

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der  
Technischen Universität München

( Direktor: Univ.-Prof. Dr. Franz Hofmann)

Die Wirkung des Sinusknoten-Inhibitors Ivabradin auf die Schrittmacherkanäle  
HCN1, HCN2 und HCN4

Karen Wieland

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten  
Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann

2. apl. Prof. Dr. W. Vierling

Die Dissertation wurde am 20.06.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 27.09.2006 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS		<i>Seite</i>
<i>Liste der Abkürzungen</i>		<i>4</i>
<b>1. Einleitung</b>		<b>7</b>
1.1	Koronare Herzkrankheit (KHK)	7
1.1.1	Grundlagen	7
1.1.2	Medikamente zur Behandlung der KHK	8
1.1.2.1	Organische Nitrate	8
1.1.2.2	Kalziumantagonisten	8
1.1.2.3	$\beta$ -Sympatholytika ( $\beta$ -Blocker)	9
1.1.2.4	Selektiv Bradykarde Substanzen	10
1.2	Kardiales Reizleitungssystem	10
1.1.2.1	Physiologischer Herzschrittmacher	10
1.1.2.2	Der $I_h$	11
1.2.2.1	Die Bedeutung des $I_h$ als Rhythmusregulator	12
1.2.3	HCN Kanäle	12
1.2.3.1	Lokalisation und dortige Funktion der HCN Kanäle	13
1.3	Ivabradin	14
1.3.1	Entwicklung des Ivabradins	14
1.3.2	Die Wirkung des Ivabradins	15
1.3.3	Vorteile des Ivabradins gegenüber bereits vorhandenen Medikamenten	16
1.4	Ziel der Arbeit	17
<b>2. Methoden</b>		<b>19</b>
2.1	Ivabradin	19
2.2	Zellkultur	19
2.3	Transfektion	20
2.4	Elektrophysiologische Registrierung	20
2.4.1	Die Patch-clamp Methode	21
2.4.1.1	Funktionsprinzip der Patch-clamp Methode	22
2.4.1.2	Experimenteller Aufbau	23
2.4.1.3	Vorgehen bei der Ganzzelleableitung	24

2.5	Elektrophysiologische Messung an HCN Kanälen	27
2.5.1	Das Stromprotokoll	27
2.5.2	Das Aktivierungsschema	30
2.5.2.1	Die Membrankapazität	30
2.6	Dosis-Wirkungskurve und Berechnung des Hill Koeffizienten	31
2.7	Statistische Auswertung	31
<b>3. Ergebnisse</b>		<b>33</b>
3.1	Strommessung	33
3.2	Die Wirkung des Ivabradins	35
3.2.1	Minderung der Kanalströme durch Ivabradin	36
3.2.2	Dosis-Wirkungskurven	40
3.2.2.1	Ergebnisse der Dosis-Wirkungskurven	43
3.2.3	Vergleich der Isoformen	44
<b>4. Diskussion</b>		<b>47</b>
4.1	Die Vorgeschichte	47
4.2	t-Test	49
4.2.1	Diskussion der t-Test Ergebnisse	49
4.3	Der Hill Koeffizient	50
4.4	Diskussion der Dosis-Wirkungskurve	52
4.5	Rundown	53
4.5.1	Stromverlust bei Zellen ohne Ivabradinumspülung	53
4.5.2	Rundown in der Diskussion	54
4.6	Andere I <sub>h</sub> Blocker	54
4.7	Vorteile des Ivabradins	57
4.7.1	Relevanz der Ergebnisse für die klinische Anwendung	58
<b>5. Literaturverzeichnis</b>		<b>60</b>
<b>6. Arbeiten, die im Rahmen dieser Dissertation entstanden sind</b>		<b>65</b>
<b>7. Zusammenfassung</b>		<b>67</b>
<b>8. Danksagung</b>		<b>69</b>

## LISTE DER ABKÜRZUNGEN

AV	atrioventrikular
S1-S6	Transmembransegmente S1- S6
U	Spannung
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
CNBD	cyclic nucleotide binding domain
CNG	cyclic nucleotide-gated
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
$E_m$	Gleichgewichtspotential der Membran
g	Leitfähigkeit
H	Hill Koeffizient
HCN	hyperpolarisation-activated, cyclic nucleotid-gated
hHCN	human hyperpolarisation-activated, cyclic nucleotid-gated
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
I	Strom
$I_f$	„funny“ current (= $I_h$ )
$I_h$	hyperpolarisations-aktivierter Kationenstrom
$IC_{50}$	halbmaximale inhibitorische Konzentration
$I_{memb}$	Membranstrom
KHK	koronare Herzkrankheit
PBS	phosphate buffered saline
R	Widerstand
$U_{soll}$	Sollspannung
$V_{1/2}$	Potential der halbmaximalen Aktivierung
SAN	sinoatrial node
ZNS	zentrales Nervensystem

## LISTE DER ABBILDUNGEN

	<i>Seite</i>
<b><i>Einleitung</i></b>	
1. Ionenbeteiligung des Aktionspotentials am Sinusknoten	11
2. Struktur des HCN Kanals	13
3. Strukturformel Verapamil	14
4. Strukturformel Ivabradin	15
5. Phasen des Aktionspotentials am Sinusknoten	15
<b><i>Methoden</i></b>	
6. Rechteckförmige Stromantwort	25
7. Cell-attached Konfiguration	26
8. Ganzzellkonfiguration	27
9. Stromprotokoll	29
<b><i>Ergebnisse</i></b>	
10. Strom durch HCN1 Kanäle	34
11. Strom durch HCN2 Kanäle	34
12. Strom durch HCN4 Kanäle	35
13. Stromreduktion durch Ivabradin 10 $\mu$ M	37
14. Stromreduktion durch Ivabradin 1 $\mu$ M	38
15. Dosis-Wirkungskurve HCN1	41
16. Dosis-Wirkungskurve HCN2	42
17. Dosis-Wirkungskurve HCN4	43
18. Überlagerung der Dosis-Wirkungskurven	45
<b><i>Diskussion</i></b>	
19. Strukturformel Zatebradin	55
20. Strukturformel Cilobradin	55
21. Strukturformel ZD7288	56
22. Anhang: Poster	66

## LISTE DER TABELLEN

*Seite****Methoden***

- |    |  |    |
|----|--|----|
| 1. | P <sub>offen</sub>                         | 28 |
| 2. | Aktivierungs- und Deaktivierungspulsdauern | 29 |
| 3. | Anzahl der Aktivierungen                   | 30 |

***Ergebnisse***

- |    |                                   |    |
|----|-----------------------------------|----|
| 4. | Konzentration der Ivabradinlösung | 40 |
| 5. | Vergleich der Isoformen           | 44 |

***Diskussion***

- |    |                             |    |
|----|-----------------------------|----|
| 6. | Die IC <sub>50</sub> Werte  | 52 |
| 7. | Der „Nullwert-Stromverlust“ | 54 |

# 1. EINLEITUNG

Der Markt für kardial wirksame Medikamente bietet zahlreiche Substanzen, die die Lebensqualität und die Überlebensrate von Patienten mit koronarer Herzkrankheit verbessern. Jedoch haben alle bisher verfügbaren Mittel deutliche Nebenwirkungen, die teilweise so stark sind, dass die Therapie abgebrochen werden muss. In dieser Arbeit wurde nun der molekulare Wirkmechanismus einer neuen Substanz untersucht, welche sich bis dato ausschließlich durch eine Senkung der Herzfrequenz ohne weitere Nebenwirkungen auszeichnet: der „Sinusknoteninhibitor“ Ivabradin.

## ***1.1 Koronare Herzkrankheit (KHK)***

### ***1.1.1 Grundlagen***

Die koronare Herzkrankheit ist die häufigste Todesursache in Deutschland. Im Laufe ihres Lebens erkranken 30 % der Männer und 15 % der Frauen an dieser Erkrankung der Herzkranzgefäße, 300 von 100.000 Menschen sterben an einem Herzinfarkt. 5 bis 10 % der Bevölkerung leidet an Angina pectoris Anfällen, welche Ausdruck des myokardialen Sauerstoffmangels durch die Verengung der Herzkranzgefäße sind. Diese Ischämie empfinden die Patienten als Druckgefühl und/oder Schmerzen im Thorax und leiden in Abhängigkeit vom Stadium zunehmend unter Luftnot. Der Myokardinfarkt selber stellt ein akutes, lebensgefährliches Krankheitsbild dar, bei dem der Verschluss einer oder mehrerer Koronararterien zu einem Absterben des minderversorgten Myokards führt. Die Symptome reichen hier von nur leichtem Druckgefühl im Thorax über massiven Schmerz mit ausgeprägter Atemnot bis hin zum Herzstillstand und Tod. Die Grundlage der KHK ist eine Verengung der Herzkranzgefäße. Zunehmende Plaquebildung (Arteriosklerose) in den Koronargefäßen reduziert den Blutfluss, wodurch die Sauerstoffversorgung des Myokards beeinträchtigt wird. Dies macht sich insbesondere bei vermehrter Myokardarbeit und somit erhöhtem Sauerstoffbedarf des Muskels bemerkbar, da hierdurch ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot entsteht. Dieses Missverhältnis führt zuerst zu Beschwerden unter körperlicher Belastung, mit dem Fortschreiten der Erkrankung kommt es dann zu Ruhebeschwerden und letztendlich zum manifesten Myokardinfarkt.

### ***1.1.2 Medikamente zur Behandlung der KHK***

Die medikamentöse Behandlung der KHK hat mehrere Ansatzpunkte. Neben der Prophylaxe der zugrundeliegenden Arteriosklerose z.B. durch blutdruck- und lipidsenkende Medikamente wird vor Allem die Steigerung des kardialen Sauerstoffangebots und die Verminderung des Sauerstoffbedarfs angestrebt. Im Folgenden sollen die medikamentösen Möglichkeiten zur KHK-Therapie erläutert werden.

#### ***1.1.2.1 Organische Nitrate***

Nitrate zeichnen sich durch ihre dilatierende Wirkung auf glatte Gefäßmuskulatur aus. Neben den „echten“ Nitraten wie Glyceroltrinitrat, Isosorbiddi- und mononitrat wird auch das Nitrate freisetzende Molsidomin verwendet. Die Nitrate wirken in erster Linie auf das venöse Stromgebiet, jedoch in geringerem Maße auch auf die arteriellen Gefäße. Die Dilatation der venösen Gefäße führt über die Senkung der Vorlast zu einer geringeren diastolischen Wandspannung im Myokard, was eine bessere Durchblutung der Koronararterien ermöglicht. Die Durchblutung der Koronararterien findet fast ausschließlich in der Diastole statt, da in der Systole die Gefäße durch die hohe Wandspannung des Herzmuskels komprimiert werden. Eine Verminderung der diastolischen Wandspannung durch geringeres diastolisches Blutvolumen im Herzen erleichtert also die Koronardurchblutung. Die durch die Wirkung auf das arterielle Stromgebiet bedingte Senkung des peripheren Blutdrucks führt allerdings bei hohen Nitratdosen reaktiv zu einer Erhöhung der Herzfrequenz, was den Sauerstoffverbrauch des Myokards erhöht. Hinzu kommt, dass bei längerfristiger Nitratmedikation eine Toleranz entsteht, die mit der Zeit zum Wirkungsverlust führt. Unerwünschterweise führen Nitrate häufig zu Kopfschmerzen, aber auch zu Schwindel, Übelkeit und Hautrötung.

#### ***1.1.2.2 Kalziumantagonisten***

Die Kalziumantagonisten unterteilt man in zwei Gruppen, wovon sich die Substanzen beider Untergruppen zur Behandlung der KHK eignen. Gemeinsam ist ihnen die Dilatation der arteriellen Gefäße über die Hemmung des Kalziumeinstroms in glatte Muskelzellen. Die eine Wirkstoffgruppe stellen die Dihydropyridine dar, welche keine kardiodepressive Wirkung zeigen. Sie reduzieren den Sauerstoffverbrauch des Herzens über die Verminderung der Nachlast und die resultierende Verminderung der Herzmuskelarbeit. Leider kann die Senkung des arteriellen Blutdruckes zu einer reaktiven Tachykardie und somit wieder vermehrtem Sauerstoffbedarf des Myokards führen. Zusätzlich zeigen sich häufig Kopfschmerzen, seltener prätibiale Ödeme u.a. Nebenwirkungen.

Die zweite Wirkstoffgruppe stellen Phenylalkylamine und Benzothiazepine dar, welche durch ihre zusätzliche kardiodepressive Wirkung auffallen. Sie reduzieren durch ihren Einfluss auf Erregungsleitungssystem und Herzmuskelzellen die Erregungsbildung am Sinusknoten, die Erregungsweiterleitung am AV Knoten und die elektromechanische Kopplung am Myokard. Somit wirken sie negativ chronotrop (rhythmusverlangsamend), negativ inotrop (die Kontraktilität reduzierend) und negativ dromotrop (die Erregungsüberleitung reduzierend). Hierdurch vermindern sie den Sauerstoffverbrauch des Herzens zusätzlich und verhindern eine durch arterielle Blutdrucksenkung ausgelöste Reflextachykardie. Im Gegenzug bergen die kardiodepressiv wirksamen Substanzen die Gefahr der Bradykardie, der AV Blockade, sie können nicht eingesetzt werden bei Herzinsuffizienz und lösen durch ihre Wirkung an den glatten Muskelzellen des Darmes häufig Obstipation aus. Bei akutem Myokardinfarkt dürfen sie auf Grund der drohenden Herzinsuffizienz ebenfalls nicht verwendet werden.

### ***1.1.2.3 $\beta$ -Sympatholytika ( $\beta$ -Blocker)***

$\beta$ -Blocker reduzieren den Sauerstoffverbrauch des Herzens über die Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren vermittelten Sympathikuswirkung. Durch ihren Einfluss auf  $\beta$ -Rezeptoren reduzieren sie die Herzfrequenz, den arteriellen Blutdruck, die Kontraktilität des Myokards und die Überleitung am AV Knoten. Der entscheidende Nachteil der  $\beta$ -Sympatholytika liegt jedoch in den vielen Nebenwirkungen bzw. Kontraindikationen:

- Herzinsuffizienz: auf Grund der Reduktion der Myokardkontraktilität und der resultierenden Hypotoniegefahr dürfen die  $\beta$ -Blocker bei ausgeprägter Herzinsuffizienz nicht verwendet werden.
- AV Block: Kontraindikation wegen der negativ dromotropen Wirkung
- Asthma & COPD: Die Blockade der  $\beta_2$ -Rezeptoren kann bei diesen Patienten durch bronchospastische Wirkung Anfälle auslösen bzw. die Atemnot verstärken.
- Diabetes mellitus:  $\beta$ -Sympatholytika verhindern die reaktive Glukosebereitstellung in der Leber, welche im Fall einer Hypoglykämie über  $\beta$ -Rezeptoren vermittelt wird.
- Periphere Durchblutungsstörungen: Die selektive Wirkung auf  $\beta$ -Rezeptoren führt zum Wegfall der arteriell vasodilatierenden Wirkung ( $\beta_2$  vermittelt), bei erhaltener vasokonstriktiver Wirkung ( $\alpha$  vermittelt). Die periphere Gefäßdurchblutung wird somit vermindert.

#### ***1.1.2.4 Selektiv Bradykarde (die Herzfrequenz reduzierende) Substanzen***

Bradykarde Substanzen senken die Herzfrequenz, was durch die verminderte Muskelarbeit eine Verringerung des Sauerstoffbedarfs sowie durch die längere diastolische Phase eine verbesserte Koronardurchblutung zur Folge hat.  $\beta$ -Blocker und manche Kalziumantagonisten wirken ebenfalls bradykard, jedoch nicht ausschließlich. Eine selektiv bradykard wirkende Substanz, die Kontraktilität, Blutdruck und AV Überleitung nicht beeinflusst, wäre für viele Patienten ein brauchbares Medikament zur Therapie ihrer KHK, auch bei einer Herzinsuffizienz im Rahmen eines frischen Infarktes. Diese Überlegungen führten schon vor mehreren Jahren zur Entwicklung der sogenannten bradykarden Substanzen.

Der Versuch einen Stoff zu entwickeln, der ausschließlich den Herzrhythmus verlangsamt begann mit der Weiterentwicklung des Verapamils zu Ivabradin. Diese älteste Substanz der bradykarden Gruppe steht im Mittelpunkt der vorliegenden Dissertation, da sich in zahlreichen Untersuchungen ergeben hatte, dass Ivabradin für die klinische Anwendung am geeignetsten scheint. Neuere aus Verapamil entwickelte Substanzen stellen Zatebradin und Cilobradin dar (Goethals et al. 1993; Van Bogaert & Pitoors 2003). ZD7288 ist eine Substanz, die vom Clonidin abgeleitet wurde (BoSmith et al. 1993), jedoch nur experimentell verwendbar ist. Diese neu entwickelten, selektiv bradykard wirkenden Substanzen werden auf Grund ihres Angriffs am Sinusknoten auch „Sinusknoteninhibitoren“ genannt.

### ***1.2 Kardiales Reizleitungssystem***

#### ***1.2.1 Physiologischer Herzschrittmacher***

Die Kontraktion des Herzmuskels ist Folge einer Erregungsfront, welche im Sinusknoten beginnt und sich über AV Knoten, His'sches Bündel, rechten und linken Tawaraschenkel, Purkinjefasern und letztendlich direkt über die Zellmembranen ausbreitet. Den Schrittmacher des Herzens stellt also der Sinusknoten dar, der Aktionspotentiale mit einer Frequenz von ca. 70 pro Minute aussendet. An diesem Knoten spielt sich folgendes Szenario ab: Sinusknotenzellen initiieren durch immer wieder von Neuem ablaufende Membrandepolarisationen die Aktionspotentiale, welche ihrerseits der Beginn der Erregungsfront sind. Das Aktionspotential selber ist Folge eines komplizierten Zusammenspiels verschiedener Ionenströme durch die Zellmembran der Sinusknotenzellen (Abbildung 1). Gezeigt sind zwei aufeinander folgende Aktionspotentiale mit den in der Zwischenzeit ablaufenden Ionenströmen, welche zur spontanen Depolarisation der Zellmembran und somit zu den sich immer wiederholenden Aktionspotentialen führen.

Beteiligt sind Kaliumkanäle, zwei Kalziumkanaltypen (L- und T-Typ), ein Natriumkanaltyp und der sogenannte  $I_h$  ( $=I_f$ ). Dieser  $I_h$  zeigte sich als besonders wichtig für die Regulation der Herzrhythmusgeschwindigkeit, es handelt sich hierbei um einen durch Hyperpolarisation der Zellmembran ausgelösten  $Na^+/K^+$  Einwärtsstrom (DiFrancesco 1993; Pape 1996).

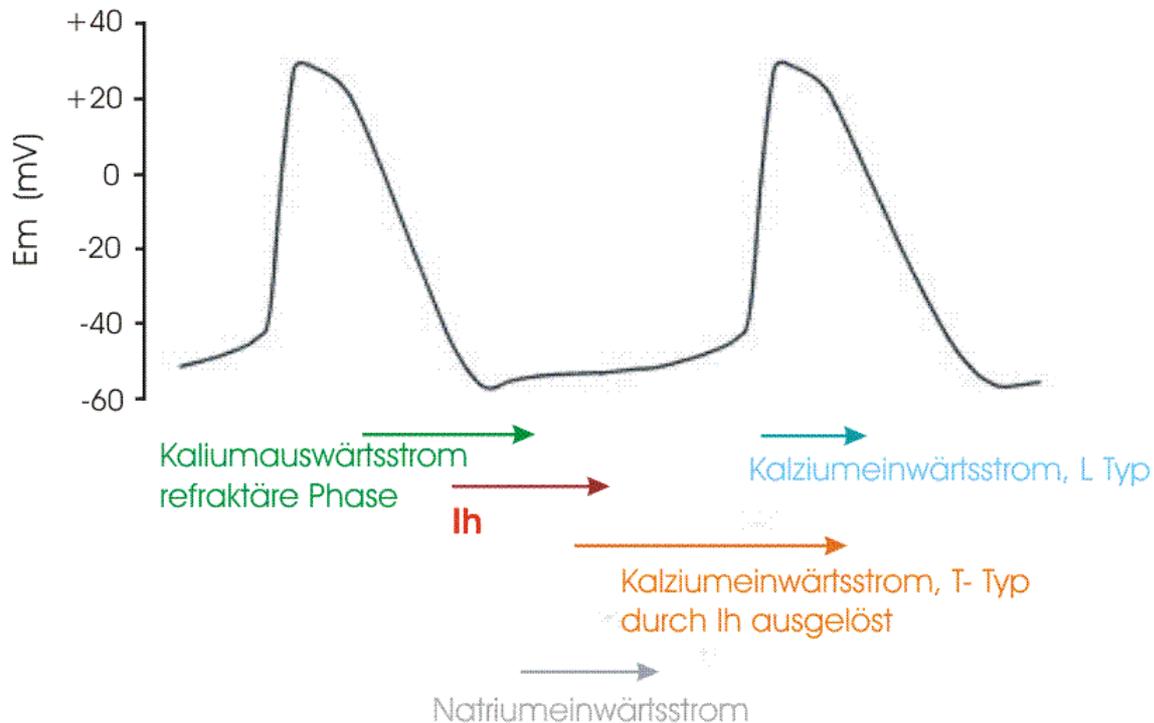


Abbildung 1 stellt die Ionenbeteiligung des Aktionspotentials an Sinusknotenzellen dar. Auf der y-Achse ist das Membranpotential [mV] aufgetragen, in x-Richtung ist der zeitliche Verlauf aufgetragen.

### 1.2.2 Der $I_h$

Der  $I_h$  wurde als erstes an Photorezeptoren der Retina entdeckt (Fain et al. 1978; Bader et al. 1979; Atwell & Wilson 1980), an denen Lichtblitze zu einer Membranhyperpolarisation führten, welche dann einen Einwärtsstrom auslösten. Dieser Strom wurde aufgrund seiner Aktivierung durch Hyperpolarisation  $I_h$  genannt. Ungefähr zur gleichen Zeit wurde ein ähnlicher hyperpolarisationsaktivierter Strom an Sinusknotenzellen und in Purkinjefasern des Herzens entdeckt, welcher einen langsamen Einwärtsstrom, getragen von Natrium- und Kaliumionen darstellte. Dieser Strom wurde auf Grund seiner „witzigen“ Ähnlichkeit zu dem von den Forschern eigentlich erwarteten Kalium Strom als  $I_f$  für „funny“ bezeichnet (Brown et al. 1979; Yanagihara & Irisawa 1980; DiFrancesco 1981). Desweiteren wurde der gleiche Strom in zentralen Neuronen gefunden, wo er auf Grund seines merkwürdigen elektrophysiologischen Verhaltens und der Unwissenheit ob seiner Funktion als „queer

current“  $I_q$  bezeichnet wurde (Halliwell & Adams 1982). Durch Fortführung der Untersuchungen konnten weitere Lokalisationen des  $I_h$  zutage gebracht werden: er wurde an zahlreichen neuronalen Zellen und in mehreren Bereichen des Herzens entdeckt .

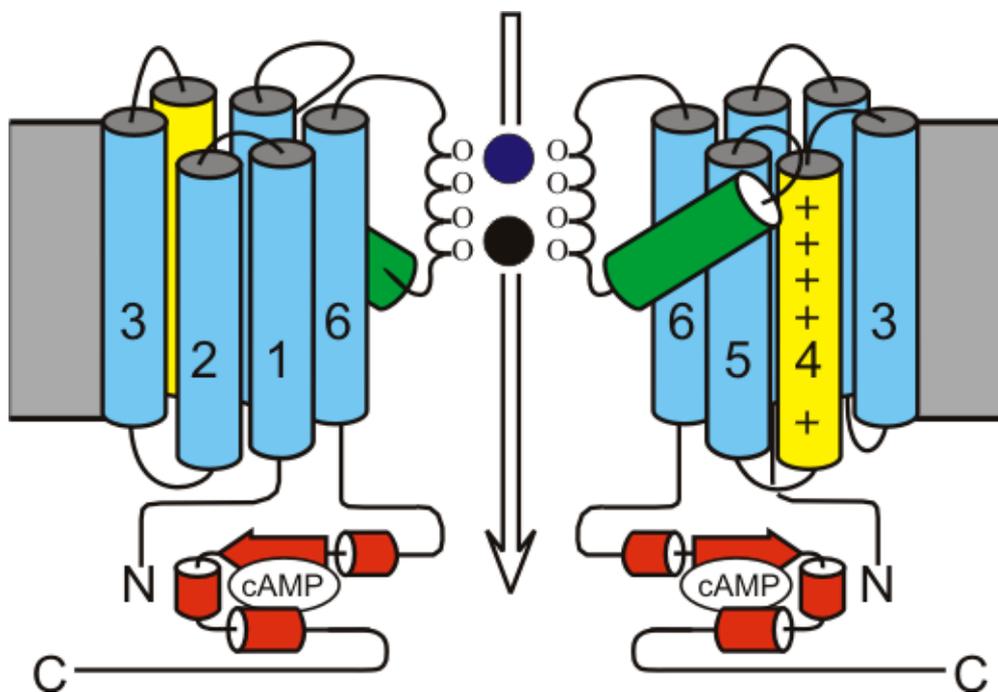
### ***1.2.2.1 Die Bedeutung des $I_h$ als Herzrhythmusregulator***

Wie bereits erwähnt, spielt der  $I_h$  eine wichtige Rolle bei der Regulation der Herzfrequenz (Campbell et al. 1992; DiFrancesco 1985; 1993). Diese Tatsache lässt sich folgendermaßen erklären. Sinusknotenzellen haben ein Ruhemembranpotential von ca.  $-55$  mV, zur Auslösung eines Aktionspotentials muss das Membranpotential bis zum Schwellenpotential von ca.  $-40$  mV depolarisiert werden. Diese langsame Anhebung des Membranpotentials, welche der  $I_h$  mitverursacht, führt zur Öffnung spannungsabhängiger Natrium- und Kalziumkanäle, was zur Auslösung des Aktionspotentials führt. Aktiviert wird der  $I_h$  bei Membranpotentialen von  $-45$  mV bis  $-85$  mV, je nach untersuchter Zellart. Dies entspricht bei der jeweiligen Zellart in etwa dem Ruhemembranpotential.

### ***1.2.3 HCN Kanäle***

HCN Kanäle sind die zugrundeliegenden Ionenkanäle des  $I_h$  (Ludwig et al. 1998) und sind somit vermutlich der eigentliche Ansatzpunkt der Ivabradinblockade. Inzwischen gelang es, vier Typen von HCN Kanälen auszumachen und zu klonieren (Ludwig et al. 1998; 1999; Santoro et al. 1998; Ischii et al. 1999; Seifert et al. 1999). Strukturell sind die vier Typen sehr nah miteinander verwandt: Sie besitzen zu 60 % die gleichen Aminosäuresequenzen, wobei die Unterschiede zum allergrößten Teil in den Carboxy- und Aminotermini liegen, welche sich vor allem auch in ihrer Länge unterscheiden. In der zentralen Region sind die Übereinstimmungen sehr hoch, sie liegen auf Ebene der Aminosäuren bei 80-90 % (Biel et al. 1999; Ludwig et al. 1999). In ihrem groben Aufbau und Verhalten sind alle HCN Isoformen gleich: Wie der Name schon andeutet, sind die Kanäle hyperpolarisations-aktiviert, durch zyklische (cyclic) Nukleotide kontrollierte Kationenkanäle. Sie sind verwandt mit CNG- und Kaliumkanälen und gehören zur Superfamilie der spannungsabhängigen Kanäle. Alle HCN Kanäle besitzen sechs transmembrane Helices (S1-S6), welche das positiv geladene S4 Segment und eine Ionen-leitende Pore zwischen dem fünften und dem sechsten Segment beinhalten. Das S4 Segment entspricht dem spannungsempfindlichen S4 Segment anderer spannungsabhängiger Kationenkanäle. Überraschend hieran ist, dass andere Kanäle, die ein solches S4 Segment besitzen, durch Depolarisation statt durch Hyperpolarisation aktiviert werden (Ludwig et al. 1999). Das C-terminale Ende beinhaltet eine sogenannte CNBD

Region, eine zyklische (cyclic) Nukleotid bindende Domäne. Das entscheidende an der CNBD Region ist die Verantwortlichkeit für die Modulation der HCN Kanalströme durch zyklische Nukleotide, welche zuerst am  $I_h$  entdeckt wurde: cAMP (DiFrancesco 1985; 1993) und cGMP (Pape & Mager 1992) sind die hier entscheidenden Modulatoren, die die Aktivierungskurve des  $I_h$  und der HCN Kanäle um 2 bis 15 mV in Richtung positiver Membranpotentiale verschieben (Ludwig et al. 1999). Die Pore der HCN Kanäle ist durchlässig sowohl für Kalium als auch für Natrium Ionen. Man vermutet, dass die Pore der HCN Kanäle zwei Bindungsstellen für Kationen aufweist: eine mit höherer Affinität zu Natrium Ionen und eine mit höherer Affinität zu Kalium Ionen (Ludwig et al. 1999).



**Abbildung 2.** Modell der Struktur eines HCN Kanals. Die Transmembransegmente S1-S6 sind mit den dem Segment entsprechenden Ziffern 1-6 versehen. Das positiv geladene S4-Segment ist gelb dargestellt, der grüne Teil gehört zur Ionenpore des Kanals, welche sich zwischen dem 5. und dem 6. Segment befindet. An den C-terminalen Enden befinden sich die CNBD Regionen.

### **1.2.3.1 Lokalisation und dortige Funktion der HCN Kanäle**

Die genetische Identität der HCN Kanäle ist noch nicht lange bekannt (Ludwig 1998; Santoro et al. 1998; Biel et al. 1999). Dennoch gelang es in den vergangenen Jahren schon mehrfach Lokalisationen und dortige Funktion verschiedener HCN Kanaltypen darzustellen. Im zentralen Nervensystem konnten die Kanaltypen 1 bis 4 nachgewiesen werden (Ludwig et al. 1997; 1998), genauer noch: in den Rückenmarksganglien von Mäusen wurden insbesondere HCN1, gefolgt von HCN2 Kanälen vorgefunden. Die im ZNS fließenden  $I_h$  Ströme regulieren

die Rate rythmischer Oszillationen (Pape 1996; Lüthi & McCormick 1998) und sind somit eine Art neuronaler Schrittmacher. In retinalen Photorezeptoren werden  $I_h$  Ströme durch Licht ausgelöst, welches zu Hyperpolarisation von Membranpotentialen führt. In den Photorezeptoren zeigten sich hohe Zahlen an HCN1 Kanälen, während keine HCN2, HCN3 oder HCN4 Kanäle gefunden wurden. Besonders interessant für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist die Verteilung und Funktion der Kanäle am Herzen: Kürzlich erst konnte die Lokalisation der HCN Kanäle am Myokard adulter Menschen untersucht werden. Es zeigte sich, dass hier HCN2 und HCN4 Kanäle zu finden sind (Ludwig et al. 1999), nicht jedoch HCN1 oder HCN3 Kanäle (Stieber et al. 2005). Bereits früher durchgeführte Untersuchungen hatten gezeigt, dass HCN2 Kanäle eine wichtige Rolle in der Prävention kardialer Arrhythmie spielen. Es zeigte sich, dass sie das diastolische Membranpotential stabilisieren. HCN4 Kanäle hingegen stellten sich als Mediatoren der Sympathikusstimulation auf die Herzrhythmusaktivität dar (Stieber et al. 2004).

### 1.3. Ivabradin

#### 1.3.1 Entwicklung des Ivabradins

Ivabradin war die erste entwickelte Substanz der von Verapamil abgeleiteten bradykarden Stoffe. Interessanterweise beruht die Entwicklung eigentlich auf einem Irrtum: Man ging davon aus, dass die rhythmusverlangsamende Wirkung des Verapamils auf einer  $\beta$ -Blockade beruht und hatte mit den neu entwickelten Stoffen eigentlich versucht nebenwirkungsärmere  $\beta$ -Blocker herzustellen. Relativ überraschend kam dann die Erkenntnis, dass Ivabradin weder auf  $\beta$ -Rezeptoren noch auf Kalziumkanäle wirkt, sondern den neu entdeckten Ionenstrom  $I_h$  blockiert (Bois et al. 1996; Fain et al. 1978 ; Bader et al. 1979 ; Atwell & Wilson 1980).

Die Struktur des Ivabradins ähnelt der des Verapamils:

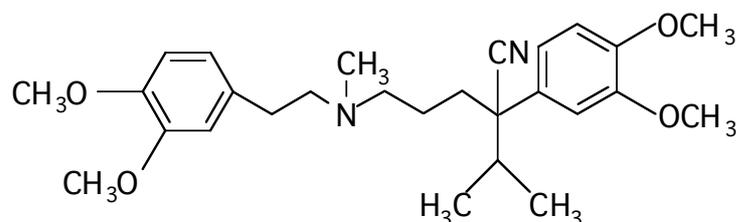


Abbildung 3. Strukturformel Verapamil

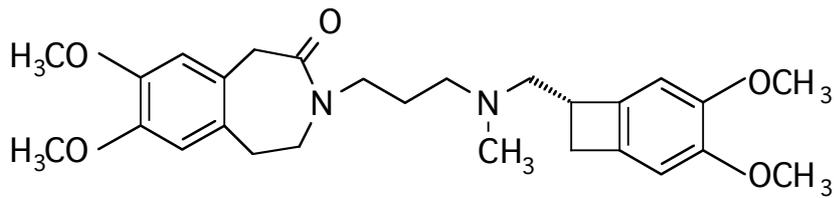


Abbildung 4. Strukturformel Ivabradin.

### 1.3.2 Die Wirkung des Ivabradins

Die Erforschung der Ivabradinwirkung begann mit der Untersuchung seiner Auswirkung auf den Herzrhythmus. Es zeigte sich, dass Ivabradin die Herzfrequenz durch die Verlangsamung der diastolischen Depolarisation am Sinusknoten reduziert, dass es also die Phase 4 des Aktionspotentials verlängert (Thollon et al. 1994) (Abbildung 5).

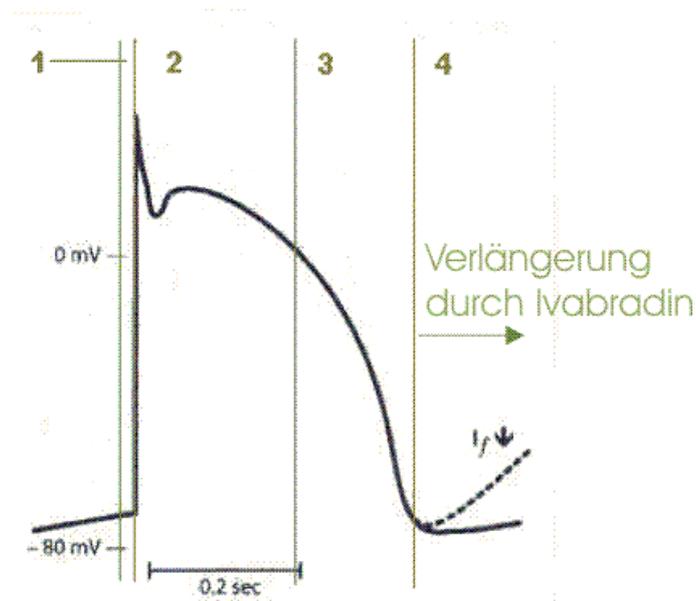


Abbildung 5 zeigt die vier Phasen des Aktionspotentials am Herzen. Auf der y-Achse ist das Membranpotential [mV] der Herzmuskelzelle aufgetragen, auf der x-Achse die Zeit [s]. Der  $I_f$  (=  $I_h$ ) unterliegt der Phase vier (langsame, spontane Depolarisation), die nur in Sinusknotenzellen zu finden ist.

Wenige Zeit später gelangte man zu der Vermutung, dass die Ivabradinwirkung auf einer Blockade des  $I_h$  beruht (Pérez et al. 1995; Bois et al. 1996). Die Entdeckung des  $I_h$  an Sinusknotenzellen und Purkinjefasern des Herzens (Brown et al. 1979; Yanagihara & Irisawa 1980; Di Francesco 1981) führte zu Erkenntnissen über die Bedeutsamkeit des neuentdeckten Stroms für die Regulierung des Herzrhythmus. Man fand heraus, dass der Mechanismus über

den der  $I_h$  seine Schrittmacherfunktion ausübte, die langsame Depolarisation des Membranpotentials war (DiFrancesco 1993). In weiteren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Ivabradin eine selektiv den  $I_h$  blockierende Wirkung und keine bzw. eine zu vernachlässigende Wirkung auf andere Ionenströme, die an der Erregungsbildung im Sinusknoten beteiligt sind, hat. Es zeigte sich eine Frequenz-, Dosis- und zusätzlich eine Spannungsabhängigkeit der Stromblockade durch Ivabradin (Bois et al. 1996). Die Spannungsabhängigkeit bestand in sofern, dass sich die HCN Kanal blockierende Wirkung nur an offenen Kanälen entfalten kann, wobei die spannungsabhängigen HCN Kanäle nur bei hyperpolarisierter Zellmembran offen sind. Andere Forschungsergebnisse bestätigten nicht nur diese Erkenntnisse, sondern zeigten zusätzlich, dass sich die volle Wirkung des Ivabradins nur durch wiederholte Membranhypertensionen und somit Kanalöffnungen erwirken lässt. Dies und die Tatsache, dass sich die ivabradinbedingte Kanalblockade ebenfalls nur bei geöffneten Kanälen aufheben lässt, führte zu dem Schluss, dass die Bindungsstelle für die Substanz im Inneren des HCN Kanals liegt (Bucchi et al. 2002).

### ***1.3.3 Vorteile des Ivabradins gegenüber bereits vorhandenen Medikamenten***

Der Hauptvorteil des Ivabradins stellt sich schon bei der Einordnung des Stoffes in die Gruppe der bradykarden Substanzen dar. Im Gegensatz zu den bisher erhältlichen rhythmusverlangsamenden Stoffen wirkt Ivabradin selektiv bradykard ohne Einfluss auf Inotropie und AV Überleitung zu nehmen. In mehreren Tierversuchen (Monet et al. 2001; Colin et al. 2003; Mulder et al. 2004) und einer Studie an Patienten (Borer et al. 2002) imponierte das Pharmakon durch die Abwesenheit von Nebenwirkungen, was den nächsten großen Vorteil darstellt. Einzige Ausnahme stellen die von manchen Patienten subjektiv wahrgenommenen Lichtintensitätsschwankungen dar. Auch die erwähnte Dosis- und Frequenzabhängigkeit der Wirkung ist eine gute Voraussetzung für die klinische Anwendung der Substanz in der Behandlung von Myokardischämien. Die Dosisabhängigkeit ermöglicht eine gute Therapieeinstellung mit für den individuellen Patienten abgestimmten Medikamentendosen, während die Frequenzabhängigkeit das Risiko einer zu stark bradykarden Wirkung minimiert. Dadurch wirkt das Ivabradin nämlich gerade bei hohen Herzfrequenzen und könnte unter guter Dosisanpassung bei niedrigen bis normalen Herzfrequenzen gar keine Wirkung zeigen. Betrachtet man die Bedeutung des  $I_h$  für die Auslösung des Aktionspotentials am Herzen, so wird klar, dass das verzögerte Erreichen des Schwellenpotentials, wie es bei Blockade des  $I_h$  Stroms der Fall ist, zu einer Verlängerung der

Zeit zwischen den Aktionspotentialen führt. Die schnelle Depolarisationsphase des Aktionspotentials wird hierbei jedoch nicht beeinflusst, ebenso wenig wie die kaliumstromgetragene Repolarisationsphase. Sie stellt die sogenannte vulnerable (nicht erregbare) Phase dar (Abbildung 1). Diese Tatsache ist insbesondere im Hinblick auf die Proarrhythmogenität wichtig, da die Verkürzung der vulnerablen Phase zu einem erhöhten Risiko für medikamenteninduzierte ventrikuläre Rhythmusstörungen führen würde.

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

In den letzten Jahren gelang die Klonierung der HCN Kanäle, was außerdem zur Identifizierung des  $I_h$  als HCN Kanalstrom führte (Ludwig 1998; Santoro et al. 1998). Weiterhin gelang die Untersuchung der HCN Kanäle hinsichtlich ihrer Struktur und ihrer Funktion soweit, dass kürzlich vier verschiedene Kanaltypen ausgemacht werden konnten: HCN1, HCN2, HCN3 und HCN4 (Biel et al. 1999; Kaupp & Seifert 2002; Robinson & Siegelbaum 1998)

Ein ganz anderes Feld, auf dem in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht wurden, ist die Wirkung bradykarder Substanzen, welche sowohl auf laborexperimenteller (Goethals et al. 1993; BoSmith et al. 1993; Thollon et al. 1994; Bois et al. 1996; Shin et al. 2001) als auch auf klinisch-experimenteller Ebene erforscht wurden (Monet et al. 2001; Colin et al. 2003; Mulder et al. 2004) In dieser Arbeit geht es um die Fortführung der Forschungen in beiden Gebieten, indem die Wirkung der bradykarden Substanz Ivabradin auf geklonte HCN Kanäle untersucht werden soll. Dabei sollen vier Fragestellungen untersucht werden:

1. Der Nachweis der Pharmakonwirkung auf HCN Kanäle direkt steht noch aus und soll in dieser Arbeit vorgenommen werden. Es war bisher nur über den Umweg der Ivabradinwirkung auf den  $I_h$  gelungen, seine Wirkung auf HCN Kanäle abzuleiten (Bois et al. 1996; Bucchi et al. 2002).

2. Eine weitere Fragestellung ist die Differenzierung der Ivabradinwirkung auf die verschiedenen HCN Kanäle. Diese Fragestellung ist insbesondere im Hinblick auf die Eignung als Medikament wichtig. Es finden sich an verschiedenen Stellen des Organismus unterschiedliche Kanaltypen: im menschlichen Herzen nur HCN2 und HCN4 (Ludwig et al. 1999; Stieber et al. 2005), an Nervenzellen und retinalen Neuronen vorwiegend HCN1 (Moosmang et al. 2001). Stellt sich nun eine stärkere oder schwächere Wirkung auf einzelne HCN Isoformen heraus, so könnte dies z.B. eine besonders gute Wirkung am Herzen mit nur

geringen Wirkungen an Nervenzellen bedeuten oder auch ein relativ hohes Nebenwirkungsrisiko dank stärkerer Wirkung an HCN Isoformen, die in erster Linie außerhalb des Reizbildungssystems vorkommen.

**3.** Ein weiteres Ziel sind Untersuchungen zur potentiellen klinischen Anwendung des Ivabradins. Hierzu sollen Dosis-Wirkungskurven der einzelnen Kanaltypen erstellt werden und  $IC_{50}$  Werte, welche eine Basis für die Medikamentendosierung in der Praxis darstellen, ermittelt werden. Untersucht werden soll auch, ob es Maximaldosen gibt, bei denen eine Steigerung der Medikation keinen Einfluss auf Ionenströme mehr hätte. Die Kenntnis solcher Maximaldosen ist insbesondere im Hinblick auf Medikamentenüberdosierungen wichtig.

**4.** Als Letztes geht es um die Analyse der erhaltenen Strom- und Dosis-Wirkungskurven zur Gewinnung neuer Erkenntnisse über die Pharmakokinetik des Ivabradins. Dabei sind insbesondere Zusammenhänge zwischen der Wirkung auf die verschiedenen HCN-Kanalisformen und dem Ivabradinbindungsverhalten interessant. Diese Erkenntnisse könnten auch dazu beitragen, das Wissen über Substanz-Kanal-Interaktionen im Allgemeinen zu erweitern.

## 2. METHODEN

### **2.1 Ivabradin**

Für die Messungen wurde der Wirkstoff Ivabradin ( S-16257 ) vom Institut de Recherches Servier, Suresnes, Frankreich verwendet. Die Trockenvorräte hatten ein Molekulargewicht von 507,0 g/mol und wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Für die Versuche wurde die Trockenmasse in bidest H<sub>2</sub>O (Millipore) zu 10 mmol/l gelöst und dann als Aliquot bei -20 °C nicht länger als 1 Jahr gelagert. Erst am Versuchstag selber wurde die Wirkstofflösung mit verschiedenen Mengen an frisch steril filtrierter Badlösung (Zusammensetzung S. 21) verdünnt, was die Untersuchung der Ivabradinwirkung bei verschiedenen Konzentrationen ermöglichte. Bei allen Ivabradinvorräten und -lösungen wurde streng auf Lichtschutz geachtet, da der Wirkstoff lichtempfindlich ist.

### **2.2 Zellkultur**

Zur Expression der humanen HCN (hHCN) Kanäle wurden HEK293-Zellen verwendet. HEK-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, die durch Transformation mit humaner Adenovirus-Typ5-DNA immortalisiert wurden (Graham et al. 1977). Die Zellen wachsen adhärent auf üblichen Zellkulturschalen und auf mit Polylysin beschichteten Glasplättchen. Sie eignen sich gut zur funktionellen Expression einzelner HCN Kanaltypen, da sie keine endogenen HCN Kanäle und nur eine geringe Anzahl an anderen spannungssensitiven Kationenkanälen aufweisen. Die Zellen wurden zunächst in Minimal Essential Medium (MEM-EARLE (1\*) von Biochrom) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (Biochrom) kultiviert. Zur Vermeidung von bakteriellem Befall wurden 10.000 U/l Penicillin und 10.000 U/l Streptomycin zum Medium gegeben. Wiederholte Schwierigkeiten mit empfindlichen, schlecht wachsenden HEK Zellen führten zum Wechsel auf ein anderes Medium: Quantum 286 (PAA Laboratories), einem Komplettmedium für epitheliale Zellen. Es enthält bereits Serumbestandteile. Penicillin und Streptomycin wurden ebenfalls in Mengen von 10.000 U/l zugegeben. Das Komplettmedium erwies sich als besser für die Zellkultivierung: die Zellen, die darin angezogen wurden, waren zumeist widerstandsfähiger und besser transfizierbar; das Quantum-Medium wurde daraufhin für alle Zellen verwendet. Die HEK Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub> Luftgehalt von 6 % gehalten.

Für die elektrophysiologische Untersuchung der HCN Kanäle mit der Patch-clamp Methode (Neher & Sakmann 1976) müssen die Zellen auf Glas-Coverclips adherieren. Dazu wurden 13

mm Coverclips 24 h mit nicht-vergälltem Ethanol desinfiziert, danach auf 24-well Platten (TPP) verteilt und mit Polylysin behandelt. Das verwendete Polylysin war ein Poly-D-Lysin (Sigma) mit einem Molekulargewicht von 70,400 Da und Hydrobromidzusatz. Es trägt durch Aufbringen von positiven Ladungen auf die Glasoberfläche entscheidend zur Haftung der eher negativ geladenen Zellen bei. Die in 25 cm<sup>2</sup> Fläschchen kultivierten Zellen wurden mit PBS (phosphate buffered saline = Puffer) gewaschen und mit 10 fach konzentriertem, 1:9 mit PBS verdünntem Trypsin-EDTA (GIBCO BRL) gelöst. Das **PBS** war folgendermaßen zusammengesetzt (in g/l): 8 NaCl; 0,2 KCl; 1,44 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die im Medium (mit Serum, Penicillin/ Streptomycin) gelösten Zellen (50.000 Zellen/ ml Medium) wurden auf den polylysierten Coverclips in unterschiedlichen Mengen (2500- 4000 Zellen) zur Haftung gebracht.

### ***2.3 Transfektion***

Zur Expression der hHCN Kanäle wurde die benötigte cDNA in den tierischen Expressionsvektor pcDNA3.1(Invitrogen) kloniert. Die Plasmide wurden dann mit Hilfe von Fugene 6 (Roche), einem auf Lipidbasis wirkendem Transfektionsreagenz, in die Zellen transfiziert. Das Transfektionsreagenz bildet dazu Komplexe mit der DNA aus. Die Transfektionseffizienz des Fugene 6 betrug bei Versuchen mit für das Grün Fluoreszierende Protein kodierender DNA ca. 70 %, was einer sehr guten Transfektionseffizienz entspricht (Stieber 2001). Zur Transfektion wurde ein Gemisch aus 0,4 µg Plasmid-DNA, 24,4 µl MEM (ohne antibiotische Zusätze) und 1,2 µl Fugene 6 Reagenz in jedes Loch einer 24-well Platte gegeben, was einem Verhältnis Fugene6 / cDNA von 3:1 entspricht. In jedem Loch befanden sich zwischen 2500 und 4000 Zellen. Die DNA-Lipidkomplexe wurden durch Endozytose in die Zellen aufgenommen und die HCN Kanäle innerhalb von ca. 48 Stunden exprimiert.

Um die elektrophysiologische Untersuchung der unterschiedlichen Kanaltypen getrennt zu ermöglichen, wurde je Coverclip immer nur die für einen HCN-Kanaltyp kodierende cDNA verwendet: hHCN1, hHCN2 oder hHCN4. Es wurden für alle Untersuchungen ausschließlich humane HCN Kanäle verwendet.

### ***2.4 Elektrophysiologische Messungen***

Die elektrophysiologische Messung an den in HEK293 Zellen exprimierten HCN Kanälen wurde bei Raumtemperatur 2 bis 3 Tage nach der Zugabe des Transfektionsreagenz vorgenommen. Hierzu wurden die mit den Zellen behafteten Coverclips in mit Badlösung gefüllte Petrischalen gelegt. Die **Badlösung** war so zusammengesetzt, dass sie bis auf den

Kaliumgehalt in ihrer Ionenzusammensetzung und ihrem pH Wert in etwa dem extrazellulären Medium im humanen Körper entsprach. An Stelle der physiologischen Kaliumkonzentration von 4,7 mM wurden 20 mM verwendet, um den HCN Strom zu verstärken. Die Lösung enthielt folgende Bestandteile (in mM):

120 NaCl; 20 KCl; 1 MgCl<sub>2</sub>; 1,8 CaCl<sub>2</sub>; 10 HEPES; 10 Glukose.

Der pH Wert wurde mit 5 M NaOH auf 7,4 (+/- 0,05) eingestellt.

#### **2.4.1 Die Patch-clamp Methode**

Die von Neher und Sakmann 1976 entwickelte Patch-clamp Methode wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Ströme durch HCN Kanäle zu untersuchen. Die Strommessung mit der Patch-clamp Methode ist inzwischen eine sehr gut etablierte Methode, die auch zur Untersuchung von Pharmakawirkungen verwendet werden kann. Sie erlaubt die Erforschung der Wirkung auf einzelne Zellen, sowie die Untersuchung der Wirkung auf ganz bestimmte Membranbestandteile, wie in diesem Fall HCN Kanäle. Hierzu wurde in der sogenannten Ganzzellkonfiguration gemessen. Im Folgenden soll eine kurze Einführung in die Patch-clamp Methode zeigen, wie diese Technik die Untersuchung der Ivabradinwirkung ermöglichte. Eine ausführliche Einführung in die Methode findet sich z.B. in Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes (Sakmann & Neher 1984).

Zur Herstellung der benötigten Mikropipetten wurden feine Borosilikatkapillaren (Harvard Apparatus LTD) mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm so gezogen, dass sie nach Einfüllen der „Intrazellulärlösung“, deren Bedeutung und Zusammensetzung später behandelt wird, 3-5 MΩ Widerstand aufwiesen. Die Pipettenspitzen wurden zur Vermeidung von scharfen Kanten, welche die Zellmembran verletzen könnten, hitzepoliert. Diese Pipetten wurden dann so auf einzelne Zellen platziert, dass eine dichte Verbindung zwischen Zellwand und Pipette entstand. Durch Anbringen von Unterdruck über das Pipetteninnere konnten Seal-Widerstände im GΩ Bereich erreicht werden, was dem sogenannten „Giga-Seal“ entsprach. Darauf folgend wurde die Zellmembran durch Erhöhung des pipetteninternen Unterdrucks zur Bildung einer Öffnung ausschließlich unterhalb der Pipettenöffnung gebracht. Der Seal blieb dabei bestehen, so dass nun eine Verbindung zwischen Pipetteninnerem und Zellinnerem gegeben war, ohne das ein Kontakt des „Innenraumes“ zur Extrazellulärflüssigkeit, in dem die Zelle schwamm, bestand. Die aufgesetzte Pipette war mit einer Flüssigkeit gefüllt, die in ihrer Ionenzusammensetzung und ihrem pH Wert der Intrazellulärflüssigkeit entsprach.

Die „**Pipettenlösung**“ (= **Intrazellulärlösung**) bestand aus folgenden Stoffen (in mM):

10 NaCl; 30 KCl; 90 Kalium-Aspartat; 1 MgSO<sub>4</sub>; 5 EGTA; 10 HEPES.

Der pH Wert wurde mit 5 M KOH auf 7,4 (+/-0,05) eingestellt.

Zwei Elektroden ermöglichten nun den Nachweis von Ionenströmungen durch die Kanäle der Zelle, da die Elektroden leitende Verbindungen zwischen Zellinnerem/ -äußerem und Verstärker darstellten. Eine der beiden Elektroden, die sogenannte Badelektrode wurde in der Badlösung platziert, also in der Extrazellulärflüssigkeit, während die zweite Elektrode im Inneren der Pipette, umspült von der Intrazellulärlösung, angebracht war.

Beide Elektroden waren Silberchloridelektroden, wobei die Intrazellulärelektrode immer wieder nachchloriert werden musste, da der dunkelgraue Chloridüberzug durch das Wechseln der Pipetten nach und nach abgeschilfert wurde. Die Pipetten wurden nach jedem Zellkontakt gewechselt. Die Pipettenelektrode wurde mit einem Vorverstärker verbunden und diente als Messelektrode, während die Badelektrode an den Erdungseingang des Vorverstärkers angeschlossen wurde und als Referenzelektrode diente.

#### ***2.4.1.1 Funktionsprinzip der Patch-clamp Methode***

Über die beiden Elektroden wird eine sogenannte Spannungsklemme an die Zelle angelegt.

Diese sorgt dafür, dass das Membranpotential stabil bleibt, was Messungen bei konstanten Membranverhältnissen und Kanalöffnungszuständen ermöglicht. Um das Membranpotential stabil zu halten, erzeugt der Verstärker einen sogenannten Kompensationsstrom. Der Kompensationsstrom ist genauso groß wie der Strom, der durch Ionenverschiebungen durch die Zellkanäle entsteht, nur dass der Kompensationsstrom entgegengerichtet ist. Dies erfolgt durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem das Membranpotential (die Spannung) gemessen und mit der vorgegebenen Sollspannung verglichen wird. Ein Regler injiziert dann entsprechend der Höhe der Abweichung entgegengerichteten Strom in die Zelle. Dieser nötige Kompensationsstrom wird dann gemessen, digitalisiert und zur Beurteilung der Leitfähigkeit der Membran verwendet. Man bedient sich hier dem Ohm'schen Gesetz, welches über  $U = R \cdot I$  einen Zusammenhang zwischen Strom (I) und Spannung (U) herstellt. Durch Einbringen der Leitfähigkeit in diesen Zusammenhang wird ersichtlich, wie dieser ganze Schaltkreis eine Aussage zum Ionenfluß durch die HCN Kanäle zulässt:

$$\text{Leitfähigkeit } g = 1/R \rightarrow I = U \cdot g$$

$U = U_{\text{soll}} - E_m$ , wobei  $U_{\text{soll}}$  die angelegte Sollspannung und  $E_m$  das Gleichgewichtspotential der Zellmembran, bei dem keine Ionenströme durch den Kanal fließen würden, darstellt. Es gilt demnach:  $I = (U_{\text{soll}} - E_m) \cdot g$ . Aus den Meßgrößen Kompensationsstrom I, Sollspannung  $U_{\text{soll}}$  und Gleichgewichtspotential  $E_m$  kann also direkt auf die Leitfähigkeit geschlossen werden. Diese Leitfähigkeit spiegelt die Zahl der aktuell offenen bzw. leitenden Ionenkanäle

wieder, so dass die Ivabradinwirkung an den HCN Kanälen über die Leitfähigkeit direkt beurteilt werden kann.

#### ***2.4.1.2 Experimenteller Aufbau:***

##### *Der Amplifier*

Der Amplifier besteht aus zwei Komponenten: dem Vorverstärker und dem Verstärker.

Der Vorverstärker (Axon Instruments) misst das Stromsignal, führt dann eine Strom-Spannungswandlung durch und gibt das Signal als Spannung aus. Er vergleicht die gemessene Spannung mit der Sollspannung und enthält den Regler, der den Kompensationsstrom induziert. Der bei den Versuchen verwendete Verstärker (Axopatch 200B, Axon Instruments) war ein „kapazitiver Feedback Verstärker“, welcher nur geringes Rauschen verursacht und so störungsarme Messungen erlaubt. Er steht in direkter Verbindung zum Vorverstärker, liefert diesem die vom Untersucher gewünschte Sollspannung und misst den benötigten Kompensationsstrom.

##### *Der Filter*

Der verwendete Filter (npi electronic GmbH) war ein Tiefpassfilter, welcher das hochfrequente Rauschen der Signale absenkte. Dies war nötig, um die Umwandlung dieses Rauschens in artifizielle Scheinsignale (Shannon-Nyquist'sches Sampling Theorem) zu vermeiden, was bei der Digitalisierung von falsch hohen Signalen vorkommen kann. Es wurden alle Frequenzen oberhalb von 2 kHz rausgefiltert.

##### *Der AD-Wandler*

Die Messdaten des Patch-Clamp-Experiments verlassen den Verstärker in Form von analogen Signalen. Um diese per Computersoftware auswerten zu können, wurden sie mit einem AD-Wandler (Axon Instruments, DigiData 1200 Series) digitalisiert.

##### *Die Umspülung*

Um die Wirkung des Ivabradins auf die HCN Kanäle der HEK Zellen zu testen, wurden diese mit in Badlösung (Zusammensetzung siehe S.21) gelöstem Wirkstoff umspült. Um das Medikament möglichst nah an die Zelle zu bringen, wurde ein in unserem Institut entwickeltes System verwendet: mehrere offene Einwegspritzen wurden über Schläuche mit einer aus Plastik bestehenden Pipettenspitze verbunden. Die Verbindung zwischen den Schläuchen und der Pipettenspitze bestand aus einem Plexiglaskegel, durch den mehrere Bohrungen zur Spitze führten. Dieses System zur Umspülung der Zelle funktionierte über die Schwerkraft der Lösungen, welche höher angebracht waren als die Zellen. Über in die

Schläuche eingebaute Magnetventile konnte gesteuert werden, aus welcher/ welchen Einwegspritzen die Lösungen zur Umspülung der Zelle verwendet werden.

Die Umspülung der Zellen mit Ivabradin in verschiedenen Konzentrationen wurde folgendermaßen durchgeführt: Die untersuchte Zelle wurde in Ganzzellkonfiguration gebracht und vorerst die Qualität des Seals, ebenso wie die Widerstandfähigkeit der Zelle gegenüber Spannungsänderungen geprüft. Hierzu wurde die Zelle, wie im Folgenden beschrieben, zwischen 20 und 100 mal aktiviert, was einem „Durchgang“ entsprach. Nach diesem erfolgreichem Vorlauf wurde die Zelle 10 min lang, bei gehaltenem Ruhemembranpotential mit der Ivabradinlösung umspült. In der direkt an die 10-minütige Einwaschphase anschließenden Messphase wurde durchgehend mit der Ivabradinlösung umspült.

#### Die Software

Die gefilterten und anschließend digitalisierten Daten wurden mit speziell für Patch-clamp Messungen entwickelter Software erfasst: pClamp7(Axon Instruments). Zur Auswertung der Daten wurde die Origin6.1 Software (Microcal) verwendet.

#### **2.4.1.3 Vorgehen bei der Ganzzelleableitung:**

Die Ganzzelleableitung ist die Variante der Patch-clamp Methode, die eine Beurteilung der Ströme der ganzen Zelle erlaubt (Hamill et al. 1981). In den durchgeführten Versuchen erlaubt sie also eine Beurteilung der Offen- oder Geschlossenzustände aller HCN Kanäle einer Zelle. In der praktischen Durchführung wird zunächst mit der Beurteilung der Funktionalität der Bad- (= Vergleichselektrode) und der Messelektrode begonnen. Funktionierende, richtig angeschlossene und sinnvoll in den zur Messung verwendeten Stromkreislauf eingebundene Elektroden erkennt man an einer rechteckförmigen Stromantwort. Diese sollte sich bei Eintauchen der Pipettenspitze in die Badlösung als Antwort auf den applizierten Kommandospannungspuls zeigen. Die eingetauchte Pipette dient hierbei, wie oben beschrieben, als Messelement. Die rechteckförmige Stromantwort dient außerdem zur Beurteilung der korrekten Einstellungen an den Messgeräten und den Softwareprogrammen.

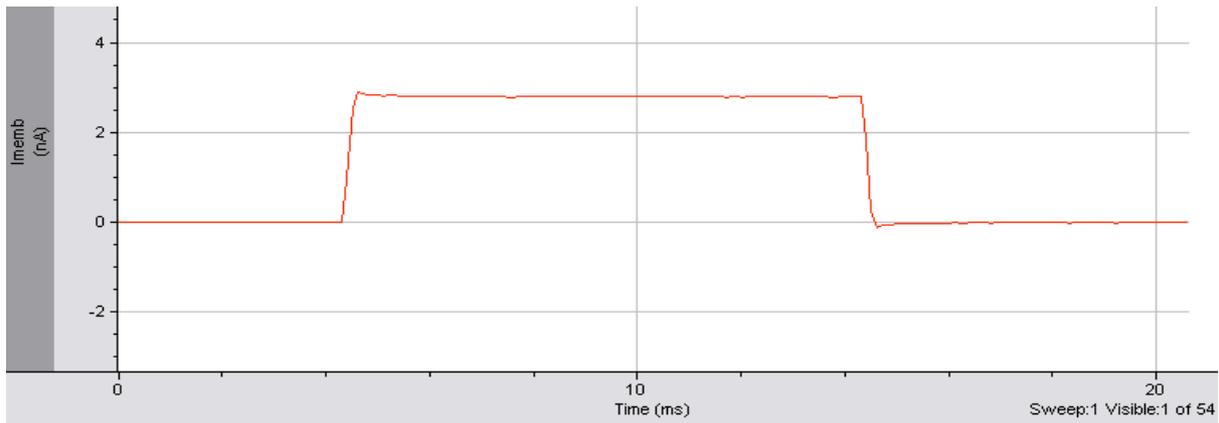
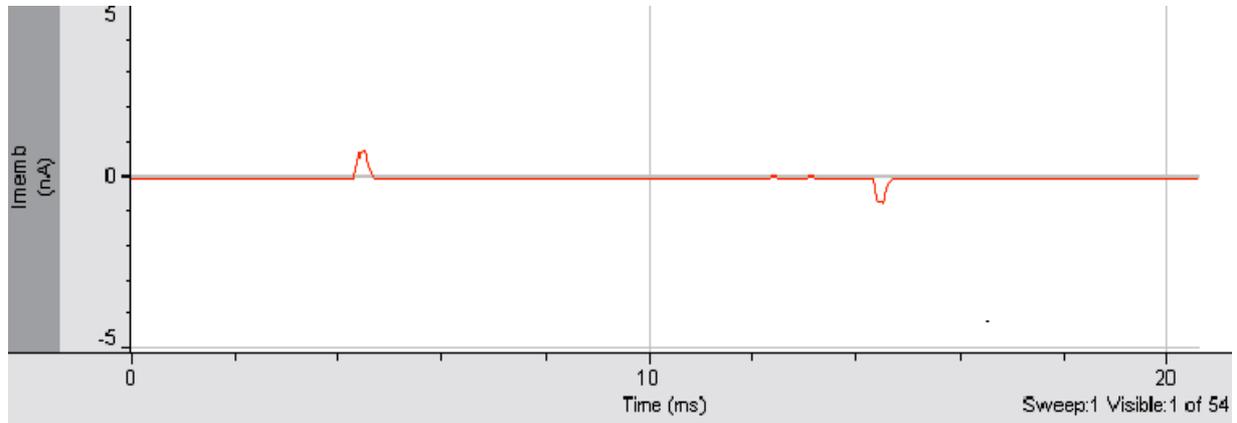


Abbildung 6 zeigt die rechteckförmige Stromantwort auf einen applizierten Stromspannungspuls. Auf der y-Achse ist die Stromantwort des Meßsystems dargestellt, welche ohne HEK Zelle entsteht [nA]. Die x-Achse stellt den zeitlichen Verlauf in [ms] dar.

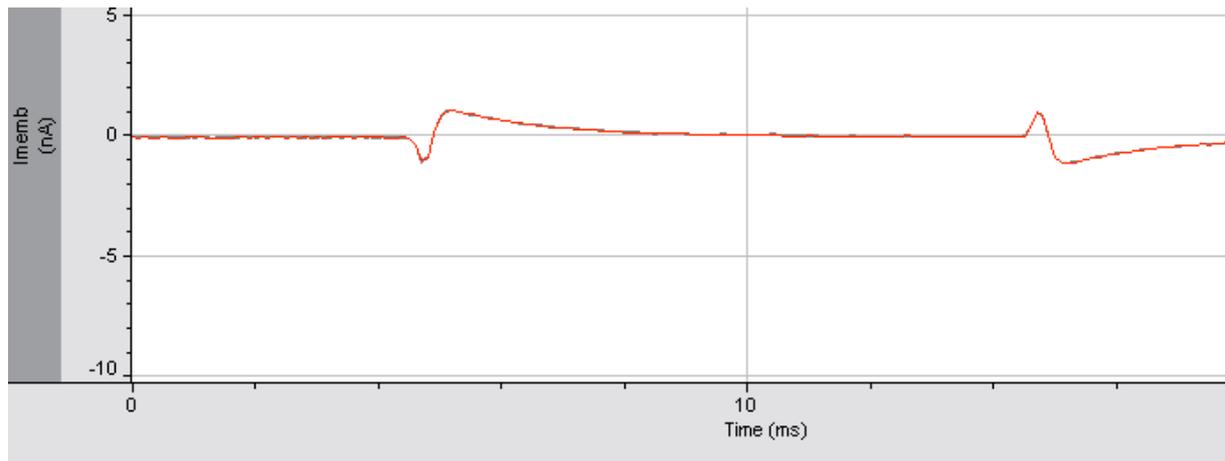
Ist die Funktion der Elektroden und somit die rechteckförmige Stromantwort zufriedenstellend, so gleicht man als nächstes das sogenannte Offsetpotential aus, bzw. legt den Nullwert für das Potential fest. Das Offsetpotential ist ein Potential, welches durch Spannungen, die an Medienübergängen entstehen, verursacht wird. Solche Übergänge bieten die Grenzflächen Silberdraht/ Badlösung und Silberdraht/ Pipettenlösung. Um dieses auszugleichen, bringt man die in die Badlösung getauchte Pipettenspitze in die Nähe der ausgewählten Zelle, da sich sogar innerhalb der Badlösung Unterschiede im Offsetpotential darstellen. Man setzt dann die Stromantwort  $I_{memb} = 0$ , womit man das Offsetpotential ausgeglichen hat. Die Pipette wird nun vorsichtig unter Sichtkontrolle auf die zu untersuchende Zelle aufgesetzt, wozu ein inverses Mikroskop (Axiovert 135 Mikroskop, Zeiss) verwendet wurde. Das Aufsetzen der Pipette auf die Zelle kann man allerdings besser an der Veränderung der rechteckigen Stromantwort erkennen; setzt man die Pipette alleine unter zur Hilfenahme der Sichtkontrolle auf, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Zellmembran dabei Schaden nimmt, außerordentlich hoch. Beim Aufsetzen der Pipette nimmt die Stromamplitude durch die Erhöhung des Pipettenwiderstandes etwas ab. Dieser Effekt wird für die genaue Positionierung ausgenutzt. Hat man die Pipette erfolgreich aufgesetzt, versucht man als nächstes die „cell-attached“ Konfiguration herzustellen, bei der Widerstände von 10-100 G $\Omega$  erreicht werden; es handelt sich dann um einen sogenannten Giga-Seal. Man erreicht den Giga-Seal, indem man über das Innere der Pipette einen Unterdruck appliziert. Den vollständigen Giga-Seal erkennt man an der Stromantwort auf den Kommandospannungspuls; sie besteht lediglich noch aus einer Linie mit zwei kapazitiven Artefakten am Anfang und am Ende des Stromspannungspulses (Abbildung 7).

Bei den kapazitiven Artefakten handelt es sich um die sogenannte Streukapazität, welche dann als Ausschlag der Linie erscheint. Sie entsteht durch Ladungsverschiebungen in den Grenzflächen Bad-Pipette, welche durch Spannungsänderungen (z.B. bei Hyperpolarisation auf  $-10$  mV) entstehen.



**Abbildung 7.** Darstellung der „cell-attached“ Konfiguration einer HEK Zelle mit ausgebildetem Giga-Seal. Auf der y-Achse ist der Strom durch die Membran der „geklampten“ Zelle aufgetragen [nA], auf der x-Achse der zeitliche Verlauf [ms]. Wie hier gezeigt, fließt bei gehaltenem Ruhemembranpotential kein Strom, die zwei dargestellten Zacken stellen kapazitative Artefakte dar.

Ein dichter, guter Seal ist eine absolut notwendige Voraussetzung für die Messung der Kanalströme. Bei nicht vollständigem Seal werden die Messdaten durch Leckströme verfälscht, falls die Ganzzellkonfiguration überhaupt erreicht werden kann. Leckströme entstehen durch Flüssigkeits- und Ionenaustausch zwischen Intra- und Extrazellulärraum an der Aufsatzstelle der Pipettenspitze. Diese Ionenverschiebungen täuschen Ionenströme durch die Kanäle der Zellmembran vor. Um aus der cell-attached Konfiguration die Ganzzellkonfiguration herzustellen, wird die Zellmembran, die sich direkt unterhalb der Pipettenspitzenöffnung befindet, durch Erhöhung des pipetteninternen Unterdrucks zum Reißen gebracht. Es bildet sich eine Verbindung zwischen Zellinnerem und Pipetteninnerem. Dieser Vorgang ist nicht ganz einfach, häufig reißen dabei größere Membranareale ein, wodurch dann entweder der Seal undicht wird oder die Zellmembran gleich komplett zerreißt. Das kann allerdings sofort an einer veränderten Stromantwort festgestellt werden, die Linie fällt dann unter das Nullpunktniveau. Bei Ausbildung der Membranöffnung ohne Zerstörung des Seals kann man die Ausbildung zweier Zacken bei ansonsten erhaltener Linie auf Nullpunktniveau feststellen (Abbildung 8).



**Abbildung 8.** Abbildung einer in Ganzzellkonfiguration „geclampten“ Zelle. Auf der y-Achse ist der Strom durch die Membran der HEK Zelle aufgetragen [nA], auf der x-Achse der zeitliche Verlauf [ms]. Zu sehen sind die Membranverhältnisse bei gehaltenem Ruhepotential: es fließt kein Strom, bei den Zacken handelt es sich um kapazitative Artefakte, welche aber in dieser Form für die Ganzzellkonfiguration typisch sind.

## **2.5 Elektrophysiologische Messungen an HCN Kanälen**

Die Aktivierung der HCN Kanäle führt zur Öffnung der Pore. Abhängig von der angelegten Spannung führt das zu einem Natrium-/Kaliumionenstrom durch die Pore. Aktiviert werden die HCN Kanäle durch Hyperpolarisation der Zellmembran (hyperpolarisationsaktivierte Kationenkanäle), wobei sich die Aktivierungskinetik der verschiedenen Kanaltypen (HCN1, HCN2, HCN4) unterscheidet. In den durchgeführten Experimenten interessieren im Sinne der Aktivierungskinetik vor allem die zur Kanalöffnung benötigte Intensität und die Dauer der Hyperpolarisation. Die entstehenden Ionenströme können mit Hilfe der beschriebenen Patch-clamp Methode als „echte“ Ströme (I) in nA gemessen werden.

### **2.5.1 Das Stromprotokoll**

Die verwendete pClamp7 Software erlaubt es dem Benutzer die Parameter des sogenannten Stromprotokolls selber zu bestimmen. Mit dem Stromprotokoll wird zum Einen eine „Ruhephase“ zwischen den Hyperpolarisationsphasen („Aktivierungsphasen“) und zum Anderen die Aktivierungsphasen, in denen der sogenannte Stromspannungspuls appliziert wird, festgelegt.

#### **Ruhephasen**

In den Ruhephasen wird die in Ganzzellkonfiguration geclampte Zelle bei Ruhemembranpotential gehalten. Das Ruhemembranpotential wurde auf  $-40$  mV festgelegt, einem Potential, bei dem noch keiner der Kanaltypen aktiviert ist. Es entstehen also keine Ionenströme (Ludwig et al. 1998).

### ***Aktivierungsphase***

In der Aktivierungsphase wird der Stromspannungspuls appliziert. Die Intensität und die Dauer der im Rahmen des Stromspannungspulses induzierten Membranhyperpolarisation hängt vom untersuchten HCN Kanaltyp ab, was wiederum an den unterschiedlichen Aktivierungskinetiken der Kanalisoforamen liegt.

#### a) die Intensität

Als Intensität wurde ein Wert gewählt, der möglichst nah am  $V_{1/2}$  (Potential der halbmaximalen Aktivierung) der untersuchten Kanaltypen liegt.  $V_{1/2}$  hat bei den drei Kanaltypen unterschiedliche Werte, um aber die Messungen an HCN1, HCN2, HCN4 dennoch vergleichen zu können, wurde immer ein Stromspannungspuls mit dem gleichen Wert verwendet: -100 mV.  $V_{1/2}$  für HCN1 liegt bei ca. -80 mV, für HCN2 bei  $-97 \pm 1$  mV und für HCN4 bei  $-109 \pm 1$  mV (Ludwig 2000), so dass bei -100 mV und der verwendeten, unterschiedlichen Längen der Pulsdauern (s.u.) alle Kanaltypen ungefähr halbmaximal aktiviert sind.

#### b) die Dauer

Im Gegensatz zur Intensität der Hyperpolarisation, die für alle drei Kanaltypen den gleichen Wert erhielt, war die Dauer des Stromspannungspulses verschieden, da alle HCN Kanäle unterschiedliche Aktivierungskinetiken haben (Stieber et al. 2005). Es ließen sich in folgender Reihenfolge ansteigende Aktivierungszeiten feststellen: hHCN1 < hHCN2 < hHCN4. Die zur Aktivierung benötigten Zeiten wurden über die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanaltyps nach einer bestimmten Hyperpolarisationszeit ( $P_{\text{offen}}$ ) veranschaulicht. Dies erleichtert den Vergleich der Aktivierungsgeschwindigkeit der drei Kanaltypen.

	HCN1	HCN2	HCN4
$P_{\text{offen}}$	maximal	0,5	0,1

Tabelle 1.  $P_{\text{offen}}$  nach 2 s dauerndem Stromspannungspuls (Membranpotential = - 100 mV)

Um am Ende des Stromspannungspulses die gleiche  $P_{\text{offen}}$  für alle Isoformen zu erreichen, wurden folgende Pulsdauern verwendet:

	Aktivierung [s]	Deaktivierung [s]
HCN1	0.5	0.5
HCN2	2	2
HCN4	10	10

Tabelle 2. Aktivierungs- und Deaktivierungspulsdauern.

Betrachtet man nun die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle, so stellt man fest, dass mit den gegebenen Zeiten die  $P_{\text{offen}}$  am Ende des Kommandospannungspulses für alle Kanaltypen gleich ist, nämlich 0,5. Dies ermöglicht später den Vergleich der Stromkurven und der Ivabradinwirkung auf die einzelnen Kanaltypen. Das zur Festlegung der Ruhe- und Aktivierungsphasen verwendete Stromprotokoll ist in der folgenden Abbildung (Abb. 9) dargestellt.

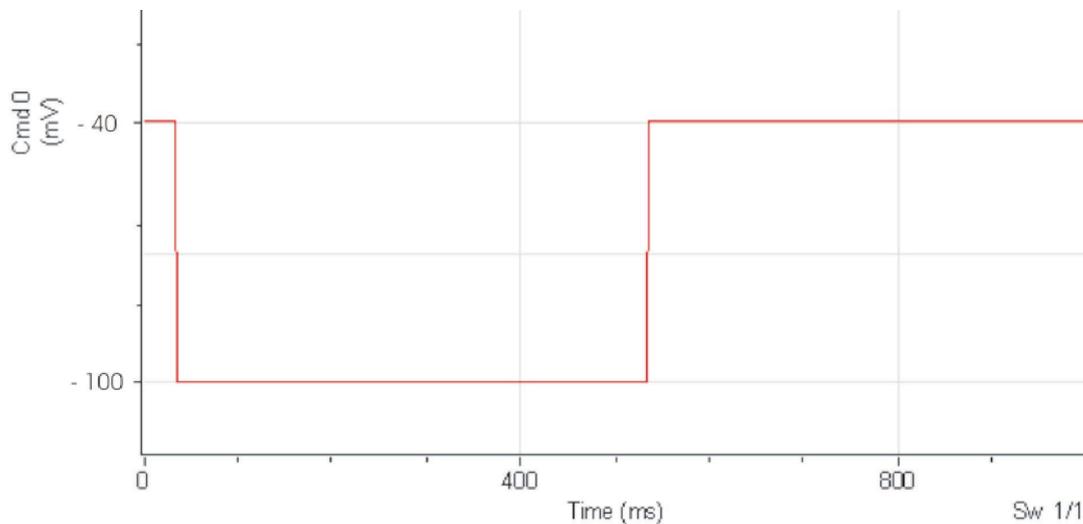


Abbildung 9 zeigt das verwendete Stromprotokoll. Auf der y-Achse ist die erwünschte Veränderung des Membranpotentials der untersuchten Zelle aufgetragen, auf der x-Achse die Zeit [ms]. Das vorgegebene Ruhemembranpotential beträgt  $-40$  mV. Der Stromspannungspuls hyperpolarisiert die Zellmembran um  $-60$  mV auf ein Membranpotential von  $-100$  mV. Die Dauer des Stromspannungspulses ist abhängig von der untersuchten Kanalisform, in dieser Abbildung betragen Ruhephase und Puls je  $0,5$  s. Das gezeigte Protokoll wurde für die Messung an HCN1 Kanälen verwendet.

### 2.5.2 Das Aktivierungsschema

Der einmalige Durchlauf des Stromprotokolls induziert eine einmalige, kurze Porenöffnung der HCN Kanäle. Da aber zur Untersuchung der Ivabradinwirkung der Öffnungszustand der Kanäle im zeitlichen Verlauf interessiert, muss der Durchlauf des Stromprotokolls mehrere Male wiederholt werden. In vorangegangenen Untersuchungen (Bucchi et al. 2002, Bois et al. 1996), in denen die blockierende Wirkung von Ivabradin auf native  $I_h$  Ströme untersucht wurde, wurde festgestellt, dass Ivabradin seine Wirkung nur bei wiederholten Aktivierungen entfaltet. Eine Dauerhyperpolarisation der Zellmembran führt nicht zur vollständigen Blockierung der Kanäle und ist darüber hinaus letal für die Zellen.

Die wiederholten Aktivierungen wurden aus praktischen Gründen in "Durchgänge" eingeteilt. Zum Einen konnten so die Daten in einzelnen Dateien mit verwaltbaren Größen gespeichert werden, zum Anderen sollte regelmäßig die Membrankapazität nachkontrolliert werden (s.u.), wozu die eigentlichen Messungen unterbrochen werden mussten. Um in etwa gleiche Zeiten zwischen diesen Kontrollpunkten zu erreichen, war die Anzahl der wiederholten Aktivierungen pro "Durchgang" unterschiedlich:

	HCN1	HCN2	HCN4
Anzahl der Wiederholungen	100	50	20

Tabelle 3. Anzahl der Wiederholung des Aktivierungsvorgangs beim jeweiligen Kanaltyp

Da die Aktivierungszeiten für die einzelnen Isoformen unterschiedlich waren (s. Kap. 2.5.1b), resultieren daraus in etwa gleiche Durchgangsdauern.

#### 2.5.2.1 Die Membrankapazität

Die Membrankapazität erlaubt eine Aussage über den Zustand der betrachteten Zelle. Wird die Zellmembran durch die zahlreichen Aktivierungen geschwächt und somit durchlässiger für Ionen, die durch die Membran selber, unabhängig von offenen oder geschlossenen HCN Kanälen diffundieren, so kann man dies an der fallenden Membrankapazität erkennen. Ebenso an einer fallenden Membrankapazität ersichtlich wird die Durchmischung von Pipettenlösung mit Zytoplasma, falls es dadurch zum Verlust für die Zelle wichtiger Substanzen wie cAMP oder cGMP kommt. Die Kapazität ist definiert als die Ladungsmenge, die notwendig ist, um einen Gegenstand mit einem bestimmten elektrischen Potential zu versehen. Die Kompensation der Membrankapazität bei deren Veränderung kann vom Anwender mit Hilfe

des Verstärkers manuell vorgenommen werden. Bei Veränderung der Membrankapazität wurde die Höhe der Abweichung am Verstärker abgelesen und dokumentiert, um später nachvollziehen zu können, welche Messergebnisse durch das Abfallen der Membrankapazität bedingt sein könnten. Die Beschreibung der Membrankapazität macht verständlich, warum in sogenannten **Durchgängen** gemessen wurde. Dieses Vorgehen ermöglichte die regelmäßige, in gleichen Abständen wiederholte Kontrolle des Zellzustandes durch das Überprüfen der Membrankapazität.

### ***2.6 Dosis-Wirkungskurve und Berechnung des Hill Koeffizienten***

Zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurven wurden die durchschnittlichen Werte der prozentualen Stromreduktion durch Ivabradin (% Block) in Abhängigkeit von der Konzentration des Wirkstoffs aufgetragen. Um die Steigungen (Hill Koeffizienten) und Wendepunkte ( $IC_{50}$ ) der Dosis-Wirkungskurven zu berechnen, wurden die linear (% Block) – logarithmisch (Ivabradindosis) aufgetragenen Werte nach folgendem Modell gefittet:

$$y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + (x / x_0)^n).$$

$A_1$  = initialer y-Wert

$A_2$  = letzter y-Wert

$x_0$  = Wendepunkt

$n$  = Exponent

### ***2.7 Statistische Auswertung***

Zur statistischen Auswertung wurde der t-Test verwendet, und zwar der "independent Type". T-Test Ergebnisse bei denen  $p < 0.05$  war, wurden als signifikant eingestuft.

Die Formel, die dem t-Test zugrunde liegt ist folgende:

$$t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) : \sqrt{s^2 (1/n_1 + 1/n_2)},$$

$$\text{wobei } s^2 = [(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2] : (n_1 + n_2 - 2)$$

$\bar{x}_1$  = Mittelwert der Ergebnisse aus der ersten Datengruppe

$\bar{x}_2$  = Mittelwert der Ergebnisse aus der zweiten Datengruppe

$s_1$  = Standardabweichung Datensatz 1

$s_2$  = Standardabweichung Datensatz 2

$n_1, n_2$  = Anzahl der Daten des entsprechenden Datensatzes

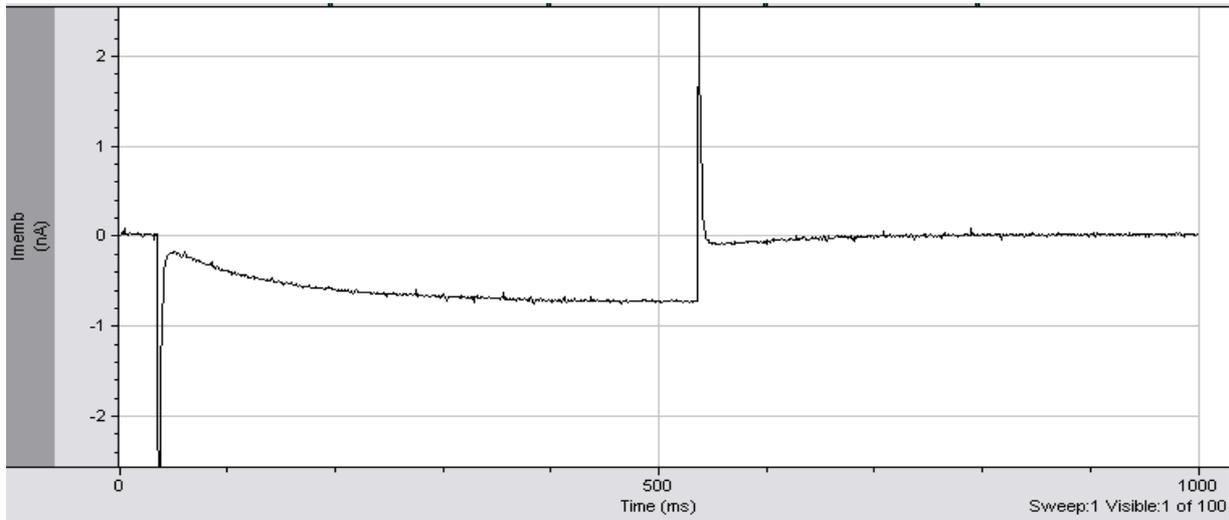
Die praktische Durchführung des t-Tests sah bei einer gegebenen Ivabradinkonzentration von z.B. 2  $\mu\text{M}$  folgendermaßen aus. Verglichen wurden die vier Messungen an HCN1 Kanälen mit den fünf Messungen an HCN2 Kanälen. Im Rahmen des t-Tests wurden die Werte der einzelnen Messungen gemittelt und der Mittelwert dann verglichen, wobei die Standardabweichung mit in die Berechnung des t-Wertes einging. Bei diesem Beispiel ergab der t-Test einen nicht signifikanten Unterschied zwischen HCN1 und HCN2 bei 2  $\mu\text{M}$  Ivabradinkonzentration.

## 3. ERGEBNISSE

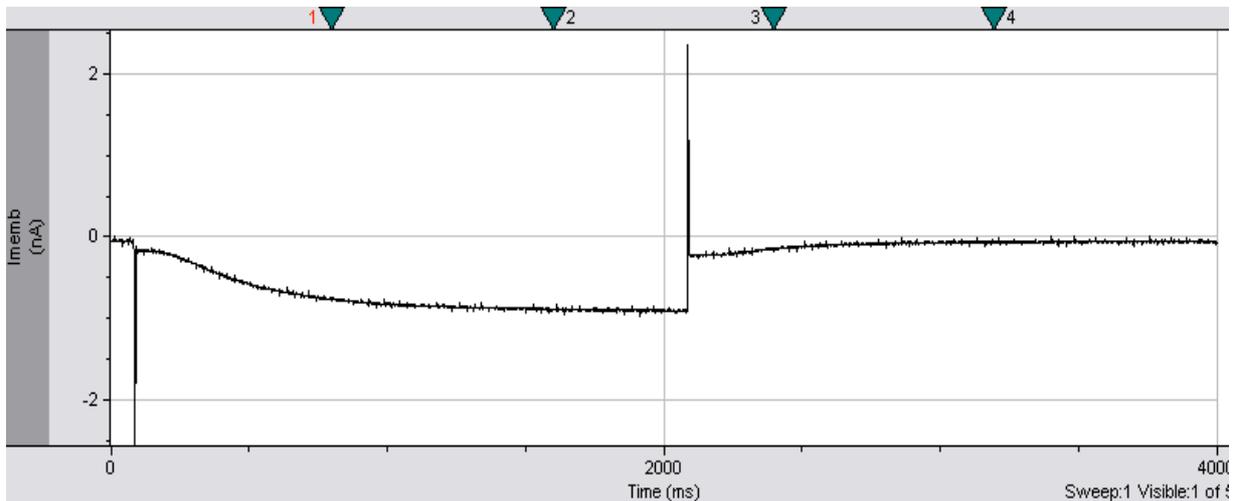
### *3.1 Strommessung*

Um die Ströme durch die HCN Kanäle der Zelle zu messen, wurde das im Methodenteil beschriebene Stromprotokoll verwendet (Abbildung 9). Die Zellmembran der in Ganzzellkonfiguration geclampten Zelle wurde initial zur Stabilisierung der Spannungsverhältnisse kurz auf Ruhemembranpotential (-40 mV) gehalten. Da hierbei kein Strom durch HCN- und andere Kanäle fließt, läuft die Stromkurve Anfangs auf dem Nullniveau  $I_{\text{memb}}$  (Membranstrom)=0 (Abbildungen 10, 11, 12).

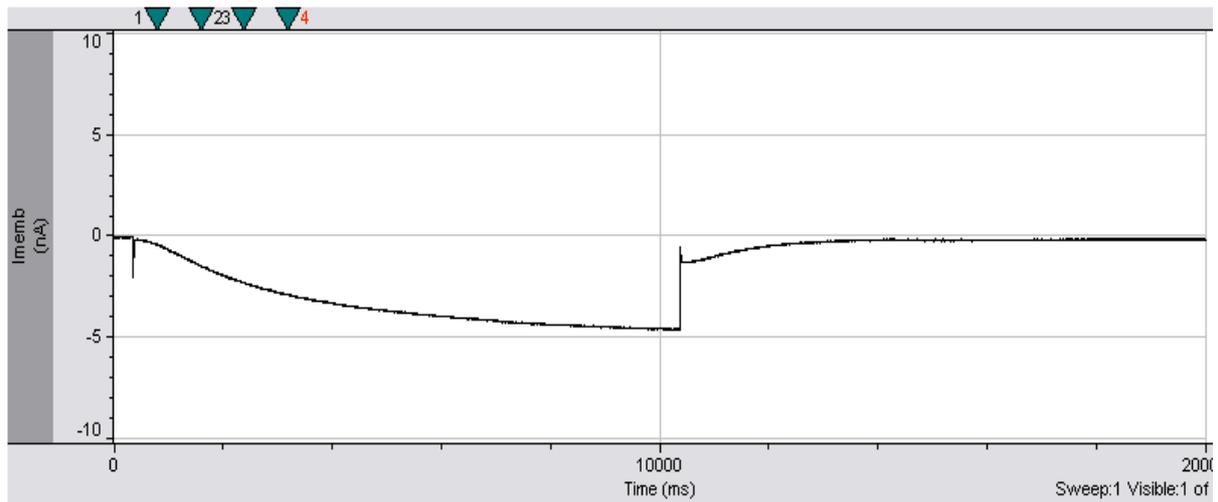
Die Hyperpolarisation der Zellmembran durch den Stromspannungspuls sorgt für die Öffnung der HCN Kanäle, wie man an der resultierenden Stromkurve erkennen kann. Bei der Messung in Ganzzellkonfiguration erfasst man die Öffnungszustände aller HCN Kanäle einer Zelle. Die als Antwort auf die Membranhyperpolarisation erhaltenen Stromkurven stellen also die Summe aller Einzelkanalstromkurven dar. Durch das Zurückkehren auf das Ruhepotential nach der Applikation des Stromspannungspulses versiegt der Stromfluss mit einer kurzen Zeitverzögerung wieder,  $I_{\text{memb}}$  ist wieder auf Nullniveau. In den Abbildungen erkennt man außerdem die auch hier vorhandenen, kapazitiven Artefakte am Anfang und am Ende des Stromspannungspulses. Anmerkung: Wie aus den Abbildungen hervorgeht, unterscheiden sich die Stromkurven der Kanalisoformentypen in ihrer Form wenig, der Hauptunterschied liegt in der Geschwindigkeit der Aktivierung (man beachte hierbei die Zeitachse der Graphen). Unterschiede der Stromkurven (Stromamplituden), die unabhängig von der Isoform sind, sind bedingt durch die Anzahl der in der Zellmembran der untersuchten Zelle vorhandenen und auch offenen HCN Kanäle. Die Anzahl der vorhandenen Kanäle variiert mit jeder einzelnen Zelle. Dies stellt jedoch keinen Nachteil für die Untersuchung der blockierenden Ivabradinwirkung dar, da immer von der für jede Zelle neu gemessenen Stromkurve ohne Ivabradineinwirkung ausgegangen wird. Die in den Abbildungen 10 bis 12 mit den Isoformen zunehmende Stromamplitude ist Zufall.



**Abbildung 10.** Darstellung des Stroms durch die HCN1 Kanäle einer HEK Zelle im Rahmen einer Aktivierung (Sweep). Die Zelle wurde zur Strommessung in die Ganzzellkonfiguration gebracht und der Stromfluss durch den Stromspannungspuls ermöglicht. Die Dauer des Stromflusses und der Ruhephase entsprach dem zugehörigen Stromprotokoll: je 0,5 s bei Ruhemembranpotential (-40 mV) und Hyperpolarisation (-100 mV). Die Stromamplitude betrug ca. 0,55 nA.



**Abbildung 11.** Darstellung des Stroms durch die HCN2 Kanäle einer HEK Zelle im Rahmen einer Aktivierung (Sweep). Die Zelle wurde zur Strommessung in die Ganzzellkonfiguration gebracht und der Stromfluss durch den Stromspannungspuls ermöglicht. Die Dauer des Stromflusses und der Ruhephase entsprach dem zugehörigen Stromprotokoll: je 2 s bei Ruhemembranpotential (-40 mV) und Hyperpolarisation (-100 mV). Die Stromamplitude betrug ca. 0,75 nA.



**Abbildung 12.** Darstellung des Stroms durch die HCN4 Kanäle einer HEK Zelle im Rahmen einer Aktivierung (Sweep). Die Zelle wurde zur Strommessung in die Ganzzellkonfiguration gebracht und der Stromfluss durch den Stromspannungspuls ermöglicht. Die Dauer des Stromflusses und der Ruhephase entsprach dem zugehörigen Stromprotokoll: je 10 s bei Ruhemembranpotential (-40 mV) und Hyperpolarisation (-100 mV). Die Stromamplitude betrug ca. 4,5 nA.

### 3.2 Die Wirkung des Ivabradins

Die bisher erläuterten Abläufe und Überlegungen waren notwendige Voraussetzungen für die aussagekräftige Erforschung der Wirkung des Ivabradins auf die HCN Kanäle.

Es wurden wiederholbare Schemata benötigt, die zufällige Unterschiede in den Messungen möglichst ausschlossen. Hierzu wurden Stromprotokolle eingeführt, die über die Anpassung der Aktivierungsdauern und –Anzahlen an den jeweiligen Kanaltyp nicht nur die optimale Ivabradinwirkung ermöglichten, sondern auch den Vergleich der Messungen.

Die Ivabradinwirkung wurde bereits von mehreren Gruppen untersucht, wobei es bisher noch keine Veröffentlichung über die direkte Wirkung auf HCN Kanäle gibt. Alle bisherigen Erforschungen bezogen sich auf die Wirkung des Pharmakons auf den  $I_h$ . Dies hatte mehrere Ursachen: Die molekulare Identität des  $I_h$  wurde erst im Jahr 1998 (Ludwig 1998) aufgeklärt. Eine Grundvoraussetzung dafür war die erfolgreiche Klonierung der HCN Kanäle (Ludwig et al. 1998; Gaus et al. 1998). Dank der inzwischen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie in München gut etablierten Methode der HCN Expression in HEK Zellen, konnte jetzt die Wirkung des Ivabradins auf die drei HCN Kanaltypen 1, 2 und 4 untersucht werden. Ein Hauptergebnis dieser Arbeit ist: Ivabradin hat eine blockierende Wirkung auf die Kanalisofmen HCN1, HCN2 und HCN4.

### ***3.2.1 Minderung der Kanalströme durch Ivabradin***

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Origin 6.0 Softwareprogramms.

Hierzu wurde die Abnahme der Stromamplitude für jede Aktivierung einzeln gemessen. Dabei wurde die Veränderung der Amplitude für alle Stromkurven, die von der gleichen Zelle stammten, an derselben Stelle erfasst. d.h. die Höhe des Stromes wurde immer nach der gleichen Zeit des laufenden Stromprotokolls verglichen. Der erste Wert wurde zu Beginn der Stromkurve erfasst, also dem Punkt, an dem der Stromfluss gerade begonnen hatte. Der zweite Wert wurde kurz vor Ende der Membranhyperpolarisation, also am Punkt des höchsten Stromflusses erfasst. Die so ermittelte Amplitude nimmt mit zunehmender Kanalblockade ab. Diese Veränderung wurde dann in Abhängigkeit von der Aktivierungszahl aufgetragen (Abbildung 13). Abbildung 13 stellt die Wirkung des Ivabradins am Beispiel einer Zelle mit HCN1 Kanälen bei einer Ivabradinkonzentration von  $10 \mu\text{mol/l}$  dar. Die Kurven der anderen Isoformen wurden genauso ausgewertet werden wie diese Beispielkurve. Die Werte vor dem Nullpunkt stellen den Vorlauf (Probelauf) dar. Mit dem Vorlauf wird untersucht, ob die HCN Kanalströme bei wiederholter Hyperpolarisation stabil bleiben und sich die Zelle zur Messung eignet. Dazu wird die Zelle einem Aktivierungsdurchgang ausgesetzt (d.h. bei HCN1 100 Aktivierungen, bei HCN2 50 Aktivierungen und bei HCN4 20 Aktivierungen). Diesem folgt die sogenannte Einwaschperiode, in der die Zelle 10 min lang auf Ruhemembranpotential ( $-40 \text{ mV}$ ) geclampt wird und während dieser Zeit durchgehend mit Ivabradinlösung der gewünschten Konzentration umspült wird. Ab dem Nullpunkt ist dann die Abnahme des Stroms auf Grund der Ivabradinwirkung zu erkennen, wobei dies natürlich im Rahmen von auf einander folgenden Aktivierungen geschieht.

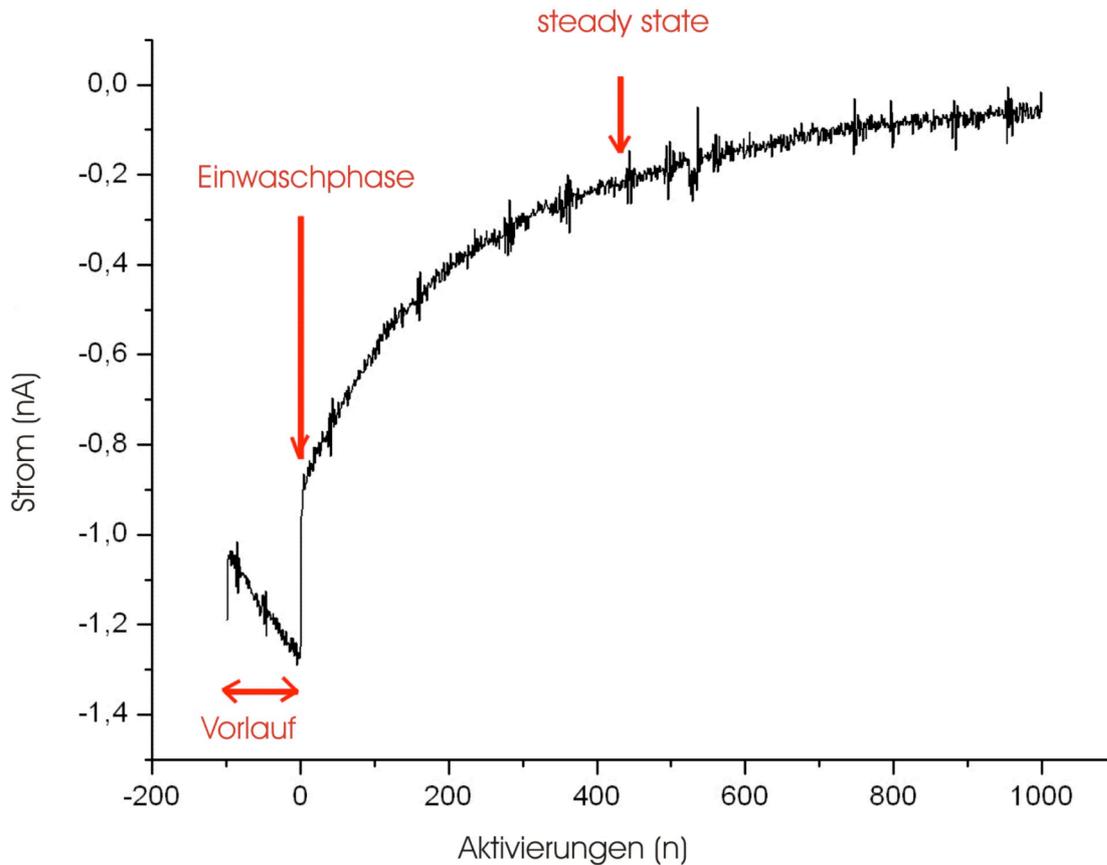


Abbildung 13 stellt die Stromreduktion an den HCN1 Kanälen einer HEK Zelle dar, die durch die Wirkung von  $10 \mu\text{M}$  Ivabradin bedingt wurde. Auf der y-Achse ist die Differenz zwischen Reststrom und Ausgangsstrom aufgetragen, auf der x-Achse die Anzahl der Aktivierungen. Der Vorlauf stellt einen Aktivierungsdurchgang (entspricht bei HCN1 100 Aktivierungen) ohne Ivabradineinwirkung dar, in der Einwaschperiode wird die untersuchte Zelle 10 min mit Ivabradinlösung in der entsprechenden Konzentration umspült. Danach beginnt die Abnahme des Stroms durch die ivabradinbedingte Blockierung der Kanäle. Am steady state zeigt sich eine leichte Abweichung des Kurvenverlaufs von der begonnenen Kurvenrundung. Die Abweichung wurde durch den einsetzenden rundown (Erläuterung folgt) bedingt.

Abbildung 14 soll den Unterschied zwischen der Stromabnahme bei hoch konzentrierter Ivabradinlösung ( $10 \mu\text{M}$ ) und niedrig konzentrierter Lösung ( $1 \mu\text{M}$ ) verdeutlichen.  $1 \mu\text{M}$  Ivabradin führt zu einem wesentlich flacheren Kurvenverlauf. Das bedeutet eine geringere Stromabnahme und somit eine deutlich schwächere Blockierung.

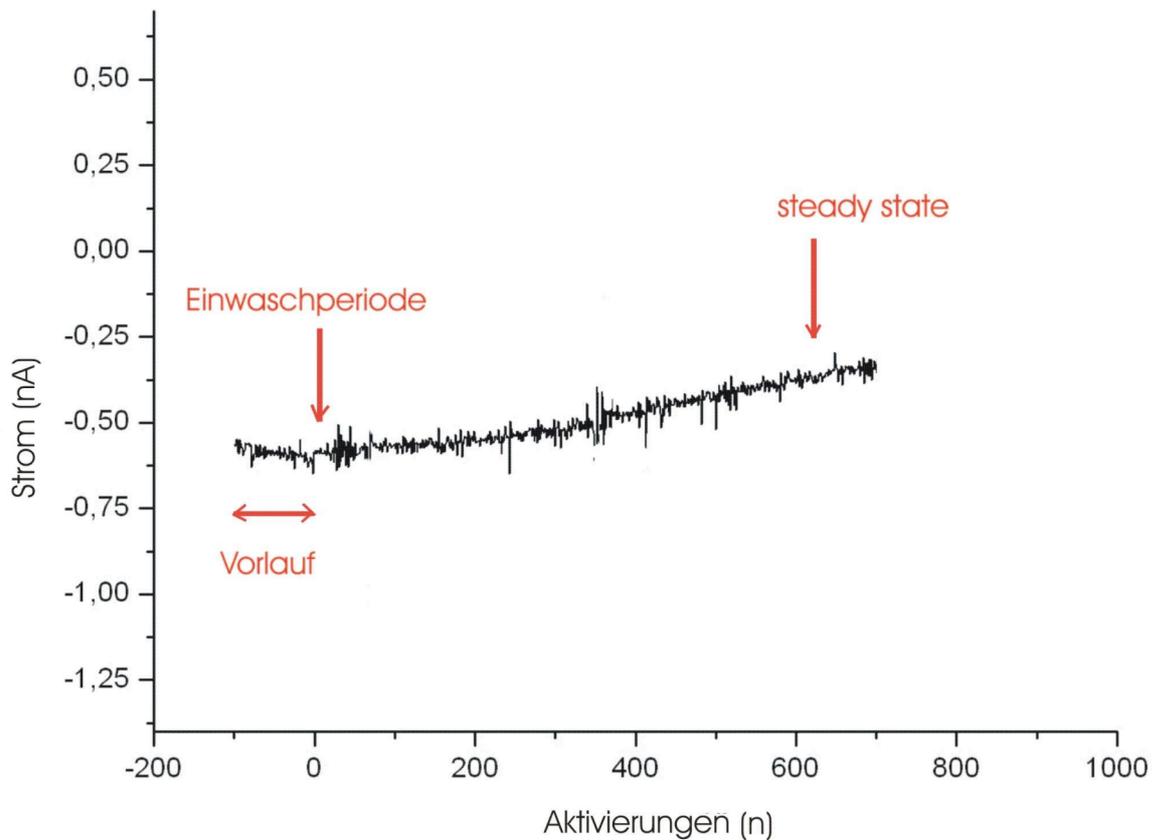


Abbildung 14 stellt die Stromreduktion an den HCN1 Kanälen einer HEK Zelle dar, die durch die Wirkung von 1  $\mu\text{M}$  Ivabradin bedingt wurde. Auf der y-Achse ist die Differenz zwischen Reststrom und Ausgangsstrom aufgetragen, auf der x-Achse die Anzahl der Aktivierungen. Vor dem Nullpunkt der x-Achse fand der Vorlauf statt (Erklärung siehe Abb. 13), danach beginnt die Abnahme des Stroms durch die ivabradinbedingte Blockierung der Kanäle. Dem steady state folgt eine Veränderung des Kurvenverlaufs, welche durch einsetzenden rundown bedingt wird.

Neben der Stromabnahme in Abhängigkeit von der Aktivierungsanzahl kann man die Aktivierungszahl ablesen, bei der der sogenannte „steady state“ eingetreten war, der Punkt, ab dem der Strom konstant bleibt. Dazu muss gesagt werden, dass das Festlegen der Stelle, an der der steady state zu finden ist, das Risiko der Fehleinschätzung birgt. Schwierigkeiten bereitete dabei das Signalrauschen der Kurve, die Identifizierung des steady states wurde vor allem aber auch durch den sogenannten „rundown“ erschwert. Der rundown wird dadurch bedingt, dass die Zelle unter den häufigen Aktivierungen leidet. Die Zellmembran wird

langsam etwas durchlässiger für Ionen, welche die Membran dann unabhängig von Kanälen passieren. Zusätzlich vermutet man, dass die Verdünnung des Zytoplasmas durch die Pipettenlösung zu einem Verlust wichtiger Substanzen wie cAMP oder cGMP führt. Sei es nun durch Membrandurchlässigkeit oder durch Verdünnungseffekt, den Ionenverlust der Zelle kann man meist an der fallenden Membrankapazität, welche zwischen den Aktivierungsdurchgängen immer überprüft wird, erkennen. Der rundown tritt bei den gewählten Aktivierungsschemata erst nach Erreichen des steady state auf, erschwert aber dennoch die Identifizierung, da der Übergang zwischen zunehmendem Block durch Ivabradin und fallender Membrankapazität fließend sein kann. Daher wurden bei der Auswertung von Kurven, bei denen der Übergang zum Kapazitätsverlust fließend zu sein schien, die Ergebnisse von Messungen an anderen Zellen zur Hilfestellung herangezogen. Man suchte sich hierzu die Messungen an Zellen mit Kanälen der gleichen Isoform bei der gleichen Ivabradinkonzentration, bei denen der Kurvenverlauf eindeutig war und fand die Aktivierungszahl heraus, bei der deren steady state eingetreten war. Die Kurvenregion der unklaren Kurve, bei der diese Aktivierungszahl erreicht war, wurde dann besonders eingehend auf einen eintretenden steady state hin untersucht.

#### Ausschluss aus der Wertung

Insgesamt wurden einige Zellen aus der Wertung genommen, wobei mehrere Gründe dafür in Frage kamen. Ein Grund waren Kapazitätsschwankungen während der Messungen, ein Anderer starke Kapazitätsverluste vor der Aktivierungsanzahl, bei der der steady state in etwa vermutet wurde. Unruhige Verläufe der Blockkurve, welche unter Anderem durch Signalrauschen verursacht wurden, konnten ebenfalls die Ursache für den Ausschluss der Zelle aus der Wertung sein. In manchen Fällen verschlechterte sich die Qualität des Seals im Verlauf der Messungen, dadurch konnten Ionen an undichten Stellen des Pipetten-Zell-Seals übertreten und Leckströme verursachen. Leckströme führen zu nicht korrigierbaren Fehlern, so dass Zellen, bei denen die Leckströme im Verlauf der Messungen auftraten, ebenfalls aus der Wertung genommen wurden.

#### **3.2.2 Dosis-Wirkungskurven**

Zur genaueren Beurteilung der Ivabradinwirkung wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt. Diese ermöglichten Aussagen über das Wirkspektrum des Ivabradins, über die minimal wirksame Konzentration, über die  $IC_{50}$  und über die maximal erreichbare Stromreduktion. Desweiteren bieten die Dosis-Wirkungskurven die Möglichkeit, den Hill Koeffizienten zu

berechnen. Diese Informationen bieten wichtige Details im Hinblick auf die mögliche medizinische Anwendung. Zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurven wurden Ivabradinlösungen in aufsteigenden Konzentrationen verwendet.

Ivabradinkonz. [ $\mu\text{M}$ ]	0 (nur Badlösung)	0,5	1	2	5	10	50
----------------------------------	-------------------	-----	---	---	---	----	----

Tabelle 4. Konzentration der zur Erstellung der Dosis- Wirkungskurve verwendeten Ivabradinlösungen

Die Dosis-Wirkungskurven waren in ihrem Verlauf für die einzelnen Kanaltypen unterschiedlich, so dass im Folgenden auf alle drei Kurven einzeln eingegangen werden soll. Das Augenmerk bei allen Messungen lag auf der Abhängigkeit der Ivabradinwirkung von der Aktivierungszahl. Die Beziehung zwischen Zeit und Wirkung wurde nicht untersucht. Der Grund dafür liegt vor allem in den bisherigen Untersuchungen der Ivabradinwirkung am  $I_h$  (Bois et al. 1996; Bucchi et al. 2002). Es wurde hierbei herausgefunden, dass die Ivabradinwirkung in erster Linie aktivierungabhängig ist. Der Wirkstoff entfaltet seine volle Wirkung nur bei wiederholten Aktivierungen mit dazwischengeschalteten Deaktivierungen, schneller und mit erhöhter Wirkung bei höheren Konzentrationen. Eine Zeitabhängigkeit gilt nur im Rahmen der Aktivierung, da herausgefunden wurde, dass Ivabradin seine Wirkung nur an offenen HCN Kanälen, also bei Membranhypervolarisation entfaltet. Bei hyperpolarisierter Zellmembran und somit offenen Kanälen kann man eventuell schon von einer gewissen zeitlichen Zunahme der Wirkung sprechen, diese geht aber auf Grund der starken Aktivierungsabhängigkeit unter und wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Die blockierende Wirkung wurde bei der jeweiligen Konzentration an mindestens 8 Zellen untersucht. Für die Dosis-Wirkungskurve wurden allerdings nur die am eindeutigsten auswertbaren Messungen verwendet, so dass zum Teil weniger Zellen (genaue Zahlen sind in den Abbildungen 15 bis 17 dargestellt) für die Erstellung der Kurve herangezogen wurden.

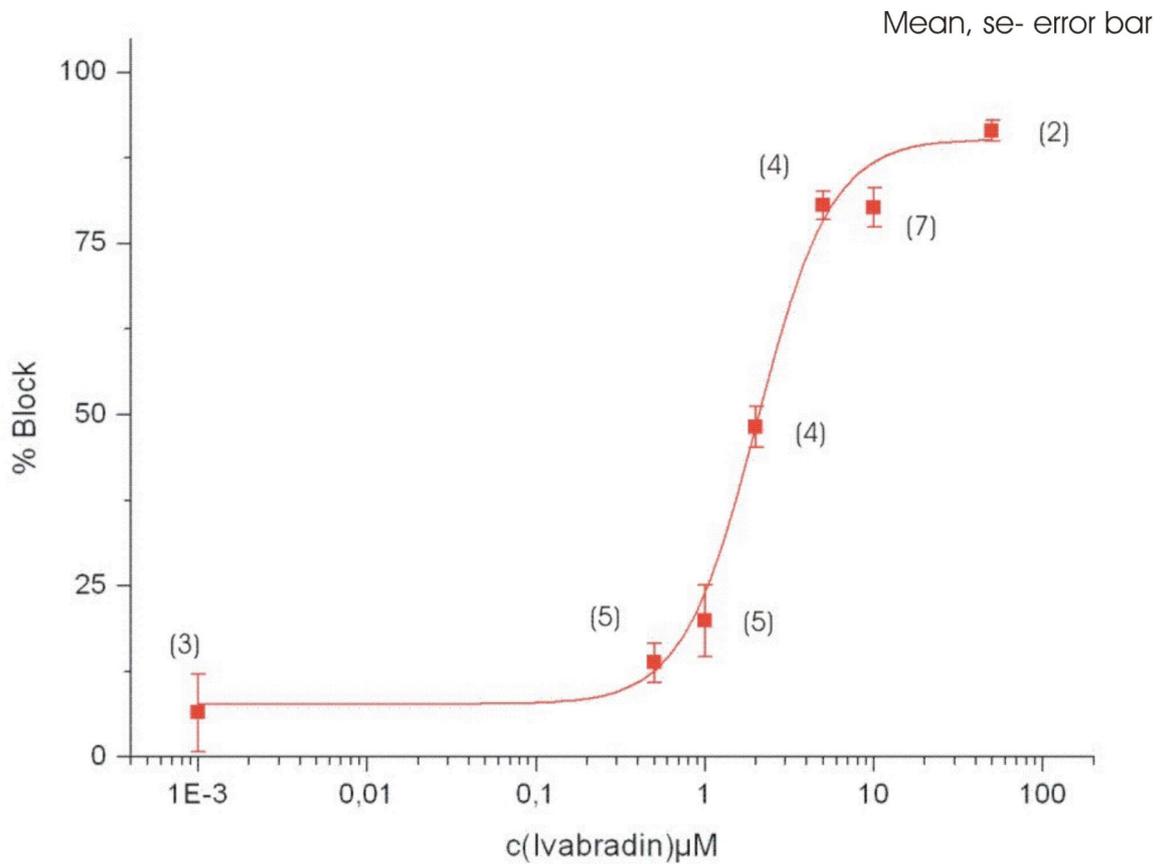


Abbildung 15. Dosis-Wirkungskurve für HCN1. Auf der y-Achse ist der prozentuale Anteil des Stroms vom Gesamtstrom der Zelle angegeben, der durch die Ivabradinwirkung reduziert wurde (% Block). Auf der x-Achse ist die verwendete Ivabradinkonzentration [ $\mu\text{M}$ ] logarithmisch aufgetragen. Die Symbole stellen den erhaltenen Mittelwert (mean) der verschiedenen Zellen bei der entsprechenden Ivabradinkonzentration dar, die zugehörigen Balken die Standardfehler vom Mittelwert (se). Der fit (rote Linie) ist sigmoidal, die Anzahl der für die Kurve verwerteten Zellen ist in Klammern angegeben.

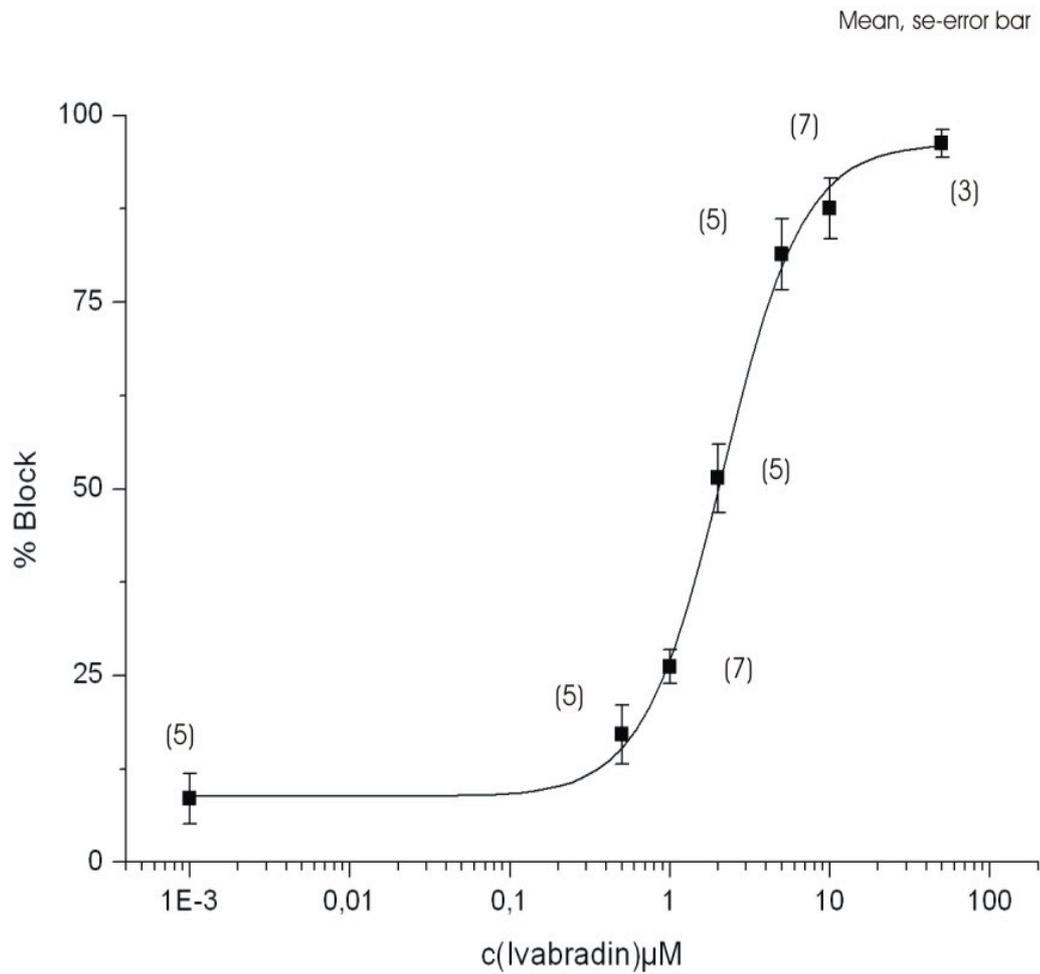
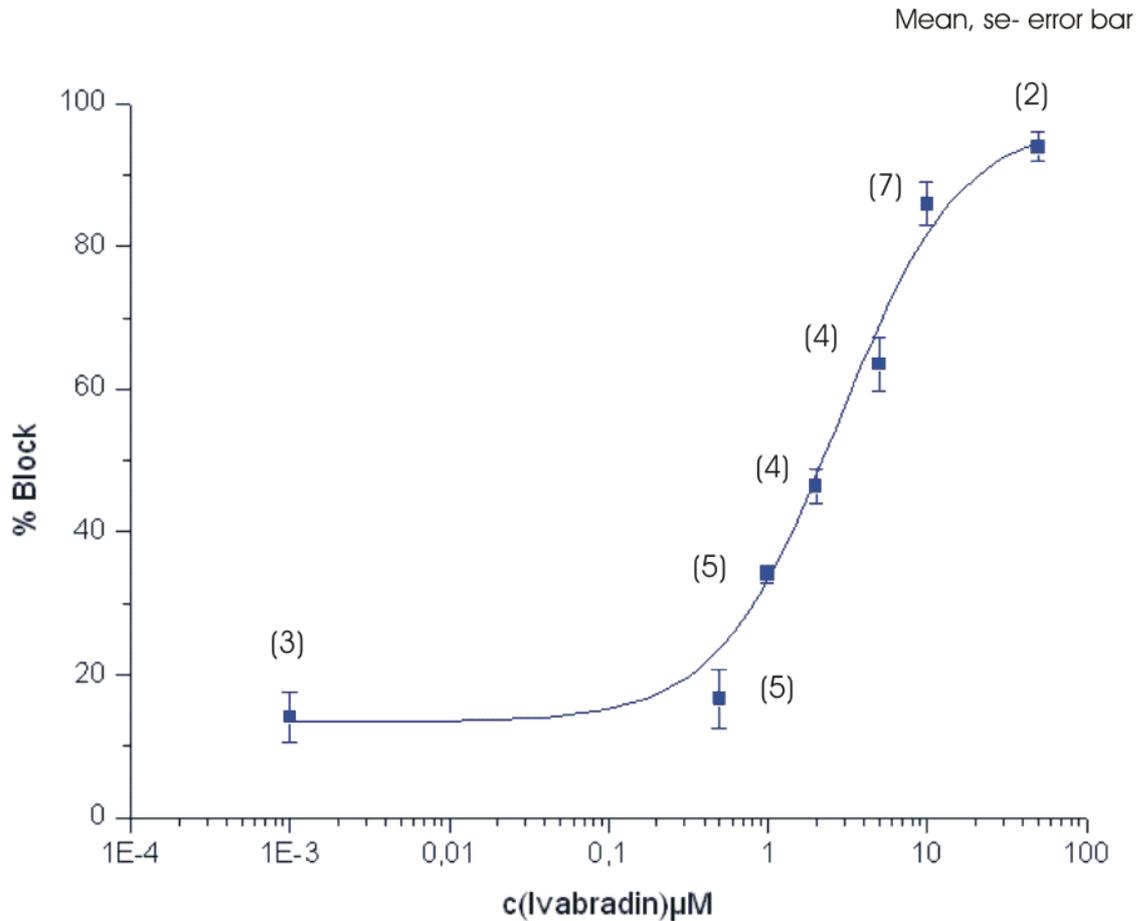


Abbildung 16. Dosis-Wirkungskurve für HCN2. Auf der y- Achse ist der Teil des Stroms vom Gesamtstrom der Zelle angegeben, um den durch die Ivabradinwirkung reduziert wurde. Die Angabe ist prozentual. Auf der x- Achse ist die verwendete Ivabradinkonzentration [ $\mu\text{M}$ ] logarithmisch aufgetragen. Die Kästchen stellen den erhaltenen Mittelwert (mean) der verschiedenen Zellen bei der entsprechenden Ivabradinkonzentration dar, die zugehörigen Balken die Standardfehler vom Mittelwert (se). Der fit (schwarze Linie) ist sigmoidal, die Anzahl der für die Kurve verwerteten Zellen ist in Klammern angegeben.



**Abbildung 17.** Dosis-Wirkungskurve für HCN4. Auf der y-Achse ist der Teil des Stroms vom Gesamtstrom der Zelle angegeben, um den durch die Ivabradinwirkung reduziert wurde. Die Angabe ist prozentual. Auf der x-Achse ist die verwendete Ivabradinkonzentration [ $\mu\text{M}$ ] logarithmisch aufgetragen. Die Kästchen stellen den erhaltenen Mittelwert (mean) der verschiedenen Zellen bei der entsprechenden Ivabradinkonzentration dar, die zugehörigen Balken die Standardfehler vom Mittelwert (se). Der fit (schwarze Linie) ist sigmoidal, die Anzahl der für die Kurve verwerteten Zellen ist in Klammern angegeben.

### 3.2.2.1 Ergebnisse der Dosis-Wirkungskurven

Die  $\text{IC}_{50}$  ist die Ivabradinkonzentration, bei der die halbmaximale Wirkung vorliegt, bei der also 50 % der maximalen Stromreduktion erreicht wurden. Sie liegt für HCN1 bei  $1,96 \mu\text{M}$  (sigmoidaler/ logistischer fit), bei HCN2 mit  $2,72 \mu\text{M}$  etwas höher und zeigt bei HCN4 mit  $2,78 \mu\text{M}$  den höchsten Wert. Die maximal erreichte Blockierung des Stroms lag für HCN1 bei durchschnittlich 91,5 %, für HCN2 mit 96,3 % am höchsten und für HCN4 mit 95,45 % im mittleren Bereich. Bei Strommessung an Zellen, die lediglich mit Badlösung umspült wurden, wurde ebenfalls eine leichte Stromreduzierung festgestellt, was auf den sogenannten „rundown“ zurückgeführt wird. Bei HCN1 wurde eine Stromreduzierung von durchschnittlich

6,48 % an Zellen ohne Ivabradinumspülung vorgefunden, bei HCN2 einen etwas höheren Wert mit 8,5 %. HCN4 stellte den Spitzenreiter mit einer Stromreduzierung von 8,63 % ohne Ivabradineinwirkung. Ob die an dieser Stelle erwähnten Unterschiede zwischen den einzelnen Kanalisformen relevant und signifikant sind, wird ausführlich im Diskussionsteil behandelt.

### 3.2.2.2 Vergleich der Isoformen

Der Vergleich der drei Dosis-Wirkungskurven (Abbildung 18 und Tabelle 5) zeigten große Ähnlichkeiten.

Die folgende Tabelle stellt die Werte der Isoformen an besonders interessanten Stellen im Vergleich dar:

	<i>HCN1</i>	<i>HCN2</i>	<i>HCN4</i>
<b>0µM</b> Iva. [rundown]	6,48± 5,67 [% Block]	8,5± 3,36 [% Block]	8,63± 0,75 [% Block]
<b>1µM</b> Ivabradin	19,86± 5,26 [% Block]	26,19± 2,28 [% Block]	33,6± 1,15 [% Block]
<b>5µM</b> Ivabradin	80,58± 2,04 [% Block]	81,38± 4,74 [% Block]	72,65± 2,43 [% Block]
<b>max.</b> Blockierung	91,5± 1,50 [% Block]	96,3± 1,85 [% Block]	95,45± 2,55 [% Block]
<b>IC<sub>50</sub></b>	1,96 µM	2,72 µM	2,78 µM
<b>Hill Koeffizienten</b>	1,99 ± 0,27	1,74 ± 0,24	1,21 ± 0,10

Tabelle 5. Vergleich der Isoformen

Sehr ähnliche Werte zeigten sich bei den zum Vergleich dienenden Messungen ohne Ivabradinumspülung (0 µM), bei denen die Kanalströme über den gleichen Zeitraum und unter der gleichen Anzahl von Aktivierungen und Deaktivierungen wie bei den Messungen mit Ivabradin erfasst wurden. Besonders auffallend ist auch die starke Überlagerung der Kurvenverläufe im Bereich der IC<sub>50</sub>.

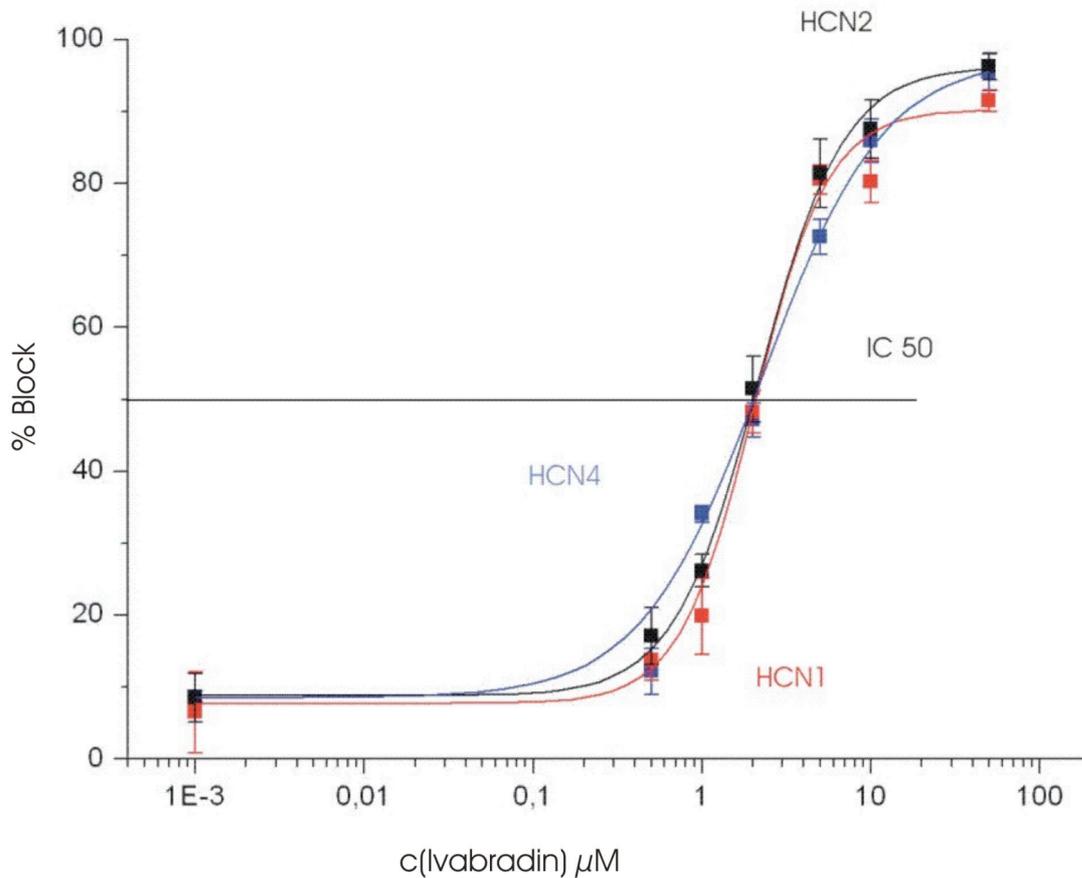


Abbildung 18 zeigt eine Überlagerung der Dosis-Wirkungskurven der drei HCN Isoformen. HCN1 ist rot aufgetragen, HCN2 schwarz und HCN4 blau. Auf der y-Achse ist der Teil des Stroms vom Gesamtstrom der Zelle angegeben, um den durch die Ivabradinwirkung reduziert wurde (% Block). Die Angabe ist prozentual. Auf der x-Achse ist die verwendete Ivabradinkonzentration [ $\mu\text{M}$ ] logarithmisch aufgetragen. Die Symbole stellen den erhaltenen Mittelwert der verschiedenen Zellen (mean) bei der entsprechenden Ivabradinkonzentration dar, die zugehörigen Balken die Standardabweichung vom Mittelwert (se). Der fit (farbige Linien) ist sigmoidal.

In der Tabelle wird außerdem besonders auf drei Bereiche der Kurve eingegangen, an denen mehr oder weniger starke Abweichungen der Isoformen unter einander zu finden sind:

Das erste genauer betrachtete Areal findet sich bei einer Ivabradinkonzentration von  $1 \mu\text{M}$ .

Wie in der Tabelle zu sehen ist, sind HCN4 Kanäle bei dieser Konzentration schon stärker geblockt als die anderen beiden Kanaltypen, wobei HCN1 Kanäle hier noch am wenigsten beeinträchtigt werden. Leicht umgedreht scheint sich die Situation bei  $5 \mu\text{M}$  zu haben. Hier zeigen HCN1 und HCN2 fast gleiche Werte, wobei die Wirkung auf HCN4 Kanäle hier geringer ausgeprägt ist. Ein weiterer Unterschied zwischen den drei Kanaltypen stellt sich, wie bereits angedeutet, bei der Betrachtung der maximal erreichten Stromreduktionen dar. So zeigen die Kurven von HCN2 und HCN4 fast gleiche Werte, die HCN1-Kurve endet jedoch

auf etwas niedrigerem Niveau. Bei Betrachtung der einzelnen Werte in der Tabelle ergeben sich allerdings eher geringe Unterschiede. In der folgenden Diskussion wird mit Hilfe des t-Tests näher auf die Signifikanz der hier erwähnten Abweichungen eingegangen.

## 4. DISKUSSION

### *4.1 Die Vorgeschichte*

Zum besseren Verständnis der Diskussion der Daten sollen an dieser Stelle ein paar Details der bisherigen Forschungen zur Ivabradinwirkung auf den  $I_h$  erwähnt werden:

In erster Linie zwei Gruppen widmeten ihre Aufmerksamkeit diesem Thema. Die erste Arbeitsgruppe (Bois et al. 1996) untersuchte die Wirkung des Ivabradins auf den  $I_h$  an Sinusknotenzellen von Kaninchen. Zu diesem Zeitpunkt war die molekulare Identität des  $I_h$  noch nicht erforscht. Ihre Patch clamp Experimente in Ganzzellkonfiguration zeigten eine dosis- und frequenzabhängige, den  $I_h$  blockierende Wirkung des Ivabradins, mit einer  $IC_{50}$  von  $2,18 \mu\text{M}$ . Die blockierende Wirkung konnte allerdings nur in Versuchen erreicht werden, in denen die Zellmembran auf Werte hyperpolarisiert wurde, bei denen die  $I_h$  Kanäle offen waren (in deren Versuchen  $-100 \text{ mV}$ ). Demzufolge wirkt Ivabradin nur an offenen Kanälen. Versuche der Gruppe in der sogenannten „inside-out macro-patch“ Konfiguration führten zu der Vermutung, dass Ivabradin von der Zellsinnenseite aus mit den  $I_h$  Kanälen interagiert. Weitere Versuche zeigten, dass das Pharmakon so gut wie keine Wirkung auf Kalzium- und Kaliumkanäle besitzt. Überhaupt keine Wirkung zeigte sich bei Untersuchungen an T-Typ Kalziumkanälen, eine nur ganz geringe Wirkung auf L-Typ Kalziumkanäle ohne eine signifikante dosisabhängige Kanalblockade (Stromreduktion von  $18,12 \pm 0,66 \%$  bei  $10 \mu\text{M}$ ). Auch auf den an Sinusknotenzellen vorhandenen Kaliumauswärtsstrom zeigte Ivabradin bei niedrigen Konzentrationen keine Wirkung und bei hohen Ivabradinkonzentrationen lediglich geringe Effekte (Stromreduktion von  $16,3 \pm 1,2 \%$  bei  $10 \mu\text{M}$  Ivabradin). Dies bestätigte die Erkenntnis, dass Ivabradin neben der bradykarden Wirkung keine negativ inotropen Effekte hat (Thollon et al. 1994), welche neben der Blockade von  $\beta$ -Rezeptoren vor allem durch eine Blockade der Kalzium Kanäle vermittelt werden würden.

Eine zweite Gruppe, die sich mit der Wirkung des Ivabradins beschäftigte, war die Arbeitsgruppe um Dario DiFrancesco. Sie verwendeten für ihre Experimente ebenfalls Sinusknotenzellen von Kaninchen, an denen sie die Ivabradinwirkung auf den  $I_h$  noch detaillierter erforschten (Bucchi et al. 2002). Auch sie bestätigten die Dosis- und Frequenzabhängigkeit der Wirkung und fanden zudem heraus, dass sowohl zur Bindung des Ivabradins an seinen Rezeptor als auch zur Lösung vom Rezeptor der  $I_h$  Kanal offen sein muss. Sie erkannten außerdem, dass alleine die Öffnung der  $I_h$  Kanäle zur Entfaltung der

vollständigen Ivabradinwirkung nicht ausreicht, sondern dass viel höhere Wirkungen erzielt werden konnten, wenn statt langdauernden Hyperpolarisationen der Zellmembran kurze Intervalle verwendet werden, bei denen die Zellmembran abwechselnd hyperpolarisiert und anschließend bis zum Ruhemembranpotential depolarisiert wird. Das Ruhemembranpotential entsprach einem Potential, bei dem die  $I_h$  Kanäle geschlossen waren, in den Versuchen dieser Gruppe  $-35$  mV. Weitere Untersuchungen zeigten zudem, dass zur Bindung des Ivabradins die  $I_h$  Kanäle zwar offen sein mussten, die Entfaltung der Ivabradinwirkung jedoch vorwiegend in der Depolarisationsphase stattfand. Dies erklärt warum zur vollen Entfaltung der Ivabradinwirkung alleinige Hyperpolarisation der Zellmembran nicht ausreicht.

Es zeigte sich auch eine Spannungsabhängigkeit der Ivabradinwirkung, die aber nicht proportional zum Grad der Kanalaktivierung war. Hierzu sei kurz erklärt, dass der  $I_h$  in Sinusknotenzellen ab einer Schwelle von  $-40$  mV bis  $-50$  mV aktiviert wird und bei  $-100$  mV bis  $-110$  mV voll aktiviert ist (DiFrancesco 1981).  $V_{1/2}$  des nativen  $I_h$  liegt bei  $-65$  mV bis  $-90$  mV (Denyer & Brown 1990, DiFrancesco & Tortora 1991, DiFrancesco & Mangoni 1994). Die Spannungsabhängigkeit der Ivabradinwirkung schien eher umgekehrt proportional zur Stromaktivierung zu sein, die Wirkung war umso stärker, je geringer die Membranhyperpolarisation (bis zum Schwellenwert) war. So blockierte  $3 \mu\text{M}$  Ivabradin den Kanalstrom bei  $-70$  mV zu  $78,3 \%$ ; bei  $-100$  mV nur zu  $63,9 \%$ . Zusätzlich zur Spannungsabhängigkeit der Ivabradinwirkung konnte eine Abhängigkeit vom Ionenfluss beschrieben werden, wobei hier nur beschrieben wurde, dass der Ionenfluss zur Entfaltung einer blockierenden Ivabradinwirkung nötig ist. Es stellt sich also ein Zusammenhang zwischen Ionenstrom und Wirkung dar, so dass vermutet werden kann, dass die mit zunehmender Membranhyperpolarisation abnehmende Ivabradinwirkung durch den zunehmenden Ionenstrom durch die Kanäle verursacht wird. Die Ivabradinmoleküle könnten durch den starken Ionenfluss daran gehindert werden an ihren Rezeptor zu binden oder sie könnten, wenn sie bereits gebunden waren, wieder vom Rezeptor „weggerissen“ werden.

Nach diesem Ausflug in die Vorgeschichte nun wieder zurück zu meinen Untersuchungen: Die Auswertung der Messergebnisse ergab Kurven, die sich im Verlauf sehr ähnlich waren, dennoch stellten sich manche Stellen dar, an denen die Kurven Differenzen zueinander aufzeigten. Ob diese Unterschiede groß genug sind, um sie als signifikant zu bezeichnen, wurde mit dem t-Test untersucht.

## 4.2 t-Test

Der t-Test ist ein statistischer Test, welcher eine Aussage darüber zulässt, ob der Unterschied zwischen Messergebnissen so gravierend ist, dass die Beurteilung „unterschiedliche Wirkung des Pharmakons“ zutreffend ist. Für die Messergebnisse dieser Arbeit wurde der t-Test folgendermaßen angewendet: Bei jeder untersuchten Ivabradinkonzentration wurden die erhaltenen „Blockprozente“ (Anteil der Stromreduktion vom Maximalstrom bedingt durch die blockierende Wirkung des Ivabradins) der einzelnen HCN Kanalisformen verglichen. Es wurden jeweils die erhaltenen „Blockprozente“ aller einzelnen Zellen zweier Kanaltypen bei der gegebenen Ivabradinkonzentration verglichen und der Unterschied als signifikant oder nicht signifikant beurteilt.

Generell wurden die Unterschiede zwischen den Isoformen als nicht signifikant eingeordnet, als signifikant wurden die Differenzen nur an drei Stellen bewertet. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich nach t-Testauswertung der Daten zwischen HCN1 und HCN4 bei 1  $\mu\text{M}$  Ivabradin, sowie zwischen HCN2 und HCN4 bei dieser Konzentration. Weitere signifikante Abweichungen zeigten sich zwischen HCN1 und HCN4 bei 5  $\mu\text{M}$ , außerdem zwischen HCN2 und HCN4 bei der gleichen Ivabradinkonzentration (Vergleiche Abbildung 18 und Tabelle 5).

### 4.2.1 Diskussion der t-Test Ergebnisse

Die einzig signifikanten Unterschiede in der Blockwirkung zeigten sich also bei 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$ . Bei 1  $\mu\text{M}$  fällt der Unterschied zwischen HCN1 und HCN4 besonders auf, zwischen HCN2 und HCN4 ist er nicht ganz so deutlich. Die folgenden Erläuterungen könnten die t-Test Ergebnisse erklären. Die drei HCN Kanalisformen weisen unterschiedliche  $V_{1/2}$  Werte auf: HCN1 hat sein  $V_{1/2}$  schon bei ca.  $-80$  mV, HCN2 bei  $-97 \pm 1$  mV und HCN4 bei  $-109 \pm 1$  mV (Ludwig 2000). Bei den in den Versuchen gegebenen  $-100$  mV sind HCN1 Kanäle stärker aktiviert, d.h. die Kanäle haben schon eine höher als 50-prozentige Offenwahrscheinlichkeit, HCN2 Kanäle sind zu etwa zu 50 % offen und HCN4 Kanäle noch nicht ganz halbmaximal aktiviert.

Die kanalblockierende Wirkung des Ivabradins ist ein Gleichgewicht zwischen Blockierung der Kanäle und deren Entblockierung. Es wird vermutet, dass die Bindung der Ivabradinmoleküle mit zunehmendem Ionenstrom durch den Kanal, also bei der Aktivierungsschwelle beginnend mit zunehmender Hyperpolarisation abnimmt. Bei  $-100$  mV sind der HCN1 und HCN2 Kanal wie beschrieben schon stärker aktiviert als die Kanäle der

HCN4 Isoform, was die Erklärung für die signifikanten Unterschiede lediglich bei 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  Ivabradinkonzentration bieten könnte. Bei niedriger Ivabradinkonzentration (0,5  $\mu\text{M}$ ) sind noch so wenig Ivabradinmoleküle vorhanden, dass der Ionenstrom aufgrund der zahlreichen freien Bindungsstellen keinen starken Einfluss auf die Molekülbindung an den Rezeptor hat. Somit ist die Wirkung des Pharmakons für alle drei Kanaltypen noch gleich. Bei höherer Konzentration und höherer Moleküldichte (1  $\mu\text{M}$ ) sind dann offenbar schon genügend Bindungsstellen belegt, um die Abhängigkeit der Ivabradinwirkung vom Ionenstrom zu bedingen. Hier findet sich eine Abnahme der blockierenden Wirkung mit zunehmender Kanalaktivierung. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Erkenntnissen von A. Bucchi et al.: je stärker die Hyperpolarisation, desto geringer die Ivabradinwirkung. Um die  $\text{IC}_{50}$  zeigt sich etwas Interessantes: die Werte der drei Isoformen zeigen nicht nur eine große Ähnlichkeit, es findet sich auch eine Art Umkehr der Ivabradinwirkung auf die Kanaltypen: bei 5  $\mu\text{M}$  zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen HCN1 und HCN4, wobei hier die blockierende Wirkung bei HCN1 am stärksten und bei HCN4 am schwächsten ist. Dies könnte daran liegen, dass so viele Ivabradinmoleküle vorhanden sind, dass der stärkere Ionenstrom zwar Moleküle an ihrer Bindung hindert oder sie wieder von ihrer Bindung losreißt, der „Molekülandrang“ aber einfach überwiegt. Warum dies zu einer stärkeren Wirkung des Ivabradins an den stärker aktivierten Kanaltypen führt, ist noch ungeklärt. Noch angemerkt sei, dass die Erkenntnis der Wirkungsabnahme des Ivabradins mit steigender Hyperpolarisation lediglich auf Versuchen bei einer Konzentration des Pharmakons beruht, nämlich 3  $\mu\text{M}$  (A. Bucchi et al.). Ob die Wirkungsabnahme des Ivabradins bei stärkerer Hyperpolarisation auch bei höheren Konzentrationen auftritt, kann also noch nicht gesagt werden.

#### ***4.3 Der Hill Koeffizient***

Im Rahmen dieser Überlegungen stellt sich die Frage nach der Anzahl der Bindungsstellen für Ivabradin. Der Hill Koeffizient stellt ein Hilfsmittel zur Beurteilung des Wirkmechanismus eines Pharmakons an seinem Rezeptor, in diesem Fall einem Ionenkanal, dar. Er gibt die Steilheit der Dosis-Wirkungskurve eines Pharmakons an und erlaubt damit eine Aussage über die Anzahl der Bindungsdomänen, die sich gegenseitig beeinflussen: Je steiler die Kurve (Hill Koeffizient  $> 1$ ), desto wahrscheinlicher ist es, dass es mehrere Bindungsdomänen gibt die sich positiv beeinflussen, also die Bindung weiterer Moleküle vereinfachen. Ein Hill Koeffizient  $< 1$  spricht dagegen für 2 Bindungsstellen, deren Belegung sich gegenseitig antagonisiert. Diese Relation wurde ursprünglich zur Beschreibung des

Sauerstoffbindungsverhaltens am vier Domänen enthaltenden Hämoglobin verwendet und später auf andere Proteine ausgeweitet (Monod et al. 1965; Koshland et al. 1966).

Die Hill Koeffizienten der Ivabradin-HCN-Dosis-Wirkungskurven indizieren unterschiedlich viele Bindungsstellen bei den Kanalisformen. So müsste HCN1 ( $H = 1,99$ ) zwei Bindungsdomänen vorweisen, HCN2 ( $H = 1,74$ ) tendenziell ebenfalls, HCN4 ( $H = 1,21$ ) nur eine. An dieser Stelle sei erwähnt, dass sich in Messungen am Sinusknoten- $I_h$  eine noch flacher verlaufende Dosis-Wirkungskurve als bei HCN4 darstellte, mit einem Hill Koeffizienten von  $\sim 0,8$  (Bucchi et al. 2002). Dies spricht für nur eine Bindungsdomäne, was auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit aller vier HCN Kanäle dazu führte, dass nur eine Bindungsdomäne im Inneren der Pore bei allen HCN Isoformen angenommen wurde (DiFrancesco & Camm 2004). Wenn man davon ausgeht, dass HCN4 die Hauptisoform in Sinusknotenzellen ist, stellen sich die Hill Koeffizienten des  $I_h$  und der HCN4 Isoform als stimmig dar, der Unterschied zwischen den drei HCN Isoformen untereinander wirft aber dennoch Fragen auf. Nebenbei bemerkt hat der  $I_h$  seinen  $V_{1/2}$  bei  $-65$  bis  $-90$  mV, so dass er in en Messungen mit  $-100$  mV schon stark aktiviert war. Der Grad der Kanalaktivierung steigt bei  $-100$  mV in folgender Weise an:  $HCN4 < HCN2 < HCN1$ . In eben dieser Reihenfolge steigen die Hill Koeffizienten an. Die in der Diskussion der t-Test Ergebnisse bereits erwähnte Abhängigkeit der Ivabradinwirkung vom Aktivierungsgrad des Kanals kann sich offenbar genau gegensätzlich auf die Steilheit der Dosis-Wirkungskurve auswirken:

- a) HCN1 und HCN2 im Vergleich zu HCN4: Stärkere Aktivierung - erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der Pore - bessere Erreichbarkeit der Bindungsstelle in der Pore- bessere blockierende Wirkung - steilere Kurve (größerer Hill Koeffizient).
- b)  $I_h$  im Vergleich zu HCN2: Stärkere Aktivierung - stärkerer Ionenfluss - erschwerte dauerhafte Bindung - flachere Kurve (kleinerer Hill Koeffizient).

Der stärkere Ionenstrom hindert gerade bei niedrigen Ivabradinkonzentrationen vermehrt Moleküle an ihrer Bindung, bzw. reißt gerade bei niedrigen Ivabradinkonzentrationen vermehrt von ihrer Bindungsstelle weg (b). Diese Situation wäre z.B. bei  $1 \mu\text{M}$  gegeben. Mit zunehmender Konzentration verliert dieser Mechanismus an Relevanz, möglicherweise weil ausreichend Moleküle zur Verfügung stehen. Bei hohen Wirkstoffkonzentrationen könnte sich die Situation sogar zugunsten der stärker aktivierten Kanäle umdrehen (a): bei  $5 \mu\text{M}$  beispielsweise findet dann eine stärkere Pharmakonwirkung auf HCN1 und HCN2 als auf HCN4 statt, was die steilere Kurve bedingt.

#### 4.4 Diskussion der Dosis-Wirkungskurve

Bei der kritischen Betrachtung der Dosis-Wirkungskurve sind unter Anderem die  $IC_{50}$  und die maximal erreichte Stromblockade durch Ivabradin von Bedeutung. Diese beiden Punkte sollen hier kurz diskutiert werden.

Die  $IC_{50}$ -Werte der drei Isoformen sind sehr ähnlich, wobei die  $IC_{50}$  für HCN1 etwas abweicht:

	HCN1	HCN2	HCN4
$IC_{50}$ [ $\mu$ M Ivabradin]	1,96	2,72	2,78

Tabelle 6.  $IC_{50}$  Werte der drei Kanalisformen

Im Vergleich dazu zeigten sich an Sinusknotenzellen der Kaninchen  $IC_{50}$  Werte von 2,18  $\mu$ M (Bois et al. 1996) und 1,5  $\mu$ M (Bucchi et al. 2002). Diese Ergebnisse liegen sehr nahe an den hier gemessenen Werten. Nicht außer acht zu lassen ist hierbei die Tatsache, dass an Sinusknotenzellen andere Umstände bestehen als an in HEK Zellen exprimierten HCN Kanälen. So finden sich in der Umgebung von Sinusknotenzellen zumindest in vivo modulierende Substanzen wie cAMP und cGMP, welche die Aktivierungskurve der HCN-Kanalströme ins Positive verschieben. In jüngsten Messungen zeigte sich eine Verschiebung der Kurve um  $28,5 \pm 5,9$  mV für hHCN 2 und  $23 \pm 8,1$  mV für hHCN4 durch den Einfluss von cAMP. Etwas geringer stellte sich die positive Verschiebung an hHCN1 Kanälen dar:  $6,7 \pm 4,0$  mV. Unter der Einwirkung von cGMP verschob sich die Aktivierungskurve um  $13,1 \pm 5,1$  mV (hHCN2) bzw.  $13,4 \pm 1,5$  mV (hHCN4), jedoch nur um  $3,9 \pm 2,1$  mV bei HCN1 (Stieber et al. 2005). Dieser Einfluss von cAMP und cGMP bietet auch eine mögliche Erklärung für die Tatsache, dass sich der  $V_{1/2}$  des  $I_h$  am Sinusknoten schon bei  $-65$  mV bis  $-90$  mV statt bei ca.  $-100$  mV findet, wie es bei den geklonten HCN Kanälen der Fall ist. Betrachtet man nun die  $IC_{50}$  Werte aus den Messungen dieser Arbeit, so stellen sich mit zunehmender Kanalaktivierung tendenziell abnehmende  $IC_{50}$  Werte dar. Dies stimmt damit überein, dass die  $IC_{50}$  Werte am  $I_h$  dem  $IC_{50}$  Wert der bei  $-100$  mV am stärksten aktivierten Isoform, nämlich HCN1, am Ähnlichsten sind.

Die maximal erreichte Stromblockade durch Ivabradin zeigte sich in den Versuchen für die drei Isoformen sehr dicht beieinander liegend. So dicht, dass sich im t-Test kein signifikanter Unterschied ergab. Für keine der drei Isoformen konnte in den Versuchen eine 100 % Blockade des Kanalstroms erreicht werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte wieder in den Aktivierungsgraden der Kanäle zu finden sein. Bei den verwendeten  $-100$  mV Pulsen ist

der Ionenstrom durch die Kanäle eventuell schon supraoptimal, so dass immer ein paar Ivabradinbindungsstellen frei sind; entweder durch im Ionenstrom wieder mitgerissene Ionen oder auch durch gar nicht erst besetzte Stellen.

#### **4.5 Rundown**

Der Rundown wird durch eine Zunahme der Durchlässigkeit der Zellmembran für Ionen neben den HCN Kanälen, möglicherweise auch etwas an der Aufsatzstelle der Pipettenspitze, bedingt. Ursache hierfür ist die Strapazierung der Zellmembran durch die wiederholten Hyperpolarisationen. Eine weitere, mögliche Ursache für Rundown findet sich in der Durchmischung von Pipettenlösung und Zytoplasma, was zum Verlust von für die Zelle wichtigen Substanzen führen kann. Starker rundown lässt sich fast immer an der fallenden Membrankapazität erkennen. Er trat zumeist erst gegen Ende der Messungen auf, nach Erreichen des steady state, so dass er keinen negativen Einfluss auf die Auswertung der Messungen hatte. Die Zellen, bei denen starker rundown schon früher auftrat, wurden aus der Wertung genommen. Schwieriger zu erkennen waren geringe Durchlässigkeiten der Zellmembran, da diese zum Teil keine oder sehr kleine Kapazitätsschwankungen verursachen. Diese ließen sich insbesondere bei den Messungen mit langen Aktivierungszeiten (z.B. HCN4) kaum verhindern, weshalb der "rundown" im Folgenden nochmals gesondert betrachtet werden soll.

##### **4.5.1 Stromverlust bei Zellen ohne Ivabradinumspülung**

Wie dem Ergebnisteil zu entnehmen ist, zeigen sich auch bei Messungen an Zellen, die als Vergleichsmessungen dienten und ohne Ivabradinumspülung durchgeführt wurden geringe Stromverluste. Die Messungen ergaben Stromverluste von durchschnittlich 6,5-8,5 %. Daher sind die erhaltenen prozentualen Stromreduktionen, die der Ivabradinwirkung zugeschrieben wurden, eventuell etwas zu hoch angesetzt. Möglich wären auch etwas zu niedrig angegebene  $IC_{50}$  Werte. Man könnte eventuell von allen „Block-Werten“ den „Nullwert-Stromverlust“ abziehen, wobei hier die Individualität der Zellen (z.B. unterschiedliche Stromhöhe) nicht außer Betracht gelassen werden dürfte. Allerdings war letztendlich der Stromverlust durch rundown im Vergleich zum Stromverlust durch Ivabradin eher gering, so dass man den rundown nicht überbewerten sollte.

##### **4.5.2 Rundown in der Diskussion**

Es wurden bereits zwei Theorien, die auf die Unterschiede in den Kurvenverläufen der Dosis-Wirkungskurve der HCN-Typen eingehen, vorgestellt: Aktivierungsgrad als Ursache und

mehrere Bindungsdomänen als Ursache. Eine weitere Erklärungsvariante stellt der rundown dar. An dieser Stelle muss man sich noch mal die verwendeten Stromprotokolle vor Augen halten: so dauerte eine Aktivierung (+ Deaktivierung) bei HCN1 1 s, ein Aktivierungsdurchgang 100 s und die Messung bis zum steady state ca. 700 s. Bei HCN2 dauerte eine Aktivierung (+ Deaktivierung) 4 s, ein Durchgang 200 s und die gesamte Messung ca. 1400 s. Bei HCN4 betrug die Aktivierungszeit (+ Deaktivierung) 20 s, ein Durchgang 400 s und die Messung bis zum steady state ca. 1300 s. Man erkennt also die deutlich kürzere Versuchsdauer bei HCN1 und in etwa gleiche Versuchsdauer bei HCN2 und HCN4. Lange Versuchszeiten und insbesondere lange Aktivierungszeiten bergen natürlich ein höheres rundown Risiko, da die Belastung der Zellwand höher ist. Dies könnte die bei HCN2 und HCN4 höheren „Nullwert-Stromverluste“ als bei HCN1 erklären.

	HCN1	HCN2	HCN4
Nullwert- Stromverlust [Ø]	6,48 %	8,50 %	8,63 %

Tabelle 7. Durchschnittlicher Stromverlust in Messungen an Zellen ohne Ivabradinumspülung. Die Messungen wurden nach dem gleichen Aktivierungsschema durchgeführt, wie es für Zellen mit Ivabradinumspülung verwendet wurde. Statt mit Ivabradinlösung wurde für die „Nullwertmessung“ mit der Badlösung umspült.

Für den Verlauf der Dosis-Wirkungskurve stellt sich die Frage, ob diese Unterschiede im rundown einen Einfluss auf den Kurvenverlauf hatten. Vorweg muss noch mal erwähnt werden, dass große Unterschiede im rundown durch die Auswahl der Zellen und Messungen vermieden wurden: Zellen mit schwankenden Kapazitäten wurden aussortiert, Zellen mit unruhigen Stromkurven oder „Block-Kurven“ ebenfalls. Außerdem wurden Stromabfälle gegen Ende der Messungen, insbesondere in Verbindung mit fallenden Kapazitäten nicht gewertet. Betrachtet man nun die Dosis-Wirkungskurven der Kanaltypen im Vergleich, so sprechen deren Verläufe gegen rundown als Ursache. Dann müsste die Kurve des HCN4 doch eigentlich permanent höhere „Block-Werte“ als die anderen beiden Kanaltypen oder zumindest als HCN1 aufweisen und die HCN1 Kurve müsste permanent niedrigere „Block-Werte“ zeigen. Dies ist allerdings nicht der Fall. Der rundown dient also nicht der hinreichenden Erklärung der Kurvenverläufe.

#### **4.6 Andere $I_h$ Blocker**

Ivabradin war nicht die einzige Substanz, die im Rahmen der Suche nach einem selektiv bradykarden Stoff entwickelt wurde. Andere entwickelte Substanzen zeigen im Großen und

Ganzen die gleichen Eigenschaften wie Ivabradin, auf den ersten Blick gering erscheinende Unterschiede machen das Ivabradin jedoch für die klinische Anwendung sehr viel nützlicher. Den Substanzen ist folgendes Gemeinsam: sie alle wirken blockierend auf den  $I_h$  und somit auch auf HCN Kanäle. Sie alle wirken dosis- und spannungsabhängig und scheinen nur an offenen HCN Kanälen zu wirken, bzw. benötigen die Öffnung der Kanäle um wirken zu können. Unterschiede, vor allem die, die in der Klinik relevant werden würden, sollen an dieser Stelle kurz erläutert werden. Zuerst einmal zeigen sich prinzipielle Unterschiede in der Entwicklung der Stoffe: Die meisten Substanzen wurden von Verapamil (s. Abbildung 3) abgeleitet, zu nennen wären hier Ivabradin, Zatebradin (UL-FS49) und Cilobradin (DK-AH 269).

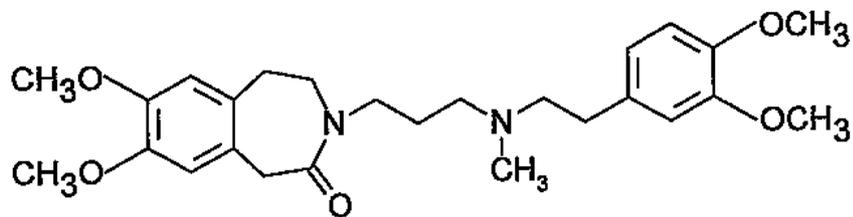


Abbildung 19. Darstellung der Strukturformel des Zatebradin

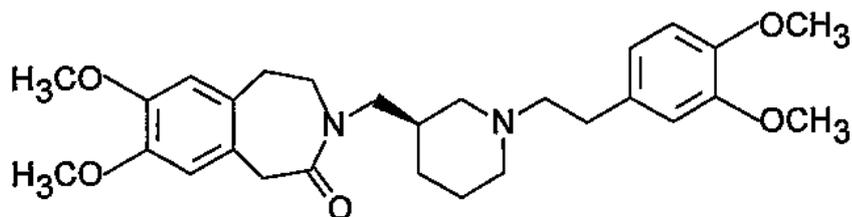


Abbildung 20. Darstellung der Strukturformel des Cilobradin

Eine andere, jedoch ebenfalls selektiv bradykarde Substanz stellt das ZD7288 dar, es wurde mit Clonidin als Vorbild hergestellt.

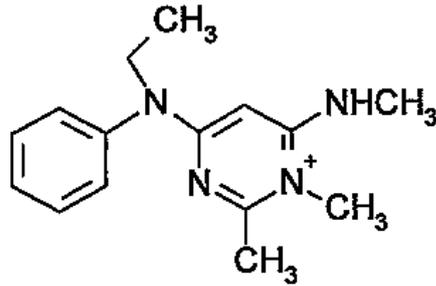


Abbildung 21. Darstellung der Strukturformel des ZD7288

ZD7288 war eine der ersten untersuchten Substanzen mit selektiv  $I_h$ -blockierender Wirkung (BoSmith et al. 1993). Die Forschungen von Shin et al. im Jahr 2001 ergaben eine Abhängigkeit der stromblockierenden Wirkung von Hyperpolarisation und somit offener Kanalkonfiguration, wie sie auch für Ivabradin existiert. Der große Nachteil des ZD 7288 liegt jedoch in der Überwindung der Blut-/ Hirnschranke, eine Tatsache, die die möglichen zentralen Nebenwirkungen zu einem Ausschlusskriterium für den klinischen Einsatz als rhythmusverlangsamendes Herzmedikament macht.

Zatebradin und Cilobradin stammen wie Ivabradin von Verapamil ab. Diese Tatsache bedingt natürlich eine relativ große Ähnlichkeit der drei Stoffe. Zate- und Cilobradin wurden erst nach Ivabradin, im Rahmen der Suche nach noch besseren Wirkstoffen entwickelt, bringen jedoch, nach heutigen Forschungsergebnissen zumindest in der klinischen Anwendung keinen Vorteil mit sich. Alle drei Stoffe haben gegenüber dem ZD7288 den entscheidenden Vorteil, dass sie die Blut-/ Hirnschranke nicht überschreiten.

Zatebradin hat jedoch den Nachteil, dass es neben der Wirkung auf den  $I_h$  eine relevante stromreduzierende Wirkung an Kalzium- und insbesondere Kaliumkanälen aufweist (Doerr & Trautwein 1990; BoSmith et al.1993; Bois et al. 1996). Dadurch wird die Dauer des Aktionspotentials stärker verlängert als durch eine selektive Blockade des  $I_h$ , was neben der erwünschten Verlangsamung des Herzrhythmus zu einer unerwünschten proarrhythmogenen Wirkung führt. Dies beinhaltet ein im Vergleich zu Ivabradin erhöhtes Risiko medikamenteninduzierter Herzrhythmusstörungen. In seiner Wirkung auf HCN Kanäle war es dem Ivabradin allerdings sehr ähnlich, die Dosis-Wirkungskurve zeigte ebenfalls einen sigmoidalen Verlauf und hatte mit einer  $IC_{50}$  von ca. 2,5  $\mu\text{M}$  (Durchschnitt der  $IC_{50}$  der drei HCN Kanaltypen HCN1, HCN2, HCN4; Stieber 2003) einen Wert, der den  $IC_{50}$  Werten der Messungen im Rahmen dieser Arbeit mit Ivabradin sehr ähnlich ist.

Die Wirkung des Cilobradins ähnelt der des Zatebradins sehr, Cilobradin ist allerdings in seiner blockierenden Wirkung auf den  $I_h$  stärker und schneller (P.P. Van Bogaert & Pittoors 2003) als Zatebradin und Ivabradin. Die stärkere und schnellere Wirkung muss für den klinischen Gebrauch allerdings eher kritisch gesehen werden, da dies die Möglichkeit zur Feindosierung und die Steuerbarkeit des Medikaments reduziert. Der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve an HCN Kanälen ist ebenfalls sigmoidal, bei einer durchschnittlichen  $IC_{50}$  von  $0,9 \mu\text{M}$  (Stieber 2003).

#### **4.7 Vorteile des Ivabradins**

Klinische Untersuchungen der Ivabradinwirkung zeigten bereits sehr positive Ergebnisse. In einer Studie mit 360 Patienten (Borer et al. 2002) konnte der Nutzen des Medikaments zur Behandlung myokardialer Ischämie und Angina pectoris dargestellt werden.

Bei ergometrisch belasteten Patienten wurde die Zeit, die bis zum Einsetzen einer ischämiebedingten ST-Senkung verging, um über eine Minute verlängert. Desweiteren konnte eine deutlich geringere Anzahl an Angina-pectoris Anfällen unter Belastung und während der Langzeittherapie mit Ivabradin eine Reduktion der Anfallhäufigkeit und des Nitratverbrauchs festgestellt werden. Es war möglich, Angina pectoris Anfälle von  $4,1 \pm 5,59$  auf  $0,95 \pm 2,24$  pro Woche zu reduzieren. Die in Tierversuchen inzwischen mehrmals bestätigte Abwesenheit von Nebenwirkungen (Monet et al. 2001; Colin et al. 2003; Mulder et al. 2004) zeigte sich auch in den Studien mit Patienten. Es zeigten sich keine hypotensiven, keine negativ inotropen und auch keine anderen unerwünschten Effekte, bis auf „Lichtblitze“. Diese Veränderungen der Lichtintensität traten bei ca. 15 % der Patienten, die die zur ausreichenden Wirkung benötigte Dosis (10 mg) eingenommen hatten auf, führten jedoch nur bei 3 von 360 Patienten zum Abbruch der Behandlung.

In einer weiteren Studie an Hunden (Colin et al. 2003) konnte gezeigt werden, dass Ivabradin den myokardialen Sauerstoffverbrauch reduziert und die Diastole verlängert, was gleich zwei Ansatzpunkte der antiischämischen Therapie erreicht: Zum Einen die Reduktion des Sauerstoffverbrauchs durch die Verlangsamung der Herzfrequenz und zum Anderen die Verbesserung der Sauerstoffversorgung. Die Diastole ist die Zeit der Herzaktion, in der die Koronarien und somit auch das Muskelgewebe durchblutet wird, so dass eine Verlängerung der Diastole eine bessere Sauerstoffversorgung ermöglicht. Auch in Untersuchungen zur längerfristigen Wirkung und Auswirkung des Ivabradins an Hunden (Monnet et al. 2001) und Ratten (Mulder et al. 2004) konnten bisher keine entscheidenden Nachteile festgestellt werden, die Studie an Ratten zeigte sogar noch weitere Vorteile auf. So kommt es zu einer

Veränderung der Myokardstruktur im Sinne einer Reduktion der Kollagendichte und einer Zunahme der Kapillardichte, die jedoch das Herzgewicht nicht beeinflusst. Durch diese strukturelle Remodelierung konnte die linksventrikuläre Funktion nicht nur deutlich verbessert werden, die strukturelle Veränderung ließ sich sogar nach Absetzen des Ivabradins und folgender Rückkehr der Herzfrequenz auf das Ausgangsniveau noch nachweisen. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass alle bisherigen Forschungsergebnisse darauf hindeuten, dass Ivabradin sehr gut für die klinische Anwendung geeignet ist:

- Es erhöht die Belastungstoleranz KHK-kranker Menschen
- Es reduziert die Frequenz der Angina-pectoris Anfälle
- Es finden sich keine Hinweise für Toleranzentwicklung oder Reboundeffekt
- Es verbessert die linksventrikuläre Funktion
- Die einzig bekannte Nebenwirkung sind Lichtintensitätsschwankungen

#### ***4.7.1 Relevanz der Ergebnisse für die klinische Anwendung***

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass Ivabradin auf alle drei HCN Kanaltypen HCN1, HCN2, HCN4 eine blockierende Wirkung hat. Die Unterschiede in der Wirkung auf die Isoformen haben für den klinischen Gebrauch keine wesentliche Bedeutung, da sich die Werte der relevanten Parameter nicht signifikant unterscheiden. Die maximal erreichte Blockade, die  $IC_{50}$  und die minimal wirksame Dosis stellen eine Möglichkeit dar, die Medikamentendosierung am Patienten zu optimieren. Die minimal wirksame Dosis ermöglicht es, nötige Mindestdosierungen des Ivabradins am Menschen zu errechnen. Die  $IC_{50}$  ist ein in der Pharmakologie anerkanntes Hilfsmittel zur Medikamentendosierung. Er ermöglicht das Abschätzen, bei welcher Dosis das Medikament gut wirksam aber dennoch nicht überdosiert ist. Der Wert der maximal wirksamen Dosis erlaubt hingegen eine Aussage darüber, ab welcher Konzentration des Pharmakons im Blut des Menschen eine weitere Dosissteigerung keinen positiven Effekt mehr hätte.

Gesichert werden konnte auch, dass die Blockade der HCN2- und HCN4 Isoform für die nötige Wirkung ausreicht und die Substanz somit als Medikament mit rhythmusverlangsamender Wirkung geeignet ist. Den entscheidenden Wirkort dafür stellt nämlich der  $I_h$  am Sinusknoten dar, welcher hauptsächlich von einem Strom durch den HCN4 Kanal getragen wird. Ob die Wirkung des Ivabradins auf die anderen Isoformen zu Nebenwirkungen in anderen Organen führt und wenn ja, wie stark, lässt sich mit absoluter Sicherheit noch nicht sagen. In peripheren Neuronen beispielsweise finden sich eher HCN1 und HCN2 Kanäle, in den Fotorezeptoren der Retina HCN1. Wirkungen auf die

Fotorezeptoren der Retina führen, wie bereits bekannt wurde, zu Schwankungen in der Lichtintensitätswahrnehmung, der einzig bekannten Nebenwirkung des Ivabradins. Auswirkungen auf die peripheren Neurone konnten bis dato nicht festgestellt werden, möglicherweise wären hierzu höhere Konzentrationen der Substanz nötig. Zentrale Nebenwirkungen sind auf Grund der fehlenden Überschreitung der Blut-Hirn-Schranke nicht zu erwarten.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

- Atwell D & Wilson MJ (1980)* Behavior of the rod network in the tiger salamander retina mediated by membrane properties of individual rods. J Physiol 309: 287-315
- Bader C, MacLeish P, Schwartz E (1979)* A voltage clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander. J Physiol 331:253-284
- Biel M, Ludwig A, Zong X, Hofmann F (1999)* Hyperpolarisation-activated cation channels : a multi-gene family. Rev Physiol Biochem Pharmacol 136 :165-181
- Bois P, Bescond J, Renaudon B, Lenfant J (1996)* Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of sinoatrial node cells. Br J Pharmacol 118 :1051-1057
- Borer JS, Fox K, Jaillon P, Lerebours G (2002)* Antiangial and Antiischemic Effects of Ivabradine, an  $I_f$  Inhibitor, in Stable Angina. Circulation 107:817-823
- BoSmith RE, Briggs I, Sturgess NC (1993)* Inhibitory actions of ZENECA ZD 7288 on whole-cell hyperpolarisation activated inward current ( $I_f$ ) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. Br J Pharmacol 110:343-349
- Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ (1979)* How does adrenalin accelerate the heart ? Nature 280:235-236
- Bucchi A, Baruscotti M, DiFrancesco D (2002)* Current- dependant Block of Rabbit Sino-Atrial Node  $I_f$  Channels by Ivabradine. J Gen Physiol 120:1-13
- Campbell DL, Rasmussen RL, Strauss HC (1992)* Ionic current mechanisms generating vertebrate primary cardiac pacemaker activity at the single cell level : an integrative view. Annu Rev Physiol 54:279-302
- Denyer & Brown H (1990)* Pacemaking in rabbit sino-atrial node cells during  $Cs^+$  block of the hyperpolarisation-activated current,  $I_f$ . J Physiol 429:401-409

*DiFrancesco D (1981)* A new interpretation of the pacemaker current in calf Purkinje fibres. J Physiol 314:359-376

*DiFrancesco D (1985)* The cardiac hyperpolarisation-activated current,  $I_f$ . Origins and developments. Prog Biophys Mol Biol 46:163-183

*DiFrancesco D & Tortora P (1991)* Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular AMP. Nature 351:145-147

*DiFrancesco D (1993)* Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. Annu Rev Physiol 55:455-472

*DiFrancesco D & Mangoni M (1994)* Modulation of single hyperpolarisation-activated channels ( $I_f$ ) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. J Physiol 474:473-482

*DiFrancesco D & Camm J (2004)* Heart rate lowering by specific and selective  $I_f$  current inhibition with ivabradine. Drugs 64 (16):1757-65

*Doerr T & Trautwein W (1990)* On the mechanism of the 'specific bradycardic action' of the verapamil derivative UL-FS49. Arch Pharmacol 341:331-340

*Fain G, Quant F, Bastian B (1978)* Contribution of a caesium-sensitive conductance increase in the rod photoresponse. Nature 272:467-469

*Gauss R, Seifert R, Kaupp UB (1998)* Molecular identification of a hyperpolarisation-activated channel in sea urchin sperm. Nature 393:583-587

*Goethals M, Raes A, van Bogaert PP (1993)* Use-dependant block of the pacemaker current  $I(f)$  in rabbit sinoatrial node cells by zatebradine (UL-FS 49). On the mode of action of sinus node inhibitors. Circulation 88:2389-2401

*Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977)* Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 36:59-72

*Halliwel JV & Adams PR (1982)* Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. Brain Res 250:71-92

*Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981)* Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflügers Arch 391:85-100

*Ishii T, Takano M, Xie L, Noma A, Ohmori H (1999)* Molecular characterization of the hyperpolarisation-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. J Biol Chem 274:12835-12839

*Kaupp U & Seifert R (2002)* Molecular diversity of pacemaker ion channels. Annu Rev Physiol 63:235-257

*Koshland DE, Némethy G, Filmer D (1966)* Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. Biochemistry 5: 365-385

*Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998)* A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. Nature 393:587-591

*Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M (1999)* Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. EMBO J 18:2323-2329

*Ludwig A (2000)* Identifizierung und funktionelle Charakterisierung einer Familie von Hyperpolarisations-aktivierten Kationenkanälen. Habilitationsschrift (TU München)

*Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M (1999)* Structure and function of cardiac pacemaker channels. Cell Physiol Biochem 9:179-186

*Lüthi A & McCormick DA (1998)* H-Current: properties of a neuronal and network pacemaker. Neuron 21:9-12

*Monnet X, Ghaleh B, Colin P, Parent de Curzon O, Guidicelli JF, Berdeaux A (2004)*

Effects of Heart Rate Reduction with Ivabradine on Exercise-Induced Myocardial Ischemia and Stunning. Pharmacol 299 :1133-1139

*Monod J, Wymann J, and Changeux, JP (1965)* On the nature of allosteric transitions: a plausible model. J. Mol. Biol. 12: 88-118

*Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2001)* Cellular expression and functional characterisation of four hyperpolarisation-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. Eur J Biochem 268:1646-1652

*Mulder P, Barbier S, Chagraoui A, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Renet S, Lerebours G, Mahlberg-Gautin F, Thuillez C (2004)* Long-Term heart Rate Reduction Induced by the Selective I<sub>f</sub> Current Inhibitor Ivabradine Improves Left Ventricular Funktion and Intrinsic Myokardial Structure in Congestive Heart Failure. Circulation 109:1674-1679

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

*Pape HC (1996)* Queer current and pacemaker: the hyperpolarisation-activated cation current in neurons. Annu Rev Physiol 58:299-327

*Pape HC & Mager R (1992)* Nitric oxide controls oscillatory activity in thalamocortical neurons. Neuron 9:441-448

*Pérez O, Gray P, Franqueza L, Carrón R, Valenzuela C, Delón E, Tamargo J (1995)* Effects of the two enantiomers, S- 16257- 2 and S- 16260- 2, of a new bradycardic agent on guinea-pig isolated cardiac preparations. Br J Pharmacol 115:787-79

*Robinson RB & Siegelbaum SA (1998)* Hyperpolarisation-activated cation currents: from molecules to physiological function. Annu Rev Physiol 65: 453-480

*Sakman B & Neher E (1984)* Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. Annu Rev Physiol. 46:455-72

*Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR (1998)* Identification of a gene encoding a hyperpolarisation-activated pacemaker channel of the brain. Cell 93:717-729

*Sesti F, Eismann E, Kaupp UB, Nizzari M, Torre V (1995)* The multi-ion nature of the cGMP-gated channel from vertebrate rods. J Physiol 487:17-36

*Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB (1999)* Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. Proc Natl Acad Sci 96:9391-9396

*Shin KS, Rothberg BS, Yellen G (2001)* Blocker State Dependence and Trapping in Hyperpolarisation-activated Cation Channels: Evidence for an Intracellular Activation Gate. J Gen Physiol 117:91-101

*Stieber J, Hofmann F, Ludwig A (2004)* Pacemaker Channels and Sinus Node Arrhythmia. Trends in Cardiovasc Med 14:23-28

*Stieber J (2003)* Non-Clinical Report (nicht veröffentlichte Daten)

*Stieber J, Stöckl G, Hermann S, Hassfurth B, Hofmann F (2005)* Functional Expression of the Human HCN3 Channel. J Biol Chem 280(41): 34635-34643

*Thollon C, Cambarrat C, Vian J, Prost JF, Peglion JL, Vilaine JP (1994)* Electrophysical effects of S 16257, a novel sino-atrial node modulator, on rabbit and guinea-pig cardiac preparations: comparison with UL-FS 49 and UL-AH 99 in sheep cardiac fibres. Eur J Pharmacol 229: 55-62

*Van Bogaert PP & Pittoors F (2003)* Use-dependant blockade of cardiac pacemaker current (I<sub>f</sub>) by cilobradine and zatebradine. Eur J Pharmacol 478:161-171

*Yanagihara K & Irisawa H (1980)* Inward current activated during hyperpolarisation in the rabbit sinoatrial node cell. Pfluegers Arch 388:11-19.

## 6. ARBEITEN, DIE IM RAHMEN DIESER DISSERTATION ENTSTANDEN SIND

1. *Juliane Stieber, Karen Wieland, Georg Stöckl, Franz Hofmann (2005)*

Molecular basis for the bradycardic and proarrhythmic properties of the sinus node inhibitors.

Abstract, Fasab Journal Vol 19, n° 4

2. *Juliane Stieber, Karen Wieland, Georg Stöckl, Franz Hofmann*

Posterpräsentation (siehe nächste Seite) auf der

- Experimental Biology April 2005

- 35. International Congress of Physiological Sciences March/ April 2005

3. *Juliane Stieber, Karen Wieland, Georg Stöckl, Andreas Ludwig, Franz Hofmann (2005)*

Bradycardic and proarrhythmic properties of sinus node inhibitors. Mol Pharm Epub ahead of print: 30.12.2005

# Molecular Basis for the Bradycardiac and Arrhythmic Properties of Sinus Node Inhibitors

Juliane Stieber, Karen Wieland, Georg Stöckl, Franz Hofmann

Institute for Pharmacology & Toxicology, Technical University Munich, Biedersteiner Str. 29, 80802 München, Germany

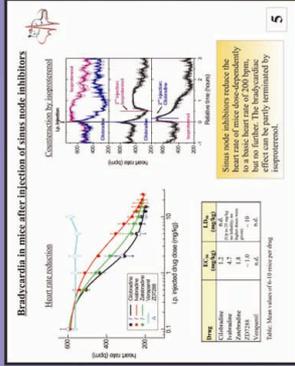
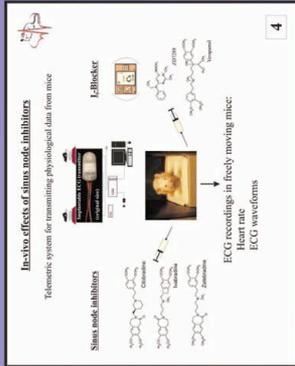
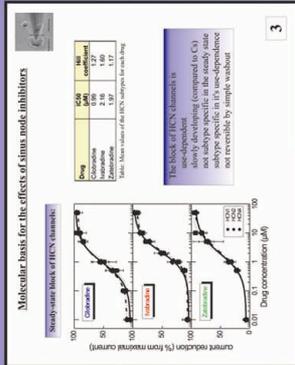
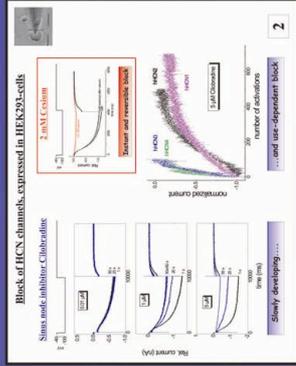
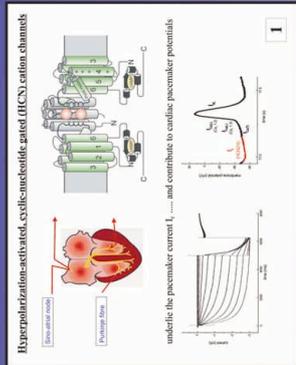


**ABSTRACT**

"Sinus node inhibitors" are a relatively new class of drugs, recently approved for clinical use. They reduce the heart rate by blocking the pacemaker current I<sub>h</sub> in the cardiac conduction system. To date, the molecular basis for the bradycardiac and arrhythmic properties of these drugs is not fully understood. We investigated the effects of three different classes of sinus node inhibitors on cloned and expressed hCN1 channels using the voltage-clamp technique.

All three substances blocked the current through human hCN1.4 channels which was elicited by hyperpolarizing the membrane stepwise from -40 to -100 mV. There was no hCN1-subtype specificity for the steady-state block with some IC<sub>50</sub> values of 0.1, 1.8 and 2.2 μM for clobutolol, zolaterodolol and zolaterodolol, respectively. The block was not dependent on the voltage protocol for the block of hCN1 and 2, but only 20-50% inhibition for hCN1.4.

In vivo action of these blockers was analyzed using telemetric ECG recordings in mice. Each compound reduced the heart rate dose-dependently from 600 to 200 bpm with EC<sub>50</sub> values of 1.2, 1.8 and 4.7 mg/kg for clobutolol, zolaterodolol and zolaterodolol, respectively. In addition, all three drugs induced increasing QT and QTc intervals. This arrhythmic effect was not observed in mice lacking the hCN1 gene. The correlation of the data between T- and P-wave<sup>1</sup>, suggestive of suppression of regular sinus node function.



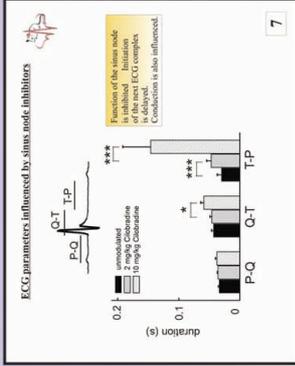
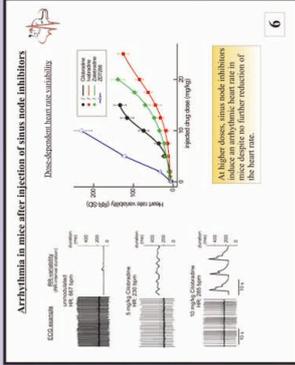
1

2

4

5

3



**CONCLUSIONS**

"Sinus node inhibitors" induce bradycardia by blocking the pacemaker channels (mainly hCN1) in the cardiac conduction system.

A lower heart rate in mice seems to be independent of arr flow through hCN1 channels.

Since all hCN1 subtypes are blocked, side effects like slowing of "leakier" described by patients are not observed in mice lacking hCN1.4, but only in mice lacking hCN1.2 or hCN1.1.

A higher "sinus node inhibitor" induces arrhythmia in mice, characterized by inhibition of regular sinus node function.

**OPEN QUESTIONS**

1 Are hCN1 channels the only target of sinus node inhibitors?

2 Is arrhythmia also induced in lower patients?

3 Consequences?

4 What are the effects of long-term blockade of hCN1 channels in neuronal tissue?

6

7

5

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die koronare Herzerkrankung als eine der weitverbreitetsten Erkrankungen der westlichen Welt war der Grund für die Suche nach neuen Substanzen, welche durch weniger Nebenwirkungen und Anwendbarkeit auch bei besonders komplexen Krankheitsbildern imponieren sollten. Im Rahmen dieser Suche fanden sich die sogenannten bradykarden Substanzen, unter denen das von Verapamil abgeleitete Ivabradin die Erste war. Es stellte sich heraus, dass Ivabradin den Herzrhythmus verlangsamt, indem es die Phase der langsamen Depolarisation des Membranpotentials an Sinusknotenzellen verlängert. Diese Wirkung entstand durch eine ivabradinbedingte Blockade des  $I_h$ . Die Identifizierung des  $I_h$  als HCN Kanalstrom erlaubte dann die Herstellung eines Zusammenhanges zwischen der den  $I_h$  blockierenden Ivabradinwirkung und der Wirkung des Ivabradins auf den HCN Kanal. Die direkte Wirkung des Ivabradins auf HCN Kanäle ist Thema der vorliegenden Dissertation. Die Identifizierung der für verschiedene HCN Kanalisformen kodierenden DNA erlaubte die Klonierung von vier HCN Kanaltypen: HCN1, HCN2, HCN3, HCN4. An drei dieser vier Isoformen wurde nun die Ivabradinwirkung erforscht, wozu die Kanalströme mit der Patch-clamp Methode an in HEK Zellen klonierte HCN Kanälen gemessen wurden. Aufwendige PCR-getragene Experimente erlaubten die Lokalisation verschiedener HCN Kanal Isoformen, am humanen Herzen sowie an den Sinusknoten von Kaninchen und Mäusen. Am menschlichen Herz fanden sich nur HCN2 und HCN4 Kanäle, im Sinusknoten der Tiere zeigten sich hohe Konzentrationen an HCN4 Kanälen, weit vor den Konzentrationen von HCN1 und HCN2 Kanälen. Es war daher ein weiteres Ziel dieser Arbeit zu erarbeiten, inwieweit Ivabradin eine Präferenz für bestimmte HCN Kanaltypen vorweist.

2. Die Patch-clamp Methode erlaubte die Messung der Ionenströme durch die HCN Kanäle. Hierzu wurde für HCN Kanäle kodierende DNA in HEK Zellen transfiziert, so dass die Wirkung des Ivabradins direkt an Hand der Minderung des Ionenstroms durch die HCN Kanäle gemessen werden konnte. Auf diese Weise gelang es, die direkte Wirkung des Ivabradins auf die drei HCN Kanalisformen HCN1, HCN2 und HCN4 das erste mal nachzuweisen.

3. Die Anwendung des Pharmakons in aufsteigenden und für alle drei Kanaltypen gleichen Konzentrationen erlaubte nicht nur die Erstellung der drei Dosis-Wirkungskurven, sondern ermöglichte auch deren Vergleich. Zusätzlich konnten  $IC_{50}$ , die minimal wirksame

Konzentration und die maximal wirksame Konzentration erfasst werden, welche für die mögliche klinische Anwendung wichtige Informationen enthalten.

4. Der Vergleich der drei Dosis-Wirkungskurven zeigte eine so große Ähnlichkeit in deren Verlauf, dass grobe Unterschiede der Ivabradinwirkung auf die Isoformen schon bei Betrachtung der sigmoidal gefitteten Kurven ausgeschlossen werden konnten. Die zur genaueren Betrachtung der Kurven bei den einzelnen Ivabradinkonzentrationen durchgeführten t-Tests zeigten bis auf wenige Ausnahmen keine signifikanten Unterschiede, so dass eine besondere Affinität des Ivabradins zu einer der Isoformen ausgeschlossen werden konnte.

5. Die Art der Interaktion zwischen Ivabradin und HCN Kanal war eine bisher ungeklärte Frage. Als relativ sicher stellt sich die Annahme dar, dass sich die Bindungsdomänen für die Substanz im Inneren des Kanals befinden; wodurch die Bindung des Ivabradins an seinen Rezeptor jedoch beeinflusst wird, war eine offene Frage. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen bestätigen die Annahme, dass sich die Bindungsstellen für Ivabradin im Inneren des HCN Kanals befinden. Schwieriger gestaltet sich die Frage nach den Einflüssen auf den Grad der kanalblockierenden Wirkung am HCN Kanal. Meine Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass ein Ionenstrom, der durch mehr als die halbmaximale Aktivierung des Kanals bedingt wird, die Bindung des Ivabradins bei niedrigen Pharmakonzentrationen (bis ca. 2  $\mu\text{M}$ ) behindern. Bei höheren Konzentrationen (über 5  $\mu\text{M}$ ) zeigt sich der umgekehrte Effekt: eine stärkere Aktivierung des Kanals führt zu einer Verbesserung der blockierenden Wirkung. Mehrere Bindungsdomänen für Ivabradin bzw. unterschiedlich viele Bindungsdomänen bei den verschiedenen HCN Isoformen können nach ausführlicher Diskussion der Hill Koeffizienten nicht angenommen werden, so dass die Erklärung der Ivabradinwirkung an den HCN Kanälen im Grad der jeweiligen Kanalaktivierung gesehen werden.

## 8. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich das Wort an Dr. Juliane Stieber wenden. Ich bedanke mich ganz herzlich für die immerzu vorhandene Bereitschaft mich in allen Fragen zu unterstützen, für die ausgezeichnete Anleitung, für die guten Ideen und für die mir entgegengebrachte Geduld. Ohne all diese Hilfestellungen wäre diese Dissertation keine geworden.

Herzlich danken möchte ich auch Prof. Dr. Franz Hofmann, dem Direktor des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der TU München. Die Aufnahme in seine hervorragende Arbeitsgruppe und die Bereitstellung der nötigen Geräte, Labors und Infrastruktur waren essentielle Voraussetzung für die Durchführung meiner Experimente. Die Diskussion meiner Arbeit im Team war immer wieder Anlass zu einer hochwertigeren Interpretation meiner Ergebnisse.

Mein voller Dank geht auch an die anderen Teammitglieder, die mir in außerordentlichen Notsituationen und bei schwierigsten Fragestellungen, insbesondere im Rahmen der Patch-clamp Technik und der Zellklonierung zur Seite standen: Prof. Andreas Ludwig, PD Dr. Thomas Kleppisch, PD Dr. Jörg Wegener, Dr. Jens Schloßmann, PD Dr. Robert Feil, PD Dr. Andrea Welling, Dr. Sven Moosmang.

In erster Linie für das fröhliche und unterhaltsame Arbeitsklima, aber auch für die vielen praktischen Unterstützungen möchte ich Robert Lukowski, Pascal Weinmeister, René Wörner, Silke Weber und natürlich auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts danken.

Zu guter Letzt geht mein besonderer Dank an meinen Freund Hendrik Dietz und meine Eltern, die mir alle durch ihr stetiges Vertrauen in meine Arbeit und ihre vielen konstruktiven Ratschläge eine unersetzliche Hilfe für die Bewerksstellung dieser Dissertation waren. Die immerzu großzügige finanzielle Unterstützung meiner Eltern stellte zudem eine Grundvoraussetzung zur Bewältigung meines Studiums und meiner Forschungen dar.

