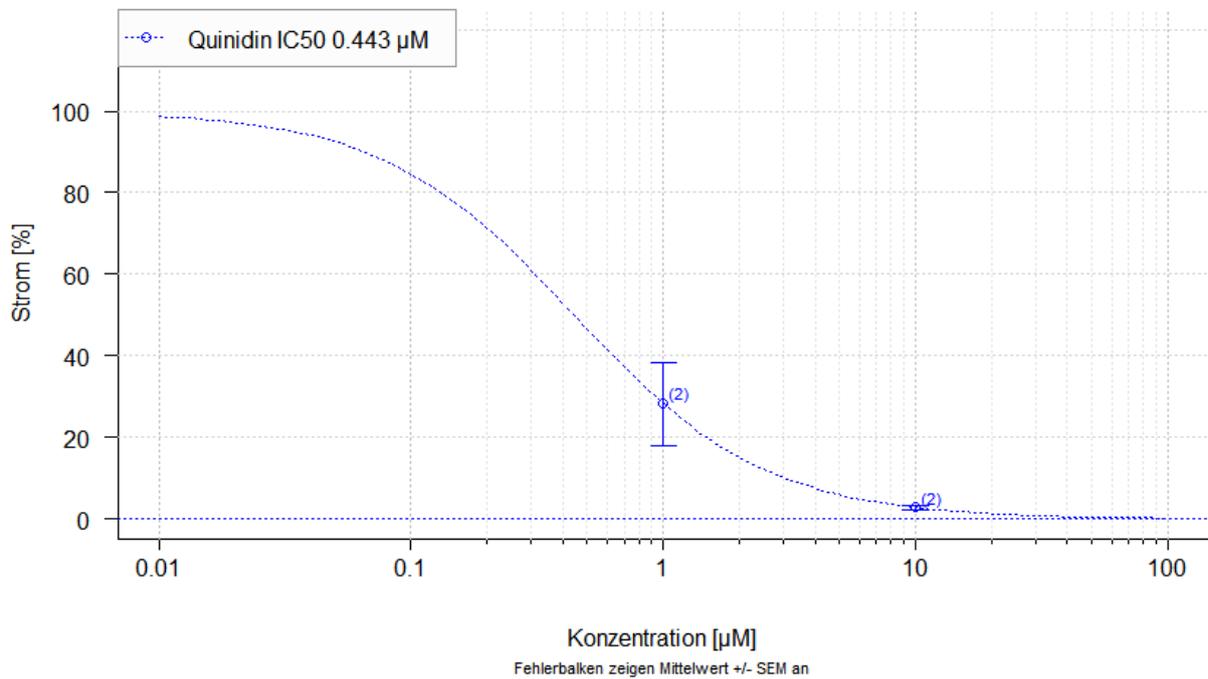


Abbildung 32: Dosis-Wirkungs-Kurve von Messschema 3

Für Quinidin ergab sich ein IC_{50} -Wert von 0,443 μM und ein Hill-Koeffizient von 1,1453. Für das Signal des UV-vis-Detektors ergaben sich die in Tabelle 10 dargestellten Werte. Der Mittelwerte stellen die Signalhöhe abzüglich der Basislinie dar.

5.2.2 Aufnahme der Kalibriergeraden

Um die genauen Konzentrationen denen die Zellen ausgesetzt waren zu bestimmen, wurden Kalibrierungsmessungen unternommen. Hierfür wurden Quinidin-Lösungen mit den Konzentrationen $0,1\ \mu\text{M}$, $0,3\ \mu\text{M}$, $0,5\ \mu\text{M}$, $0,7\ \mu\text{M}$, $1\ \mu\text{M}$ und $10\ \mu\text{M}$ verwendet. Die blauen Punkte in den folgenden Abbildungen zeigen den konstanten Strom der Simulationszelle, der hier keine Bedeutung hat. Die grünen Punkte markieren das UV-vis-Signal.

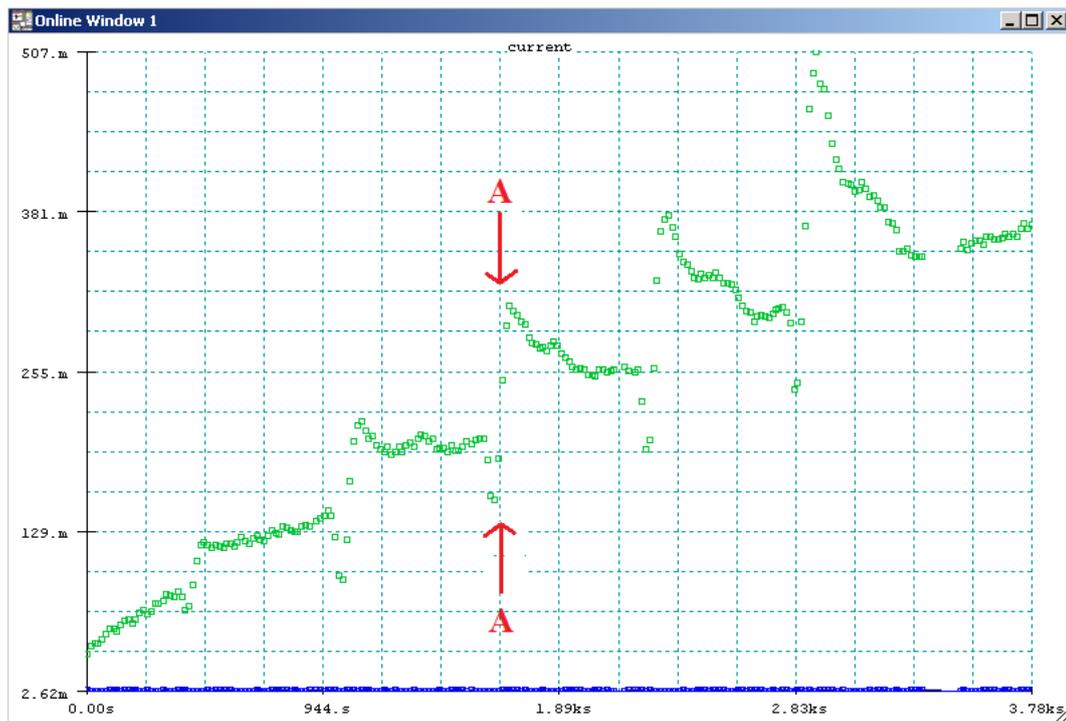


Abbildung 33: Beispiel einer Kalibrierkurve (1). (A) Störsignale

Die Aufnahme war mit einigen nachfolgend beschriebenen Problemen verbunden. Wie in Abbildung 33 zu sehen, ist das eigentliche Messsignal bei der gewählten Messzeit kaum auszumachen, da bei diesen Messungen Schwankungen beim Messsignal auftraten (rote Pfeile (A)). Diese Schwankungen entstanden vermutlich beim Wechsel der Lösungen, z.B. durch unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten beim Perfusionssystem. Die Vermutung liegt Nahe, dass sich bei dieser Messung erneut eine Luftblase im Strahlengang der Messzelle befand, welche die Störungen verursachte.

Wie in Abbildung 34 eingezeichnet, sind die eigentlichen Messsignale der applizierten Konzentration (C) und des Blanks (B) wegen den Störsignalen und des Drifts schlecht zu erkennen. Bei den Quinidin-Lösungen ist auch teilweise schwer erkennbar, ob sich bereits ein Gleichgewicht bei den Lösungen eingestellt hat oder ob die Störsignale die Messung komplett verfälscht hatte.

Es gab aber auch Messungen, bei denen keine Luftblasen (oder zumindest weniger störende) und ein geringerer Drift vorhanden waren. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 35 dargestellt.

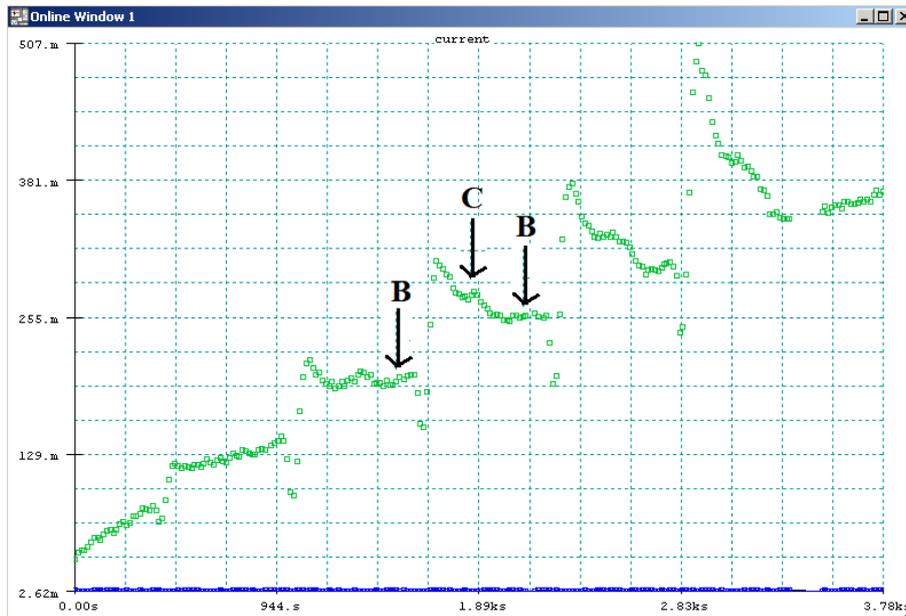


Abbildung 34: Beispiel einer Kalibrierkurve (2). (B) Messsignal des Blanks, (C) Eigenliches Messsignal der Konzentration

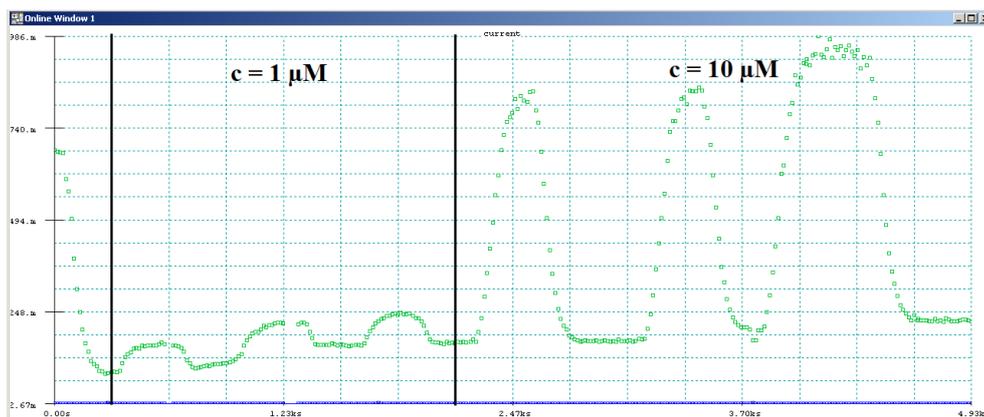


Abbildung 35: Aufnahme Kalibrierkurve (1)

Bei der Messung aus Abbildung 35 wurden die Konzentrationen $1\ \mu\text{M}$ und $10\ \mu\text{M}$ aufgenommen. Für die $10\ \mu\text{M}$ -Lösung reichte die Messzeit nicht aus, um das Maximum zu erreichen. Dies wurde mit der letzten Messung deutlich, bei der die Messzeit verdoppelt wurde.

Für die dritte Kalibriermessung, die in Abbildung 36 dargestellt ist, wurden Quinidin-Lösungen mit den Konzentrationen $0,1\ \mu\text{M}$, $0,3\ \mu\text{M}$, $0,5\ \mu\text{M}$ und $0,7\ \mu\text{M}$ verwendet. Jede Konzentration wurde drei Mal hintereinander aufgenommen. Zwischen jeder Quinidin-Messung wurde der Drift über eine Messung des Blanks kontrolliert. Die Messung besitzt im Vergleich zu Abbildung 35 einen etwa $60\ \text{mV}$ steileren Drift.

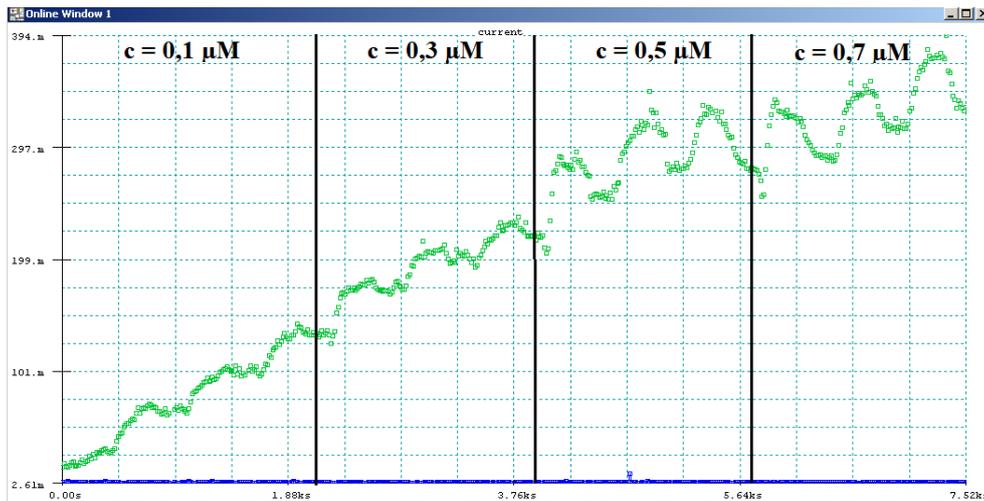


Abbildung 36: Aufnahme Kalibrierkurve (2)

Auffällig bei dieser Kurve war, dass der Drift bei $c = 0,5 \mu\text{M}$ dem Anschein nach steiler war als bei der restlichen Messung, oder die Zeit zum Auswaschen der Substanz für die Messung des Blanks nicht mehr ausreichte. Auch sind immer wieder Ausreißer zu erkennen, was dafür spricht, dass die Aufnahme keine optimalen Bedingungen besaß.

5.2.3 Auswertung der Daten der Kalibriermessungen

Die Daten wurden mit Python in Jupyter Notebook ausgewertet. Die Messdaten wurden interpoliert und gefiltert. Um das eigentliche Signal der gemessenen Konzentrationen zu erhalten, wurde der Drift der Basislinie ermittelt und die abgedriftete Basislinie von den Signalen der Konzentrationen abgezogen (Abbildung 37). Um den Drift der Basislinie von den Messsignalen abzuziehen, wurde die Datenpunkte der gemessenen Blank-Werte ermittelt und mit einem quadratischen Modell gefittet. Dadurch konnte die zeitliche Entwicklung der Basislinie (= Drift) ermittelt werden. Für den Drift wurde ein quadratisches Modell der Form $t[s] = (-b) \cdot (x - a)^2 + c$ erstellt (Drift in mV). Für die beiden Kalibriermessungen (siehe Abbildung 35 und Abbildung 36) ergaben sich folgende Parameter:

Tabelle 11: Ergebnisse der Kalibrierung (1).

Kalibriermessung	Parameter a [s]	Parameter b [mV/s]	Parameter c [mV]
1	$1,08 \cdot 10^4$	$1,66 \cdot 10^{-6}$	$2,80 \cdot 10^2$
2	$9,92 \cdot 10^3$	$3,380 \cdot 10^{-6}$	$3,43 \cdot 10^2$

Nach dem Modell für den Drift der Basislinie wäre nach etwa 3 h eine relativ flache Basislinie zu erwarten. Dies deckte sich auch in etwa mit den Daten, die bei der Testung des Geräts mit reinem Blank erhalten wurden (siehe Kapitel 5.1.3).

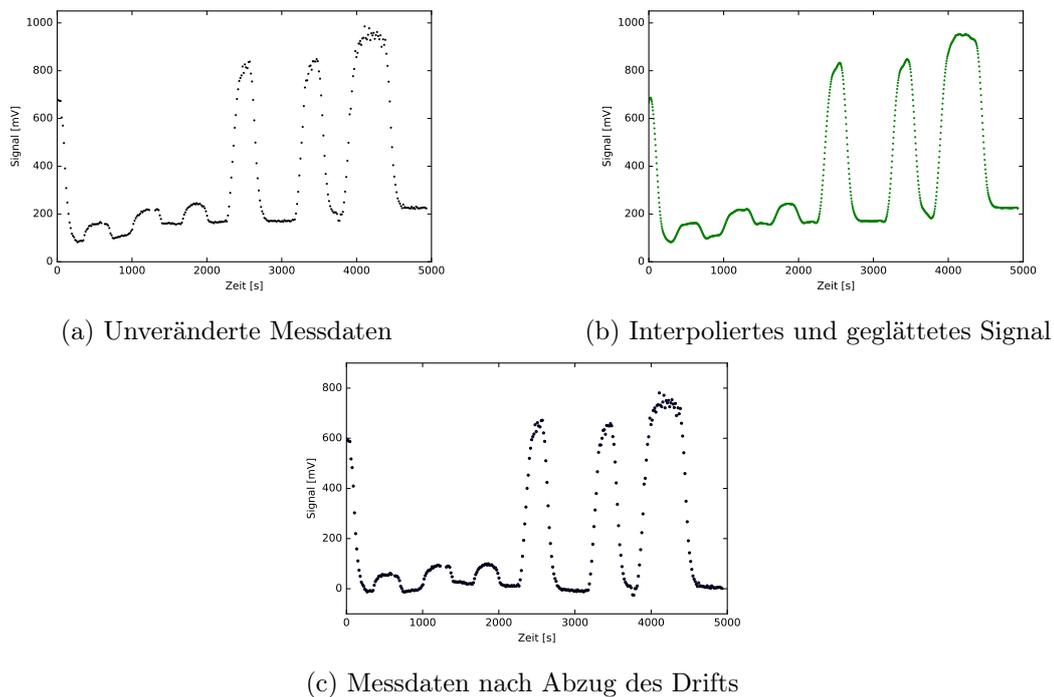


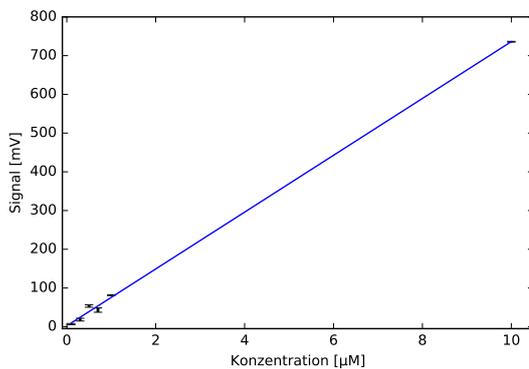
Abbildung 37: Nachbearbeitung des Signals schematisch dargestellt für Kalibriermessung (1)

Die Messsignale der gemessenen Konzentrationen wurden anschließend mit dem eben beschriebenen Modell des Drifts der Basislinie korrigiert.

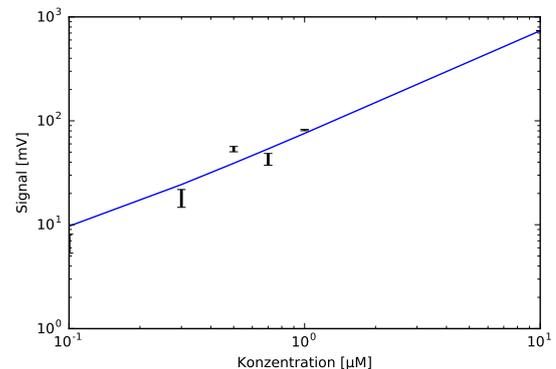
Tabelle 12: Ergebnisse der Kalibrierung (2). Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen, die Mittelwerte der erhaltenen Signale (nach abgezogener Basislinie) und die Fehler.

Konzentration [μM]	Mittelwert [mV]	Standardabweichung [mV]	SEM [mV]
0,1	6,72	2,40	1,39
0,3	18,26	6,16	3,56
0,5	53,49	5,46	3,15
0,7	42,91	9,69	5,59
1	81,47	17,51	1,17
10	735,86	20,10	1,00

Aus dem Mittelwerten der Messsignale aus der ersten und zweiten Aufnahme der Kalibriermessungen, die in Tabelle 12 dargestellt sind, wurde eine Kalibriergerade erstellt. Es wurde das Messsignal gegen die Konzentration aufgetragen (siehe Abbildung 38).



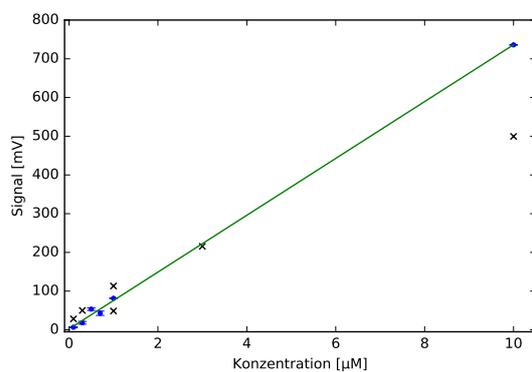
(a) Doppelt lineare Auftragung



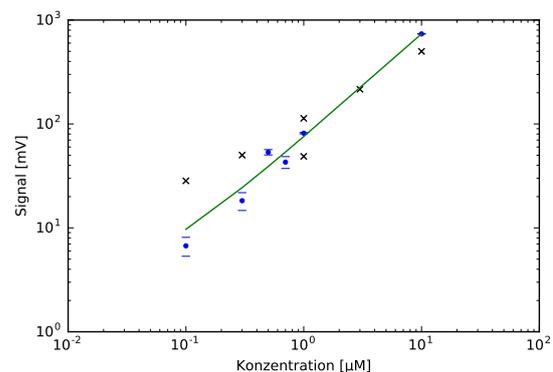
(b) Doppelt logarithmische Auftragung

Abbildung 38: Datenpunkte der Kalibrierungsmessungen 1 und 2 und daraus berechnete Kalibrierkurve

Für die lineare Regression der Kalibrierkurve ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $R = 0,99943$. Zusätzlich wurden die aus den hERG-Messungen erhaltenen Spektrometerdaten zur Veranschaulichung in die Kalibriergerade eingefügt (siehe Abbildung 39).



(a) Doppelt Lineare Auftragung mit Messpunkten



(b) Doppel-log. Auftragung mit Messpunkten

Abbildung 39: Kalibriergeraden

Die blauen Punkte stellen die Datenpunkte der Kalibrierungsmessungen dar, die x-förmigen Punkte die Datenpunkte aus den hERG-Messungen. Besonders in Abbildung 39b sieht man sehr gut, dass die Signale der Messungen von der Kalibrierkurve abweichen und auch die Kalibrierkurve selbst nicht ausreichend zufriedenstellend mit den Datenpunkten der Kalibrierung übereinstimmen.

6 Diskussion

6.1 UV-vis-Detektor

6.1.1 Inbetriebnahme

Bei der Inbetriebnahme des UV-vis-Detektors zeigte der Detektor extrem starke Schwankungen durch Lichteinfall, welche das Messsignal bis zu Unkenntlichkeit überlagerten. Dieses Problem wurde gelöst, indem die Durchflusszelle und deren Ein- bzw. Ausgänge mit Hilfe von Alufolie und einer schwarzen Kunststoffbox von äußeren Lichteinflüssen abgeschirmt wurden. Dies verbesserte das Signal deutlich und ermöglichte erste Messungen. Die Testversuche mit Nifedipin- und Quinidinlösungen zeigten nun deutlich sichtbare Signale. Das Rauschsignal entsprach nach den Maßnahmen noch nicht den Angaben des Herstellers, sodass an dieser Stelle eine noch bessere Abschirmung der Durchflusszelle möglich wäre. Eventuell liegen auch noch weitere Störquellen vor.

Des Weiteren wurde vermutet, dass das teilweise starke Rauschen, der teils sehr starke Drift und Störungen im Messsignal auf Luftblasen im Strahlengang der Durchflusszelle zurückzuführen waren. Dies würde auch den teilweise wellenförmigen Verlauf der Basislinie erklären, der vermutlich von den pulsartigen Pumpbewegungen der Peristaltikpumpe verursacht wurden, wenn sich eine Luftblase im Strahlengang befand. Entweder hingen diese von Anfang an im Strahlengang fest, oder sie entstanden möglicherweise beim Übergang der Flüssigkeit in den vom Durchmesser aus gesehenen größeren Strahlengang. Spülvorgänge mit Isopropanol zeigten nur eine temporäre Verbesserung des Problems. Beim Spülen mit Isopropanol verschwanden zwar alle sichtbaren Luftblasen, diese tauchten allerdings bei der Verwendung von extrazellulärem Puffer teilweise wieder auf. Durch das Spülen konnte manchmal ein ausreichend ruhiges Signal erhalten werden, um Messungen durchzuführen. Eine langfristige Lösung stellen die Spülvorgänge allerdings nicht dar, da vor jeder Messung das Isopropanol auch wieder sorgfältig herausgespült werden musste. Detergenzien könnten bei Kontakt die Zellen schädigen.

Ein weiterer schwieriger Punkt stellte der starke Drift der Basislinie dar. Bei einer reinen Messung des extrazellulären Puffers zeigte sich, dass sich nach einiger Zeit der Drift der Basislinie deutlich verringerte. Es wurde vermutet, dass die Lampe am UV-vis-Detektor eine gewisse Zeit (ca. 1 h bis 2 h) benötigt, um sich vorzuheizen. Erst dann ist die Emission stabil genug, um genaue Messungen zu ermöglichen. Auch hier störten Luftblasen die Messung, sodass eine genaue Bestimmung der „Vorheizzeit“ der Lampe bzw. des Zeitpunkts, an dem sich die Basislinie weit genug abflacht hatte, nicht endgültig möglich war. Da der UV-vis-Detektor jedoch meist etwa mindestens 1 h vor Beginn der Messungen eingeschaltet wurde, wird vermutet, dass die Luftblasen die Hauptverantwortlichen für die Störungen der Messsignale und das teils starke Rauschen darstellten.

Bei den sicherheitspharmakologischen Messungen am hERG-Ionenkanal konnte parallel zur Aufnahme des Stromes auch ein Signal am Detektor gemessen werden. Es gelangen teilweise gute Aufnahmen, und der Zusammenhang zwischen Exposition der Zelle mit einer den hERG-Strom messenden Substanz und der Verringerung des Stroms wurde deutlich. Die Kopplung der Messungen war demnach zwar gut gelungen, für eine Quantifizierung von Quinidin waren die Messsignale des Detektors allerdings noch nicht ausreichend gut, was in Kapitel 6.1.2 näher diskutiert wird.

6.1.2 Kalibrierung

Um die genaue Konzentration bei den sicherheitspharmakologischen hERG-Strom-Messungen bestimmen zu können, sollte eine Kalibriergerade aufgenommen und mit den Signalen des UV-vis-Detektors während den sicherheitspharmakologischen Messungen verglichen werden. Allerdings konnte keine mit der Qualität von Rast und Guth [22] zu vergleichende Kalibrierung erreicht werden. Eine Quantifizierung von Quinidin war mit dem aktuellen Setup daher nicht möglich.

Bereits die Aufnahme der Datenpunkte für die Kalibriergerade gestaltete sich als äußerst schwierig. Wie bereits beschrieben, entstanden durch Luftblasen Störungen bei den Messsignalen, sodass diese nur schwer gedeutet werden konnten, oder das Rauschen war allgemein so stark, dass selbst Signale höherer Konzentrationen ($>1 \mu\text{M}$) nicht erkennbar waren. Es brauchte daher einige Versuche, bis eine relativ ruhige Basislinie erhalten wurde. Der vorhandene je nach Messung unterschiedlich starke Drift wurde bei den Messungen in Kauf genommen, da er später aus den eigentlichen Messsignalen herausgerechnet werden sollte.

In Tabelle 13 sind die Mittelwerte der Signale der Kalibriermessungen sowie die erhaltenen Spektrometer-Signale aus den sicherheitspharmakologischen Messungen am hERG-Ionenkanal dargestellt. Bei allen Signalen wurde die Basislinie herausgerechnet, um sie einigermaßen vergleichbar zu machen, da die Basislinie bei jeder Messung unterschiedlich starke Signale und Drifts besaß.

Tabelle 13: Vergleich der Spektrometer-Daten. Dargestellt sind die Mittelwerte der Signale aus den Kalibriermessungen sowie die Signale der sicherheitspharmakologischen Messungen von Schema 1 und 3

Konzentration [μM]	Kalibrierungsdaten (Mittelwert) [mV]	Messung Schema 1 (Mittelwert) [mV]	Messung Schema 3 [mV]
0,1	6,72	28,37	
0,3	18,26	50,14	
0,5	53,49		
0,7	42,91		
1	81,47	113,26	48,78
3		215,76	
10	735,86		499,54

Die Daten der Kalibrierung zeigen für die Konzentrationen $0,1\ \mu\text{M}$, $0,3\ \mu\text{M}$, $1\ \mu\text{M}$ und $10\ \mu\text{M}$ ein Schema. Für diese Werte kann gesagt werden, dass entsprechend Lambert-Beerschem-Gesetz das Vielfache einer Konzentration auch das Vielfache des Messsignals entspricht (z.B. ist das Signal der $0,3\ \mu\text{M}$ -Lösung etwa das 3-fache der $0,1\ \mu\text{M}$ -Lösung). Für die Signale der $0,5\ \mu\text{M}$ und $0,7\ \mu\text{M}$ -Lösungen trifft das nicht zu, was allerdings zu erwarten war, da die Basislinie an dieser Stelle eine Art „Knick“ zu machen schien (siehe Kapitel 5.2.2, Abbildung 36). Das deutet entweder auf eine Störung hin, oder die Zeit der Messungen der Konzentrationen und des Blanks wurden an dieser Stelle zu kurz, sodass die Signale verfälscht wurden. Auch bei Messschema 3 (Tabelle 13) ist zu sehen, dass der Detektor prinzipiell funktioniert. Das UV-vis-Detektor Signal der $10\ \mu\text{M}$ -Lösung ist etwa 10 mal so hoch wie das der $1\ \mu\text{M}$ -Lösung. Die Signale des UV-vis-Detektors aus Messschema 1 (Tabelle 13) zeigen jedoch keinen dem Lambert-Beerschen-Gesetz entsprechenden linearen Zusammenhang. Zudem weichen alle in Tabelle 13 gezeigten Signale des UV-vis-Detektors einer Konzentration stark voneinander ab. Dies zeigt, dass die Messungen mit dem UV-vis-Detektor noch nicht zuverlässig funktionieren. Es muss daher auch davon ausgegangen werden, dass die UV-vis-Signale der Kalibrierung möglicherweise unzuverlässig sind und durch Störungen verfälscht wurden.

Des Weiteren muss darauf geachtet werden, dass die Basislinie nicht zwangsweise bei $0\ \text{mV}$ beginnt, wenn man das Signal einer Konzentration abliest. Dies hängt davon ab, ob und wie oft man einen Nullpunktgleich durchführt, und ob man ihn nach jeder Messung anwendet. Auch der Drift der Basislinie muss beachtet und später bei der Auswertung der Messsignale miteinbezogen werden. Die Basislinie wurde hier bereits aus den Messsignalen herausgerechnet, sodass diese an dieser Stelle keinen Einfluss mehr auf die Signale haben sollte. Die bestehende, starke Variation der Signale ist im Einklang mit der Vermutung, dass Störfaktoren die Messung beeinflussten. Wie sehr sich die Messdaten von der Kalibrierkurve unterscheiden ist auch gut in Abbildung 39 erkennbar. Ein Fehler beim Herstellen der verschiedenen Lösungen wäre möglich; hiervon wird allerdings nicht ausgegangen. Es könnte sich etwas von der gelösten Substanz an Glas- oder Kunststoffwände der Gefäße abgesetzt haben, da die Flüssigkeiten nicht fortlaufend gerührt wurden. Insgesamt wird jedoch von einer durch Störungen verursachten Messungenauigkeit am Detektor ausgegangen, die für die ungleichen Messergebnisse Verantwortlich ist.

Dieser direkte Vergleich der Spektrometer-Daten zeigt, dass trotz des Abzugs des Drifts der Basislinie der Messfehler zu groß ist, um eine zuverlässige Kalibrierung und eine Quantifizierung der Substanz durchzuführen, geschweige denn Korrekturberechnungen bzgl. der online-Exposition bei der sicherheitspharmakologischen Messungen. Es wird eine Reihe weiterer Messungen nötig sein, um die korrekten Signalhöhen der Konzentrationen zu ermitteln. Zunächst müssen allerdings alle Störungen am UV-vis-Detektor eliminiert werden, bevor die Aufnahme einer reproduzierbaren Kalibrierung möglich wird.

6.1.3 Verbesserungsmöglichkeiten

Als Hauptproblem für die Störungen am UV-vis-Detektor werden Luftblasen vermutet, die sich im Strahlengang bilden oder festsetzen und somit die Messsignale verfälschen. Eine Lösung für dieses Problem wäre vermutlich eine „back pressure coil“. Ein back pressure coil kann aus ca. 3 m Teflonschlauch erhalten werden, indem man den Schlauch eng zu einer Art Spule zusammenwickelt. Die back pressure coil wird am Ausgang der Durchflusszelle anstelle des normalen Schlauchs angebracht. Durch die Länge des aufgewickelten Schlauches entsteht ein hoher Druck, der die Bildung der Luftblasen im Strahlengang verhindert. Dadurch wird der Druck im gesamten System erhöht und die Pumprate müsste entsprechend angepasst werden, um die gleiche Flussgeschwindigkeit zu erhalten.

Manchmal wurden gute Ergebnisse erzielt, obwohl die Peristaltikpumpe des UV-vis-Detektors zwischen den Messungen abgeschaltet wurde. Es würde sich dennoch empfehlen, zwischen der Messkammer und einem Vorratsgefäß eine Schaltvorrichtung einzurichten, damit die Pumpe durchgängig laufen gelassen werden kann, gleichzeitig die Messkammer aber nicht durchgängig mit Lösungsmittel versorgt werden muss. Wegen der relativ kleinen Gefäße am Perfusionssystem mussten die verwendeten Lösungen gut beobachtet und relativ oft nachgefüllt werden, was die Messung insgesamt schwieriger gestaltete. Eine Verbesserung hierzu wäre das Perfusionssystem anzupassen und größere Gefäße als Vorratsbehälter zu verwenden. Hierbei würde es sich empfehlen, rührbare Gefäße zu nutzen, um eine inhomogene Verteilung der gelösten Substanzen oder ein Absetzen dieser zu vermeiden.

Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit stellt die Anbringung einer hauchdünnen Kapillare am Schlaucheingang der Durchflusszelle dar. Die dünne Kapillare ermöglicht eine Justierung des Schlauches neben der zu messenden Zelle, sodass direkt die Konzentration an der gepatchten Zelle gemessen wird. Der aktuell verwendete Teflonschlauch hatte bereits einen zu großen Durchmesser, um im Mikroskop gut beobachtet werden zu können. Allerdings müsste man bei dieser Modifikation darauf achten, ob hierbei nicht das gleiche Phänomen auftritt wie beim Übergang des Teflonschlauchs in den Strahlengang - und zwar dass sich in der Flüssigkeit beim Übergang von der Kapillare in den Teflonschlauch keine Luftblasen bilden. Gleichzeitig könnte man den Teflonschlauch, der von der Messkammer zur Durchflusszelle führt, verkürzen. Dadurch würde man auch die Verzögerung des Messsignals des UV-vis-Detektors bei Konzentrationsänderungen verringern.

Zudem sollte ein Schmutzpartikelfilter vor den Eingang der Durchflusszelle angebracht werden. Es wurde zwar nach einer von Rast und Guth [22] empfohlenen Filterfritte aus Titan gesucht, über die Online-Recherche konnte allerdings kein auf einer Titan-Fritte-basierender Filter gefunden werden, da diese anscheinend nicht mehr hergestellt werden. Ein Filter würde das Einziehen von Staub- oder Schmutzpartikeln und insbesondere von agglomerierten Zellen, welche die Messung ebenfalls stören könnten, verhindern.

6.2 Sicherheitspharmakologische Messungen am hERG-Ionenkanal

Um die konzentrationsabhängige Wirkung von Quinidin auf den hERG-Ionenkanal zu untersuchen, wurden sicherheitspharmakologische Messungen mit Hilfe der Patch Clamp Technik durchgeführt. Aus den erhaltenen Daten wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und daraus die IC_{50} -Werte und die Hill-Koeffizienten abgeleitet. Die erhaltenen Werte sind in im Vergleich zu Werten aus der Literatur in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Vergleich der Ergebnisse aus den sicherheitspharmakologischen Messungen mit Quinidin mit Ergebnissen aus der Literatur

Messung	IC_{50} -Werte	Hill-Koeffizienten	Quelle
Schema 1	0,511 μ M	0,728 3	eigenes Ergebnis
Schema 3	0,443 μ M	1,145 3	eigenes Ergebnis
	0,3 μ M		De Bruin u. a. [8]
	0,54 \pm 0,13 μ M	0,71 \pm 0,11	Du u. a. [9]
	0,89 μ M		Kirsch u. a. [11]

Bei den eigenen Messungen wurde einmal ein Hill-Koeffizient mit einem Wert >1 , einmal mit einem Wert <1 erhalten. Der Hill-Koeffizient zeigt an, wie Steil die Kurve in den Dosis-Wirkungs-Kurven verläuft. Der Wert sollte ungefähr bei 1 liegen. Der kleinere Wert könnte den run down Problemen zuzuschreiben sein, die während den Messungen oft auftraten, weicht in diesem Fall aber noch nicht kritisch weit vom Sollwert ab [7]. Die gefundenen IC_{50} -Werte stimmen mit einigen in der Literatur gefundenen Werten überein und können somit, trotz einiger Schwierigkeiten mit dem run down Effekt, als plausibel angesehen werden.

Das Problem mit zu starkem run down Effekt konnte an einer fehlerhaften oder schlechten Zellkultur gelegen haben. Wenn die Zellkultur 80 % Konfluenz übersteigt oder die CO_2 -Konzentration im Brutschrank oft schwankt, könnte das die Zellen negativ beeinflussen oder auch schädigen. Der extrazelluläre und der intrazelluläre Puffer könnten ebenso Mitschuld am run down Effekt getragen haben [7]. Die Osmolarität und der pH-Wert wurden regelmäßig überprüft, sodass der Fehler zumindest darin nicht bei den verwendeten Puffern vermutet werden. Es könnte lediglich bei der Herstellung der Puffer eine falsche Substanz verwendet worden sein, dies würde allerdings nicht erklären, warum manche Messungen besser funktioniert haben als andere, da immer der Puffer der gleichen Charge verwendet wurde. Alternativ könnte der Fehler auch durch die eigene mangelnde Erfahrung in der Patch Clamp Technik aufgetreten sein, da schlechte Whole-cell-Konfigurationen ebenfalls zu einem schlechten Strom führen könnten. Eventuell hätte eine Stabilisierung der Zellen durch Zugabe eines Zusatzstoffes, wie beispielsweise K_2ATP , zur Verringerung des run down Effekts beigetragen.

Ziel der Arbeit war es, eine Online-Expositionsmessung während der sicherheitspharmakologischen Messungen durchzuführen. Die Zugaben der unterschiedlichen Konzentrationen von Quinidin konnten beobachtet werden. Jedoch störten starkes Rauschen und Drift der Basislinie die Messungen. Die Störungen wurden vermutlich durch Luftblasen im Strahlengang der Durchflusszelle verursacht. Es konnte daher keine Kalibriergerade erstellt und somit keine Quantifizierung der Konzentrationen der Lösungen erfolgen. Eine Korrektur der Dosis-Wirkungs-Kurve und den daraus erhaltenen Parametern (IC_{50} -Werte, Hill-Koeffizienten) konnten dadurch ebenfalls nicht durchgeführt werden.

7 Schlussfolgerung

Im Verlauf der Arbeit konnte erfolgreich ein UV-vis Spektrometer in einen manuellen Patch Clamp Stand integriert werden. Das UV-vis-Spektrometer wurde getestet, um zu zeigen, dass es dazu in der Lage war, die relativ niedrigen Konzentrationen, die für sicherheitspharmakologischen Messungen verwendet werden, zu erfassen. Dadurch wurden Grundlagen zur online Messung der Exposition bei sicherheitspharmakologischen Patch Clamp Experimenten geschaffen. Diese erlauben es, das Spektrometer-Signal während der Untersuchung der Ströme von Ionenkanälen zu verfolgen und aufzuzeichnen. Die von Rast und Guth [22] vorgeschlagene Methode und gute Eignung zur Online-Expositionsmessung konnte nachvollzogen werden.

Die Integration in den Patch Clamp Aufbau ist nicht vollständig abgeschlossen. Die Störsignalverursachenden Faktoren wie Luftblasen und der starke, ungleiche Drift der Basislinie gilt es in Zukunft zu bereinigen. Dann sollte die Kalibrierung und die damit verbundene Quantifizierung der Substanzen bei den sicherheitspharmakologischen Messungen durchgeführt werden können. Entsprechend dem Aufbau von Rast und Guth [22] sollte vor die Durchflusszelle ein Filter geschaltet werden, um Fremdkörper vom Strahlengang fernzuhalten. Des Weiteren empfiehlt sich eine Schaltung, die es erlaubt, zwischen Messkammer und einem Vorratsgefäß hin- und herzuschalten, um die Peristaltikpumpe dauerhaft laufen lassen zu können.

Um die Problematik mit den störenden Luftblasen zu lösen, sollte eine Supercoil anstelle des normalen Schlauches an den Ausgang der Durchflusszelle montiert werden. Die Einstellungen an der Pumpe müssen dann entsprechend angepasst werden, um die gleiche Flussrate zu erhalten. Eventuell könnte man das Perfusionssystem an den hohen Verbrauch an Flüssigkeiten anpassen. Es empfiehlt sich, wie auch bei Rast und Guth [22], gerührte Vorratsgefäße zu verwenden, um eine homogene Vermischung der Testlösungen zu gewährleisten.

Die Fortführung des Projektes ist wichtig, da auch in Zukunft Patch Clamp Messungen durchgeführt werden müssen, gerade hinsichtlich der S7B-Richtlinie der ICH und der CiPA-Initiative. UV-vis Spektroskopie stellt ein simples und auch relativ erschwingliches Analysensystem dar und eignet sich gut zur Integration in den Patch Clamp Aufbau. Nicht nur in manuellen Patch Clamp Systemen ist die online-Expositionskontrolle von Bedeutung. Gerade in Patch Clamp Automaten kommen viele Kunststoffteile mit den Substanzlösungen in Berührung. Die getesteten Stoffe haben oftmals die Eigenschaft, dass sie an Wänden haften bleiben und somit die Soll-Konzentration nicht mit der Ist-Konzentration übereinstimmt. Ein bekanntes Beispiel für eine solche Substanz wäre das bereits erwähnte Terfenadin. Vielleicht finden sich somit später auch in den automatisierten Patch Clamp Systemen UV-vis-Detektoren wieder, um auch dort die Exposition während den sicherheitspharmakologischen Messungen zu kontrollieren.

Literatur

Literaturverzeichnis

- [3] Böhm, R. u. a. *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. 3. Auflage Thieme Verlagsgruppe. 2014. ISBN: 9783131422934. DOI: 10.1055/b-0034-96394.
- [4] Brown, A. „Drugs, hERG and sudden death“. In: *Cell Calcium* 35.6 (2004). Cardiac and smooth muscle excitation and contraction coupling, S. 543–547. ISSN: 0143-4160. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2004.01.008>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143416004000168> (besucht am 05.08.2017).
- [7] Danker, T. und Möller, C. „Early identification of hERG liability in drug discovery programs by automated patch clamp“. In: *Frontiers in pharmacology* 5 (Sep. 2014), S. 203. DOI: 10.3389/fphar.2014.00203. URL: <http://europepmc.org/articles/pmc4151236> (besucht am 05.08.2017).
- [8] De Bruin, M. u. a. „Anti-HERG activity and the risk of drug-induced arrhythmias and sudden death“. In: 26 (Apr. 2005), S. 590–7. URL: https://www.researchgate.net/publication/8094410_Anti-HERG_activity_and_the_risk_of_drug-induced_arrhythmias_and_sudden_death (besucht am 21.08.2017).
- [9] Du, C. u. a. „Modification by KCNE1 variants of the hERG potassium channel response to premature stimulation and to pharmacological inhibition“. In: 1 (Nov. 2013), e00175. URL: https://www.researchgate.net/publication/259628428_Modification_by_KCNE1_variants_of_the_hERG_potassium_channel_response_to_premature_stimulation_and_to_pharmacological_inhibition (besucht am 21.08.2017).
- [10] Gintant, G., T. Sager, P. und Stockbridge, N. „Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing“. In: 15 (Feb. 2016). URL: https://www.researchgate.net/publication/295083401_Evolution_of_strategies_to_improve_preclinical_cardiac_safety_testing (besucht am 19.08.2017).
- [11] Kirsch, G. E. u. a. „Variability in the measurement of hERG potassium channel inhibition: Effects of temperature and stimulus pattern“. In: *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 50.2 (2004), S. 93–101. ISSN: 1056-8719. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2004.06.003>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056871904000589> (besucht am 21.08.2017).
- [12] Lunn, G. *HPLC methods for recently approved pharmaceuticals*. John Wiley & Sons, Inc, 2015. Kap. Phentermine. ISBN: 0-471-66941-5. URL: <http://files.instrument.com.cn/bbs/upfile/2009325111232.pdf> (besucht am 14.08.2017).
- [16] Numberger, M. und Draguhn, A. *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996. ISBN: 3-8274-0023-6.

-
- [18] Pape, H.-C., Kurtz, A. und Silbernagl, S. *Physiologie*. 7. Aufl. Georg Thieme Verlag, 22. Okt. 2014. ISBN: 978-3-13-796007-2.
- [19] Priest, B. T. und McDermott, J. S. „Cardiac ion channels“. In: *Channels* 9.6 (2015). PMID: 26556552, S. 352–359. DOI: 10.1080/19336950.2015.1076597. eprint: <http://dx.doi.org/10.1080/19336950.2015.1076597>. URL: <http://dx.doi.org/10.1080/19336950.2015.1076597> (besucht am 19.08.2017).
- [20] Pugsley, M. K. und Curtis, M. J., Hrsg. *Principles of Safety Pharmacology*. 1. Aufl. Handbook of Experimental Pharmacology 229. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015. ISBN: 978-3-662-46942-2,978-3-662-46943-9.
- [21] R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2017. URL: <https://www.R-project.org/>.
- [22] Rast, G. und Guth, B. D. „Solubility assessment and on-line exposure confirmation in a patch-clamp assay for hERG (human ether-a-go-go-related gene) potassium channel inhibition“. In: *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 70.2 (2014), S. 182–187. ISSN: 1056-8719. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2014.08.001>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056871914002421> (besucht am 21.08.2017).
- [23] Ritz, C. u. a. „Dose-Response Analysis Using R“. In: *PLOS ONE* 10.e0146021 (12 2015). URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0146021> (besucht am 09.09.2017).
- [24] Vandenberg, J. I. u. a. „hERG K⁺ Channels: Structure, Function, and Clinical Significance“. In: *Physiological Reviews* 92.3 (2012), S. 1393–1478. ISSN: 0031-9333. DOI: 10.1152/physrev.00036.2011. eprint: <http://physrev.physiology.org/content/92/3/1393.full.pdf>. URL: <http://physrev.physiology.org/content/92/3/1393> (besucht am 19.08.2017).

Quellenverzeichnis (Internet)

- [1] *About CiPA*. 2016. URL: <http://cipaproject.org/about-cipa/#1> (besucht am 20.08.2017).
- [2] Bamerny, S. *Funktion von Ionenkanälen im Herz-Kreislauf-System*. Institut für Physiologie und Pathophysiologie. 8. Aug. 2008. URL: <https://www.uni-marburg.de/fb20/physiologie/ags/daut/funktion> (besucht am 19.08.2017).
- [5] Chan, S. *6 Hospitalized, One of Them Brain-Dead, After Drug Trial in France*. The New York Times Company. 15. Jan. 2016. URL: <https://www.nytimes.com/2016/01/16/world/europe/french-drug-trial-hospitalization.html?mcubz=3> (besucht am 21.08.2017).
- [6] Chemgapedia, Hrsg. *UV-Spektroskopie. Spektrometerkomponenten*. URL: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/13/vlu/spektroskopie/spektrometer/komponenten.vlu.html> (besucht am 20.08.2017).
- [13] National Center for Biotechnology Information. *Nifedipine. Compound Summary for CID 4485*. PubChem Compound Database. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nifedipine#section=Top> (besucht am 05.08.2017).
- [14] National Center for Biotechnology Information. *Quinidine. Compound Summary for CID 441074*. PubChem Compound Database. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/quinidine#section=Top> (besucht am 05.08.2017).
- [15] National Center for Biotechnology Information. *Terfenadine. Compound Summary for CID 5405*. PubChem Compound Database. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/terfenadine#section=Top> (besucht am 05.08.2017).
- [17] Oliva-Chatelain, B. L. und Barron, A. R. *Basics of UV-Visible Spectroscopy*. Version 1.1. 5. Juni 2010. URL: <http://cnx.org/contents/Auez1s9H01/Basics-of-UV-Visible-Spectrosc> (besucht am 20.08.2017).

Anhang

Verwendete Geräte und Materialien

Verwendete Zelllinie: hERG DUO, Spezies: human, Zelltyp: CHO, Hersteller: B'SYS, Schweiz

Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Software

Name	Version	Verwendungszweck
L ^A T _E X	2.12.4	Dokumentation
Patchmaster, HEKA	2x35 16-Jun-2008	Aufzeichnung der elektrischen Messungen und der Signale des UV-Detektors
RStudio, RStudio	1.0.153	Auswertung der Patchmaster-Daten
Jupyter Notebook, Project Jupyter	4.3.0	Auswertung der Spektrometerdaten
Python, Python Software Foundation	2.7.13	Auswertung der Spektrometerdaten

Tabelle 16: Zusammensetzung des Mediums für die Zellkultur

Substanz	Menge
F-12 Nutrient Mix, GlutaMAX TM	450 ml
FBS	50 ml
Geneticin	1 ml
Hygromycin B	1 ml

Tabelle 17: Auflistung der verwendeten Gebrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Bechergläser	DURAN Group GmbH, Wertheim
Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Erlenmeyerkolben	DURAN Group GmbH, Wertheim
Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon [®] -Tubes	Corning, Inc., USA
Flaschen	DURAN Group GmbH, Wertheim
Halbmikroküvetten, PS	Ratiolab [®] , Dreieich
Pipetten	Corning, Inc., USA
Pipettenrohlinge (GB 150TF-10)	Science Products GmbH, Hofheim
Spritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzenvorsatzfilter	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Sterilfilter	Corning, Inc., USA
Zellkulturflaschen T25 und T75	Corning, Inc., USA

Tabelle 18: Auflistung der Geräte für den manuellen Patch Clamp Stand

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Ablaufsammlbehälter	Erlenmeyerkolben	DURAN Group GmbH, Wertheim
Absaugröhrchen	Path Perfusion Tool	Scientifica LTD, UK
Beleuchtungseinheit	HAL 100	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Druckanzeige	DP4	Panasonic Industrial Devices SUNX Co., Ltd., USA
Durchflusszelle	Fiber Optic SMA Z-Flow Cell	FIAlab [®] Instruments Inc., USA
Euro-Gehäuse	ABS Schwarz Strapubox 2007SW	Strapubox, Hemmingen
Halterung für die Messelektrode	Magnetic bracket type 2	Luigus & Neumann, Ratingen
Kamera	BW-320XD	Soligor GmbH, Leinfelden-Echterdingen
Lichtwellenleiter		KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin
Messkammer	Slice mini chamber	Luigus & Neumann, Ratingen
Messkammereinsatz	LN insert, type 0 with drilling	Luigus & Neumann, Ratingen
Mikromanipulator	Mini 4 axes Unit	Luigus & Neumann, Ratingen
Manueller Mikromanipulator	Bathchamber XY Unit - 2 axes	Luigus & Neumann, Ratingen
Mikroskop	Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Patch Clamp Verstärker	patch clamp EPC 10	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht
Peristaltikpumpe	502-S	Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen
Peristaltikpumpe	Minipuls 3	Gilson, Inc., USA
Schwingungsgedämpfter Tisch	Halcyonics Micro 40	Accurion GmbH, Göttingen
Shutter Driver	VMM-D1	Vincent Associates, USA
Steuerungseinheit	SM-5 Control System	Luigus & Neumann, Ratingen
UV-Detektor	UVD 2.1S LWL	KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin
Ventilkontroller	L/M-SPS-8	E.S.F. electronics, Göttingen
Ventilsteuereinheit	PF-8	E.S.F. electronics, Göttingen

Tabelle 19: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	CP 225 D	Sartorius AG, Göttingen
Brutschrank	CO ₂ -Inkubator CB 210	Binder GmbH, Tuttlingen
Elektrische Pipettierhilfe	PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Magnetrührer	Combimag RCT, RCT basic	IKA [®] -Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Microforge		NMI, Reutlingen
Micropipette Puller	P-97	Sutter Instruments, USA
Mikroskop	EVOS FL	Life Technologies Inc., USA
Osmometer	OSMOMAT 030	Gonotec GmbH, Berlin
pH-Meter	Labor-pH-Meter 766	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Pipetten	Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Präzisionswaage	CP 153	Sartorius AG, Göttingen
Sterilbank	HeraSafe	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Timer		Oregon Scientific, USA
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	Heraeus Labofuge 400	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Ultraschallbad	BANDELIN SONOREX	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
UV/VIS-Spektrometer	Lambda Bio+	PerkinElmer, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., USA
Wasserbad	Lauda E 100	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & CO. KG, Lauda-Königshofen
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen

Tabelle 20: Auflistung der verwendeten Substanzen

Name der Substanz	Hersteller
Accutase	Corning, Inc., USA
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
D-Glukose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
FBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Geneticin	Life Technologies Inc., USA
Ham's F-12 Nutrient Mix, GlutaMAX™ Supplement	Life Technologies Inc., USA
HEPES	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hygromycin B	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
K ₂ ATP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Nifedipine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
PBS	Life Technologies Inc., USA
QClean	Sophion Bioscience A/S, Dänemark
Quinidine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Terfenadine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München