

Bachelorarbeit

Nona Forghani

Vorgelegt am 21. April 2026

Etablierung eines Fluoreszenz-basierten 96-Well-Assays zur Messung ligandengesteuerter Ionenkanäle unter Verwendung von Assay-Ready Cells

HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN HAMBURG

Fakultät Life Sciences

Studiengang Biotechnologie

Erstprüferin: Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)

Zweitprüfer: M. Sc. Lukas Focke (acCELLerate GmbH)

Nona Forghani

**Etablierung eines Fluoreszenz-basierten
96-Well-Assays zur Messung ligandengesteuerter
Ionenkanäle unter Verwendung von Assay-Ready
Cells**

Bachelorarbeit eingereicht im Rahmen der Bachelorprüfung

im Studiengang Biotechnologie
an der Fakultät Life Sciences
der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Campus Bergedorf

in Zusammenarbeit mit:
acCELLerate GmbH
Abteilung F&E
Osterfeldstraße 12-14
22529 Hamburg

Erstprüfer: Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW-Hamburg)
Zweitprüfer: M. Sc. Lukas Focke (Head of R&D, acCELLerate GmbH)

Abgabedatum: 21. April 2026
Matrikelnummer: XXXXXXXXXX

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	ii
Tabellenverzeichnis	iii
Abkürzungsverzeichnis	iv
1 Einleitung	1
1.1 Ausgangslage und Motivation	1
1.2 Ziel der Arbeit	3
2 Theoretischer Hintergrund	4
2.1 Aufbau und Funktion von Ionenkanälen	4
2.2 Spannungsabhängige Ionenkanäle	6
2.3 CHO-Zellen als heterologes Expressionssystem	7
2.4 Fluoreszenzbasierte Ionenkanal-Assays	10
3 Material und Methoden	12
3.1 Experimentelles Design und Materialien	12
3.2 Zellvorbereitung und Assay-Setup	13
3.3 Fluoreszenzbasierte Assays	16
4 Ergebnisse	22
4.1 Thallium-Flux-Assay (hERG)	22
4.2 Calcium-Assay (CaV1.2)	33
5 Diskussion	38
5.1 Assaybezogene und methodische Aspekte des thalliumbasierten Brilliant-Thallium-Gold-Snapshot-Assays	38
5.2 Funktionelle Einordnung der untersuchten hERG-Modulatoren im Snapshot-Assay . .	40
5.3 Assaybezogene und methodische Aspekte des Fluo-4-AM-basierten Calcium-Assays	42
5.4 Zusammenfassende Bewertung der verwendeten Assays	43
Literaturverzeichnis	44

Abbildungsverzeichnis

1	Sekundärstrukturen von Proteinen	4
2	Struktur und Topologie des hERG-Kanals	5
3	Ionentransporter und Ionenkanäle in der Zellmembran	6
4	Aufbau spannungsabhängiger Kaliumkanäle	7
5	Aufbau spannungsabhängiger Natriumkanäle / Calciumkanäle	7
6	Gating von hERG-Kanälen	9
7	Konzentrations-Wirkungs-Kurven von NS 1643	23
8	Konzentrations-Wirkungs-Kurven von NS 1643 im erweiterten Konzentrationsbereich	25
9	Konzentrations-Wirkungs-Kurven von NS 1643 im aktivitätsrelevanten Konzentrationsbereich	26
10	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von NS 1643 mit 2X Ti^+ -Konzentration	28
11	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von RPR-260243	30
12	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von RPR-260243 im erweiterten Konzentrationsbereich	31
13	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Terfenadin	32
14	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von FPL 64176	34
15	Konzentrations-Wirkungs-Kurven von FPL 64176 im erweiterten Konzentrationsbereich	35
16	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Nisoldipin	36

Tabellenverzeichnis

1	Zusammensetzung und Endkonzentrationen des tetracyclinfreien Assay-Mediums . . .	13
2	Zusammensetzung und Endkonzentrationen des serumfreien Assay-Mediums C . . .	13
3	Dilutionsschritte für CASY-Messungen	15
4	Zusammensetzung der Färbelösung für den Brilliant Thallium-Gold-Snapshot-Assay (10 mL Ansatz).	17
5	Zusammensetzung der Färbelösung für den Brilliant Thallium-Gold-Snapshot-Assay (10 mL Ansatz) - Inhibition.	18
6	Zusammensetzung der Färbelösung für den Calcium-Assay (10 mL Ansatz).	19
7	Fit-Parameter der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von NS 1643 im aktivitätsrele- vanten Konzentrationsbereich im Thallium-Flux-Assay.	27
8	Fit-Parameter der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von NS 1643 bei erhöhter Tl ⁺ -Konzentration (0,5 mM).	29
9	Fit-Parameter der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Terfenadin.	33

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Begriffe und Methoden

4PL	Vierparametrisches logistisches Modell (four-parameter logistic model)
API	Application Programming Interface
in vitro	außerhalb eines lebenden Organismus
in vivo	im lebenden Organismus
n	Anzahl der Messwerte (Stichprobengröße)
SD	Standardabweichung
assay-ready	gebrauchsfertig vorbereitete Zellen bzw. Assaysysteme
F₀	basale Fluoreszenz vor Stimulation
F₁	Fluoreszenz nach Stimulation
F/F₀	Verhältnis der Fluoreszenz nach Stimulation zur basalen Fluoreszenz
log₁₀	dekadischer Logarithmus
HillSlope	Steigungsparameter der logistischen Kurve
Snapshot-Assay	endpunktbasierter Assay mit einmaliger Messung

Biologische und pharmakologische Begriffe

ATP	Adenosintriphosphat
CaV	Calcium Voltage-Gated Channel
CaV1.2	Spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanal (CaV1.2, α_1C -Untereinheit)
CHO	Chinese Hamster Ovary
DUO	Dual-Expression-System (gleichzeitige Expression mehrerer Proteine in einer Zelllinie)
eag	ether-à-go-go
Fluo-4-AM	fluoreszenter Calcium-Indikatorfarbstoff (Acetoxymethylester-Form)
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPCRs	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
hERG	human Ether-à-go-go-Related Gene (Kaliumkanal)
IKr	schneller verzögerter Kaliumauswärtsstrom
IKs	langsamer verzögerter Kaliumauswärtsstrom
IK1	inward rectifier potassium current
KCNH2	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 2
KCNE2	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E Member 2
Kv7.2/3	spannungsabhängige Kaliumkanäle der Subtypen Kv7.2 und Kv7.3

Kv11.1	spannungsabhängiger Kaliumkanal der Subfamilie Kv11.1
MiRP1	MinK-related peptide 1
P-Loop	Porenschleife (pore loop)
S1–S6	Transmembransegmente 1 bis 6
S4	Transmembransegment 4
S5	Transmembransegment 5
S6	Transmembransegment 6
α	Alpha-Untereinheit (Proteinuntereinheit)
β	Beta-Untereinheit (Proteinuntereinheit)
α_1	Alpha-1-Untereinheit
$\alpha_2\delta$	Alpha-2-Delta-Untereinheit
CASY TT	Cell Counter and Analyzer System
FBS	fetal bovine serum

Pharmakologische Parameter

EC₅₀	Halbmaximale effektive Konzentration
IC₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
LogIC₅₀	dekadischer Logarithmus der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration

Chemische Substanzen und Modulatoren

AM	Acetoxymethyl
cDNA	komplementäre DNA
ChEMBL	Chemical Database of Bioactive Molecules
DMSO	Dimethylsulfoxid
NS 1643	synthetischer Aktivator des hERG-Kanals
RPR-260243	synthetischer Aktivator des hERG-Kanals

Ionen und chemische Spezies

Ca²⁺	Calcium-Ion
Cl[−]	Chlorid-Ion
CO₂	Kohlenstoffdioxid

H₂O	Wasser
K⁺	Kalium-Ion
Na⁺	Natrium-Ion
Tl⁺	Thallium-Ion

Experimentelle und medizinische Begriffe

NP	lower particle size limit
LP	upper particle size limit
CL/CR	gerätespezifische Kalibrierungsparameter
NL/NR	gerätespezifische Normalisierungsparameter
TRS	extracellular background masking solution
Kat. Nr.	Katalognummer

Einheiten

g	Gramm
h	Stunde
L	Liter
m	Meter
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mM	Millimolar (10^{-3} mol/L)
min	Minute
nM	Nanomolar (10^{-9} mol/L)
s	Sekunde
μM	Mikromolar (10^{-6} mol/L)
%	Prozent

1 Einleitung

1.1 Ausgangslage und Motivation

Der Bereich der roten Biotechnologie umfasst die Anwendung biotechnologischer Verfahren in der Medizin und pharmazeutischen Forschung. Fortschritte in der Molekular- und Zellbiologie haben in den vergangenen Jahrzehnten ein detailliertes Verständnis krankheitsrelevanter Proteine ermöglicht, wodurch diese gezielt identifiziert, charakterisiert und therapeutisch moduliert werden können (Gupta et al., 2016).

Neben der Identifikation geeigneter molekularer Zielstrukturen ist die funktionelle Überprüfung potenzieller Wirkstoffe essenziell, um deren biologische Wirkung zuverlässig zu quantifizieren. Vor der Durchführung klinischer Studien unterliegt ein Arzneistoff einer umfassenden präklinischen Prüfung, die sowohl in vitro (Untersuchungen außerhalb eines lebenden Organismus) als auch in vivo (Untersuchungen im lebenden Organismus) durchgeführt werden. Zellbasierte in-vitro-Assays sind dabei von zentraler Bedeutung für die frühe Wirkstoffcharakterisierung (Wang et al., 2024). In dieser Phase werden Wirksamkeit, Selektivität und potenzielle Sicherheitsrisiken systematisch analysiert. Hierfür sind standardisierte, robuste und reproduzierbare Testsysteme erforderlich. Zellbasierte Assays ermöglichen die Quantifizierung pharmakologischer Effekte unter kontrollierten Bedingungen und liefern gleichzeitig physiologisch relevante Messgrößen (Hughes et al., 2011).

Pharmakologische Zielstrukturen werden unter anderem in der Bioaktivitätsdatenbank ChEMBL (Chemical Database of Bioactive Molecules) klassifiziert (vgl. Gaulton et al., 2012). Zu den Hauptklassen zählen Enzyme, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), Ionenkanäle, nukleäre Rezeptoren und Transportproteine. Ionenkanäle stellen mit mehr als 400 Mitgliedern die zweitgrößte Familie von Membranproteinen dar (BMG LABTECH, 2026). Sie übernehmen zentrale Funktionen in zellulären Signalwegen und Stoffwechselprozessen (Santos et al., 2017). Insbesondere regulieren sie die elektrische Erregbarkeit von Zellen und beeinflussen grundlegende physiologische Prozesse wie Nervenleitung, Muskelkontraktion, Hormonfreisetzung und Herzrhythmus (Dai, 2023; Goodman, 2008; Priest & McDermott, 2015; Stojilkovic et al., 2010).

Ionenkanäle sind zudem an sogenannten Kanalopathien beteiligt, einer Gruppe genetischer Erkrankungen, die durch Mutationen in Ionenkanalgenen verursacht werden. Darüber hinaus stellen sie relevante pharmakologische Targets dar, unter anderem im Kontext von Krebs- und Autoimmunerkrankungen (BMG LABTECH, 2026). Gleichzeitig sind sie von hoher Bedeutung für die Sicherheitspharmakologie, da unerwünschte Wirkstoffinteraktionen, insbesondere am Herzen, schwerwiegende Nebenwirkungen hervorrufen können (de Lera Ruiz & Kraus, 2015).

Einen grundlegenden Beitrag zum Verständnis der Funktion von Ionenkanälen lieferte die Arbeit von Hodgkin und Huxley im Jahr 1952, in der das Aktionspotenzial mathematisch beschrieben und die grundlegende Rolle spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumströme für die neuronale Erregung gezeigt wurde (Hodgkin et al., 1952). Obwohl zu diesem Zeitpunkt die zugrunde liegenden Proteine noch nicht identifiziert werden konnten, bildeten diese Arbeiten die Grundlage für das heutige Verständnis selektiver Ionenleitung (Hodgkin et al., 1952).

Einen weiteren methodischen Durchbruch stellte die Entwicklung der Patch-Clamp-Technik durch Neher und Sakmann in den 1970er- und 1980er-Jahren dar (vgl. Hamill et al., 1981). Diese Methode

ermöglicht die hochauflösende Messung ionischer Ströme sowohl einzelner Ionenkanäle als auch ganzer Zellmembranen. Insbesondere in Einzelkanalaufnahmen können Eigenschaften wie Öffnungsdauer, Leitfähigkeit und pharmakologische Modulation direkt analysiert werden. Während die Patch-Clamp-Technik bis heute als Goldstandard der elektrophysiologischen Charakterisierung gilt und häufig als Referenzmethode zur Bewertung neuer Assay-Systeme eingesetzt wird (Catacuzzeno & Franciolini, 2025). Aufgrund des hohen experimentellen Aufwands und der geringen Durchsatzrate ist ihre Anwendung jedoch eingeschränkt. Fluoreszenzbasierte Assays ermöglichen hingegen die parallele Untersuchung einer Vielzahl von Bedingungen und stellen damit eine geeignete Methode für Hochdurchsatzanalysen dar, gehen jedoch mit einer geringeren Spezifität der Messung einher (Voldřich et al., 2024).

Fortschritte in der molekularen und zellbiologischen Forschung verdeutlichten, dass spannungsabhängige Kalium- und Calciumkanäle jeweils umfangreiche Genfamilien mit zahlreichen Subtypen umfassen, die sich in Struktur, Gewebeverteilung und biophysikalischen Eigenschaften unterscheiden. Strukturell bestehen diese Kanäle aus porenbildenden α -Untereinheiten, deren Eigenschaften durch zusätzliche regulatorische Untereinheiten moduliert werden. Unterschiede in Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik sowie in der Sensitivität gegenüber pharmakologischen Modulatoren führen zu einer ausgeprägten funktionellen Diversität. Diese Subtypvielfalt erschwert einerseits die experimentelle Analyse einzelner Kanalvarianten, ermöglicht jedoch andererseits eine gezielte subtypspezifische pharmakologische Beeinflussung (Catterall, 2012).

Obwohl viele dieser Kanäle physiologisch spannungsabhängig aktiviert werden, erfolgt ihre experimentelle Beeinflussung häufig durch spezifische Inhibitoren oder Aktivatoren, die an definierte Bindungsstellen des Kanalproteins binden und dessen Aktivität verändern. Die Expression dieser Kanäle in geeigneten Zelllinien unter kontrollierten Bedingungen bildet die Grundlage für funktionelle Untersuchungen und pharmakologische Analysen (de Lera Ruiz & Kraus, 2015).

Innerhalb der spannungsabhängigen Ionenkanäle sind Kalium- und Calciumkanäle von besonderer Bedeutung. Der Kaliumkanal-Komplex Kv7.2/3 (spannungsabhängige Kaliumkanal-Subtypen 7.2 und 7.3) reguliert die neuronale Erregbarkeit, und Dysfunktionen dieses Kanals sind mit neurologischen Erkrankungen wie Epilepsie assoziiert (Brown & Passmore, 2009). Der kardiale Kaliumkanal hERG (human Ether-à-go-go-Related Gene; erstbeschrieben durch Warmke und Ganetzky Warmke und Ganetzky, 1994) ist ein zentraler Parameter in der Sicherheitsbewertung von Wirkstoffen, da seine Blockade mit potenziell letalen Herzrhythmusstörungen korreliert (Ashcroft, 2000; Sanguinetti, 2014). Der L-Typ-Calciumkanal CaV1.2 (spannungsabhängiger Calciumkanal, α_{1C} -Untereinheit) spielt eine wesentliche Rolle bei der elektromechanischen Kopplung im Herzen und ist ein wichtiger Angriffspunkt für kardiovaskuläre Therapeutika (Hu et al., 2017).

Automatisierte Patch-Clamp-Systeme sowie fluoreszenzbasierte Assays zur Messung von Membranpotenzialänderungen und intrazellulären Ionenkonzentrationen ermöglichen standardisierte und skalierbare Analysen und werden insbesondere in der präklinischen Wirkstoffcharakterisierung eingesetzt (Bell & Dallas, 2018; Fitch et al., 2003; Voldřich et al., 2024).

Trotz dieser Fortschritte bleibt die funktionelle Analyse von Ionenkanälen methodisch anspruchsvoll. Die Expression dieser komplexen Membranproteine erfordert geeignete Expressionssysteme, stabile Zelllinien und kontrollierte experimentelle Bedingungen. Variationen in Kanalexpression, Membranpotenzial oder Ionengradienten können die Messergebnisse beeinflussen (Geron et al., 2017). Zudem

erfassen fluoreszenzbasierte Assays in der Regel indirekte zelluläre Signale und nicht den isolierten Einzelkanalstrom, was bei der Interpretation berücksichtigt werden muss (Islam et al., 2021; Voldřich et al., 2024).

Die Bedeutung der Ionenkanalforschung in der pharmazeutischen Entwicklung nimmt weiterhin zu, insbesondere im Kontext der Entwicklung selektiver Wirkstoffe und personalisierter Therapieansätze. Daraus resultieren steigende Anforderungen an Testsysteme, die eine differenzierte und zuverlässige Quantifizierung pharmakologischer Effekte ermöglichen (Fernández-Ballester et al., 2011; Kaczorowski et al., 2008).

1.2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung und funktionelle Charakterisierung zweier fluoreszenzbasierter Assays zur Untersuchung der in Assay-Ready-CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) exprimierten Ionenkanäle hERG-DUO (Dual-Expression-System für hERG-Kanäle) und CaV1.2. Dabei wurden ein Thallium-Flux-Assay und ein Fluo-4-AM (Fluo-4 acetoxymethyl ester) basierter Calcium-Assay hinsichtlich ihrer Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Interpretierbarkeit der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen untersucht. Im Fokus stand die Bewertung der jeweiligen Aussagekraft der beiden Messsysteme für die Detektion aktivierender und inhibierender Substanzen unter den gewählten experimentellen Bedingungen.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Aufbau und Funktion von Ionenkanälen

Ionenkanäle sind integrale Membranproteine, deren Funktion durch ihren strukturellen Aufbau bestimmt wird. Die Proteinstruktur lässt sich in verschiedene Organisationsebenen unterteilen, darunter die Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur. Die Primärstruktur beschreibt die genetisch codierte lineare Aminosäuresequenz. Bestimmte Abschnitte dieser Sequenz bestehen überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren und bilden Transmembransegmente, die in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran verankert sind. Hydrophile Aminosäuren sind demgegenüber überwiegend in intra- oder extrazellulären Bereichen des Proteins zu finden. Sekundärstrukturen wie α -Helices und β -Faltblätter (vgl. Abbildung 1) entstehen durch intramolekulare Wechselwirkungen entlang der Polypeptidkette (Breda et al., 2008).

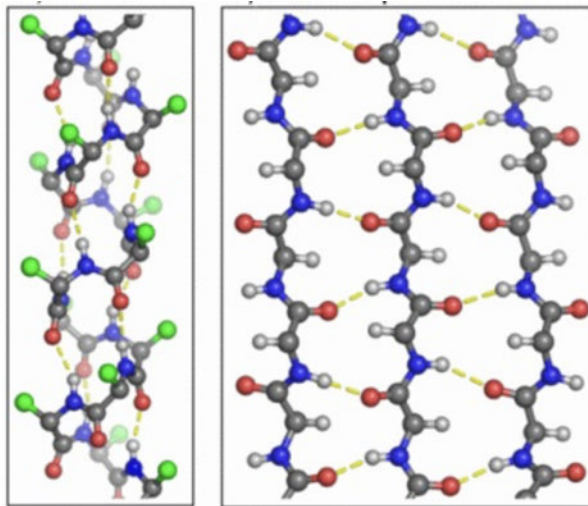


Abbildung 1: Sekundärstrukturen von Proteinen.

Darstellung der häufigsten Sekundärstrukturen, α -Helix (links) und β -Faltblatt (rechts). Übernommen aus Abbildung 6 in *Protein Structure, Modelling and Applications* (Breda et al., 2008).

Diese Strukturelemente organisieren sich zu einer stabilen dreidimensionalen Tertiärstruktur (Abbildung 2), die durch Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Disulfidbrücken stabilisiert wird. Viele Ionenkanäle bestehen aus mehreren Polypeptidketten, die sich zu funktionellen Komplexen zusammenlagern. Diese Anordnung mehrerer Untereinheiten wird als Quartärstruktur bezeichnet und ist für die Funktion zahlreicher Kanäle ausschlaggebend (Vandenberg et al., 2012).

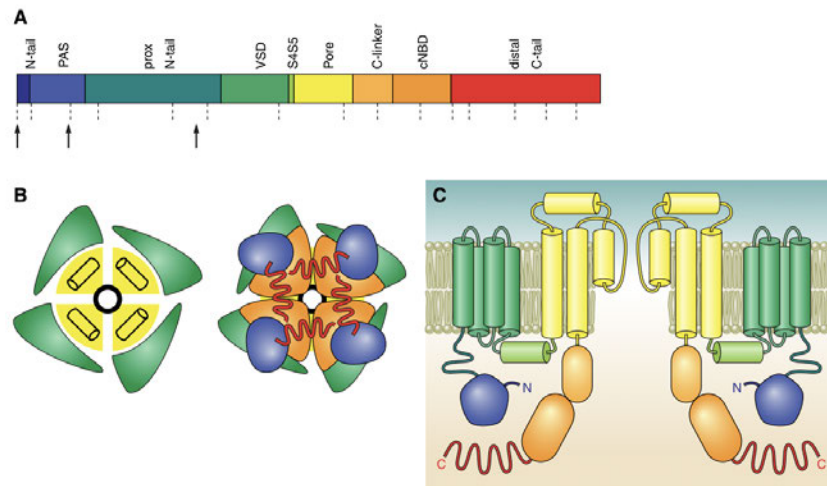


Abbildung 2: Struktur und Topologie des hERG-Kanals (Kv11.1).

(A) Lineare Darstellung der Aminosäuresequenz des hERG1a-Proteins mit farbcodierter Darstellung der funktionellen Domänen; Pfeile kennzeichnen Transkriptionsstartstellen, gestrichelte Linien Exon-Exon-Grenzen. (B) Tetramere Struktur des Kanals in der Extrazelluläransicht (links) und Intrazelluläransicht (rechts). (C) Topologie zweier gegenüberliegender hERG1a-Untereinheiten. Übernommen aus (Vandenberg et al., 2012).

Die Transmembransegmente der Kanaluntereinheiten bilden eine zentrale, wassergefüllte Pore, die den selektiven Transport von Ionen durch die ansonsten hydrophobe Membran ermöglicht. Ein zentrales funktionelles Element vieler Ionenkanäle ist der Selektivitätsfilter, der durch spezifische Wechselwirkungen zur Ionenselektivität beiträgt. Ionenkanäle zeichnen sich durch eine hohe Leitfähigkeit und eine ausgeprägte Selektivität gegenüber bestimmten Ionen wie Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Calcium (Ca^{2+}) und Chlorid (Cl^-) aus. Neben der Selektivität stellt der Wechsel zwischen verschiedenen funktionellen Zuständen ein wesentliches Merkmal von Ionenkanälen dar. Sie können zwischen offenen, geschlossenen und inaktivierten Zuständen wechseln; dieser Prozess wird als Gating bezeichnet und kann beispielsweise durch Änderungen des Membranpotentials oder durch Ligandenbindung ausgelöst werden. Die Anzahl der beteiligten Untereinheiten sowie die Anordnung der Transmembransegmente variieren zwischen verschiedenen Ionenkanalfamilien und beeinflussen sowohl die Ionenselektivität als auch die Aktivierungsmechanismen (Feigenspan, 2017).

Darüber hinaus verfügen viele Ionenkanäle über regulatorische und strukturelle Domänen, die die Kanalaktivität steuern. Dazu zählen Spannungssensor-Domänen in spannungsabhängigen Ionenkanälen, Ligandenbindungsstellen in ligandengesteuerten Kanälen sowie mechanosensitive Strukturelemente in mechanosensitiven Ionenkanälen. Konformationsänderungen in diesen Domänen führen zur Öffnung oder Schließung der Kanalpore (Feigenspan, 2017; Gu & Gu, 2014).

Im Gegensatz zu aktiven Transportproteinen erfolgt der Ionentransport durch Ionenkanäle passiv entlang elektrochemischer Gradienten und erfordert keine direkte Nutzung von ATP (Adenosintriphosphat) (vgl. Abbildung 3).

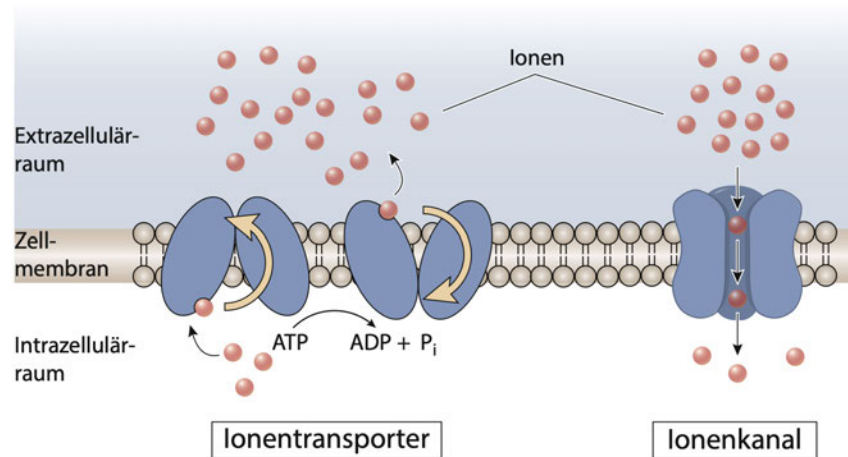


Abbildung 3: Iontentransporter und Ionenkanäle in der Zellmembran.

Schematischer Vergleich von Iontentransportern und Ionenkanälen in der Zellmembran. Übernommen aus (Feigenspan, 2017).

2.2 Spannungsabhängige Ionenkanäle

Spannungsabhängige Ionenkanäle weisen eine charakteristische Membrantopologie auf, die aus sechs Transmembransegmenten (S1–S6, Segmente 1 bis 6) pro funktioneller Domäne besteht. Das Segment S4 enthält mehrere positiv geladene Aminosäurereste, insbesondere Arginin- und Lysinreste, und fungiert als Spannungssensor, der Änderungen des Membranpotentials detektiert. Verschiebungen dieses Spannungssensors führen zu Konformationsänderungen des Kanalproteins und regulieren die Öffnung und Schließung der Kanalpore.

Die Kanalpore wird durch die Transmembransegmente S5 und S6 sowie die dazwischenliegende Porenschleife (P-Loop) gebildet. Innerhalb dieses Bereichs befindet sich der Selektivitätsfilter.

Zwischen verschiedenen Klassen spannungsabhängiger Ionenkanäle bestehen strukturelle Unterschiede. Kaliumkanäle sind typischerweise tetramere Komplexe aus vier separaten Untereinheiten, die jeweils eine funktionelle Domäne mit sechs Transmembransegmenten enthalten (vgl. Abbildung 4). Natrium- und Calciumkanäle bestehen hingegen aus einer einzelnen Polypeptidkette, die vier homologe Domänen umfasst, wobei jede Domäne aus sechs Transmembransegmenten aufgebaut ist (vgl. Abbildung 5). Trotz dieser Unterschiede weisen die verschiedenen Kanaltypen eine ähnliche grundlegende Architektur auf.

Die Aktivität spannungsabhängiger Ionenkanäle wird durch Gating-Mechanismen reguliert. Kanäle wechseln zwischen geschlossenen, offenen und inaktivierten Zuständen, wobei die Zustandsübergänge auf spannungsabhängigen Konformationsänderungen des Proteins beruhen. Diese dynamischen Prozesse ermöglichen eine präzise zeitliche und funktionelle Kontrolle des Ionentransports durch die Zellmembran (Feigenspan, 2017).

Spannungsabhängige Calciumkanäle sind an der intrazellulären Signaltransduktion sowie an der Freisetzung von Neurotransmittern beteiligt. Spannungsabhängige Kaliumkanäle tragen hingegen zur Stabilisierung des Membranpotentials und zur Repolarisation während des Aktionspotenzials bei (Feigenspan, 2017).

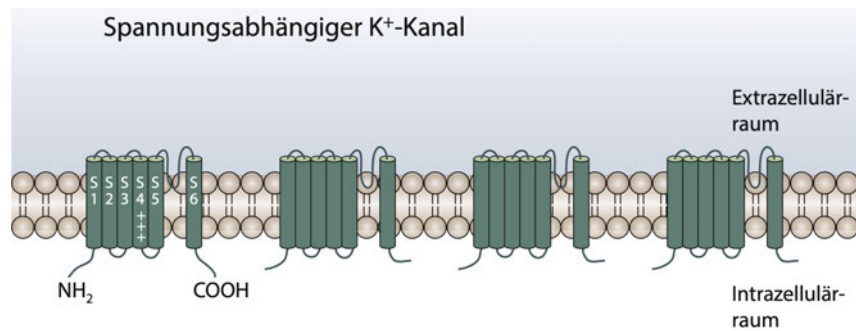


Abbildung 4: Aufbau spannungsabhängiger Kaliumkanäle.

Aufbau spannungsabhängiger Kaliumkanäle mit vier separaten Untereinheiten (I–IV), die jeweils aus sechs Transmembransegmenten (S1–S6) bestehen. Übernommen nach (Feigenspan, 2017).

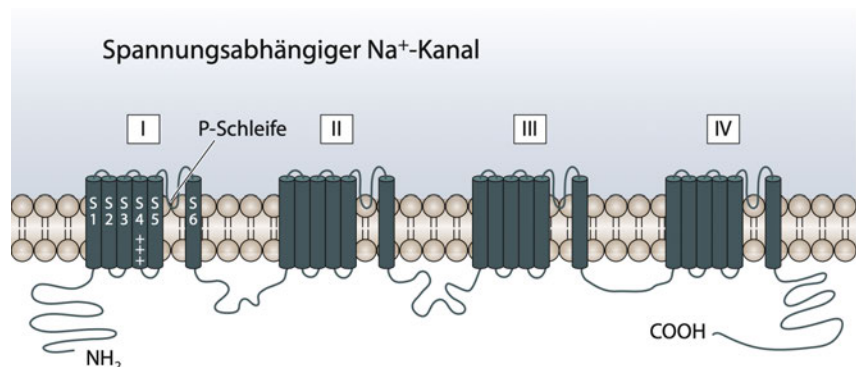


Abbildung 5: Aufbau spannungsabhängiger Natriumkanäle / Calciumkanäle.

Aufbau spannungsabhängiger Natriumkanäle / Calciumkanäle mit vier Domänen (I–IV), die jeweils aus sechs Transmembransegmenten (S1–S6) bestehen. Übernommen nach (Feigenspan, 2017).

2.3 CHO-Zellen als heterologes Expressionssystem

Für funktionelle Untersuchungen von Membranproteinen, insbesondere von Ionenkanälen, werden häufig heterologe Expressionssysteme eingesetzt. Dabei wird das Gen eines Zielproteins in eine geeignete Zelllinie eingebracht, wodurch eine kontrollierte Expression und anschließende funktionelle Analyse unter definierten experimentellen Bedingungen ermöglicht wird. Dieses Vorgehen erlaubt die Untersuchung struktureller, funktioneller und pharmakologischer Eigenschaften von Ionenkanälen unter definierten Bedingungen (Geron et al., 2017).

CHO-Zellen (Chinese hamster ovary cells) zählen zu den am häufigsten verwendeten Säugerzelllinien für die heterologe Expression. Sie zeichnen sich durch eine hohe Transfektionseffizienz, robuste Wachstumsbedingungen sowie eine stabile Expression rekombinanter Proteine aus. Zudem ist die endogene Expression vieler Ionenkanäle in CHO-Zellen vergleichsweise gering, wodurch funktionelle Analysen exogen exprimierter Kanäle mit reduzierter Hintergrundaktivität durchgeführt werden können (Trapani & Korn, 2003). Aufgrund dieser Eigenschaften stellen CHO-Zellen ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung ionenkanalvermittelter Prozesse dar.

Aufgrund ihrer hohen Fähigkeit zur Aufnahme fremder DNA können CHO-Zellen effizient mittels etablierter Methoden wie Lipofektion oder Elektroporation transfiziert werden. Darüber hinaus weisen CHO-Zellen eine hohe genetische Stabilität auf, sodass integrierte Gene über mehrere Passagen

hinweg stabil exprimiert werden. Diese Eigenschaften machen CHO-Zellen zu einem geeigneten System für die Herstellung stabiler rekombinanter Zelllinien (Ji et al., 2025).

2.3.1 CHO-hERG-DUO-Zelllinie

Das Membranpotential von Herzmuskelzellen wird durch den kontrollierten Fluss von Ionen über spezifische Membrankanäle reguliert. Es bildet somit die Grundlage für das kardiale Aktionspotential. Dieses ist wiederum die Grundlage für die Herzkontraktion. Das kardiale Aktionspotential lässt sich in mehrere Phasen unterteilen. Während der Depolarisationsphase öffnen sich spannungsabhängige Natriumkanäle, sodass Natriumionen in die Zelle einströmen und das Membranpotential rasch ansteigt. Darauf folgt eine Plateauphase, die hauptsächlich durch Calciumströme aufrechterhalten wird. Die anschließende Repolarisation wird überwiegend durch Kaliumströme vermittelt: Kaliumionen treten aus der Zelle aus und führen das Membranpotential wieder in Richtung des Ruhepotentials (Chen et al., 2016).

Kaliumkanäle sind daher für die Repolarisation von Herzmuskelzellen entscheidend und regulieren die Dauer des kardialen Aktionspotenzials. Verschiedene Kaliumströme tragen zur Repolarisation des kardialen Aktionspotenzials bei, darunter insbesondere der rapid delayed rectifier potassium current (IKr), der slow delayed rectifier potassium current (IKs) und der inward rectifier potassium current (IK1). Diese Ströme wirken zusammen und regulieren die Dauer des Aktionspotenzials, wodurch eine stabile elektrische Aktivität des Herzens gewährleistet wird (Chen et al., 2016; Hansen et al., 2006).

In diesem Zusammenhang ist ein besonders wichtiger Kaliumkanal der hERG-Kanal (Human Ether-à-go-go Related Gene), der durch das KCNH2-Gen kodiert wird. KCNH2 steht für Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 2 und bezeichnet ein Gen, das zur Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle gehört. Der Name hERG hat seinen Ursprung in genetischen Studien an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bei dem zuerst das Gen *ether-à-go-go* (*eag*) identifiziert wurde. Mutationen dieses Gens führten dazu, dass Fliegen unter Ether-Anästhesie eine charakteristische Zitterbewegung ihrer Beine zeigten, die die Forscher an den Go-Go-Tanz der 1960er Jahre erinnerte. Als später ein homologes Gen beim Menschen entdeckt wurde, erhielt es die Bezeichnung *human ether-à-go-go related gene* (hERG) (Issa et al., 2012; Warmke & Ganetzky, 1994).

Dieser spannungsabhängige Kaliumkanal entsteht durch die Zusammenlagerung von vier identischen α -Untereinheiten, die gemeinsam eine Kanalpore bilden (Abbildung 4). Durch diese Pore können Kaliumionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten diffundieren. Unter physiologischen Bedingungen führt dies überwiegend zu einem Ausstrom von Kaliumionen aus der Zelle. Der durch den hERG-Kanal vermittelte Strom ist also der IKr-Strom und trägt maßgeblich zur Repolarisationsphase des kardialen Aktionspotenzials bei (Vandenberg et al., 2012).

Eine besondere Eigenschaft des hERG-Kanals ist seine Aktivierung und Inaktivierungskinetik. Während der Depolarisationsphase wird der Kanal zwar aktiviert, jedoch gleichzeitig schnell inaktiviert, sodass nur ein geringer Kaliumstrom fließt. Während der Repolarisation wird diese Inaktivierung jedoch schnell aufgehoben (Abbildung 6). Dadurch kommt es zu einem verstärkten Kaliumausstrom. Diese spezielle kinetische Eigenschaft ermöglicht eine präzise Regulation der Repolarisation im Herzen (Perry et al., 2015).

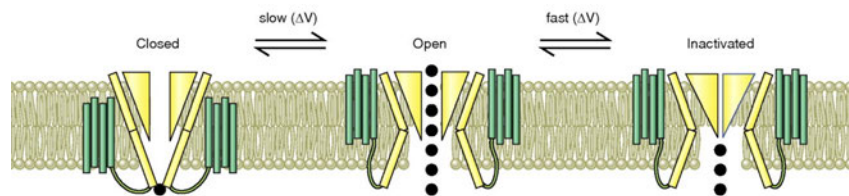


Abbildung 6: Gating von Kv11.1-Kanälen.

Schematische Darstellung des hERG-Kanals und seines Gating-Verhaltens (geschlossen, offen, inaktiviert). Spannungsabhängiger Wechsel zwischen geschlossenen, offenen und inaktivierten Zuständen; der Übergang vom geschlossenen in den offenen Zustand erfolgt langsamer als zwischen offenem und inaktiviertem Zustand. Übernommen aus (Vandenberg et al., 2012).

Eine Hemmung des hERG-Kanals reduziert den IKr-Strom und kann zu einer Verlängerung des QT-Intervalls im Elektrokardiogramm (EKG) führen. Eine solche QT-Verlängerung erhöht das Risiko für schwerwiegende Herzrhythmusstörungen wie die Torsade-de-Pointes-Arrhythmie, die potenziell lebensbedrohlich sein kann. Der funktionelle IKr-Kanal im menschlichen Herzen besteht nicht ausschließlich aus hERG- α -Untereinheiten. In einigen Fällen können zusätzliche regulatorische Untereinheiten an den Kanal binden, beispielsweise das Protein MiRP1 (MinK-related peptide 1), welches durch das KCNE2-Gen (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E Member 2) kodiert wird. Diese Einheiten können die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals modulieren, beispielsweise seine Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik (Abbott et al., 1999).

In experimentellen Zellmodellen wird jedoch häufig gezielt ausschließlich die hERG- α -Untereinheit exprimiert, um die pharmakologischen Eigenschaften des Kanals isoliert untersuchen zu können. Für diese Untersuchungen werden häufig rekombinante Zelllinien verwendet, die den hERG-Kanal stabil exprimieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die CHO-hERG-DUO-Zelllinie (Dual-Expression-System) verwendet. Diese Zelllinie basiert auf CHO-Zellen, die stabil mit dem humanen hERG-Gen transfiziert wurden und dadurch funktionelle hERG-Kaliumkanäle in der Zellmembran exprimieren (Vandenberg et al., 2012).

Die Bezeichnung „DUO“ bezieht sich in diesem Zusammenhang auf die zweifache Integration des hERG-Gens in das Zellgenom. Dabei wurde die hERG-cDNA (komplementäre DNA) mit zwei unterschiedlichen Expressionsvektoren in die Zellen eingebracht, wodurch eine besonders stabile und robuste Expression des Kanals erreicht wird. Die erhöhte Kanalexpression führt zu größeren, messbaren Kaliumströmen und verbessert somit das Signal-Rausch-Verhältnis bei elektrophysiologischen Messungen. Aus diesem Grund eignet sich die CHO-hERG-DUO-Zelllinie besonders gut für elektrophysiologische Untersuchungen des hERG-Kanals (BSYS, 2026).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CHO-hERG-DUO-Zelllinie ein etabliertes experimentelles Modell ist, um die Funktion des hERG-Kanals sowie dessen pharmakologische Modulation zu untersuchen und die Wirkung verschiedener Substanzen auf den hERG-vermittelten IKr-Strom zu analysieren.

2.3.2 CHO-CaV1.2-Zelllinie

Spannungsabhängige Calciumkanäle spielen eine zentrale Rolle bei der elektrischen Aktivität von Herzmuskelzellen. Sie vermitteln den Einstrom von Calciumionen in die Zelle und sind maßgeblich

an der Regulation des kardialen Aktionspotenzials sowie an der Auslösung der Muskelkontraktion beteiligt (Splawski et al., 2004).

Nach der Depolarisation öffnen sich CaV1.2-Kanäle und ermöglichen den Einstrom von Calciumionen in die Zelle. Der daraus resultierende Calciumeinstrom stabilisiert die Plateauphase des Aktionspotenzials. Gleichzeitig führt der initiale Calciumeinstrom zur Freisetzung weiterer Calciumionen aus intrazellulären Speichern (Calcium-induced Calcium Release), wodurch die Kontraktion der Herzmuskelzelle ausgelöst wird (Splawski et al., 2004).

Die Bezeichnung „CaV1.2“ folgt der systematischen Nomenklatur spannungsabhängiger Calciumkanäle. „CaV“ steht für „Calcium Voltage-Gated Channel“, die Zahl „1“ kennzeichnet die Familie der L-Typ-Calciumkanäle („long-lasting“), und „2“ beschreibt die spezifische Isoform. Der Kanal wird durch das CACNA1C-Gen (Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C) kodiert und ist der wichtigste L-Typ-Calciumkanal im Herzmuskel. Strukturell besteht der CaV_{1.2}-Kanal aus einer großen α_1 -Untereinheit, welche die Ionenpore bildet (siehe Abbildung 5). Diese enthält vier homologe Domänen (I–IV), die jeweils aus sechs Transmembransegmenten bestehen und gemeinsam den spannungsabhängigen Kanal formen. Zusätzlich können regulatorische Untereinheiten, wie β - und $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten, an den Kanal binden und dessen funktionelle Eigenschaften, beispielsweise die Aktivierungskinetik, die Spannungsabhängigkeit oder die Stabilität in der Zellmembran, modulieren (Catterall, 2011).

Funktionsstörungen des CaV1.2-Kanals können erhebliche Auswirkungen auf die kardiale Elektrophysiologie haben. Mutationen im CACNA1C-Gen können beispielsweise zu einer verzögerten Inaktivierung des Kanals führen, wodurch Calciumionen länger in die Zelle einströmen. Dies kann eine Verlängerung des kardialen Aktionspotenzials sowie des QT-Intervalls im Elektrokardiogramm verursachen (Splawski et al., 2004).

2.4 Fluoreszenzbasierte Ionenkanal-Assays

Fluoreszenzbasierte Assays sind eine weit verbreitete Methode, um die Aktivität von Ionenkanälen zu untersuchen. Dabei werden fluoreszierende Indikatorfarbstoffe verwendet, deren Fluoreszenzintensität sich in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmter Ionen in der Zelle verändert. Der Einstrom von Ionen durch aktivierte Ionenkanäle verändert die intrazelluläre Ionenkonzentration, was durch den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff detektiert werden kann (Voldřich et al., 2024).

Mithilfe dieser Assays kann die Ionenkanalaktivität indirekt gemessen werden. Sie werden häufig in der pharmakologischen Forschung eingesetzt, um die Wirkung von Wirkstoffen auf Ionenkanäle zu untersuchen. Im Vergleich zu elektrophysiologischen Methoden wie der Patch-Clamp-Technik erlauben fluoreszenzbasierte Assays eine deutlich höhere Probendurchsatzrate. Sie eignen sich daher besonders für Hochdurchsatz-Screenings (Yu et al., 2016).

Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei verschiedene, auf Fluoreszenz basierende Testverfahren genutzt: ein Fluo-4-AM-Calcium-Assay zur Messung von Calciumionen sowie ein Thallium-Flux-Assay zur Analyse der Aktivität von Ionenkanälen anhand des Einstroms von Thalliumionen.

2.4.1 Fluo-4-AM-Calcium-Assay

Der Fluo-4-AM-Calcium-Assay ist ein fluoreszenzbasierter Assay zur Untersuchung der intrazellulären Calciumkonzentration. Dabei handelt es sich um einen funktionellen Assay, da Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration als indirekter Indikator für die Aktivität von Ionenkanälen dienen (Yu et al., 2016).

Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 liegt in der membranpermeablen Acetoxymethylester-Form (Fluo-4-AM) vor. Dadurch kann er in die Zelle aufgenommen werden. Nach dem Eintritt in die Zelle wird die AM-Gruppe (Acetoxymethyl-Gruppe) durch intrazelluläre Esterasen abgespalten, sodass der Farbstoff in seiner aktiven Form vorliegt und im Zytosol verbleibt.

Fluo-4 besitzt eine hohe Affinität für Calciumionen. Nach Bindung von Ca^{2+} kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenzintensität. Wird ein Calciumkanal aktiviert, führt der Einstrom von Calciumionen (Ca^{2+}) in die Zelle zu einem messbaren Anstieg der Fluoreszenz. Dieser Anstieg kann mit fluoreszenzbasierten Plattenlesesystemen detektiert werden (Spinelli & Gillespie, 2012).

Der Fluo-4-AM-Calcium-Assay wird häufig in der pharmakologischen Forschung sowie im Hochdurchsatz-Screening eingesetzt (Wu et al., 2019). Dies ist auf seine hohe Sensitivität sowie die Möglichkeit zurückzuführen, Messungen in Multi-Well-Platten durchzuführen. Mit ihm lassen sich Modulatoren von Calciumkanälen identifizieren (ION Biosciences, 2026a).

2.4.2 Thallium-Flux-Assay (Thallos Gold)

Der Thallium-Flux-Assay ist ein fluoreszenzbasierter funktioneller Assay, der zur Untersuchung der Aktivität von Ionenkanälen, insbesondere von Kaliumkanälen, eingesetzt wird. Dabei wird der Ioneneinstrom durch geöffnete Kanäle indirekt über Änderungen der Fluoreszenzintensität erfasst (Weaver et al., 2004).

In diesem Assay wird Thallium (Tl^+) als Surrogat-Ion für Kalium verwendet, da es aufgrund ähnlicher physikochemischer Eigenschaften durch viele Kaliumkanäle permeieren kann. Im Vergleich zu Kalium ermöglicht Tl^+ eine empfindlichere Detektion, da spezifische thalliumsensitive Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung stehen (Weaver et al., 2004).

Zur Messung des ThalliumEinstroms werden solche Farbstoffe eingesetzt, deren Fluoreszenz nach Bindung von Tl^+ zunimmt. Nach Aktivierung der Ionenkanäle führt der Einstrom von Thalliumionen in die Zelle zu einer messbaren Änderung der Fluoreszenz, die mithilfe fluoreszenzbasierter Plattenlesesysteme quantifiziert werden kann (ION Biosciences, 2026b).

Aufgrund seines hohen Probendurchsatzes sowie seiner einfachen Durchführung wird der Thallium-Flux-Assay in der pharmakologischen Forschung und im Hochdurchsatz-Screening eingesetzt, um Modulatoren von Ionenkanälen zu identifizieren (Thermo Fisher Scientific, o.J.).

3 Material und Methoden

3.1 Experimentelles Design und Materialien

Zur funktionellen Charakterisierung der Ionenkanäle hERG-DUO und CaV1.2 wurden fluoreszenzbasierte Assays in standardisierten, zellbasierten Testsystemen durchgeführt. Hierfür kamen assay-ready CHO-Zelllinien zum Einsatz, die eine direkte Anwendung in Hochdurchsatz-Assays ermöglichen. Das experimentelle Vorgehen umfasste die kontrollierte Zellvorbereitung, die Durchführung von Aktivierungs- und Inhibitionsassays sowie die quantitative Auswertung der resultierenden Fluoreszenzsignale.

Die Wahl fluoreszenzbasierter Assays erfolgte, da diese im Vergleich zu elektrophysiologischen Methoden eine höhere Skalierbarkeit und Standardisierbarkeit bei gleichzeitig ausreichender Sensitivität zur Detektion funktioneller Kanalaktivität ermöglichen.

3.1.1 Zelllinien, Reagenzien, Assay-Kits und Testsubstanzen

Für die Experimente wurden adhärente, assay-ready CHO-hERG-DUO- und CHO-CaV1.2-Zelllinien verwendet, die von der acCELLerate GmbH (Hamburg, Deutschland) bereitgestellt wurden. Diese Zelllinien exprimieren stabil die jeweiligen Zielkanäle und können ohne vorherige Kultivierung direkt in funktionellen Assays eingesetzt werden.

Zur Durchführung der funktionellen Analysen wurden kommerzielle Fluoreszenz-Assay-Kits von ION Biosciences verwendet. Für die Untersuchung der Kaliumkanalaktivität kam der Brilliant Thallium Gold Snapshot Assay Kit (Kat. Nr. 11021-10) zum Einsatz, während für die Analyse der Calciumkanalaktivität der Brilliant Calcium Assay Kit (Kat. Nr. 10000-10) verwendet wurde.

Ergänzend wurden der 10X High Potassium (K^+) Chloride-Free Stimulus Buffer (Kat. Nr. 7030S), 100X Pluronic F-127 (Kat. Nr. 7601A) sowie Dimethylsulfoxid (DMSO) (Carl Roth, Kat. Nr. A994.1) eingesetzt.

Zur gezielten Modulation der Kanalaktivität wurden spezifische pharmakologische Substanzen verwendet. Für den hERG-Kanal wurden die Aktivatoren RPR-260243 (10 mM Stocklösung, MedChem-Express, Kat. Nr. HY-16915) und NS 1643 (26,3 mM Stocklösung, Cayman Chemical, Kat. Nr. 20343) sowie der Inhibitor Terfenadin (100 mM Stocklösung, Biomol, Kat. Nr. TGM-T78570) eingesetzt. Die Aktivität des CaV1.2-Kanals wurde durch den Inhibitor Nisoldipin (100 mM Stocklösung, Biomol, Kat. Nr. N3474) sowie den Aktivator FPL64176 (1 mM Stocklösung, Sigma, Kat. Nr. F131) beeinflusst.

Die Auswahl dieser Substanzen erfolgte aufgrund ihrer bekannten und gut charakterisierten Wirkung auf die jeweiligen Zielkanäle.

3.1.2 Assay-Medien

Für den Calcium-Assay wurde ein serumhaltiges Assay-Medium unter Verwendung tetracyclinfreien FBS (fetal bovine serum) eingesetzt, um die Expression des hERG-Kanals in der verwendeten Zelllinie nicht zu beeinträchtigen. Während der Kultivierung werden die Zellen zunächst in tetracyclinhaltigem Medium gehalten, wodurch die Expression des hERG-Kanals unterdrückt wird. In der letzten Passage vor dem Experiment wird Tetracyclin entfernt, um die Expression des Kanals zu induzieren.

Ein erneutes Vorhandensein von Tetracyclin im Assay-Medium würde die Kanalexpression wieder inhibieren und somit die funktionelle Messung verfälschen. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Herstellung des Assay-Mediums erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank.

Tabelle 1: Zusammensetzung und Endkonzentrationen des tetracyclinfreien Assay-Mediums

Komponente	Endkonzentration	Hersteller	Katalognummer
Ham's F12 (without phenol red)	Basismedium	Pan Biotech	P04-14559
Pen/Strep (10.000 U/10 mg)	1 %	Pan Biotech	P06-07100
L-Glutamine 200 mM	2 mM	Pan Biotech	P04-80100
HEPES Buffer Solution 1 M	20 mM	Pan Biotech	P05-01100
Sodium pyruvate 100 mM	1 mM	Sigma	S8636
FBS (tetracycline free)	20 %	Capricorn	FBS-TET-12A

Für den Thallium-Snapshot-Assay wurde ein serumfreies Assay-Medium (Medium C) verwendet, um mögliche Interferenzen durch Serumkomponenten, insbesondere Proteinbindungseffekte und Hintergrundfluoreszenz, zu minimieren. Die Zusammensetzung dieses Mediums ist in Tabelle 2 aufgeführt. Die Herstellung der Medien erfolgte ebenfalls unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank.

Tabelle 2: Zusammensetzung und Endkonzentrationen des serumfreien Assay-Mediums C

Komponente	Endkonzentration	Hersteller	Katalognummer
Ham's F12 (without phenol red)	Basismedium	Pan Biotech	P04-14559
Pen/Strep (10.000 U/10 mg)	1 %	Pan Biotech	P06-07100
L-Glutamine 200 mM	2 mM	Pan Biotech	P04-80100
HEPES Buffer Solution 1 M	20 mM	Pan Biotech	P05-01100
Sodium pyruvate 100 mM	1 mM	Sigma	S8636

3.1.3 Geräte und Software

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Fluoreszenzplattenreader (Safire2, Tecan).

Die Zellzählung erfolgte mittels eines automatisierten Zellzählsystems (CASY TT (Cell Counter and Analyzer System), Roche Innovatis AG). Die Zellaufarbeitung wurde mit einer Zentrifuge (VWR Mega Star 1.6R, VWR International) durchgeführt.

Die Zellkultivierung und Inkubation erfolgten in einem CO₂-Inkubator (Heracell 150i, Thermo Scientific) bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die Auswertung der experimentellen Daten erfolgte mit GraphPad Prism 10 (Version 10.3.1, GraphPad Software Inc.).

3.2 Zellvorbereitung und Assay-Setup

Zur Durchführung der funktionellen Assays wurden die assay-ready CHO-Zellen unter standardisierten Bedingungen aufbereitet und in zellkultur geeignete schwarze 96-Well-Mikrotiterplatten mit

klarem Boden und Deckel ausgesät. Ziel war es, eine definierte und reproduzierbare Zellverteilung sowie konstante experimentelle Ausgangsbedingungen für alle Messungen sicherzustellen.

3.2.1 Auftauen und Aufarbeitung der Zellen

Kryokonservierte assay-ready Zellen (1,8 mL Cryovials), die bei -180°C im Stickstofftank gelagert wurden, wurden entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Trockeneis (-80°C) aufbewahrt. Zur Sicherstellung einer hohen Zellviabilität wurde der Auftauprozess möglichst schnell durchgeführt. Das Cryovial wurde dazu in einen Schwimmer eingesetzt und für etwa 3 min in ein auf 37°C temperiertes Wasserbad überführt.

Parallel wurden unter sterilen Bedingungen 8,2 mL vorgewärmtes Assay-Medium C in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Nach dem Auftauen wurde das Cryovial aus dem Wasserbad entnommen und unter die Sterilwerkbank überführt; alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Zur Aufnahme der Zellen wurden 4 mL des vorgelegten Assay-Mediums C mit einer serologischen Pipette aufgenommen. Mit diesem Medium wurde die Zellsuspension aus dem Cryovial vorsichtig aufgezogen und bis auf einen Rest von etwa 2 mL in das vorbereitete Zentrifugenröhrchen überführt. Das Cryovial wurde anschließend mit dem verbleibenden Medium (ca. 2 mL) gespült, um restliche Zellen zu lösen, und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt.

Die Zellsuspension wurde anschließend für 3 min bei $200 \times g$ zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand unter der Sterilwerkbank vorsichtig abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde vorsichtig gelockert und anschließend in einem geeigneten Volumen frischen Assay-Mediums C (ca. 5–10 mL) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert.

Dieses Vorgehen dient der Entfernung kryoprotektiver Substanzen sowie unerwünschter Medienbestandteile und der Herstellung einer definierten Ausgangssuspension für die anschließende Zellzählung.

3.2.2 Zellzählung und Viabilitätsbestimmung

Die Bestimmung der Zellkonzentration und Viabilität erfolgte mittels eines automatisierten Zellzählsystems (CASY TT Counter). Das Messprinzip basiert auf der elektrischen Widerstandsmessung (Coulter-Prinzip). Während der Messung passieren die Zellen eine Pore, in der ein elektrisches Niederspannungsfeld angelegt ist. Durch das Verdrängen eines definierten Volumens der Elektrolytlösung (CASYton) entsteht beim Durchtritt jeder Zelle ein elektrischer Impuls, dessen Amplitude proportional zum Zellvolumen ist. Dies erlaubt die simultane Bestimmung von Zellzahl, Viabilität und Aggregationszustand.

Die Differenzierung zwischen vitalen und toten Zellen beruht auf der Integrität der Zellmembran. Bei lebenden Zellen verhindert die intakte Membran den Stromdurchtritt, sodass das Signal das vollständige Zellvolumen widerspiegelt. Bei toten Zellen ist die Membran permeabel, wodurch der Strom teilweise durch die Zelle fließen kann; in diesem Fall wird überwiegend das Volumen des Zellkerns erfasst. Auf Basis dieses Prinzips können zusätzlich Zelltrümmer und Zellaggregate von intakten Zellen unterschieden werden (OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, 2018, 2026).

Zur Differenzierung zwischen intakten Zellen und Zellfragmenten wurden zellspezifische Auswertungsgrenzen definiert. Die untere Grenze (NP, lower particle size limit) bestimmt die minimale

Partikelgröße, ab der ein Ereignis als Zelle gewertet wird, wodurch Zelltrümmer und kleine Partikel ausgeschlossen werden. Die obere Grenze (LP, upper particle size limit) definiert die maximale Größe für Einzelzellen, sodass Zellaggregate nicht in die Analyse einbezogen werden. Für die Durchführung der Zellzählung wurden zelllinienspezifische Größenfenster verwendet.

Zusätzlich wurden gerätespezifische Parameter zur Kalibrierung und Normalisierung (CL/CR und NL/NR) verwendet, die aus der internen Unternehmensdatenbank stammten.

Für die Messung wurden zunächst 200 µl der zuvor vorbereiteten/resuspendierten Zellsuspension entnommen und in ein 1 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde vor der Probenahme durch vorsichtiges Antippen homogenisiert. Aus diesem Aliquot wurden anschließend 70 µl mittels Reverse-Pipetting-Technik an die Innenwand eines zuvor mit 6950 µl CASYton befüllten CASY Cups pipettiert, was einer Verdünnung von 1:100 entspricht. Diese wurde von der Gerätesoftware automatisch berücksichtigt.

Nach Zugabe der Probe wurde der CASY Cup verschlossen und durch behutsames Invertieren durchmischt. Die Messung erfolgte anschließend mit den jeweils für die entsprechende Zelllinie festgelegten Cursor-Einstellungen. Lag die Zellkonzentration oberhalb des optimalen Messbereichs, wurde die Probe vor der Analyse zusätzlich mit CASYton verdünnt. Die jeweils verwendeten Verdünnungsschritte und die daraus resultierenden Verdünnungsfaktoren sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Verdünnungsschritte und entsprechende Faktoren für CASY-Messungen

Verdünnung	1:1	1:2	1:5	1:10
CASYton	0 µl	35 µl	280 µl	630 µl
Probe	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl

Die Zellkonzentration sowie die Viabilität wurden anschließend automatisch durch das System berechnet. Auf Basis dieser Werte wurde die Zellsuspension für die Aussaat auf die gewünschte Zielkonzentration eingestellt.

3.2.3 Aussaat und Inkubation

Die Zellen wurden auf schwarzen 96-Well-Platten mit transparentem Boden (clear bottom) und Deckel ausgesät, um optimale Bedingungen für die Fluoreszenzmessung zu gewährleisten. Die Zielzellzahl betrug 3×10^4 Zellen pro Well bei einem Applikationsvolumen von 100 µL, entsprechend einer Zielkonzentration von 3×10^5 Zellen/mL. Diese ergibt sich aus:

$$c_2 = \frac{3 \times 10^4}{0,1 \text{ mL}} \quad (3.1)$$

wobei 3×10^4 die gewünschte Zellzahl pro Well und 0,1 mL das eingesetzte Volumen pro Well beschreibt.

Zur Einstellung der Zielzellkonzentration wurde die Zellsuspension anhand der Verdünnungsformel

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \quad (3.2)$$

verdünnt, wobei c_1 die mittels CASY TT gemessene Ausgangskonzentration, c_2 die Zielkonzentration, V_2 das Endvolumen und V_1 das zu entnehmende Volumen der Zellsuspension beschreibt. Das Volumen des zuzugebenden Assay-Mediums wurde aus der Differenz $V_2 - V_1$ bestimmt.

Die Verdünnung wurde unter sterilen Bedingungen angesetzt und die Zellsuspension anschließend mittels Mehrkanalpipette gleichmäßig auf die Wells verteilt, wobei 100 μL pro Well appliziert wurden. Die Platten wurden verschlossen und bei 37 °C und 5 % CO_2 für 24 Stunden inkubiert, um eine stabile Adhärenz und Regeneration der Zellen vor Beginn der Assaydurchführung zu gewährleisten.

Die Wahl einer definierten Zellzahl pro Well dient der Minimierung experimenteller Variabilität und stellt sicher, dass Unterschiede in der Fluoreszenzintensität auf pharmakologische Effekte und nicht auf Unterschiede in der Zelldichte zurückzuführen sind.

3.3 Fluoreszenzbasierte Assays

3.3.1 Vorbereitungen des hERG-DUO-Assays (Thallium-Flux)

Zur Untersuchung der Modulation der hERG-Kanalaktivität in CHO-hERG-DUO-Zellen wurde ein fluoreszenzbasierter Thallium-Flux-Assay (Brilliant Thallium Gold Snapshot Assay) eingesetzt. Dieser basiert auf der Detektion von Thalliumionen (Tl^+), die als Surrogat für Kaliumionen durch geöffnete Kaliumkanäle in die oder aus der Zelle gelangen und eine Fluoreszenzänderung hervorrufen.

Zur Herstellung der Thallium Gold AM Stocklösung wurden 25 μg des Farbstoffs in 20 μL DMSO resuspendiert und bis zur vollständigen Lösung gevortext. Aufgrund der Photosensitivität des Farbstoffs wurden sämtliche Arbeitsschritte lichtgeschützt durchgeführt.

Die Färbelösung wurde anschließend gemäß Tabelle 4 aus den Komponenten des Assay-Kits sowie ergänzendem DMSO, Pluronic F-127 und Zellkulturwasser hergestellt. Hierzu wurde zunächst Zellkulturwasser in ein lichtgeschütztes 15-mL-Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Anschließend wurden die weiteren Komponenten schrittweise zugegeben und die Lösung vorsichtig gevortext.

Die Lagerung der Reagenzien erfolgte gemäß Herstellerangaben bei 4 °C, während die Färbelösung sowie die verwendeten Modulatoren bei –20 °C lichtgeschützt gelagert wurden. Aufgrund der hygroskopischen Eigenschaften von DMSO wurde auf eine luftdichte Lagerung geachtet. Dies wurde durch luftdichtes Verschließen der Gefäße mit Parafilm sichergestellt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Färbelösung für den Brilliant Thallium-Gold-Snapshot-Assay (10 mL Ansatz).

Reagenz	Volumen [μ L]
Thallos Gold AM Solution	20
50X DySolv	200
10X Brilliant Thallium Gold Snapshot-Assay Buffer	1000
50X TRS (extracellular background masking solution)	200
50X Probenecid	200
50 mM Thallium Sulfate Solution	50
100X Pluronic F-127	100
H ₂ O	8250
Gesamt	10000

Anmerkung: Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 10 mL Färbelösung. Die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten ergeben sich aus den jeweiligen Stammlösungen.

Aktivierungsassay

Die am Vortag ausgesäten adhärennten Zellen wurden auf den 96-Well-Platten zur Färbung aus dem Inkubator entnommen. Das Zellkulturmedium wurde unter sterilen Bedingungen mithilfe eines Mehrkanal-Aspirators vorsichtig entfernt. Anschließend wurden 100 μ L Färbelösung (Tabelle 4) pro Well mittels einer Mehrkanalpipette auf die Zellen gegeben. Als Kontrollbedingungen wurden mindestens eine Medienkontrolle sowie eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Beide dienten als Negativkontrollen ohne aktive Testsubstanz, unterschieden sich jedoch in ihrer Zusammensetzung. Für die Medienkontrolle wurden anstelle von Färbelösung und Testsubstanz jeweils 150 μ L Assay Medium C in die entsprechenden Wells pipettiert. Für die Lösungsmittelkontrolle wurden 100 μ L Färbelösung und anstelle der Testsubstanz 50 μ L Assay-Buffer in die Wells gegeben. Die Platte wurde für 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um die intrazelluläre Aufnahme des Farbstoffs zu gewährleisten. Anschließend wurde der (F_0) gemessen.

Während der Inkubationszeit wurde der 1X Assay-Buffer durch Verdünnung des 10X Brilliant Thallium Gold Assay Buffers im Verhältnis 1:10 mit Zellkulturwasser hergestellt und mit der High-K⁺-Stimulus-Lösung versetzt, sodass eine Endkonzentration von 20 mM K⁺ erreicht wurde. Parallel dazu wurden Verdünnungsreihen der Testsubstanzen ausgehend von den jeweiligen Stocklösungen durch serielle Verdünnung im Assay-Buffer hergestellt. Die Verdünnungsreihen wurden durch serielle Verdünnungen mit experimentabhängig angepassten Verdünnungsfaktoren erzeugt, indem definierte Volumina der jeweiligen Ausgangslösung mit dem zuvor hergestellten 1X Assay-Buffer gemischt wurden. Nach jedem Verdünnungsschritt wurden frische Pipettenspitzen verwendet und die Lösungen kurz gevortext, um eine homogene Durchmischung zu gewährleisten. Die Verdünnungen wurden in ein Reagenzreservoir überführt und vor der Applikation kurz gemischt.

Nach der Inkubation wurden 50 μ L der jeweiligen Testsubstanz pro Well mittels einer Mehrkanalpipette zugegeben. Anschließend wurde der F_1 -Wert mittels Plattenlesegerät gemessen. Aufgrund des bereits vorhandenen Volumens von 100 μ L Färbelösung ergab sich eine Verdünnung der Testsubstanzen im Well im Verhältnis 1:3 (v/v, volume per volume), wodurch die effektiven Endkonzentrationen entsprechend reduziert wurden.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzwerte F_0 und F_1 wurde mit einem Fluoreszenzplattenreader im Bottom-Read-Modus bei einer Exzitationswellenlänge von 528 nm und einer Emissionswellenlänge von 552 nm (Emissionsbandbreite: 7 nm) gemessen. Der Gain wurde auf 100 eingestellt, und die Messung erfolgte im High-Sensitivity-Modus mit einer Integrationszeit von 32 μ s bei einer Temperatur von etwa 25–27 °C.

Für die Untersuchung der NS 1643-Wirkung wurden die F_1 -Werte nach Zugabe der Testsubstanzen unter identischen Messbedingungen entweder direkt als Einzelmessung (0 min) oder kinetisch über einen längeren Zeitraum in Intervallen von 5 min erfasst.

Inhibitionsassay

Der Inhibitionsassay wurde analog zum Aktivierungsassay durchgeführt. Abweichend davon wurde die Färbelösung zweifach konzentriert unter Zusatz von (Ti^+) solution (Tabelle 5) angesetzt und der 1X Assay-Buffer auf 60 mM K^+ eingestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Färbelösung für den Brilliant Thallium-Gold-Snapshot-Assay (10 mL Ansatz) - Inhibition.

Reagenz	Volumen [μ L]
Thallos Gold AM Solution	20
50X DySolv	200
10X Brilliant Thallium Gold Snapshot-Assay Buffer	1000
50X TRS (extracellular background masking solution)	200
50X Probenecid	200
50 mM Thallium Sulfate Solution	100
100X Pluronic F-127	100
H_2O	8200
Gesamt	10000

Anmerkung: Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 10 mL Färbelösung. Die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten ergeben sich aus den jeweiligen Stammlösungen.

Für die Durchführung wurden zunächst 50 μ L Färbelösung pro Well auf die Zellen gegeben und für 60 min bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert und danach der F_0 -Wert mittels eines Plattenlesegerät gemessen. Anschließend wurden 50 μ L der jeweiligen Inhibitorlösung zugegeben und für 15 min inkubiert. Die Inhibitorlösungen wurden als Verdünnungsreihen im Assay-Buffer mit der vorher angesetzten Färbelösung hergestellt und vor der Applikation kurz gemischt.

Zur Aktivierung der Kanäle wurden anschließend 50 μ L Veratridin pro Well zugegeben.

Veratridin wurde als dreifach konzentrierte Arbeitslösung im Assay-Buffer (K^+) angesetzt. Hierfür wurde eine 26,302 mM-Stocklösung auf eine Zielkonzentration von 300 μ M verdünnt. Das benötigte Volumen der Stocklösung wurde mithilfe der Verdünnungsgleichung $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ berechnet. Für ein Endvolumen von 2600 μ L wurden 29,7 μ L der Veratridin-Stocklösung mit 2570,3 μ L Assay-Buffer (K^+) gemischt. Der F_1 -Wert wurde anschließend unter den zuvor beschriebenen Messbedingungen erfasst.

Durch die schrittweise Zugabe der Lösungen ergab sich zunächst eine 1:2-Verdünnung der Inhibitoren nach deren Zugabe zur Färbelösung. Nach anschließender Zugabe von Veratridin entsprach die effektive Endkonzentration einer finalen 1:3-Verdünnung im Well.

3.3.2 Vorbereitungen des CaV1.2-Assay (Calcium-Flux)

Zur Untersuchung der Modulation der Calciumkanalaktivität in CHO-CaV1.2-Zellen wurde ein fluoreszenzbasierter Calcium-Flux-Assay unter Verwendung des Farbstoffs Fluo-4 AM durchgeführt. Zur Herstellung der Fluo-4 AM Stocklösung wurden 50 µg des Farbstoffs in 20 µL DMSO resuspendiert und bis zur vollständigen Lösung gevortext. Aufgrund der Photosensitivität des Farbstoffs wurden sämtliche Arbeitsschritte lichtgeschützt durchgeführt. Die Färbelösung wurde anschließend gemäß Tabelle 6 aus den Komponenten des Assay-Kits sowie ergänzendem DMSO, Pluronic F-127 und Zellkulturwasser hergestellt. Hierzu wurde zunächst Zellkulturwasser in ein lichtgeschütztes 15-mL-Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Anschließend wurden die weiteren Komponenten schrittweise zugegeben und die Lösung vorsichtig gevortext.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Färbelösung für den Calcium-Assay (10 mL Ansatz).

Reagenz	Volumen [µL]
Fluo-4 AM	20
50X DySolv	400
10X Brilliant Assay Buffer	1000
50X TRS	400
50X Probenecid	400
100X Pluronic F-127	100
H ₂ O	8080
Gesamt	10000

Anmerkung: Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 10 mL Färbelösung. Die Endkonzentrationen ergeben sich aus den jeweiligen Stammlösungen.

Aktivierungsassay

Die am Vortag ausgesäten 96-Well-Platten wurden zur Färbung aus dem Inkubator entnommen und das Zellkulturmedium unter sterilen Bedingungen mithilfe eines Mehrkanal-Aspirators vorsichtig entfernt. Anschließend wurden 100 µL Färbelösung pro Well mittels einer Mehrkanalpipette auf die Zellen gegeben. Als Kontrollbedingungen wurden mindestens eine Medienkontrolle sowie eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Beide dienten als Negativkontrollen ohne aktive Testsubstanz, unterschieden sich jedoch in ihrer Zusammensetzung. Für die Medienkontrolle wurden anstelle von Färbelösung und Testsubstanz jeweils 150 µL Assay Medium in die entsprechenden Wells pipettiert. Für die Lösungsmittelkontrolle wurden 100 µL Färbelösung und anstelle der Testsubstanz 50 µL Assay-Buffer in die Wells gegeben. Die Platte wurde für 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um die intrazelluläre Aufnahme des Farbstoffs zu gewährleisten.

Während der Inkubationszeit wurde der 1X Assay-Buffer durch Verdünnung des 10X Brilliant Assay Buffers im Verhältnis 1:10 mit Zellkulturwasser hergestellt. Parallel dazu wurden Verdünnungsreihen der Testsubstanzen ausgehend von den jeweiligen Stocklösungen durch serielle Verdünnung im Assay-Buffer hergestellt. Die Verdünnungsreihen wurden durch serielle Verdünnungen mit experi-

mentabhängig angepassten Verdünnungsfaktoren erzeugt, indem definierte Volumina der jeweiligen Ausgangslösung mit dem zuvor hergestellten 1X Assay-Buffer (20 mM K⁺) gemischt wurden. Nach jedem Verdünnungsschritt wurden frische Pipettenspitzen verwendet und die Lösungen kurz gevortext, um eine homogene Durchmischung zu gewährleisten. Die Verdünnungen wurden in ein Reagenzreservoir überführt und vor der Applikation kurz gemischt.

Nach der Inkubation wurden 50 µL der jeweiligen Testsubstanz pro Well mittels einer Mehrkanalpipette zugegeben. Aufgrund des bereits vorhandenen Volumens von 100 µL Färbelösung ergab sich eine Verdünnung der Testsubstanzen im Well im Verhältnis 1:3 (v/v), wodurch die effektiven Endkonzentrationen entsprechend reduziert wurden.

Zur Bestimmung der basalen Fluoreszenz wurde nach Zugabe der Färbelösung und einer anschließenden Inkubation von 60 min zunächst der Ausgangswert (F_0) mittels eines Fluoreszenzplattenreaders gemessen. Die Messung erfolgte im Bottom-Read-Modus bei einer Exzitationswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm (Bandbreite: 10 nm). Der Gain wurde auf 100 eingestellt. Zudem wurde im High-Sensitivity-Modus mit einer Integrationszeit von 32 µs bei einer Temperatur von etwa 25–27 °C gemessen.

Die F_1 -Werte wurden unter identischen Messbedingungen entweder direkt als Einzelmessung (0 min) oder kinetisch über einen längeren Zeitraum in Intervallen von 5 min erfasst.

Inhibitionsassay

Der Inhibitionsassay wurde analog zum Aktivierungsassay durchgeführt. Abweichend davon wurden zunächst 50 µL Färbelösung (siehe Tabelle 6) pro Well auf die Zellen gegeben und für 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der F_0 -Wert mittels Plattenlesegerät gemessen.

Anschließend wurden 50 µL der jeweiligen Inhibitorlösung zugegeben und für 15 min inkubiert. Die Inhibitorlösungen wurden als Verdünnungsreihen in der Färbelösung hergestellt und vor der Applikation kurz gemischt.

Zur Aktivierung der Kanäle wurden anschließend 50 µL der Aktivatorsubstanz FPL 64176 pro Well zugegeben. FPL 64176 wurde als dreifach konzentrierte Arbeitslösung im 1X Ca-Assay-Buffer hergestellt. Hierfür wurde eine 1 mM-Stocklösung auf eine Zielkonzentration von 9 µM verdünnt. Das benötigte Volumen der Stocklösung wurde mithilfe der Verdünnungsgleichung $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ berechnet. Für ein Endvolumen von 3000 µL wurden 27 µL der FPL-64176-Stocklösung mit 2973 µL 1X Ca-Assay-Buffer gemischt. Die F_1 -Wert wurde anschließend unter den zuvor beschriebenen Messbedingungen kinetisch erfasst.

Durch die schrittweise Zugabe der Lösungen ergab sich zunächst eine 1:2-Verdünnung der Inhibitoren nach deren Zugabe zur Färbelösung. Nach anschließender Zugabe der Aktivatorlösung entsprach die effektive Endkonzentration einer finalen 1:3-Verdünnung im Well.

3.3.3 Auswertung der Fluoreszenzdaten

Zur Auswertung der Fluoreszenzdaten und Beurteilung der Qualität der durchgeführten Assays wurden zunächst die Fluoreszenzwerte nach Stimulation (F_1) ins Verhältnis zu den basalen Fluoreszenzwerten (F_0) gesetzt und als F_1/F_0 in Microsoft Excel berechnet.

Die berechneten Verhältnisse wurden zusammen mit den entsprechenden effektiven Endkonzentrationen der Testsubstanzen in die Software GraphPad Prism (Version 10.3.1, GraphPad Software Inc.) übertragen. Die Konzentrationen wurden als dekadischer Logarithmus ($\log_{10}$, Logarithmus zur Basis 10) transformiert und gegen die zugehörigen F_1/F_0 -Werte aufgetragen.

Die Analyse der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen erfolgte mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung eines vierparametrischen logistischen Modells. Die Anpassung wurde mit variabler Steigung (*HillSlope*, Steigungsparameter der Kurve) durchgeführt.

Das Modell wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^{HillSlope}} \quad (3.3)$$

Dabei beschreibt *Bottom* die minimale Antwort, *Top* die maximale Antwort, *EC*50 (half maximal effective concentration) bzw. *IC*50 (half maximal inhibitory concentration) die Konzentration bei 50 % des maximalen Effekts und *HillSlope* die Steilheit der Kurve.

Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwerten aus technischen Duplikat- oder Triplikatmessungen.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Etablierung der fluoreszenzbasierten Kalium- und Calcium-Assays werden im Folgenden dargestellt. Zunächst wird der Kalium-Assay und anschließend der Calcium-Assay beschrieben. Die Auswertung aller Konzentrations-Wirkungs-Daten erfolgte mithilfe eines vierparametrischen logistischen Modells, wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben (Gleichung 3.3).

Die angegebenen Zeitpunkte (0 min, 20 min, 30 min) stellen nominelle Zeitpunkte dar. Da die Substanzen manuell zugegeben wurden und die Platte anschließend erst in den Reader eingesetzt werden musste, entspricht der Zeitpunkt 0 min nicht einer exakt unmittelbaren Messung nach Zugabe.

4.1 Thallium-Flux-Assay (hERG)

Die Darstellung der Ergebnisse folgt einem schrittweisen, aufeinander aufbauenden Vorgehen. Zunächst wird die Wirkung von NS 1643 im initial gewählten Konzentrationsbereich dargestellt. Auf Basis dieser Ergebnisse wird der Konzentrationsbereich angepasst und anschließend im aktivitätsrelevanten Bereich detailliert untersucht. Darauf aufbauend wird der Einfluss experimenteller Parameter, insbesondere der Thallium-Konzentration, untersucht. Abschließend werden ergänzende Experimente zur weiteren Einordnung der beobachteten Effekte dargestellt.

4.1.1 Aktivierung des hERG-Kanals mit NS 1643

Die konzentrationsabhängige Wirkung des hERG-Aktivators NS 1643 wurde in einem fluoreszenzbasierten Thallium-Flux-Assay in einer seriellen 1:3-Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich von 0,14 μM bis 300 μM untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Abschnitt 3 beschrieben. Für die Untersuchung der NS 1643-Wirkung wurden Messungen nach 0, 20 und 45 min Inkubationszeit durchgeführt, um sowohl unmittelbare als auch zeitabhängige Veränderungen des Fluoreszenzsignals nach Aktivatorzugabe zu erfassen und die zeitliche Stabilität der Signalantwort unter den gewählten Assay-Bedingungen zu beurteilen.

Ziel war es, sowohl unmittelbare als auch zeitabhängige Veränderungen des Fluoreszenzsignals nach Zugabe des Aktivators zu erfassen, um die zeitliche Stabilität der Signalantwort unter den gewählten Assay-Bedingungen zu beurteilen. Insbesondere sollte geprüft werden, ab welchem Zeitpunkt ein stabiles Signal vorliegt, wie sich das Signal im weiteren Zeitverlauf verändert und welche Inkubationszeit sich daraus als optimal für die Endpunktmessung ableiten lässt.

Die Daten zeigen eine zeitabhängige Abnahme der Baseline des Fluoreszenzsignals, während die konzentrationsabhängige Wirkung von NS 1643 in Form und Steilheit der Dosis-Wirkungs-Kurven weitgehend erhalten bleibt.

Die Ergebnisse zeigen, dass F_1/F_0 sowohl mit steigender NS 1643-Konzentration als auch mit zunehmender Inkubationszeit abnimmt (vgl. Abbildung 7). Insgesamt zeigte sich im Konzentrationsbereich bis etwa 30–50 μM für alle Messzeitpunkte ein weitgehend konstantes Fluoreszenzsignal. Veränderungen der Signalintensität traten erst bei Konzentrationen ab 60 μM auf.

Für den Messzeitpunkt 0 min nach Aktivatorzugabe lag das Verhältnis F/F_0 im Konzentrationsbereich 0,14 μM bis etwa 30–50 μM bei 1,04–1,06 und reduzierte sich bis 300 μM auf etwa 0,98. Nach 20 min

lagen die Werte bei etwa 0,83–0,85 und nahmen bei Konzentrationen $>100 \mu\text{M}$ auf etwa 0,73 ab. Nach 45 min wurden Werte von etwa 0,71–0,74 im niedrigen Konzentrationsbereich gemessen und reduzierten sich bei Konzentrationen von über $100 \mu\text{M}$ bis $300 \mu\text{M}$ auf etwa 0,65.

Während bei den späteren Messzeitpunkten die Signalveränderungen erst bei Konzentrationen von über $100 \mu\text{M}$ beobachtet wurden, waren diese durch einen steileren Abfall der Signalintensität gekennzeichnet. Zusätzlich zeigte sich eine systematische Abnahme des Verhältnisses F/F_0 mit zunehmender Inkubationszeit über alle Konzentrationen hinweg.

Allerdings wurde, entgegen der Erwartung, eine vollständige sigmoide Konzentrations-Wirkungs-Beziehung im untersuchten Konzentrationsbereich nicht erreicht. Insbesondere konnte kein unteres Plateau beobachtet werden, sodass eine Bestimmung apparater EC_{50} -Werte nicht möglich war.

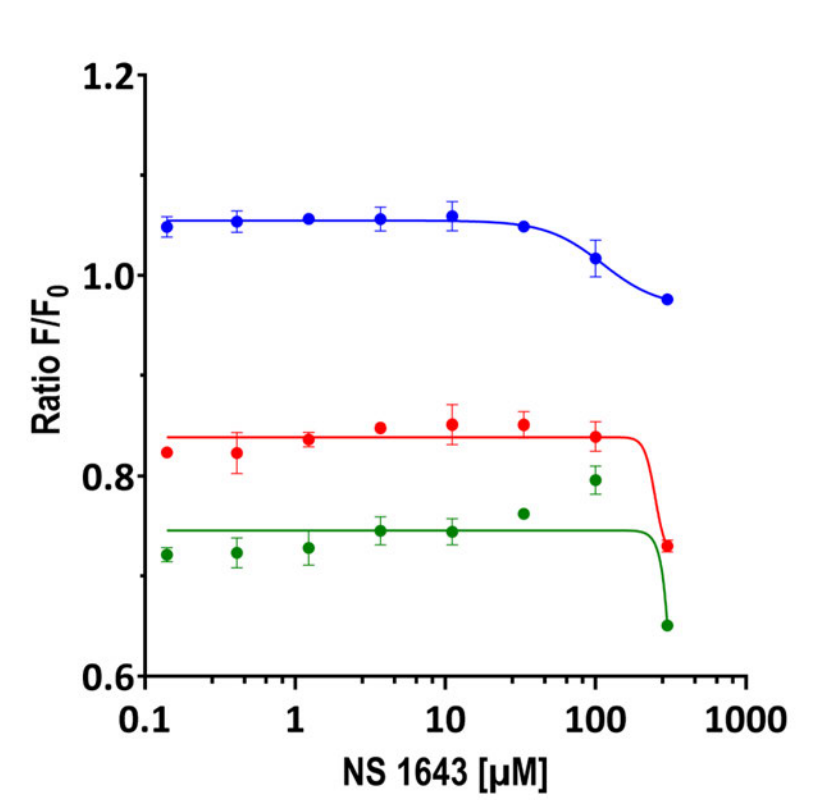


Abbildung 7: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von NS 1643.

Dargestellt ist das Verhältnis F/F_0 in Abhängigkeit von der NS 1643-Konzentration zu den Zeitpunkten 0 min (blau), 20 min (rot) und 45 min (grün). Datenpunkte zeigen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD; $n = 3$ technische Replikate). Messung im Thallium-Flux-Assay.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde der Konzentrationsbereich in nachfolgenden Experimenten angepasst, um die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung in dem relevanten Bereich detaillierter zu erfassen.

4.1.2 Wirkung von NS 1643 im erweiterten Konzentrationsbereich

Die konzentrationsabhängige Wirkung des hERG-Aktivators NS 1643 wurde im fluoreszenzbasierten Thallium-Flux-Assay in einer seriellen 1:3-Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich von $0,2 \mu\text{M}$ bis

500 μM untersucht. Abbildung 8 zeigt die resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurven für die Zeitpunkte 0 min und 30 min.

Für beide Zeitpunkte zeigte sich im niedrigen und mittleren Konzentrationsbereich bis etwa 100 μM ein weitgehend konstantes Fluoreszenzsignal. Zum Zeitpunkt 0 min lag das Verhältnis F/F_0 bei etwa 0,97–0,98, während für 30 min ein niedrigeres Ausgangsniveau von etwa 0,84–0,86 beobachtet wurde.

Erst bei höheren Konzentrationen ($>100 \mu\text{M}$) trat eine deutliche Abnahme des Fluoreszenzsignals auf. Dieser Effekt war nach 30 min Inkubationszeit stärker ausgeprägt als zum Zeitpunkt 0 min. Während bei 0 min ein moderater Abfall auf etwa 0,78 beobachtet wurde, zeigte sich bei 30 min ein deutlich stärkerer Signalabfall bis auf Werte unter 0,2.

Zusätzlich ist eine systematische Verschiebung des Signalniveaus in Abhängigkeit von der Inkubationszeit erkennbar. Über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg liegen die F/F_0 -Werte nach 30 min unter denen zum Zeitpunkt 0 min.

Während die Streuung der Messwerte bei niedrigen und mittleren Konzentrationen gering war, nahm sie bei den höchsten Konzentrationen deutlich zu.

Wie im vorherigen Versuch wurde für beide Zeitpunkte kein vollständiger sigmoider Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung beobachtet. Insbesondere wurde kein unteres Plateau erreicht.

Die im vorherigen Experiment identifizierte konzentrations- und zeitabhängige Abnahme des Fluoreszenzsignals wurde im erweiterten Konzentrationsbereich bestätigt. Dabei zeigte sich insbesondere, dass der Signalabfall bei höheren NS 1643-Konzentrationen ($>100 \mu\text{M}$) und längerer Inkubationszeit (30 min) deutlich verstärkt ist. Entgegen der Erwartung wurde jedoch kein ausgeprägtes unteres Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung erreicht.

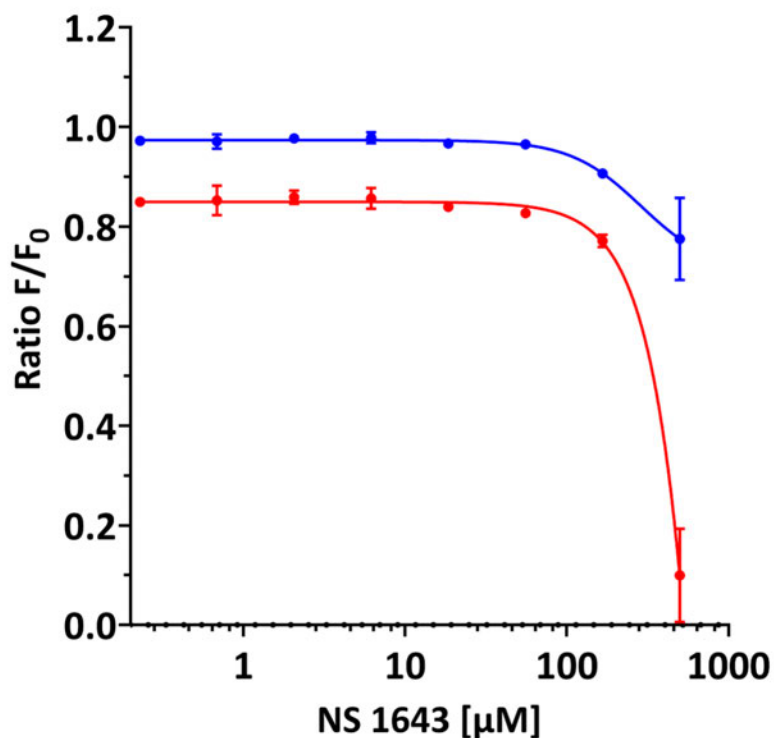


Abbildung 8: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von NS 1643 im erweiterten Konzentrationsbereich.

Dargestellt ist das Verhältnis F/F_0 in Abhängigkeit von der NS 1643-Konzentration zu den Zeitpunkten 0 min (blau) und 30 min (rot). Datenpunkte zeigen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD; $n = 2$ technische Replikate). Messung im Thallium-Flux-Assay.

4.1.3 Analyse der NS 1643-Wirkung im aktivitätsrelevanten Konzentrationsbereich

Vorversuche zeigten, dass Veränderungen des Fluoreszenzsignals für NS 1643 vor allem im Bereich von etwa 100–500 µM auftraten. Dieser Konzentrationsbereich wurde daher im fluoreszenzbasierten Thallium-Flux-Assay mit einer seriellen 1:1,3-Verdünnungsreihe von 79,68–500 µM detaillierter untersucht, um die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit höherer Punktdichte im wirksamen Bereich besser aufzulösen. Zur Erfassung möglicher zeitabhängiger Effekte von NS 1643 wurden die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen zu den Zeitpunkten 0 min, 20 min und 30 min bestimmt (Abbildung 9). Höhere Konzentrationen konnten unter den gewählten Assaybedingungen nicht untersucht werden, da es bei der Herstellung der Verdünnungsreihe zu Ausfällungen von NS 1643 kam.

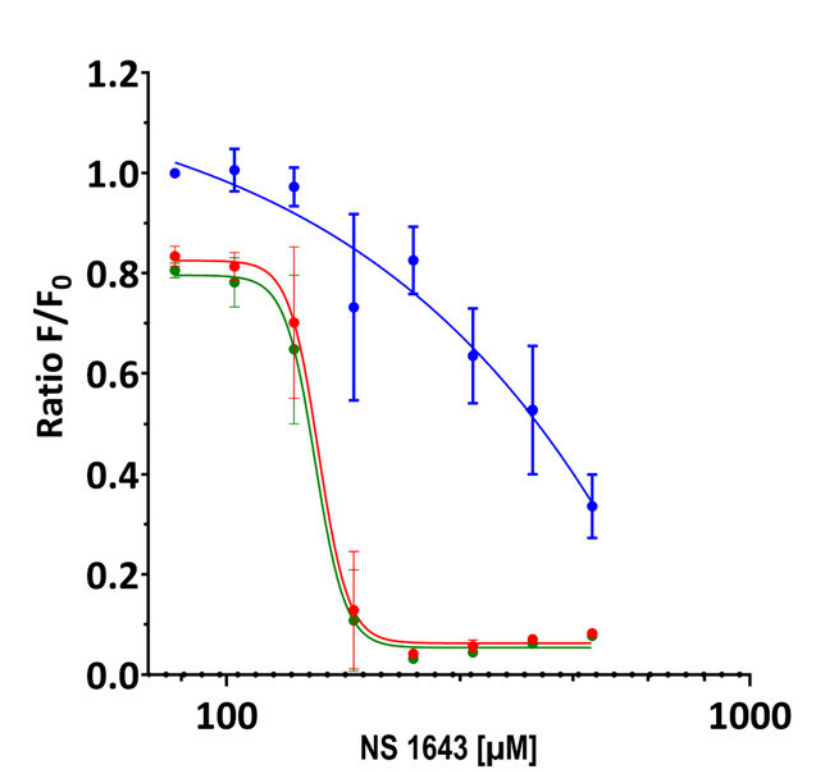


Abbildung 9: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von NS 1643 im aktivitätsrelevanten Konzentrationsbereich.

Dargestellt ist das Verhältnis F/F_0 in Abhängigkeit von der NS 1643-Konzentration zu den Zeitpunkten 0 min (blau), 20 min (rot) und 30 min (grün). Datenpunkte zeigen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD; $n = 2$ technische Replikate). Messung im Thallium-Flux-Assay.

Im aktivitätsrelevanten Konzentrationsbereich zeigte sich eine ausgeprägte zeitabhängige Veränderung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Zum Zeitpunkt 0 min lag das Verhältnis F/F_0 im niedrigen Konzentrationsbereich (80–100 μM) bei etwa 1,0 und nahm mit steigender Konzentration kontinuierlich ab. Der Signalabfall erfolgte graduell über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich, ohne dass ein ausgeprägter Übergangsbereich oder ein stabiles unteres Plateau beobachtet werden konnte. Bei der höchsten Konzentration wurden Werte von etwa 0,3–0,4 erreicht. Zudem zeigte die 0-min-Bedingung eine vergleichsweise hohe Streuung der Messwerte, insbesondere im mittleren Konzentrationsbereich.

Im Gegensatz dazu zeigten die Messungen nach 20 min und 30 min einen deutlich veränderten Verlauf. Im niedrigen Konzentrationsbereich lagen die F/F_0 -Werte bei etwa 0,82–0,84 (20 min) bzw. 0,78–0,80 (30 min). Mit steigender Konzentration trat in beiden Fällen ein ausgeprägter, steiler Signalabfall in einem engen Konzentrationsbereich zwischen etwa 150–200 μM auf.

Nach diesem Übergangsbereich erreichten beide Kurven ein stabiles niedriges Signalniveau. Für 20 min lagen die Werte im Plateau-Bereich bei etwa 0,05–0,08, während für 30 min Werte von etwa 0,04–0,06 beobachtet wurden. Die Streuung der Messwerte war in diesen Bedingungen insgesamt geringer und beschränkte sich hauptsächlich auf den Übergangsbereich.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit zunehmender Inkubationszeit sowohl eine Verschiebung des Ausgangsniveaus als auch eine Veränderung der Kurvenform aufweist. Während zum Zeitpunkt 0 min kein sigmoider Verlauf mit definierbarem Plateau

beobachtet wurde, zeigen die späteren Zeitpunkte eine klar ausgeprägte sigmoide Charakteristik mit steilem Übergang und stabilem unterem Plateau.

Zur quantitativen Beschreibung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen sind die Fit-Parameter dargestellt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Fit-Parameter der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von NS 1643 im aktivitätsrelevanten Konzentrationsbereich im Thallium-Flux-Assay.

Parameter	0 min	20 min	30 min
Top	1,199	0,8252	0,7958
Bottom	n.d.	0,0628	0,0538
log(IC ₅₀)	n.d.	2,176	2,169
IC ₅₀ [μM]	n.d.	149,9	147,7
Hill-Slope	n.d.	-15,28	-15,02
Span	n.d.	0,7624	0,7420

Anmerkung: Parameter bestimmt mittels nichtlinearer Regression (vierparametrisches logistisches Modell, 4PL). Der von GraphPad ausgegebene IC₅₀-Wert entspricht aufgrund des fallenden Kurvenverlaufs dem Mittelpunkt der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung und wird im Folgenden als apparenter EC₅₀ interpretiert.
n.d. = nicht bestimmbar.

Für die Messzeitpunkte 20 min und 30 min konnte jeweils ein stabiler sigmoider Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit klar definiertem oberen und unteren Plateau beobachtet werden. Die maximalen Signalwerte (Top) lagen bei 0,8252 (20 min) bzw. 0,7958 (30 min), während die minimalen Signalwerte (Bottom) bei 0,0628 bzw. 0,0538 lagen.

Die berechneten apparenten EC₅₀-Werte betrugen 149,9 μM (20 min) und 147,7 μM (30 min), entsprechend LogIC₅₀-Werten von 2,176 bzw. 2,169. Die nahezu identischen Werte zeigen, dass sich die Konzentration für die halbmaximale Wirkung zwischen 20 min und 30 min nicht wesentlich verändert. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen zeigten einen sehr steilen Übergang. Diese ausgeprägte Steilheit ist im vorliegenden Kontext jedoch nicht biologisch erklärbar, sondern vielmehr darauf zurückzuführen, dass im Bereich des EC₅₀ lediglich zwei Messpunkte vorliegen. Der Span, als Differenz zwischen maximalem und minimalem Signal, betrug 0,7624 (20 min) bzw. 0,7420 (30 min).

Für den Zeitpunkt 0 min konnte aufgrund des fehlenden sigmoiden Verlaufs keine verlässlichen Parameter bestimmt werden.

Da unter diesen Bedingungen erstmals eine klar definierte Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit stabilem Plateau beobachtet werden konnte, wurde in einem weiteren Experiment der Einfluss der Thallium-Konzentration auf die NS 1643-vermittelte Signaländerung untersucht.

4.1.4 Einfluss der Thallium-Konzentration auf die NS 1643-Wirkung

Zur Untersuchung des Einflusses der TI⁺-Konzentration auf die NS 1643-vermittelte Signaländerung wurde die konzentrationsabhängige Wirkung von NS 1643 im fluoreszenzbasierten Thallium-Flux-Assay in einer seriellen 1:1,3-Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich von 79,68 bis 500 μM untersucht. Hierfür wurde die Konzentration von Thalliumsulfat im Assay im Vergleich zum Standardansatz verdoppelt (0,5 mM TI⁺ statt 0,25 mM). Die resultierenden Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen zu den Zeitpunkten 0 min, 20 min und 30 min sind dargestellt (Abbildung 10).

Ausgehend vom zugrunde liegenden Messprinzip wurde erwartet, dass eine Erhöhung der TI^+ -Konzentration zu einer verstärkten Signalantwort führt und dadurch eine Detektion von Effekten bei niedrigeren NS 1643-Konzentrationen ermöglicht.

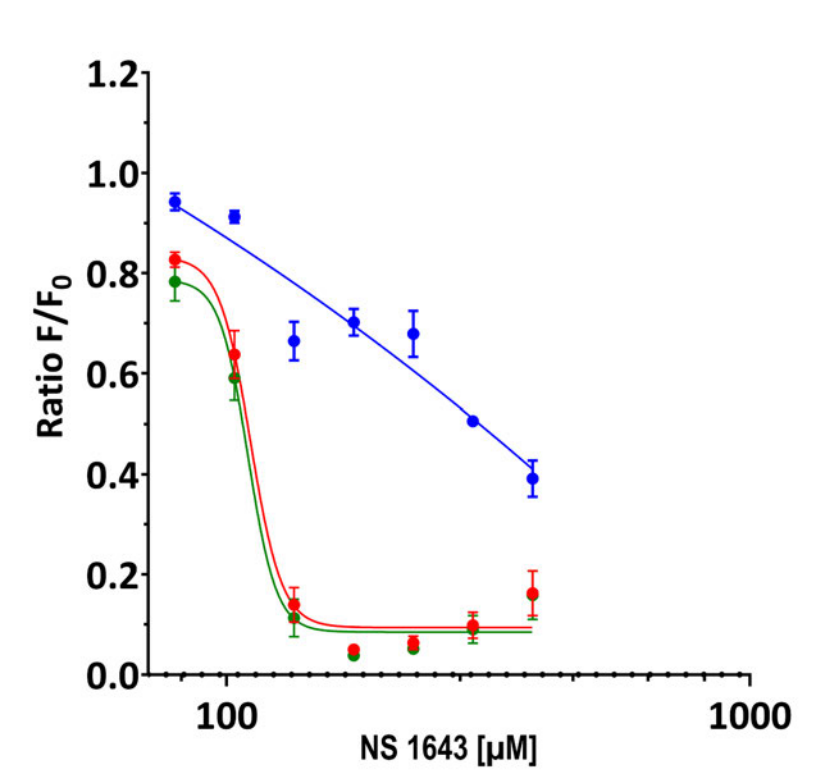


Abbildung 10: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von NS 1643 mit 2X TI^+ -Konzentration.

Dargestellt ist das Verhältnis F/F_0 in Abhängigkeit von der NS 1643-Konzentration bei erhöhter TI^+ -Konzentration (0,5 mM) zu den Zeitpunkten 0 min (blau), 20 min (rot) und 30 min (grün). Datenpunkte zeigen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD; $n = 3$ technische Replikate). Messung im Thallium-Flux-Assay.

Für den Zeitpunkt 0 min zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall des Fluoreszenzsignals über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich. Das Ausgangsniveau lag bei etwa 0,92–0,95 und nahm mit steigender Konzentration graduell bis auf etwa 0,35–0,40 ab. Ein sigmoider Verlauf mit definiertem Übergangsbereich oder stabilem unteren Plateau wurde nicht beobachtet. Zudem zeigte die 0-min-Bedingung eine erhöhte Streuung der Messwerte, insbesondere im mittleren Konzentrationsbereich. Demgegenüber zeigten die Messungen nach 20 min und 30 min weiterhin einen ausgeprägten sigmoiden Verlauf. Im niedrigen Konzentrationsbereich lagen die F/F_0 -Werte bei etwa 0,82–0,84 (20 min) bzw. 0,78–0,80 (30 min). Mit steigender Konzentration trat ein steiler Signalabfall in einem engen Konzentrationsbereich zwischen etwa 100–150 μM auf. Nach diesem Übergangsbereich wurde ein stabiles niedriges Signalniveau erreicht. Die Plateau-Werte lagen bei etwa 0,08–0,12 (20 min) bzw. 0,07–0,10 (30 min) und waren damit im Vergleich zum Standardansatz leicht erhöht. Die Streuung der Messwerte war in diesen Bedingungen insgesamt gering und beschränkte sich auf den Übergangsbereich.

Zur quantitativen Beschreibung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen sind die Fit-Parameter dargestellt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Fit-Parameter der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von NS 1643 bei erhöhter Ti^+ -Konzentration (0,5 mM).

Parameter	0 min	20 min	30 min
Top	n.d.	0,8328	0,7873
Bottom	n.d.	0,09398	0,08506
$\log(\text{IC}_{50})$	n.d.	2,046	2,041
IC_{50} [μM]	n.d.	111,2	109,9
Hill-Slope	n.d.	-14,51	-15,96
Span	n.d.	0,7388	0,7022

Anmerkung: Parameter bestimmt mittels nichtlinearer Regression (vierparametrisches logistisches Modell, 4PL). Der von GraphPad ausgegebene IC_{50} -Wert entspricht aufgrund des fallenden Kurvenverlaufs dem Mittelpunkt der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung und wird im Folgenden als apparenter EC_{50} interpretiert. n.d. = nicht bestimmbar. Messung im Thallium-Flux-Assay bei erhöhter Ti^+ -Konzentration (0,5 mM).

Im Vergleich zum vorherigen Experiment zeigte sich bei erhöhter Ti^+ -Konzentration eine Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zu niedrigeren NS 1643-Konzentrationen, was sich in einem reduzierten apparenten EC_{50} -Wert widerspiegelt (111,2 μM bei 0,5 mM Ti^+ vs. 149,9 μM bei 0,25 mM Ti^+ , jeweils 20 min). Gleichzeitig zeigte sich ein erhöhtes unteres Plateau (Bottom: 0,09398 vs. 0,0628), was auf eine veränderte minimale Signalintensität hinweist. Die grundsätzliche sigmoide Charakteristik der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung blieb jedoch erhalten. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen zeigten einen sehr steilen Übergang, was auf eine begrenzte Datendichte im Übergangsbereich zurückzuführen sein könnte, da lediglich ein Messpunkt im Bereich des EC_{50} vorliegt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Erhöhung der Ti^+ -Konzentration die grundsätzliche Form der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung nicht verändert, jedoch das Signalniveau und die Dynamik der Fluoreszenzantwort beeinflusst. Insbesondere blieb der sigmoide Verlauf für die späteren Messzeitpunkte erhalten, während sich das untere Plateau sowie der Übergangsbereich der Kurven veränderten.

4.1.5 Wirkung von RPR-260243 im Thallium-Flux-Assay

Die konzentrationsabhängige Wirkung von RPR-260243 wurde im fluoreszenzbasierten Thallium-Flux-Assay in einer seriellen 1:3-Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich von 1,4 nM bis 3000 nM untersucht (Abbildung 11).

Aufgrund des Wirkmechanismus von RPR-260243 als hERG-Aktivator wurde erwartet, dass eine konzentrationsabhängige Veränderung des Fluoreszenzsignals detektierbar ist, zumindest in Form einer initialen Signalabnahme bei steigenden Konzentrationen, analog zu den Beobachtungen für NS 1643.

Zum Zeitpunkt 0 min lag das Verhältnis F/F_0 konstant bei etwa 0,98–1,00 und zeigte keine systematische Abhängigkeit von der eingesetzten RPR-260243-Konzentration. Die Streuung der Messwerte war gering.

Nach 30 min wurde ein leicht reduziertes Signalniveau beobachtet, wobei die F/F_0 -Werte im Bereich von etwa 0,82–0,86 lagen. Auch hier zeigte sich keine klare konzentrationsabhängige Veränderung des Signal, mit nur minimaler Streuung der Messwerte.

Ein sigmoider Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung konnte für keinen der untersuchten Zeitpunkte beobachtet werden. Entsprechend war keine Bestimmung eines apparenteren EC_{50} -Werts möglich. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass RPR-260243 unter den gewählten experimentellen Bedingungen keinen messbaren Einfluss auf das Fluoreszenzsignal im Thallium-Flux-Assay ausübt.

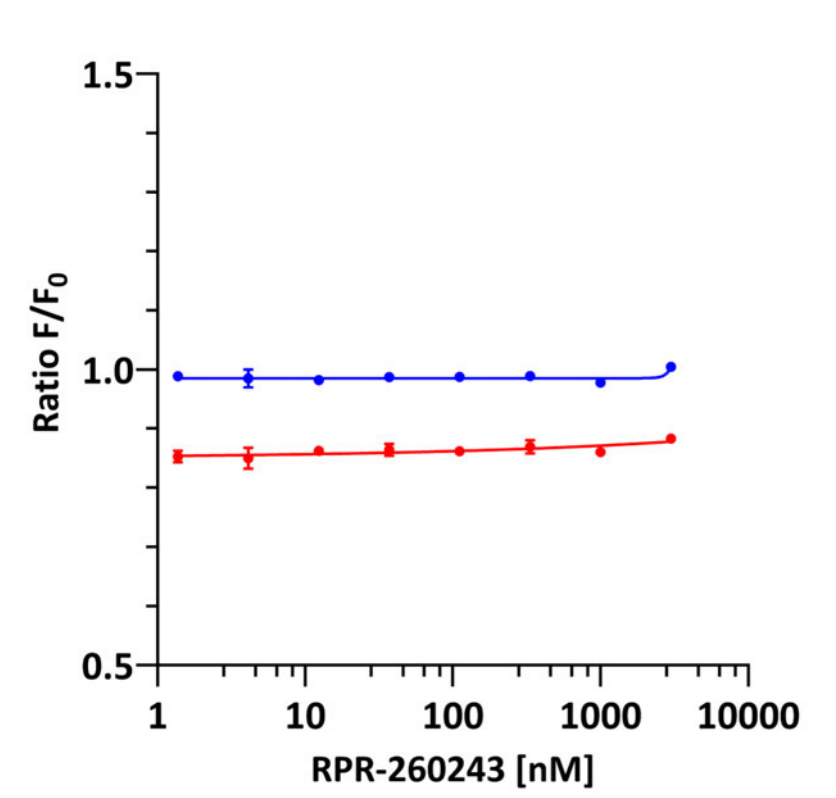


Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von RPR-260243.

Dargestellt ist das Verhältnis F/F_0 in Abhängigkeit von der RPR-260243-Konzentration zu den Zeitpunkten 0 min (blau) und 30 min (rot). Datenpunkte zeigen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD; $n = 2$ technische Replikate). Messung im Thallium-Flux-Assay.

Da im untersuchten niedrigen Konzentrationsbereich keine konzentrationsabhängige Veränderung des Fluoreszenzsignals beobachtet werden konnte, wurde im folgenden Experiment ein erweiterter Konzentrationsbereich gewählt, um zu prüfen, ob unter diesen Bedingungen eine messbare Wirkung von RPR-260243 detektiert werden kann.

4.1.6 Wirkung von RPR-260243 im erweiterten Konzentrationsbereich

Die konzentrationsabhängige Wirkung von RPR-260243 wurde im fluoreszenzbasierten Thallium-Flux-Assay in einer seriellen 1:3-Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich von 0,2 μ M bis 500 μ M untersucht (Abbildung 12).

Im Gegensatz zu den Untersuchungen im nanomolaren Konzentrationsbereich zeigte sich unter diesen Bedingungen eine konzentrationsabhängige Veränderung des Fluoreszenzsignals.

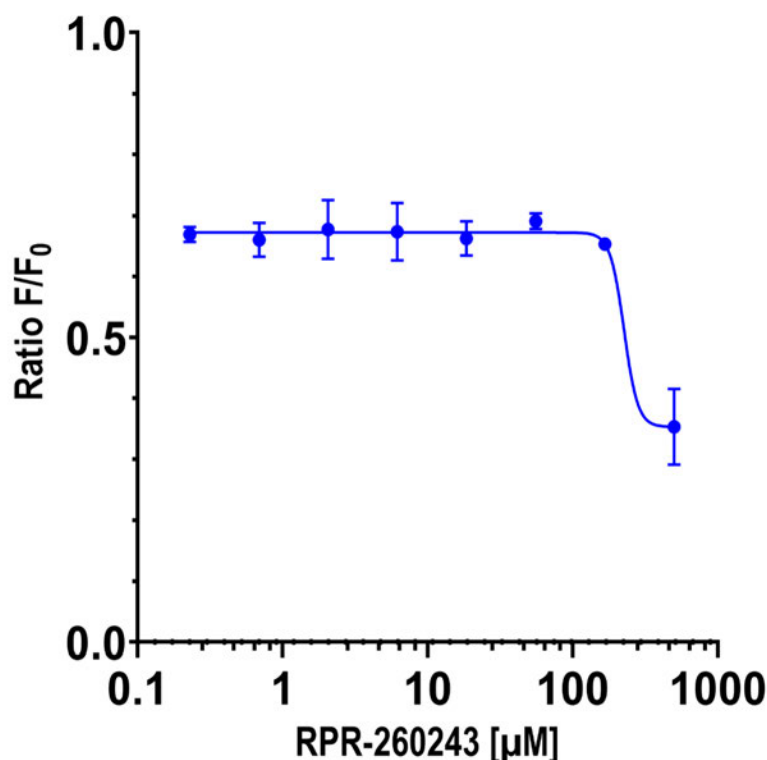


Abbildung 12: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von RPR-260243 im erweiterten Konzentrationsbereich.

Dargestellt ist das Verhältnis F/F_0 in Abhängigkeit von der RPR-260243-Konzentration im Bereich von 0,2 µM bis 500 µM. Datenpunkte zeigen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD; $n = 2$ technische Replikate). Messung im Thallium-Flux-Assay.

Im niedrigen Konzentrationsbereich bis etwa 100 µM lag das Verhältnis F/F_0 konstant bei etwa 0,65–0,70 und zeigte keine relevante Konzentrationsabhängigkeit.

Mit steigender Konzentration trat in einem engen Bereich zwischen etwa 100 µM und 200 µM ein steiler Signalabfall auf. Das Fluoreszenzsignal reduzierte sich dabei auf Werte um 0,30–0,35.

Bei höheren Konzentrationen (>100 µM) wurde ein deutlich reduziertes Signalniveau erreicht. Ein klar ausgeprägtes unteres Plateau war im untersuchten Konzentrationsbereich nicht erkennbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass RPR-260243 erst bei hohen Konzentrationen ab 100 µM im mikromolaren Bereich eine sichtbare Wirkung im Thallium-Flux-Assay zeigt.

4.1.7 Inhibitorische Wirkung von Terfenadin im Thallium-Flux-Assay

Die konzentrationsabhängige Wirkung des hERG-Inhibitors Terfenadin wurde im fluoreszenzbasierten Thallium-Flux-Assay in einer seriellen 1:3-Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich von 0,457 µM bis 1000 µM untersucht (Abbildung 13).

Zur Beurteilung eines möglichen Zeiteffekts wurden verschiedene Inkubationszeiten untersucht. Dadurch sollte auch ein Vergleich mit dem Aktivierungsassay ermöglicht werden, um zu prüfen, ob die Inkubationszeit in beiden Assayformaten einen ähnlichen Einfluss auf die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung hat.

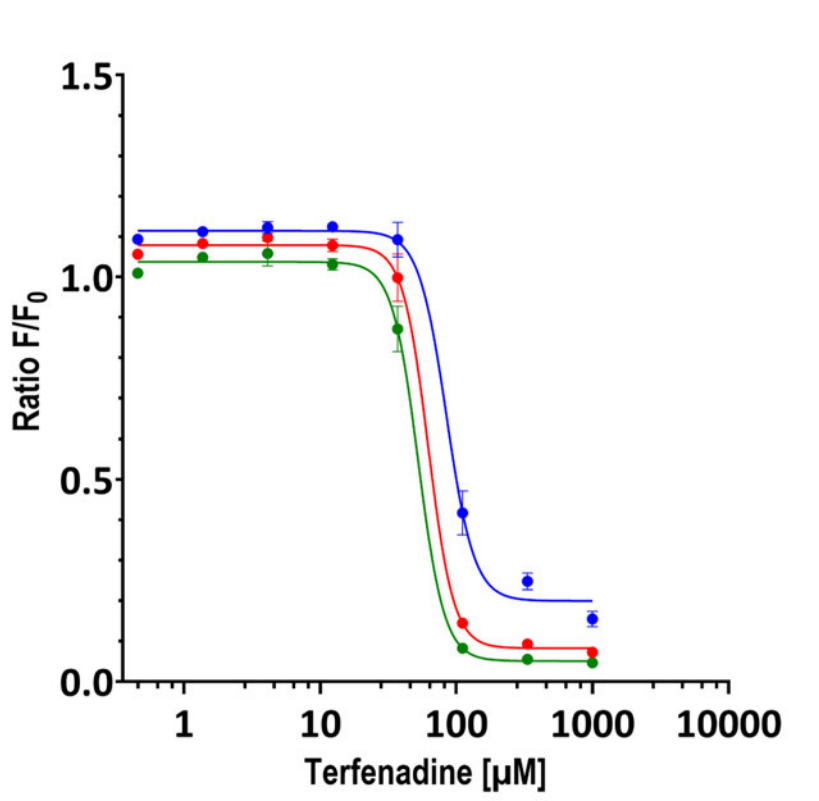


Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Terfenadin.

Dargestellt ist das Verhältnis F/F_0 in Abhängigkeit von der Terfenadin-Konzentration zu den Zeitpunkten 0 min (blau), 15 min (rot) und 30 min (grün). Datenpunkte zeigen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD; $n = 3$ technische Replikate). Messung im Thallium-Flux-Assay.

Zum Zeitpunkt 0 min lag das Verhältnis F/F_0 im niedrigen Konzentrationsbereich bei etwa 1,10 und zeigte mit steigender Konzentration einen steilen Abfall auf Werte um 0,20. Die nichtlineare Regression ergab einen IC_{50} -Wert von 84,7 μM ($\text{Log}IC_{50} = 1,928$). Die maximalen und minimalen Signalwerte lagen bei 1,114 (Top) bzw. 0,1994 (Bottom), bei einem Hill-Koeffizienten von -4,250. Nach 15 min Inkubationszeit zeigte sich eine Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Das Ausgangsniveau lag bei etwa 1,08 und nahm mit steigender Konzentration auf Werte um 0,08 ab. Der berechnete IC_{50} -Wert betrug 62,27 μM ($\text{Log}IC_{50} = 1,794$). Die maximalen und minimalen Signalwerte lagen bei 1,079 (Top) bzw. 0,0821 (Bottom), mit einem Hill-Koeffizienten von -4,673 (siehe Tabelle 9)

Tabelle 9: Fit-Parameter der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Terfenadin.

Parameter	0 min	15 min	30 min
Top	1,114	1,079	n.d.
Bottom	0,1994	0,08207	n.d.
log(IC ₅₀)	1,928	1,794	n.d.
IC ₅₀ [μM]	84,70	62,27	n.d.
Hill-Slope	-4,250	-4,673	n.d.
Span	0,9147	0,9968	n.d.

Anmerkung: Parameter bestimmt mittels nichtlinearer Regression (vierparametrisches logistisches Modell, 4PL). n.d. = nicht bestimmbar. Messung im Thallium-Flux-Assay.

Im Vergleich der Zeitpunkte zeigt sich somit eine erhöhte inhibitorische Wirkung von Terfenadin mit zunehmender Inkubationszeit, erkennbar an der Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zu niedrigeren Konzentrationen sowie an einer stärkeren Absenkung des minimalen Signalniveaus.

Für den Messzeitpunkt 30 min konnte kein stabiler Fit der Daten durchgeführt werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse eine ausgeprägte, zeitabhängige und konzentrationsabhängige Abnahme des Fluoreszenzsignals durch Terfenadin. Der Verlauf entspricht einer sigmoiden Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit klar definiertem oberen und unteren Plateau.

4.2 Calcium-Assay (CaV1.2)

4.2.1 Etablierung des Calcium-Assays und Wirkung von FPL 64176

Die Wirkung des CaV1.2-Aktivators FPL 64176 wurde im Fluo-4-AM-basierten Calcium-Assay in CHO-CaV1.2-Zellen untersucht (Abbildung 14). Der Versuch diente zunächst der ersten Einschätzung, ob FPL 64176 im gewählten Konzentrationsbereich unter den verwendeten Assaybedingungen eine nachweisbare Aktivierung des Systems hervorruft. Aufgrund des Wirkmechanismus von FPL 64176 als Aktivator spannungsabhängiger CaV1.2-Kanäle wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme des intrazellulären Calciumsignals erwartet, die sich in einer sigmoiden Konzentrations-Wirkungs-Beziehung widerspiegeln sollte. Im untersuchten Konzentrationsbereich von 1,8 nM bis 4000 nM zeigte FPL 64176 eine ausgeprägte konzentrationsabhängige Zunahme des Fluoreszenzsignals.

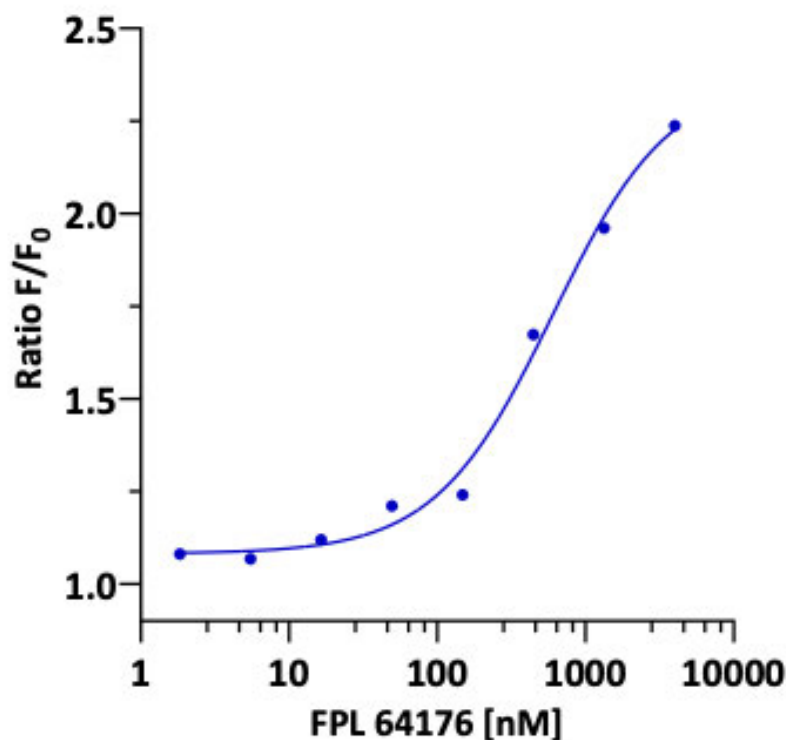


Abbildung 14: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von FPL 64176.

Dargestellt ist das Verhältnis F/F_0 in Abhängigkeit von der FPL 64176-Konzentration im Bereich von 1,8 bis 4000 nM. Datenpunkte zeigen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD; $n = 3$ technische Replikate). Messung im Fluo-4-AM-basierten Calcium-Assay in CHO-CaV1.2-Zellen.

Im niedrigen Konzentrationsbereich bis etwa 30 nM lag das Verhältnis F/F_0 bei etwa 1,05–1,10 und zeigte keine relevante Veränderung. Mit steigender Konzentration trat ein kontinuierlicher Anstieg des Signals auf, der im Bereich zwischen etwa 50 nM und 500 nM besonders ausgeprägt war. Bei höheren Konzentrationen wurde kein oberes Plateau erreicht, wobei F/F_0 -Werte von etwa 2,1–2,3 beobachtet wurden. Dies entspricht einer etwa zweifachen Erhöhung des Fluoreszenzsignals im Vergleich zum Ausgangswert. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zeigte damit einen ansteigenden Verlauf mit grundsätzlich sigmoidaler Tendenz, ohne dass im untersuchten Konzentrationsbereich ein vollständig ausgeprägtes oberes Plateau erreicht wurde. Die Streuung der Messwerte war gering, was auf eine gute Reproduzierbarkeit des Assays hinweist.

Die Ergebnisse belegen, dass der etablierte Calcium-Assay grundsätzlich geeignet ist, die Aktivität von CaV1.2-Kanälen abzubilden. Zur weiteren Charakterisierung wurde im folgenden Versuch geprüft, ob durch eine Erhöhung des untersuchten Konzentrationsbereichs ein deutlicher ausgeprägter sigmoidaler Verlauf und ein oberes Plateau erfasst werden können.

4.2.2 Zeitabhängigkeit der FPL 64176-Wirkung im Calcium-Assay

Die konzentrationsabhängige Wirkung des CaV1.2-Aktivators FPL 64176 wurde im Fluo-4-AM-basierten Calcium-Assay zu verschiedenen Zeitpunkten nach Substanzzugabe untersucht (Abbildung 15).

Es wurde erwartet, dass sich im erweiterten Konzentrationsbereich eine vollständige sigmoide Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit ausgeprägtem oberem Plateau ausbildet. Darüber hinaus sollte durch die Untersuchung verschiedener Inkubationszeiten beurteilt werden, wie sich die Signalintensität und Kurvenform zeitabhängig verändern und welcher Zeitpunkt eine stabile und reproduzierbare Messung ermöglicht.

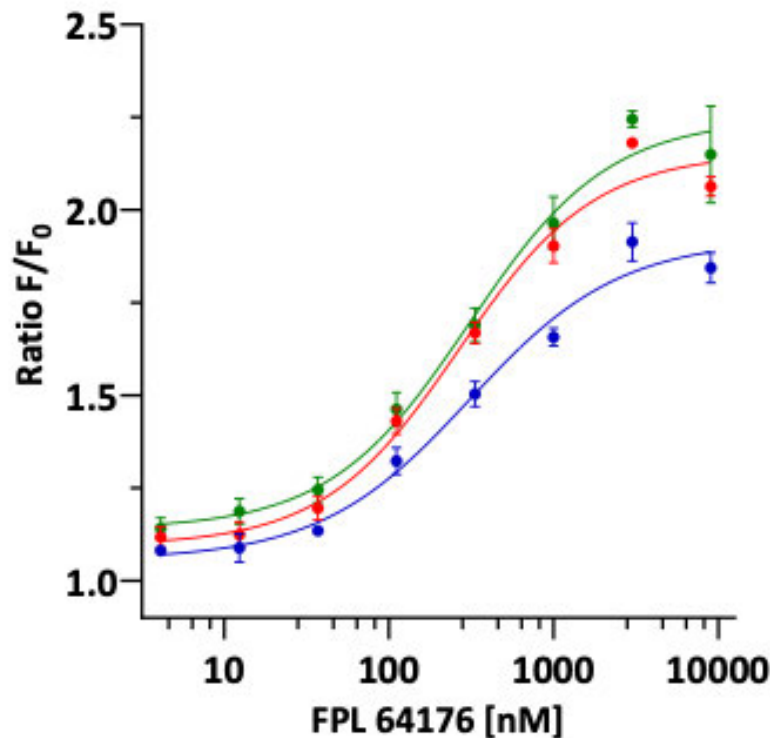


Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von FPL 64176 im erweiterten Konzentrationsbereich.

Dargestellt ist das Verhältnis F/F_0 in Abhängigkeit von der FPL 64176-Konzentration zu den Zeitpunkten 0 min (blau), 20 min (rot) und 45 min (grün). Datenpunkte zeigen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD; $n = 3$ technische Replikate). Messung im Fluo-4-AM-basierten Calcium-Assay in CHO-CaV1.2-Zellen.

Für alle untersuchten Zeitpunkte zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme des Fluoreszenzsignals. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen zeigten einen grundsätzlich sigmoidalen Verlauf, wobei sich im hohen Konzentrationsbereich eine Annäherung an ein oberes Plateau erkennen ließ.

Im niedrigen Konzentrationsbereich (< 50 nM) lagen die F/F_0 -Werte für alle Zeitpunkte nahe bei etwa 1,05–1,15 und zeigten keine ausgeprägte Konzentrationsabhängigkeit. Mit steigender Konzentration trat ein kontinuierlicher Anstieg des Signals auf, wobei sich deutliche Unterschiede zwischen den Zeitpunkten zeigten. Bereits nach 20 min war eine stärkere Signalzunahme im Vergleich zu 0 min erkennbar, die sich nach 45 min weiter verstärkte. Im oberen Konzentrationsbereich (> 1000 nM) erreichten die F/F_0 -Werte etwa 1,8–1,9 (0 min), 2,0–2,1 (20 min) und 2,1–2,3 (45 min). Damit zeigt sich eine zeitabhängige Zunahme der maximalen Signalintensität. Zusätzlich ist mit zunehmender Inkubationszeit eine leichte Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven zu niedrigeren Konzentrationen erkennbar, was darauf hindeutet, dass FPL 64176 unter diesen Bedingungen bereits bei geringeren Konzentrationen eine vergleichbare Wirkung auslöst.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung von FPL 64176 im Calcium-Assay sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig ist, wobei längere Inkubationszeiten zu einer verstärkten Aktivierung der CaV1.2-Kanäle führen.

4.2.3 Inhibition der CaV1.2-Aktivität durch Nisoldipin

Zur Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von Nisoldipin auf CaV1.2-Kanäle wurde dessen konzentrationsabhängige Wirkung im Fluo-4-AM-basierten Calcium-Assay untersucht, wobei Nisoldipin vor dem Aktivator FPL 64176 (3 μM) induziert wurde (Abbildung 16). Der Versuch erfasst damit nicht die Wirkung von Nisoldipin allein, sondern die Signalantwort nach Vorinkubation mit Inhibitor und anschließender Aktivierung durch FPL 64176.

Es wurde erwartet, dass mit steigender Nisoldipin-Konzentration die nachfolgend durch FPL 64176 ausgelöste Signalzunahme abgeschwächt wird. Im niedrigen Konzentrationsbereich zeigte sich ein erhöhtes Fluoreszenzsignal mit F/F_0 -Werten von etwa 1,7–1,8. Dies zeigt, dass nach Vorinkubation mit niedrigen Nisoldipin-Konzentrationen durch die anschließende Zugabe von FPL 64176 weiterhin eine deutliche Signalantwort ausgelöst werden konnte.

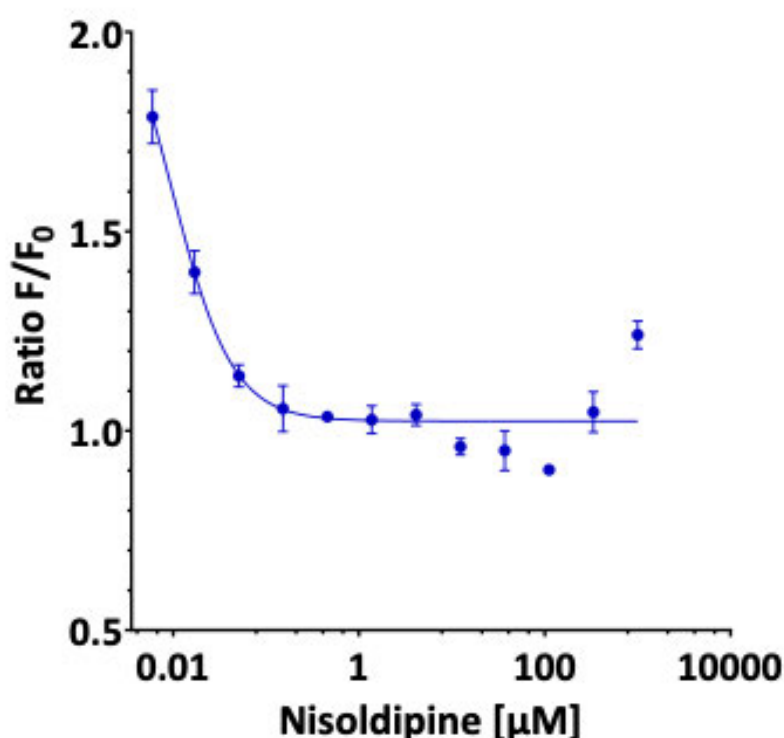


Abbildung 16: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Nisoldipin.

Dargestellt ist das Verhältnis F/F_0 in Abhängigkeit von der Nisoldipin-Konzentration. Die CaV1.2-Kanäle wurden zuvor mit FPL 64176 (3 μM) aktiviert. Datenpunkte zeigen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD; $n = 3$ technische Replikate). Messung im Fluo-4-AM-basierten Calcium-Assay in CHO-CaV1.2-Zellen.

Mit steigender Nisoldipin-Konzentration nahm das Fluoreszenzsignal deutlich ab. Bereits im unteren bis mittleren Konzentrationsbereich war ein starker Signalrückgang erkennbar. Ab etwa 0,1–1 μM näherte sich das Signal Werten um $F/F_0 \approx 1,0$ an und blieb über einen breiten Konzentrationsbereich

weitgehend auf diesem Niveau. Im höchsten Konzentrationsbereich zeigte sich kein weiterer ausgeprägter Abfall; einzelne Messpunkte lagen wieder leicht oberhalb des zuvor erreichten Signalniveaus.

Insgesamt zeigte sich damit eine konzentrationsabhängige Abschwächung der nachfolgenden FPL 64176-Antwort durch Nisoldipin. Die Kurve weist einen abfallenden Verlauf mit Annäherung an das Ausgangsniveau auf. Im untersuchten Konzentrationsbereich war jedoch kein klar ausgeprägtes oberes Plateau mit mehreren Plateaupunkten erkennbar, sodass die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung nicht für eine Bestimmung von Fit-Parametern geeignet war.

5 Diskussion

5.1 Assaybezogene und methodische Aspekte des thalliumbasierten Brilliant-Thallium-Gold-Snapshot-Assays

5.1.1 Signalcharakteristik und Interpretierbarkeit des thalliumbasierten Snapshot-Assays

Zur Einordnung der hERG-Daten musste zunächst geklärt werden, wie die Signalrichtung im verwendeten thalliumbasierten Snapshot-Assay zu interpretieren ist. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der Assay grundsätzlich geeignet ist, Modulationen des hERG-Kanals funktionell zu erfassen. Auffällig war jedoch, dass sowohl für die untersuchten Aktivatoren als auch für den Inhibitor Terfenadin eine Abnahme des Fluoreszenzsignals beobachtet wurde. Dieses Signalverhalten weicht von klassischen kinetischen Thallium-Flux-Assays ab, in denen eine Kanalaktivierung typischerweise mit einem erhöhten Tl^+ -Influx und einer Zunahme des Fluoreszenzsignals einhergeht (Thermo Fisher Scientific, o.J. Weaver et al., 2004).

Für den hier verwendeten Brilliant Thallium Gold Snapshot Assay ist eine solche inverse Signalcharakteristik jedoch grundsätzlich mit dem Assayprinzip vereinbar (ION Biosciences, n.d. Smith et al., n.d.). Laut Hersteller werden die Zellen in diesem Format bereits vor Zugabe des Modulators gleichzeitig mit Tl^+ und dem intrazellulären Tl^+ -sensitiven Indikator Thallos Gold AM beladen; die anschließende Fluoreszenzänderung kann sowohl durch Tl^+ -Influx als auch durch Tl^+ -Efflux verursacht werden. Zudem handelt es sich ausdrücklich um ein Snapshot-/Endpoint-kompatibles Assayformat mit lang anhaltendem Signal und nicht um ein Assayformat, das ausschließlich einen unmittelbaren, zeitaufgelösten Tl^+ -Influx erfasst (ION Biosciences, 2025).

Vor diesem Hintergrund ist für die Interpretation der Daten zu berücksichtigen, dass das gemessene Signal im Snapshot-Assay nicht unmittelbar die Flussrichtung von Tl^+ abbildet, sondern das intrazelluläre Tl^+ -abhängige Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt des Readouts. Eine erhöhte hERG-Kanalaktivität muss daher in diesem Assayformat nicht zwangsläufig mit einer Signalzunahme einhergehen. Es ist vielmehr denkbar, dass die unter den gewählten Bedingungen veränderte Tl^+ -Verteilung zu der beobachteten Signalabnahme beiträgt. Die vom Hersteller empfohlene Verwendung einer K^+ -haltigen Stimuluslösung sowie die notwendige Optimierung von Tl^+ -Konzentration und Readout-Zeit weisen zusätzlich darauf hin, dass das Signal stark von den jeweiligen Messbedingungen abhängen kann.

Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Signalabnahme bei der Aktivierung (Abbildung 9) ist, dass die K^+ -haltige Stimuluslösung die Zellen depolarisiert und dadurch die elektrische Triebkraft für den Einstrom positiv geladener Ionen wie Tl^+ vermindert. Unter diesen Bedingungen könnte der Tl^+ -Influx reduziert und die intrazelluläre Tl^+ -Beladung zum Zeitpunkt des Readouts geringer ausfallen (Rienecker et al., 2020). Da der Hersteller für den Snapshot-Assay angibt, dass die Fluoreszenzänderung sowohl durch Tl^+ -Influx als auch durch Tl^+ -Efflux beeinflusst werden kann, lässt sich die genaue Flussrichtung jedoch nicht eindeutig bestimmen.

Diese Einordnung wird auch durch andere Snapshot-basierte Thallium-Assays gestützt. Smith et al. (2024) beschrieben für einen endpoint-basierten Thallium-Assay an GIRK-Kanälen ebenfalls

eine Signalabnahme bei Aktivierung und nutzten das Snapshot-Prinzip gezielt, um ein kinetisches Kaliumkanal-Assay auf endpoint-fähige Standard-Plattenleser zu übertragen.

Dies spricht dafür, dass die Signalrichtung in solchen Assayformaten nicht unmittelbar mit der pharmakologischen Wirkungsrichtung gleichgesetzt werden kann und dass eine inverse Konzentrations-Wirkungs-Beziehung bei Aktivatoren mit dem methodischen Prinzip eines Snapshot-Assays vereinbar ist.

Während die Signalabnahme bei Terfenadin mit einer Abschwächung des hERG-vermittelten I_{T^+} -Signals vereinbar ist, könnte dieselbe Signalrichtung bei Aktivatoren mit einer veränderten I_{T^+} -Verteilung beziehungsweise einer verminderten Nettoakkumulation zum Messzeitpunkt zusammenhängen. Der Snapshot-Assay erscheint damit grundsätzlich zum funktionellen Nachweis einer hERG-Modulation geeignet, erlaubt jedoch keine eindeutige mechanistische Einordnung allein anhand der Signalrichtung. Eine belastbare Interpretation sollte daher stets im Kontext des Assayprinzips und geeigneter Referenzsubstanzen erfolgen.

Zusätzlich ist für die Interpretation der inhibitorischen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zu berücksichtigen, dass der Inhibitor im vorliegenden Versuchsaufbau vor Zugabe des Aktivators NS 1643 appliziert wurde. Der Inhibitionsassay bildet damit nicht die Hemmung eines bereits aktivierten Kanalzustands ab, sondern die konzentrationsabhängige Abschwächung der nachfolgend durch NS 1643 ausgelösten Signalantwort. Die beobachtete Inhibitionskurve ist daher nicht isoliert, sondern im Kontext eines aktivatorgekoppelten Assaydesigns zu interpretieren. Die ähnliche Signalrichtung von Aktivator- und Inhibitorcurven (Abbildung 9, Abbildung 13) ist folglich nicht als Hinweis auf identische zugrunde liegende Mechanismen zu verstehen, sondern als Folge des verwendeten Snapshot-Assayformats und der gewählten Versuchsabfolge.

5.1.2 Inkubationszeit beeinflusst Baseline-Stabilität und Nachweisbarkeit der Aktivatorwirkung

Ein wesentlicher Einflussfaktor auf die Assay-Performance war die Inkubationszeit mit NS 1643. Mit längerer Inkubationsdauer nahm die Baseline des Fluoreszenzsignals tendenziell ab. Dies spricht für zeitabhängige Veränderungen des Assaysystems, die nicht unmittelbar der eigentlichen Wirkung des Aktivators zuzuordnen sind. Da die begleitenden Kontrollen unauffällig waren, werden Dye-Leakage, ausgeprägte Zellschädigung und offensichtliche allgemeine Störungen der Zellphysiologie durch die vorliegenden Daten nicht als Hauptursachen des Baseline-Drifts gestützt.

Gleichzeitig zeigten die Ergebnisse, dass eine gewisse Inkubationszeit erforderlich war, um die Wirkung von NS 1643 klarer zu erfassen. Insbesondere bei kurzen Inkubationszeiten blieb die Signaländerung auch bei höheren Konzentrationen begrenzt. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivatorwirkung unter den gewählten Bedingungen nicht unmittelbar vollständig erfassbar war, sondern sich erst im Verlauf der Inkubation deutlicher ausprägte. Dabei zeigte sich, dass der größte Unterschied zwischen unmittelbarer Messung (0 min) und Inkubationszeiten von etwa 15–20 min lag. Während bei 0 min häufig noch kein annähernd sigmoidaler Verlauf erkennbar war, zeigten sich ab etwa 15–20 min deutlich besser ausgebildete Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen. Eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit auf 30 min führte dagegen meist nur noch zu einer vergleichsweise geringen zusätzlichen Verbesserung. Daraus ergibt sich ein methodischer Zielkonflikt: Längere Inkubationszeiten

können die Nachweisbarkeit der Aktivatorwirkung verbessern, gehen jedoch gleichzeitig mit einer, wenn auch nur moderaten, Verminderung der Baseline-Stabilität einher (Abbildung 9, Abbildung 13).

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen daher dafür, dass eine Inkubationszeit von etwa 15–20 min unter den getesteten Bedingungen einen günstigen Kompromiss zwischen Kurvenausbildung und Baseline-Stabilität darstellt. Die Inkubationsdauer ist damit als wichtiger assaybezogener Parameter zu bewerten. Für zukünftige Experimente erscheint eine systematische Optimierung sinnvoll, um ein Gleichgewicht zwischen ausreichender Einwirkdauer des Modulators und möglichst stabilen Ausgangsbedingungen zu erreichen.

5.1.3 Die Thallium-Konzentration war unter den getesteten Bedingungen kein limitierender Assay-Parameter

Ein weiterer untersuchter Faktor war die eingesetzte Thallium-Konzentration (Abbildung 9, Abbildung 10). Entgegen der anfänglichen Annahme ergab die Erhöhung auf die zweifache Thallium-Konzentration keine methodische Verbesserung des Assays. Vielmehr zeigten die Absolutmesswerte, dass bereits bei 1x Thallium das günstigere Signal-to-noise-Verhältnis vorlag.

Auch die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung war unter diesen Bedingungen bereits günstig ausgeprägt.

Diese Beobachtung spricht dagegen, dass die Tl^{+} -Verfügbarkeit bei 1x die Sensitivität des Assays wesentlich begrenzte. Eine Erhöhung der Thallium-Konzentration stellte damit keinen relevanten Optimierungsschritt dar. Die eingeschränkte Auswertbarkeit einzelner Messreihen ist daher eher auf andere Einflussgrößen zurückzuführen, insbesondere auf Inkubationseffekte, Baseline-Verschiebungen oder allgemeine assaybedingte Variabilität.

Für die methodische Bewertung des Assays bedeutet dies, dass die Thallium-Konzentration innerhalb des getesteten Bereichs nicht als zentraler limitierender Faktor anzusehen ist. Für weiterführende Untersuchungen könnte dennoch geprüft werden, welchen Einfluss eine Reduktion der Thallium-Konzentration auf Signalqualität und Assaystabilität hat. Wichtiger für die weitere Optimierung erscheinen jedoch die Stabilität des Ausgangssignals und die Standardisierung der Inkubationsbedingungen.

5.2 Funktionelle Einordnung der untersuchten hERG-Modulatoren im Snapshot-Assay

Für NS 1643 zeigte sich insgesamt eine konzentrationsabhängige Veränderung des Fluoreszenzsignals, was mit einer aktivatorischen Wirkung auf den hERG-Kanal vereinbar ist. Unter geeigneten assaybezogenen Bedingungen, insbesondere bei Inkubationszeiten ab etwa 15 min und bei 1x Thallium, ließ sich eine gut ausgebildete Konzentrations-Wirkungs-Beziehung erfassen. Dies spricht dafür, dass die Wirkung von NS 1643 im verwendeten Snapshot-Assay grundsätzlich erfassbar ist. Die im aktivitätsrelevanten Bereich beobachteten größeren Standardabweichungen könnten zumindest teilweise durch die geringe Anzahl an Replikaten im vorliegenden Versuch bedingt sein (Abbildung 9).

Die Auswertbarkeit wurde dabei vor allem durch die Stabilität der Baseline und die noch ausgeprägte Steilheit im Übergangsbereich beeinflusst. Letztere könnte im vorliegenden Fall weniger auf einen tatsächlichen biologischen Effekt als vielmehr auf die begrenzte Auflösung im Bereich des apparen-

ten EC_{50} zurückzuführen sein. Da in diesem Bereich nur wenige Messpunkte vorlagen, konnte der Übergang der Kurve nur eingeschränkt belastbar beschrieben werden. Eine dichtere Konzentrationsabstufung nahe dem EC_{50} könnte daher zu einer realistischeren Erfassung der Kurvensteigung sowie zu einer stabileren Fit-Analyse beitragen.

Für RPR-260243 konnte im zunächst untersuchten nanomolaren Konzentrationsbereich keine erkennbare Veränderung des Fluoreszenzsignals festgestellt werden (Abbildung 11). Erst im erweiterten mikromolaren Konzentrationsbereich zeigte sich eine Abnahme des F/F_0 -Verhältnisses, die grundsätzlich mit einer Modulation der hERG-Kanalaktivität vereinbar ist (Abbildung 12). Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung blieb jedoch nur eingeschränkt auswertbar, da der Übergangsbereich durch wenige Messpunkte erfasst wurde und weder ein belastbarer EC_{50} -Wert noch ein klar definiertes Plateau abgeleitet werden konnten. Insgesamt spricht dies dafür, dass der relevante Aktivitätsbereich mit der gewählten Konzentrationsabstufung noch nicht ausreichend präzise erfasst wurde. Für eine verlässlichere Bewertung wären daher weitere Messungen mit enger abgestuften Konzentrationen im aktivitätsrelevanten Bereich sinnvoll. Zusätzlich könnte geprüft werden, ob eine Erweiterung des Konzentrationsbereichs zu höheren Konzentrationen weitere Informationen zum Kurvenverlauf liefert, da auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht eindeutig beurteilt werden kann, ob der letzte Messpunkt einen Ausreißer darstellt oder bereits den Beginn eines abfallenden Kurvenverlaufs markiert.

Der hERG-Inhibitor Terfenadin zeigte im verwendeten Snapshot-Assay eine sigmoide Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit konzentrationsabhängiger Abnahme des Fluoreszenzsignals (Abbildung 13). Wie bei NS 1643 war damit grundsätzlich eine gut auswertbare Konzentrations-Wirkungs-Beziehung erfassbar. Im Vergleich zu NS 1643 blieb die Baseline bei Terfenadin über die untersuchten Inkubationszeiten näher an $F/F_0 = 1$ und zeigte geringere zeitabhängige Veränderungen. Dies spricht für stabilere Ausgangsbedingungen und erleichtert die Auswertung.

Für die Interpretation ist jedoch zu berücksichtigen, dass der Inhibitionsassay nicht mit Terfenadin allein durchgeführt wurde. Stattdessen wurde Terfenadin vor dem Aktivator NS 1643 appliziert, dessen Wirkung nach Literaturangaben vor allem auf einer Abschwächung der Kanalinaktivierung beruht, während die Aktivierung selbst weitgehend unverändert bleibt. Dadurch kann der Kanal länger leitfähig bleiben (Casis et al., 2006).

Die beobachtete Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ist daher nicht als Wirkung des Inhibitors allein zu verstehen, sondern im Kontext der Kombination aus Inhibitor und nachfolgendem Aktivator zu interpretieren. Da sich der Inhibitionsassay im niedrigen Konzentrationsbereich zudem nicht vollständig wie der Aktivierungsassay verhält, lässt sich auf Grundlage des vorliegenden Assaydesigns nur eingeschränkt beurteilen, welcher Anteil der Signaländerung auf den Inhibitor, den Aktivator oder deren Zusammenspiel zurückzuführen ist. Für eine klarere Einordnung erscheinen zusätzliche Vergleichsbedingungen mit Inhibitor allein sinnvoll.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Terfenadin im verwendeten Assayformat eine gut auswertbare Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zeigte. Gleichzeitig sprechen sie dafür, dass für die Einordnung inhibitorischer Effekte nicht nur die Kurvenform, sondern auch das zugrunde liegende Assaydesign berücksichtigt werden sollte.

5.3 Assaybezogene und methodische Aspekte des Fluo-4-AM-basierten Calcium-Assays

5.3.1 Der Calcium-Assay ermöglicht eine direkt interpretierbare Detektion von Aktivierung und Inhibition

Im Gegensatz zum thalliumbasierten hERG-Snapshot-Assay zeigte der Fluo-4-AM-basierte Calcium-Assay eine unmittelbar interpretierbare Signalrichtung (Abbildung 14, Abbildung 15). Für den Aktivator FPL 64176 wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme des Fluoreszenzsignals beobachtet, während Nisoldipin zu einer Abnahme des Signals führte (Abbildung 16). Diese Signalcharakteristik entspricht der erwarteten Beziehung zwischen Kanalaktivität und intrazellulärem Ca^{2+} -Signal und erleichtert die mechanistische Interpretation der Daten deutlich.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von FPL 64176 zeigten einen grundsätzlich sigmoidalen Verlauf und einen vergleichbaren maximalen Signalbereich. Dies spricht dafür, dass der Assay prinzipiell geeignet ist, aktivatorische Effekte spannungsabhängiger Calciumkanäle abzubilden. Ein vollständig ausgeprägtes Plateau wurde jedoch nicht erreicht, sodass der maximale Effekt unter den gewählten Bedingungen möglicherweise noch nicht vollständig erfasst wurde.

Auch die Ergebnisse zu Nisoldipin sind grundsätzlich mit einer inhibitorischen Wirkung auf das CaV1.2 -vermittelte Calciumsignal vereinbar. Die Substanz führte zu einer konzentrationsabhängigen Abschwächung der nachfolgenden FPL-64176-Antwort. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Nisoldipin zeigte zwar einen deutlichen abfallenden Verlauf, ein klar ausgeprägtes oberes Plateau war jedoch nicht erkennbar. Dies spricht dafür, dass der gewählte Konzentrationsbereich für die vollständige Erfassung der Kurve nicht optimal gewählt war. Während der höhere Konzentrationsbereich bereits weit im Bereich des unteren Plateaus lag, wurde der niedrigere Konzentrationsbereich offenbar nicht ausreichend fein abgedeckt, um das obere Plateau belastbar darzustellen. Für eine präzisere quantitative Auswertung wären daher zusätzliche Messpunkte bei niedrigeren Nisoldipin-Konzentrationen sinnvoll.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass der Fluo-4-AM-basierte Calcium-Assay grundsätzlich geeignet ist, sowohl aktivatorische als auch inhibitorische Effekte auf CaV1.2 funktionell zu erfassen. Gleichzeitig zeigen sie, dass die quantitative Auswertung durch die Wahl des Konzentrationsbereichs und die unvollständige Erfassung der Kurve eingeschränkt bleibt.

5.3.2 Die Inkubationszeit beeinflusst die maximale Antwort auf FPL 64176

Zusätzlich zeigte sich im Calcium-Assay ein deutlicher Einfluss der Inkubationszeit auf die beobachtete Aktivatorwirkung von FPL 64176. Inkubationszeiten von etwa 20 min führten zu deutlich besser ausgebildeten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen als die unmittelbare Messung bei 0 min (Abbildung 15). Während bei 0 min nur eine vergleichsweise geringe Signaländerung beobachtet wurde, zeigten sich bei längerer Inkubation stärkere Signalantworten und ein klarerer Kurvenverlauf. Gleichzeitig war bei längeren Inkubationszeiten im hohen Konzentrationsbereich eine größere Standardabweichung erkennbar, sodass auch diese Bedingungen nicht uneingeschränkt als optimal zu bewerten sind. Dies spricht dafür, dass die Inkubationszeit unter den gewählten Bedingungen sowohl die Signalstärke als auch die Auswertbarkeit der Messreihen beeinflusst. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Inkubationszeit von etwa 20 min unter den getesteten Bedingungen am

ehesten einen günstigen Kompromiss zwischen Kurvenausbildung und Streuung der Messwerte darstellt. Die Inkubationsdauer erscheint damit auch im Fluo-4-AM-basierten Calcium-Assay als relevanter methodischer Parameter und sollte für zukünftige Experimente möglichst konsequent standardisiert werden.

Zusätzlich zeigte sich im Calcium-Assay ein deutlicher Einfluss der Inkubationszeit auf die beobachtete Aktivatorwirkung von FPL 64176. Inkubationszeiten von etwa 20 min führten zu deutlich besser ausgebildeten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen als die unmittelbare Messung bei 0 min (Abbildung 15). Während bei 0 min nur eine vergleichsweise geringe Signaländerung beobachtet wurde, zeigten sich bei längerer Inkubation stärkere Signalantworten und ein klarerer Kurvenverlauf. Gleichzeitig war bei längeren Inkubationszeiten im hohen Konzentrationsbereich eine größere Standardabweichung erkennbar, sodass auch diese Bedingungen nicht uneingeschränkt als optimal zu bewerten sind. Dies spricht dafür, dass die Inkubationszeit unter den gewählten Bedingungen sowohl die Signalstärke als auch die Auswertbarkeit der Messreihen beeinflusst.

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Inkubationszeit von etwa 20 min unter den getesteten Bedingungen am ehesten einen günstigen Kompromiss zwischen Kurvenausbildung und Streuung der Messwerte darstellt. Die Inkubationsdauer erscheint damit auch im Fluo-4-AM-basierten Calcium-Assay als relevanter methodischer Parameter und sollte für zukünftige Experimente möglichst konsequent standardisiert werden.

5.4 Zusammenfassende Bewertung der verwendeten Assays

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sowohl der thalliumbasierte hERG-Snapshot-Assay als auch der Fluo-4-AM-basierte Calcium-Assay grundsätzlich zur Detektion pharmakologischer Modulationen geeignet sind. Zwischen beiden Formaten bestehen jedoch deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Interpretierbarkeit und methodischen Robustheit.

Der Brilliant-Thallium-Gold-Snapshot-Assay erlaubt den Nachweis funktioneller Kanalmodulation, ist jedoch durch eine eingeschränkte Interpretierbarkeit der Signalrichtung limitiert. Darüber hinaus beeinflussen Baseline-Verschiebungen und Inkubationseffekte die Auswertbarkeit der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen deutlich. Die funktionelle Analyse von Kaliumkanälen mittels Fluoreszenzverfahren ist im Vergleich zu calciumabhängigen Assays methodisch erschwert, da für intrazelluläre Ca^{2+} -Signale seit langem etablierte und empfindliche Fluoreszenzindikatoren verfügbar sind, während geeignete Fluoreszenzsysteme zur direkten Erfassung von K^{+} -Flux in lebenden Zellen lange Zeit nur eingeschränkt verfügbar waren (Weaver et al., 2004).

Der Calcium-Assay zeigte demgegenüber eine klarer interpretierbare Signalcharakteristik, da Aktivierung und Inhibition direkt mit einer beziehungsweise Abnahme des Fluoreszenzsignals korrelierten. Gleichzeitig war auch hier die quantitative Auswertbarkeit durch Variabilität, unvollständige Plateaubildung und inkubationsabhängige Effekte eingeschränkt.

Insgesamt erscheinen beide Assays für die funktionelle Untersuchung pharmakologischer Modulatoren grundsätzlich geeignet, erfordern jedoch weitere Optimierungen. Für zukünftige Experimente erscheinen insbesondere eine bessere Standardisierung der Inkubationsbedingungen, die Reduktion assaybedingter Variabilität sowie eine gezieltere Wahl der Konzentrationsbereiche wichtig, um belastbare und quantitativ auswertbare Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen zu erhalten.

Literaturverzeichnis

- Abbott, G. W., Sesti, F., Splawski, I., & et al. (1999). MiRP1 Forms IKr Potassium Channels with HERG and Is Associated with Cardiac Arrhythmia. *Cell*, 97(2), 175–187. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80728-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80728-X)
- Ashcroft, F. M. (2000). Voltage-gated K⁺ channels. In F. M. Ashcroft (Hrsg.), *Ion Channels and Disease* (S. 97–133). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012065310-2/50007-2>
- Bell, D. C., & Dallas, M. L. (2018). Using automated patch clamp electrophysiology platforms in pain-related ion channel research: insights from industry and academia. *British Journal of Pharmacology*, 175(12), 2312–2321. <https://doi.org/10.1111/bph.13916>
- BMG LABTECH. (2026). *Adaptation of a potassium channel assay to enable HTS*. Verfügbar 28. März 2026 unter <https://www.bmglabtech.com/en/application-notes/adaptation-of-a-potassium-channel-assay-to-enable-easier-high-throughput-screening/>
- Breda, A., Valadares, N. F., Norberto de Souza, O., et al. (2008). Protein Structure, Modelling and Applications [Originally published 2006, updated 2007]. In A. Gruber, A. M. Durham, C. Huynh et al. (Hrsg.), *Bioinformatics in Tropical Disease Research: A Practical and Case-Study Approach*. National Center for Biotechnology Information (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6824/>
- Brown, D. A., & Passmore, G. M. (2009). Neural KCNQ (Kv7) channels. *British Journal of Pharmacology*, 156(8), 1185–1195. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00111.x>
- BSYS. (2026). *Zelllinien*. Verfügbar 10. März 2026 unter https://bsys.ch/cell-lines/?category_id=2#content_start
- Casis, O., Olesen, S.-P., & Sanguinetti, M. C. (2006). Mechanism of Action of a Novel Human ether-a-go-go-Related Gene Channel Activator. *Molecular Pharmacology*, 69(2), 658–665. <https://doi.org/10.1124/mol.105.019943>
- Catacuzzeno, L., & Franciolini, F. (2025). Celebrating 50 Years of Single-Channel Recording with the Patch Clamp. *Journal of Membrane Biology*, 258(6), 429–445. <https://doi.org/10.1007/s00232-025-00362-3>
- Catterall, W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *The Journal of Physiology*, 590(11), 2577–2589. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224204>
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), a003947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
- Chen, L., Sampson, K. J., & Kass, R. S. (2016). Cardiac Delayed Rectifier Potassium Channels in Health and Disease. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, 8(2), 307–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2016.01.004>
- Dai, G. (2023). Signaling by Ion Channels: Pathways, Dynamics and Channelopathies. *Missouri Medicine*, 120(5), 367–373.
- de Lera Ruiz, M., & Kraus, R. L. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(18), 7093–7118. <https://doi.org/10.1021/jm501981g>
- Feigenspan, A. (2017). Neurone und Ionenkanäle. In *Prinzipien der Physiologie* (S. 369–399). Springer Spektrum. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54117-3_9

- Fernández-Ballester, G., Fernández-Carvajal, A., González-Ros, J. M., & Ferrer-Montiel, A. (2011). Ionic Channels as Targets for Drug Design: A Review on Computational Methods. *Pharmaceutics*, 3(4), 932–953. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3040932>
- Fitch, R. W., Xiao, Y., Kellar, K. J., & Daly, J. W. (2003). Membrane potential fluorescence: A rapid and highly sensitive assay for nicotinic receptor channel function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4909–4914. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630641100>
- Gaulton, A., et al. (2012). ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Research*, 40, D1100–D1107.
- Geron, M., Hazan, A., & Priel, A. (2017). Controllable Ion Channel Expression through Inducible Transient Transfection. *Journal of Visualized Experiments*, (120), 55370. <https://doi.org/10.3791/55370>
- Goodman, B. E. (2008). Channels active in the excitability of nerves and skeletal muscles across the neuromuscular junction: basic function and pathophysiology. *Advances in Physiology Education*, 32(2), 127–135. <https://doi.org/10.1152/advan.00091.2007>
- Gu, Y., & Gu, C. (2014). Physiological and pathological functions of mechanosensitive ion channels. *Molecular Neurobiology*, 50(2), 339–347. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8654-4>
- Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., & Tripathy, B. C. (2016). An Introduction to Biotechnology. In *Basic and Applied Aspects of Biotechnology* (S. 1–21). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7_1
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 391(2), 85–100. <https://doi.org/10.1007/bf00656997>
- Hansen, R. S., Diness, T. G., Christ, T., Demnitz, J., Ravens, U., Olesen, S.-P., & Grunnet, M. (2006). Activation of Human Ether-a-go-go-Related Gene Potassium Channels by the Diphenylurea NS1643. *Molecular Pharmacology*, 69(1), 266–277. <https://doi.org/10.1124/mol.105.015859>
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., & Katz, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology*, 116(4), 424–448. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004716>
- Hu, Z., Liang, M. C., & Soong, T. W. (2017). Alternative Splicing of L-type CaV1.2 Calcium Channels: Implications in Cardiovascular Diseases. *Genes*, 8(12), 344. <https://doi.org/10.3390/genes8120344>
- Hughes, J., Rees, S., Kalindjian, S., & Philpott, K. (2011). Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 162(6), 1239–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>
- ION Biosciences. (2025, 1. April). *Brilliant Thallium Gold Snapshot Assay Kit Protocol*. ION Biosciences. Verfügbar 19. April 2026 unter <https://ionbiosciences.com/wp-content/uploads/Brilliant-Thallium-Gold-Snapshot-Assay-Kit-PROTOCOL.pdf>
- ION Biosciences. (2026a). *Calcium Indicators | Calcium Assays*. <https://ionbiosciences.com/ion-indicators/calcium-indicators/>
- ION Biosciences. (2026b). *Thallium Indicators | Thallium Flux Assays*. <https://ionbiosciences.com/ion-indicators/thallium-indicators/>

- ION Biosciences. (n.d.). *Brilliant Thallium Gold Snapshot Assay*. Verfügbar 19. April 2026 unter <https://ionbiosciences.com/store/brilliant-thallium-gold-snapshot-assay/>
- Islam, M. S., Gaston, J. P., & Baker, M. A. B. (2021). Fluorescence Approaches for Characterizing Ion Channels in Synthetic Bilayers. *Membranes*, 11(11), 857. <https://doi.org/10.3390/membranes11110857>
- Issa, Z. F., Miller, J. M., & Zipes, D. P. (2012). Cardiac Ion Channels. In *Clinical Arrhythmology and Electrophysiology: A Companion to Braunwald's Heart Disease* (2. Aufl., S. 10–35). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-1274-8.00002-6>
- Ji, W., Chen, Z., Zhou, J., Yue, X., Qiao, Z., & Wang, J. (2025). Advances in Serum-Free Suspension Culture Technology for Animal Cells and Their Applications. *Vaccines*, 13(11), 1109. <https://doi.org/10.3390/vaccines13111109>
- Kaczorowski, G. J., McManus, O. B., Priest, B. T., & Garcia, M. L. (2008). Ion Channels as Drug Targets: The Next GPCRs. *The Journal of General Physiology*, 131(5), 399–405. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709946>
- OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG. (2018, August). *CASY - Cell Counter & Analyser Operators Guide Version 2018-08* [Version 018-08, accessed 2026-04-14]. OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG. Bremen, Germany. https://www.labmakelaar.eu/wp-content/uploads/2021/04/roche_innovatis_casy_ttc_cell_counter_analyser.pdf
- OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG. (2026). *CASY Technology*. <https://www.ols-bio.com/casy-s-technology>
- Perry, M. D., Ng, C. A., Mann, S. A., & et al. (2015). Getting to the heart of hERG K⁺ channel gating. *The Journal of Physiology*, 593(12), 2575–2585. <https://doi.org/10.1113/JP270095>
- Priest, B. T., & McDermott, J. S. (2015). Cardiac ion channels. *Channels*, 9(6), 352–359. <https://doi.org/10.1080/19336950.2015.1076597>
- Rienecker, K. D. A., Poston, R. G., & Saha, R. N. (2020). Merits and Limitations of Studying Neuronal Depolarization-Dependent Processes Using Elevated External Potassium. *ASN Neuro*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1177/1759091420974807>
- Sanguinetti, M. C. (2014). HERG1 Channel Agonists and Cardiac Arrhythmia. *Current Opinion in Pharmacology*, 17, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.11.006>
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., & et al. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(1), 19–34. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230>
- Smith, E., Shumate, J., Scampavia, L., Spicer, T., Hernandez, D., & Peters, C. (n.d.). *Adaptation of a potassium channel assay to enable easier high throughput screening*. BMG LABTECH. Verfügbar 19. April 2026 unter <https://www.bmglabtech.com/en/application-notes/adaptation-of-a-potassium-channel-assay-to-enable-easier-high-throughput-screening>
- Smith, E., Dickson, L., Pickford, P., Rowland, A., Shumate, J., Perez, K., Scampavia, L., Hernandez, D., & Spicer, T. P. (2024). Protocol for kinetic mode potassium channel assays on common plate readers and microscopes. *SLAS Discovery*, 29(3), 100148. <https://doi.org/10.1016/j.slasd.2024.100148>
- Spinelli, K. J., & Gillespie, P. G. (2012). Monitoring Intracellular Calcium Ion Dynamics in Hair Cell Populations with Fluo-4 AM. *PLoS ONE*, 7(12), e51874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051874>

- Splawski, I., Timothy, K. W., Sharpe, L. M., & et al. (2004). CaV1.2 Calcium Channel Dysfunction Causes a Multisystem Disorder Including Arrhythmia and Autism. *Cell*, 119(1), 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.011>
- Stojilkovic, S. S., Tabak, J., & Bertram, R. (2010). Ion Channels and Signaling in the Pituitary Gland. *Endocrine Reviews*, 31(6), 845–915. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0005>
- Thermo Fisher Scientific. (o.J.). *FluxOR Potassium Ion Channel Assay*. Verfügbar 19. April 2026 unter <https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/pharma-biopharma/drug-discovery-development/target-and-lead-identification-and-validation/ion-channel-biology/cell-based-ion-channel-assays/fluorescent-fluxor-trade-.html>
- Trapani, J. G., & Korn, S. J. (2003). Control of ion channel expression for patch clamp recordings using an inducible expression system in mammalian cell lines. *BMC Neuroscience*, 4(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-4-15>
- Vandenberg, J. I., Perry, M. D., Perrin, M. J., Mann, S. A., Ke, Y., & Hill, A. P. (2012). hERG K⁺ Channels: Structure, Function, and Clinical Significance. *Physiological Reviews*, 92(3), 1393–1478. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2011>
- Voldřich, J., Matoušová, M., Šmídková, M., & Mertlíková-Kaiserová, H. (2024). Fluorescence-Based HTS Assays for Ion Channel Modulation in Drug Discovery Pipelines. *ChemMedChem*, 19(24), e202400383. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202400383>
- Wang, L., Hu, D., Xu, J., Hu, J., & Wang, Y. (2024). Complex in vitro model: A transformative model in drug development and precision medicine. *Clinical and Translational Science*, 17(2), e13695. <https://doi.org/10.1111/cts.13695>
- Warmke, J. W., & Ganetzky, B. (1994). A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8), 3438–3442. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3438>
- Weaver, C. D., Harden, D., Dworetzky, S. I., Robertson, B., & Knox, R. J. (2004). A thallium-sensitive, fluorescence-based assay for detecting and characterizing potassium channel modulators in mammalian cells. *Journal of Biomolecular Screening*, 9(8), 671–677. <https://doi.org/10.1177/1087057104268749>
- Wu, N., Nishioka, W. K., Derecki, N. C., & Maher, M. P. (2019). High-throughput-compatible assays using a genetically-encoded calcium indicator. *Scientific Reports*, 9(1), 15464. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49070-8>
- Yu, H.-B., Li, M., Wang, W.-P., & Wang, X.-L. (2016). High throughput screening technologies for ion channels. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(1), 34–43. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.108>

Danksagung

Ich danke allen, die mich bei der Erstellung dieser Bachelorarbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt der Firma acCELLerate, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat, sowie meinen Betreuerinnen und Betreuern für die fachliche Begleitung und wertvolle Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihre kontinuierliche Unterstützung. Ganz besonders danke ich meiner Mutter, die mich stets begleitet, unterstützt und in all meinen Entscheidungen bestärkt hat.

Ebenso danke ich meinen Kindern, deren bloße Anwesenheit für mich eine tägliche Motivation war.

Ich danke Gott für die Kraft und Unterstützung während dieser Zeit.

Eidestaatliche Erklärung zur selbständigen Bearbeitung

Hiermit versichere ich, Nona Forghani, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Thema

Etablierung eines Fluoreszenz-basierten 96-Well-Assays zur Messung ligandengesteuerter Ionenkanäle unter Verwendung von Assay-Ready Cells

ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der entsprechenden Quellen kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht oder einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Zusätzlich wurde das KI-gestützte Sprachmodell ChatGPT (OpenAI, Version Stand 2026, <https://chat.openai.com>) unterstützend verwendet. Der Einsatz beschränkte sich auf die sprachliche Überarbeitung, die Verbesserung von Formulierungen, die Strukturierung von Textpassagen sowie technische Unterstützung bei der Formatierung (insbesondere $\text{\LaTeX}$). Die inhaltliche Konzeption, Datenauswertung, Interpretation der Ergebnisse und wissenschaftlichen Schlussfolgerungen erfolgten eigenständig. Sämtliche Inhalte wurden kritisch geprüft und eigenverantwortlich überarbeitet.

Zur sprachlichen Überarbeitung eigenständig verfasster Textpassagen wurde folgender Prompt verwendet: „Überprüfe den folgenden Text auf Rechtschreib- und Grammatikfehler und schlage Verbesserungen zur Klarheit und Verständlichkeit vor.“

Für technische und formatierungsbezogene Unterstützung in $\text{\LaTeX}$ wurde folgender Prompt verwendet: „Überprüfe den folgenden LaTeX-Code auf Formatierungsfehler, identifiziere fehlerhafte Umsetzungen und mache Vorschläge zur Korrektur, ohne den zugrunde liegenden Inhalt zu verändern.“

Ort

Datum

Unterschrift