

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Professor Dr. H. Ehmke

Das Dipeptidyl-Aminopetidase-ähnliche Protein DPP6 als Bestandteil kardialer Kaliumkanalkomplexe

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich der Universität Hamburg vorgelegt von

Magdalini Tozakidou

aus Soest

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 23.09.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg
Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. H. Ehmke
Prüfungsausschuss: 1.Gutachter: PD Dr. R. Bähring
Prüfungsausschuss: 2.Gutachter: Prof. Dr. J. Kähler

Darin besteht das Wesen der Wissenschaft: Zuerst denkt man an etwas, das wahr sein könnte.
Dann sieht man nach, ob es der Fall ist, und im Allgemeinen ist es nicht der Fall.

Bertrand Russell (1872-1970)

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	4
1 IONENSTRÖME WÄHREND DES KARDIALEN AKTIONSPOTENTIALS	4
2 AUFBAU UND ZUSAMMENSETZUNG VON SPANNUNGSABHÄNGIGEN KALIUMKANÄLEN	5
3 INAKTIVIERUNG VON KV-KANÄLEN	9
4 UNTEREINHEITEN-ZUSAMMENSETZUNG VON KV4-KANÄLEN UND DER TRANSIENTE KALIUMAUSWÄRTSSTROM (I_{T0})	10
4.1 K^+ -Kanal interagierende Proteine (KChIPs)	11
4.2 Dipeptidyl-Aminopeptidase-ähnliche Proteine (DPPs)	12
5 ARBEITSHYPOTHESE UND ZIELE DER VORLIEGENDEN ARBEIT	14
MATERIAL UND METHODEN	15
1 VERWENDETE KLONE UND MUTANTEN	15
2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	15
2.1 Lösungen und Medien	15
2.2 Routinehaltung von HEK293-Zellen	16
2.3 Transfektion	17
3 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE METHODEN	18
3.1 Die Patch-Clamp-Technik	18
3.2 Patch-Clamp-Messstand	20
3.2.1 Mikroskop	20
3.2.2 Messkammer und Superfusionssystem	20
3.2.3 Messtisch und mechanische Komponenten	20
3.2.4 Elektroden und Patchpipetten	20
3.2.5 Datenerfassung	21

3.3	Lösungen für die elektrophysiologischen Untersuchungen	21
3.4	Ablauf eines Patch-Clamp-Experiments	23
3.4.1	Sealbildung und Ganz-Zell-Konfiguration	23
3.4.2	Kapazitätskompensation	24
3.4.3	Serienwiderstandskompensation	25
3.4.4	Leckstromkorrektur	26
3.5	Pulsprotokolle	26
3.5.1	Rechteckpulsprotokoll	27
3.5.2	<i>Recovery</i> -Protokoll	28
3.5.3	<i>Tail</i> -Protokoll	28
3.6	Datenanalyse	28
3.6.1	Zeitkonstanten der Inaktivierung und der Deaktivierung	28
3.6.2	Erholung von der Inaktivierung	29
3.6.3	Bestimmung von I_{20}/I_{max} und $t_{(10-90)}$	29
3.6.4	Statistik	30
4	CHEMIKALIEN UND GEBRAUCHSMATERIALIEN	30
 ERGEBNISSE		31
1	EFFEKT VON DPP6 AUF DAS SCHALTVERHALTEN VON WILDTYP UND HA-EPITOP-MARKIERTEN Kv4.2-KANÄLEN	31
1.1	Effekt von DPP6 auf das Kv4.2-Inaktivierungsverhalten in HEK293-Zellen	31
1.1.1	Onset der Inaktivierung	31
1.1.2	Erholung von der Inaktivierung	35
1.2	Effekt von DPP6 auf die Kv4.2-Aktivierungskinetik	37
2	MUTATIONSANALYSE DER FUNKTIONELLEN INTERAKTION ZWISCHEN Kv4.2 UND DPP6	38
2.1	Auswirkung von S2-Mutationen auf die Inaktivierung	39
2.1.1	Onset der Inaktivierung	39
2.1.2	Erholung von der Inaktivierung	39
2.2	Auswirkung von S2-Mutationen auf die Aktivierungskinetik	43
2.3	Auswirkung der HA-Epitop-Markierung auf die untersuchten Parameter	44
2.3.1	Inaktivierungskinetik	44
2.3.2	Aktivierungskinetik	47
3	EIGENSCHAFTEN DES TERNÄREN KOMPLEXES Kv4.2/DPP6/KCHIP2.1	49
3.1	Inaktivierungskinetik des ternären Komplexes	49
3.2	Aktivierungskinetik des ternären Komplexes	51
4	EFFEKT VON DPP6 AUF DIE KANALDEAKTIVIERUNG	52

DISKUSSION	54
1 EFFEKT VON AKZESSORISCHEN UNTEREINHEITEN AUF DAS SCHALTVERHALTEN VON Kv4.2-KANÄLEN	54
2 STRUKTURELLE DETERMINANTEN DER Kv4.2-DPP6-INTERAKTION	56
3 TERNÄRER KANAL-KOMPLEX UND PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG	58
ZUSAMMENFASSUNG	62
LITERATURVERZEICHNIS	63
ANHANG	74
1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	74
2 TABELLEN	76

Einleitung

1 Ionenströme während des kardialen Aktionspotentials

Die normale Pumpfunktion des Herzens beruht auf der Kopplung von räumlich und zeitlich genau abgestimmter elektrischer Erregung und Kontraktion des Herzmuskels. Entstehung und Zeitdauer der kardialen Erregung werden durch zahlreiche Ionenströme bestimmt. Diese Ionenströme wirken depolarisierend (Na^+ - bzw. Ca^{2+} -Einwärtsströme) oder repolarisierend bzw. hyperpolarisierend (K^+ - bzw. Na^+ -Auswärts- und Cl^- -Einwärtsströme).

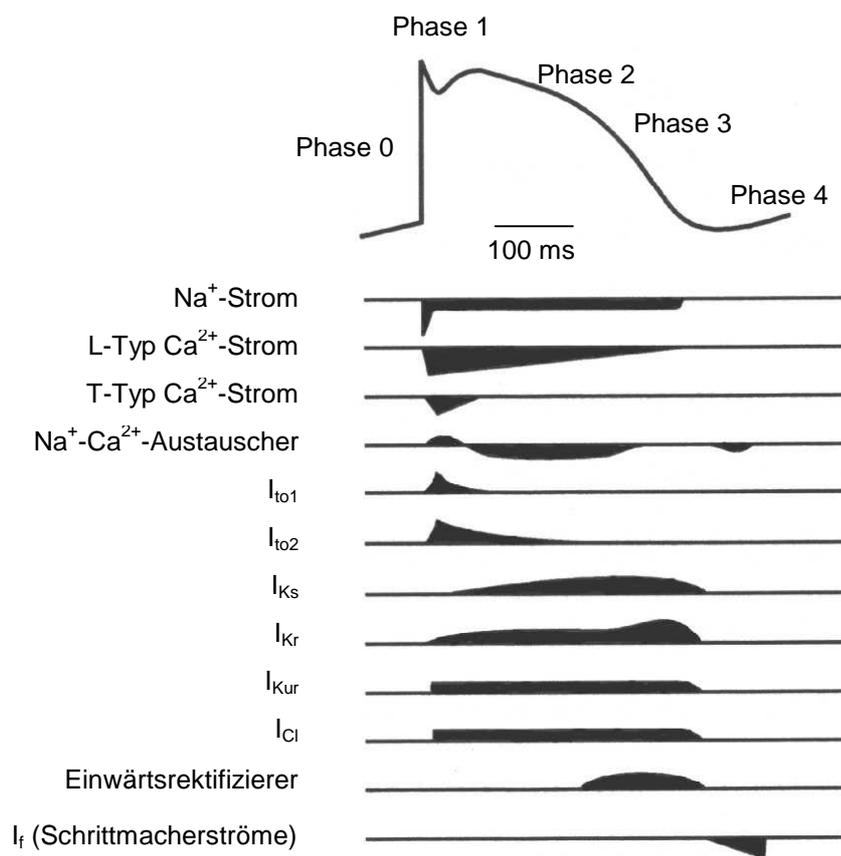


Abbildung 1. Phasen des Aktionspotentials einer humanen Arbeitsmyokardzelle

Aufstrich der schnellen Depolarisierung (Phase 0), schnelle Repolarisierung nach dem Maximum (Phase 1), Plateau (Phase 2), Repolarisierung nach dem Plateau (Phase 3) und Ruhephase (Phase 4). Die am kardialen AP beteiligten Einwärtsströme sind unterhalb, die Auswärtsströme oberhalb der Basislinie dargestellt. Erläuterungen im Text (modifiziert nach Roden und Schulze-Bahr (Roden *et al.*, 1996; Schulze-Bahr *et al.*, 2000)).

Der Zeitverlauf des Aktionspotentials kann in fünf Phasen eingeteilt werden: Als **Phase 0** wird der schnelle Aufstrich (*upstroke*) des Aktionspotentials bezeichnet. Dieser wird im Wesentlichen durch den Na^+ -Einstrom vermittelt. In der Phase der schnellen Repolarisation (**Phase 1**) kommt es zu einer Aktivierung des transienten Kaliumauswärtsstroms (I_{to}) sowie zur Inaktivierung von I_{Na} . **Phase 2** wird als Plateau-Phase bezeichnet, da die Repolarisation verzögert wird und das Membranpotential nahezu konstant bleibt. Diese Phase ist prominent im Ventrikel und wird von einem langsam inaktivierenden L-Typ Ca^{2+} -Strom getragen (Wang *et al.*, 1998). Die Dauer des Aktionspotentials wird von einem verzögerten, auswärts gerichteten Kaliumstrom I_{K} (**Phase 3**) bestimmt (Noble & Tsien, 1969). I_{K} besteht aus mindestens 3 verschiedenen Strömen, der sehr schnell (*ultra rapid*) aktivierende I_{Kur} , der schnell (*rapid*) aktivierende I_{Kr} und der langsam (*slow*) aktivierende I_{Ks} . Als **Phase 4** wird die elektrische Diastole bezeichnet (Lederer, 2005). Sie wird als Ruhephase hauptsächlich durch einwärtsrektifizierende Kaliumströme verursacht.

Für die Ionenströme während des Aktionspotentials ist eine besondere Familie von membrandurchspannenden Proteinen verantwortlich, die Ionenkanäle bilden. Diese besitzen die Fähigkeit, sehr spezifisch bestimmte Ionen durch die Membran zu leiten. Daneben gibt es elektrogene Transporter, wie z.B. der Natrium-Calcium-Austauscher (NCX), die während des Aktionspotentials Ionen über die Membran transportieren.

2 Aufbau und Zusammensetzung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen

Kaliumkanäle sind die größte und vielfältigste Gruppe der Ionenkanäle mit einer Vielzahl unterschiedlicher Eigenschaften. Sie bilden eine große Superfamilie integraler Membranproteine (Chandy & Gutman, 1993), die nach der Anzahl der Transmembranbereiche (TM) im Wesentlichen in zwei große Strukturklassen unterteilt wird: in Kanäle mit zwei TM, z.B. die Einwärtsrektifizierer (K_{IR}), und solche mit sechs TM. Letztere lassen sich weiter unterteilen in die spannungsgesteuerten K^+ -Kanäle (Kv -Kanäle), sowie verschiedene Ca^{2+} abhängige K^+ -Kanäle (IK und SK). Darüber hinaus existieren z.B. Ca^{2+} abhängige K^+ -Kanäle mit 7 TM (BK).

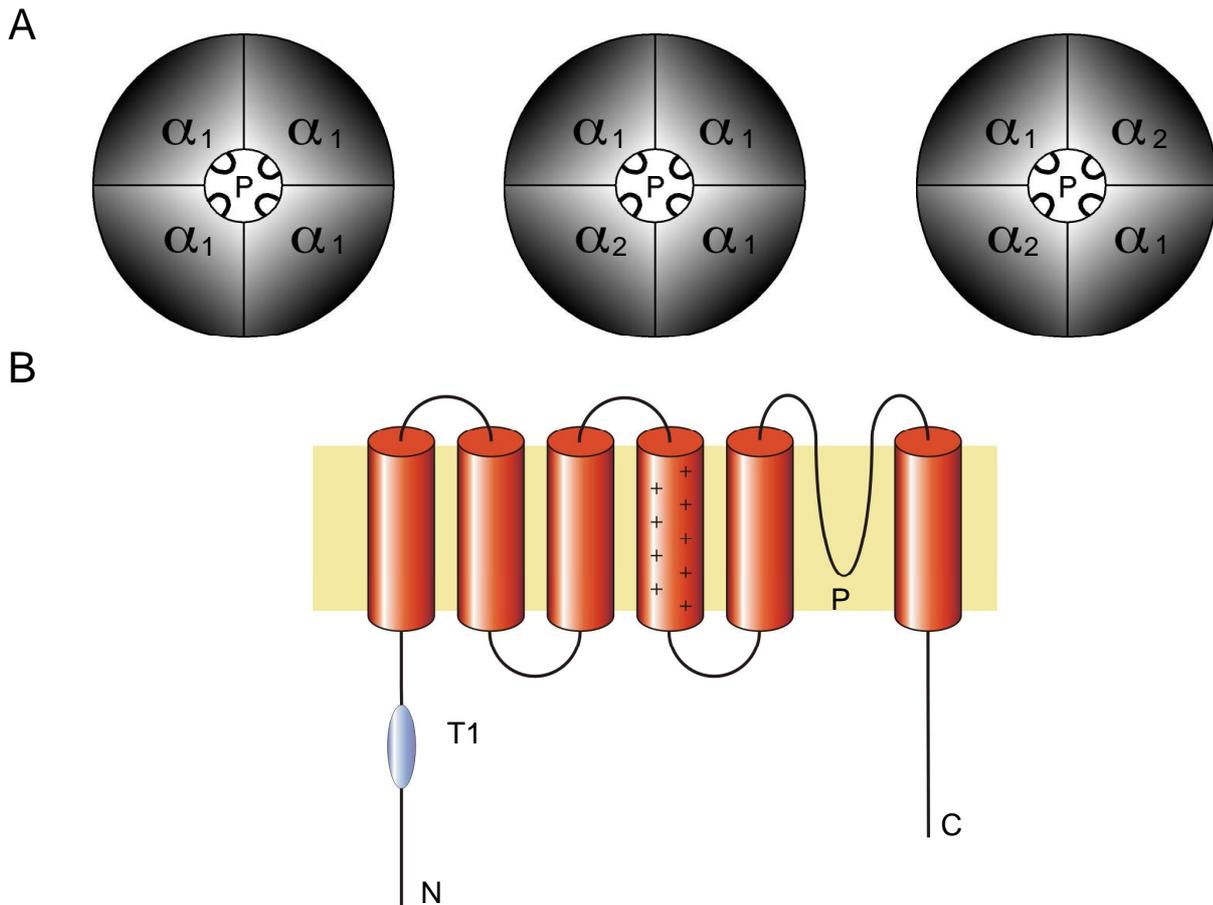


Abbildung 2. Untereinheiten-Zusammensetzung und Membrantopologie von Kv-Kanälen

A. Homomere und heteromere Tetramerisierung von α -Untereinheiten führt zur Bildung einer zentralen Pore (P). **B.** Die α -Untereinheiten der Kv-Kanäle bestehen aus sechs in der Zellmembran gelegenen α -helikalen Domänen, einer Porenregion (P), dem intrazellulär gelegenen C-Terminus (C) und dem ebenfalls intrazellulär gelegenen N-Terminus mit der T-Domäne (T1).

Der erste identifizierte K^+ -Kanal stammte vom *Shaker*-Genlocus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Papazian *et al.*, 1987; Pongs *et al.*, 1988; Pongs, 1989). Die Suche nach homologen DNA-Sequenzen in *Drosophila* und Vertebraten erbrachte den Nachweis, dass neben dem *Shaker*-Kanal (Kv1) drei weitere K^+ -Kanal-Familien existieren, die als Kv-Kanäle im engeren Sinne bezeichnet werden: Shab (Kv2), Shaw (Kv3) und Shal (Kv4) (Dolly & Parcej, 1996).

Die *Shaker*-verwandten Kv-Kanäle weisen eine gemeinsame Struktur auf. Sie setzen sich aus vier porenbildenden α -Untereinheiten zusammen. Innerhalb einer Kv-Subfamilie können sich die α -Untereinheiten zu einem homo- oder heterotetrameren Satz zusammenlagern (Isacoff *et al.*, 1990; Covarrubias *et al.*, 1991) (Abbildung 2A). Jede dieser α -Untereinheiten besteht aus sechs hydrophoben Transmembranhelices, den Segmenten 1-6 (S1-S6), sowie zytoplasmatischen N- und C-terminale Domänen (Tempel *et al.*, 1987; Rudy, 1988; Jan & Jan, 1994; Yellen, 1998; Li-Smerin *et al.*, 2000) (Abbildung 2B). Am zytoplasmatischen

Aminoterminus befindet sich die T-Domäne. Diese spielt für die spezifische Zusammenlagerung der α -Untereinheiten und die Assoziation von modulierenden β -Untereinheiten eine wichtige Rolle (Li *et al.*, 1992; Shen & Pfaffinger, 1995; Sewing *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996). Zwischen S5 und S6 ist die sogenannte P-Schleife lokalisiert. Die vier zusammengelagerten P-Schleifen der Untereinheiten bilden gemeinsam den größten Teil der Pore des Kanals (Hartmann *et al.*, 1991; Yool & Schwarz, 1991). Sie enthält den Selektivitätsfilter, eine Struktur mit einer in allen Kaliumkanälen konservierten Signatursequenz, die der selektiven Permeation von Kaliumionen dient (Heginbotham *et al.*, 1992). Das Segment 4 (S4) enthält eine hohe Anzahl an positiv geladenen Aminosäuren und bildet den wichtigsten Teil des sogenannten Spannungssensors. Dieser bewegt sich bei Änderungen der Membranspannung und steuert so das Öffnen und Schließen des Kanals (Papazian *et al.*, 1991; Durell & Guy, 1992; Larsson *et al.*, 1996).

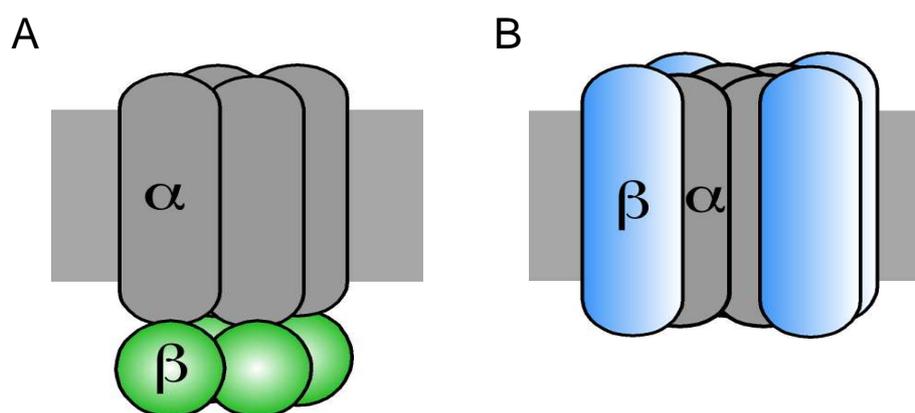


Abbildung 3. Untereinheiten-Zusammensetzung von Kv-Kanälen

Der tetramere Kanalkomplex kann zytosolische (A) oder membranständige (B) β -Untereinheiten binden.

Neben den α -Untereinheiten können auch verschiedene weitere Untereinheiten, wie zum Beispiel β -Untereinheiten, an der Bildung des Kanalkomplexes beteiligt sein. Die β -Untereinheiten können zytosolisch lokalisiert sein, wie zum Beispiel Kv β -Untereinheiten (Rettig *et al.*, 1994) oder die K⁺-Kanal interagierenden Proteine (An *et al.*, 2000). Es kann sich auch um membranständige Proteine handeln, wie z.B. DPP6 (Nadal *et al.*, 2001), KCNE1 (Sanguinetti *et al.*, 1996) oder Sigma-Rezeptoren (Aydar *et al.*, 2002). Die akzessorischen Untereinheiten können neben der Pharmakologie und der Oberflächenexpression auch das Schaltverhalten der Kanäle auf charakteristische Weise beeinflussen (Pourrier *et al.*, 2003).

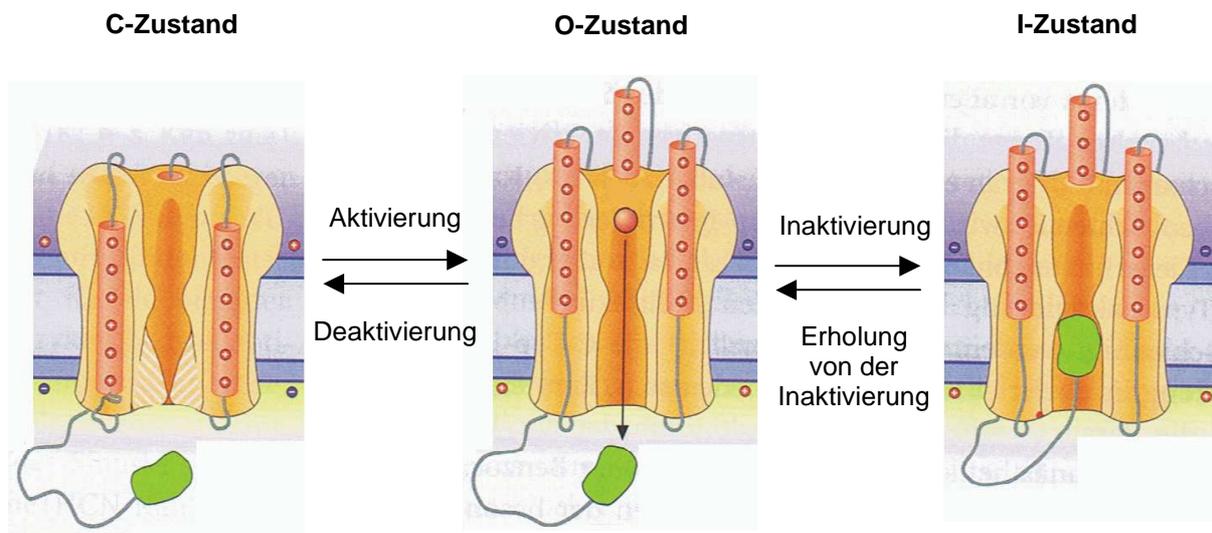


Abbildung 4. Zustandsmodell des Kanal gating

Geschlossenzustand (C-Zustand), Offenzustand (O-Zustand), blockiert durch die Inaktivierungsdomäne (I-Zustand) (Fakler & Fahlke, 2005)

Das Kanalschaltverhalten bestimmt die Funktion eines Kanalproteins. Stark vereinfacht lässt sich das Schaltverhalten spannungsgesteuerter Kanäle als sequenzielle Reaktion in einem System aus drei Zuständen beschreiben: der Geschlossenzustand (C-Zustand), der Offenzustand (O-Zustand) und der Zustand, bei dem der Kanal durch eine Inaktivierungsdomäne blockiert ist (I-Zustand). Bei negativen Membranspannungen befinden sich Kv-Kanäle in einem deaktivierten, geschlossenen Zustand. Eine Depolarisation der Membran kann eine Bewegung des Spannungssensors hervorrufen. Dieser aktivierte Zustand ist Voraussetzung für das Öffnen des Tors (geöffneter Zustand). Eine Repolarisation führt zum Schließen der Kanäle und zur Deaktivierung der Spannungssensoren. Dieses Schließen der Kanäle kann in Form von *Tail*-Strömen beobachtet werden. Viele Kv-Kanäle zeigen auch im aktivierten Zustand bei positiven Potentialen eine Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit. Dieser Prozess wird als Inaktivierung bezeichnet (Hille, 2001).

3 Inaktivierung von Kv-Kanälen

Kanäle mit einer stark ausgeprägten Inaktivierung und einer schnellen Aktivierung erzeugen transiente Ströme und können als Gruppe der A-Typ Kanäle zusammengefasst werden (Connor & Stevens, 1971b; Choi *et al.*, 1991). Die Bezeichnung A-Typ stammt von ihrer Erstbeschreibung in Neuronen der Schnecke *Anisodoris* (Connor & Stevens, 1971b, a). Im Wesentlichen können zwei Arten der Inaktivierung von Kv-Kanälen unterschieden werden: eine schnelle N-Typ und eine langsame C-Typ-Inaktivierung.

Für die beiden A-Typ Kanäle Shaker und Kv4.2 konnte der molekulare Mechanismus der schnellen Inaktivierung geklärt werden (Hoshi *et al.*, 1990; Gebauer *et al.*, 2004). Der zytoplasmatische Amino(N)-Terminus des Shaker-Kanals verschließt bei der schnellen N-Typ Inaktivierung die offene Kanalpore. Da dieses Inaktivierungspartikel als bewegliche Domäne des N-Terminus einem Ball an einer Kette gleicht, wird dieser Mechanismus auch als *Ball-and-Chain Reaction* bezeichnet (Hoshi *et al.*, 1990). Auch für die akzessorische Untereinheit Kv β 1 konnte ein N-terminales Inaktivierungspartikel nachgewiesen werden. Der nicht inaktivierende Kanal (*delayed rectifier*) Kv1.5 wird durch Koexpression mit Kv β 1 in einen schnell inaktivierenden A-Typ-Kanal umgewandelt (Rettig *et al.*, 1994). Als Rezeptor für die inaktivierende Domäne wurde eine Stelle tief innerhalb der Pore identifiziert (Zhou *et al.*, 2001).

Neben der N-Typ-Inaktivierung wurde noch ein zweiter Typ der Inaktivierung beschrieben. Sie wird C-Typ-Inaktivierung genannt und ist meist langsamer als die N-Typ-Inaktivierung. Sie wird auf Konformationsänderungen im äußeren Teil der Pore zurückgeführt (Hoshi *et al.*, 1990; Choi *et al.*, 1991; Yellen, 1998). Es gibt Hinweise darauf, dass Aminosäuren in der extrazellulären Porenregion und im Transmembransegment S6 sowie der Carboxyterminus am Mechanismus der C-Typ-Inaktivierung beteiligt sind (Lopez-Barneo *et al.*, 1993). Der Mechanismus der C-Typ-Inaktivierung besteht darin, dass der äußere Porenbereich kollabiert. Eine erhöhte extrazelluläre K⁺-Konzentration reduziert diesen Effekt (Lopez-Barneo *et al.*, 1993), was darauf hinweist, dass die Konformationsänderungen der C-Typ Inaktivierung von der Besetzung von K⁺-Bindungsstellen im extrazellulären Porenbereich abhängt (Baukrowitz & Yellen, 1995). Da nur geöffnete Kanäle der C-Typ-Inaktivierung unterliegen, wird sie durch die N-Typ Inaktivierung begünstigt, welche die Verweildauer des Kanals im offenen Zustand erhöht und zu einer Minderung der Anzahl der sich in der Pore befindenden K⁺-Ionen

führt (Baukrowitz & Yellen, 1995). Man spricht daher von einer N-C-Kopplung (Hoshi *et al.*, 1991).

Die Inaktivierung von Kv4-Kanälen weist einige Besonderheiten auf. Kv4-Kanäle werden bereits bei Membranspannungen unterhalb der Schwelle für das Auslösen von Aktionspotentialen aktiviert und inaktiviert. Während Kv1.4 Kanäle sich nur langsam, in einem Zeitbereich von mehreren Sekunden, aus der Inaktivierung erholen, zeigen Kv4-Kanäle eine sehr schnelle Erholung aus der Inaktivierung (im Milisekundenbereich). Anders als die N- und C-Typ-Inaktivierung von Shaker setzt die Inaktivierung von Kv4 kein vorheriges Öffnen des Kanals voraus (Jerng & Covarrubias, 1997). Nach einer Aktivierung können Kv4-Kanäle kurz in den offen-inaktivierten Zustand übergehen. Aus diesem Zustand können sie sich sofort wieder erholen und anschließend in einem geschlossen-inaktivierten Zustand akkumulieren (Bähring *et al.*, 2001a).

4 Untereinheiten-Zusammensetzung von Kv4-Kanälen und der transiente Kaliumauswärtsstrom (I_{to})

Alle Mitglieder der Kv4-Kanal-Gruppe sind A-Typ-Kanäle. Bisher sind vier Mitglieder dieser Shaker-verwandten Unterfamilie bekannt: Kv4.1, Kv4.2 und zwei Splicevarianten von Kv4.3 (Kv4.3S und Kv4.3L).

Porenbildende α -Untereinheiten von Kv4-Kanälen bilden den Hauptbestandteil des somatodendritischen A-Typ-Stroms (I_{SA}) in Neuronen und des transienten Kaliumauswärtsstroms am Herzen (I_{to}), der zuständig ist für die schnelle Phase der Repolarisation während der Aktionspotentials (Abbildung 1). Während am menschlichen Myokard Kv4.3 die am häufigsten vorkommende Isoform darstellt (Dixon *et al.*, 1996), spielt Kv4.2 am Herzen der Maus eine wichtige Rolle (Guo *et al.*, 1999). Durch Expression dieser Kanäle in *Xenopus laevis* Oozyten werden Ströme evoziert, die in ihren biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften denen nativer Ströme ähneln (Dixon *et al.*, 1996).

Allerdings reichen heterolog exprimierte Kv4-Kanäle allein nicht aus, um die Eigenschaften nativer Ströme zu imitieren (Rudy, 1988). Durch Koinjektion niedermolekularer mRNA-Fractionen aus dem Rattengehirn in Oozyten ist es möglich, das Inaktivierungsverhalten der in Oozyten exprimierten Kv4.1 Kanäle zu modifizieren (Chabala *et al.*, 1993). Diese

Beobachtung führte zu der Annahme, dass diese mRNA-Fractionen für Untereinheiten oder Enzyme kodieren, die für die Modulation der Kv4-Kanäle von Bedeutung sind. Mittlerweile konnten verschiedene akzessorische Untereinheiten in nativem Gewebe identifiziert werden .

Auf zwei strukturell verschiedene Arten von Kv-Kanalmodulatoren, die Kalium-Kanal interagierenden Proteine (*Kv Channel Interacting Proteins*, KChIPs) und die Dipeptidyl-Peptidase-verwandten Proteine (DPPs: DPP6 und DPP10), die die Oberflächenexpression und die funktionellen Eigenschaften der Kanäle verändern (Jerng *et al.*, 2005), soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

4.1 K⁺-Kanal interagierende Proteine (KChIPs)

Die erste Publikation einer Modulation von Kv4-Strömen durch KChIP beschreibt die drei KChIP-Subtypen (KChIP1 bis 3), die jeweils einem eigenen Gen zugeordnet sind (An *et al.*, 2000). Später wurde mit KChIP4 ein weiterer KChIP-Subtyp entdeckt (Holmqvist *et al.*, 2002). KChIPs gehören zur Familie der neuronalen Ca²⁺-Sensoren (NCS), bei der es sich um Ca²⁺-bindende Proteine handelt. Sie besitzen eine konservierte Kernregion mit vier EF-Hand-Motiven, die auf Ca²⁺-Bindestellen hinweisen, und einen variablen N-Terminus. Das N-terminale Ende der KChIPs scheint keine wesentliche Rolle für die Bindung zu spielen. Mutationen der EF-Hand Region des C-Terminus hingegen führen zum Verlust des KChIP-Effektes (An *et al.*, 2000).

Der N-Terminus des Kv4.2-Kanals scheint für die Interaktion mit KChIP2.2 notwendig zu sein, denn die Ströme einer N-terminalen Deletionsmutante von Kv4.2 (Kv4.2 Δ 2-40) werden nicht durch KChIP moduliert (Bähring *et al.*, 2001b).

KChIPs 1–3 haben ähnliche Effekte auf die physiologischen Eigenschaften von Kv4-Kanälen. Sie wurden überwiegend mit Kv4.2 untersucht. Die Effekte beinhalten die Erhöhung der Stromdichte, eine Verschiebung der Aktivierungskurve in Richtung Hyperpolarisation, eine Beschleunigung der Erholung aus der Inaktivierung sowie eine Verlangsamung der Inaktivierung (An *et al.*, 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass KChIP2 ein integraler Bestandteil von I_{to}-Kanalkomplexen ventrikulärer Kardiomyozyten ist (Deschenes *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2002). Dichte und

Frequenzabhängigkeit des transienten Kaliumauswärtsstrom unterliegen regionalen Schwankungen (Wettwer *et al.*, 1994; Nabauer *et al.*, 1996). Untersuchungen an Herzmuskelzellen von Hunden ergaben, dass die Dichte von I_{to} epikardial höher ist als endokardial. Dieser Gradient korreliert mit der Expression von KChIP2 im Herzen, welches epikardial stärker exprimiert wird als endokardial (Rosati *et al.*, 2001).

4.2 Dipeptidyl-Aminopeptidase-ähnliche Proteine (DPPs)

Obwohl KChIPs in heterologen Expressionssystemen einen Großteil der Eigenschaften nativer A-Typ Ströme zeigen, verzögern sie die Inaktivierungskinetik im Vergleich zum nativen Strom (Beck *et al.*, 2002). Auch Transfektion zerebellärer Granulazellen mit Kv4.2 cDNA führt zu einer verlangsamten Inaktivierung der gemessenen Ströme (Shibata *et al.*, 2000). Daher wurde vermutet, dass es einen Faktor gibt, der die A-Typ-Stromkinetik beschleunigt. In der Arbeitsgruppe von Bernado Rudy konnte in Oozyten gezeigt werden, dass Koexpression von Kv4.2 mit der 4-7 kb-Fraktion cerebellärer mRNA die Inaktivierungskinetik beschleunigt. Diese Beschleunigung wurde nicht durch KChIP Antisense Oligonukleotide aufgehoben (Nadal *et al.*, 2001). Zunächst wurde dieses Protein als „ K^+ -Channel accelerating factor“ (KAF) bezeichnet. Später konnte DPP6, ein Protein, das z. B. als Oberflächenprotein im Gehirn exprimiert wird, als molekulares Korrelat von KAF identifiziert werden (Nadal *et al.*, 2003).

DPP6 besitzt Ähnlichkeit mit der Dipeptidyl-Aminopeptidase IV (CD26). Dipeptidyl-Aminopeptidasen spielen eine Rolle beim Abbau von Zytokinen und Hormonen. Trotz seiner Verwandtschaft mit der Dipeptidyl-Aminopeptidase CD-26 besitzt das DPP6 keine enzymatische Aktivität, selbst wenn man die Aminosäuresequenz im aktiven Zentrum entsprechend derjenigen funktioneller Dipeptidyl-Aminopeptidasen mutiert (Kin *et al.*, 2001).

DPP6 besteht aus einer kurzen N-terminalen zytoplasmatischen Domäne, einem Transmembran-Segment (1 TM) und einer großen extrazellulären Domäne. Bisher sind mindestens zwei verschiedene Splicevarianten bekannt: eine kurze Variante, DPP6-S (short) und eine lange Variante, DPP6-L (long). Sie unterscheiden sich im Wesentlichen in der Zusammensetzung ihrer N-terminalen Domänen (Wada *et al.*, 1992; Hough *et al.*, 1998).

DPP6 wird als Oberflächenprotein im Gehirn exprimiert (Kin *et al.*, 2001). Darüber hinaus findet es sich in Nieren, Ovarien und Testes (Wada *et al.*, 1992). Vor kurzem konnte auch aus dem menschlichen Herzen DPP6 mRNA isoliert werden (Radicke *et al.*, 2005).

Neben der bereits erwähnten Beschleunigung der Inaktivierung führt Koexpression von DPP6 mit Kv4.2 zu einer Beschleunigung der Erholung aus der Inaktivierung, einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung in Richtung negativer Potentiale und zu einer Zunahme der Kv4.2-Oberflächenexpression (Nadal *et al.*, 2003). Die Veränderung der Lokalisation des Kv4.2 Kanals sowie die Fähigkeit, native A-Typ Ströme zu imitieren, lassen vermuten, dass DPPX ein integraler Bestandteil von Kv4 Kanälen ist (Birnbaum *et al.*, 2004).

Das ebenfalls zu den Dipeptidyl-Aminopeptidase-ähnlichen Proteinen gehörende DPP10 hat eine hohe Aminosäureidentität (48-51 %) und ein ähnliches Molekulargewicht (91kDa) wie DPP6. Auch besitzt es wie DPP6 keine Enzymaktivität (Jerng *et al.*, 2004b). DPP10 konnte sowohl im Gehirn, Pankreas und Rückenmark als auch im geringen Maße in Plazenta, Leber und Trachea aber nicht im Herzen nachgewiesen werden (Allen *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2003). Koexpression von DPP10 mit Kv4.2 zeigt, dass DPP10 ähnliche Effekte hat wie DPP6 (Jerng *et al.*, 2004b). Auch Koexpressionsexperimente mit Kv4.3 weisen darauf hin, dass die Effekte von DPP10 denen von DPP6 ähneln (Ren *et al.*, 2005). Ren et al konnten im Bereich des S2-Segmentes von Kv4.3 Strukturdeterminanten für die Bindung von DPP10 identifizieren. Die Bindung von DPP6 an Kv4-Kanäle wurde bisher nicht untersucht.

5 Arbeitshypothese und Ziele der vorliegenden Arbeit

Kardialer I_{to} lässt sich durch Koexpression von Kv4 und KChIP nicht vollständig reproduzieren und wird vermutlich zusätzlich durch weitere Untereinheiten, wie z.B. DPPs, gebildet. Um zur Klärung der molekularen Zusammensetzung des kardialen I_{to} beizutragen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Interaktion von Kv4-Kanälen mit DPP6 genauer untersucht. Dabei wurden folgende Ziele verfolgt:

- Charakterisierung des Effekts von DPP6 auf das Kanalschaltverhalten von Kv4.2
- Identifizierung von Kv4.2-Strukturdeterminanten für die Bindung von DPP6
- Charakterisierung des ternären Komplexes Kv4.2/KChip2/DPP6

Dazu wurden Kv4.2-Wildtypkanäle und geeignete Mutanten durch transiente Transfektion in HEK293-Zellen exprimiert und mit der Patch-Clamp-Technik elektrophysiologisch untersucht.

Material und Methoden

1 Verwendete Klone und Mutanten

Für die heterologe Expression wurden hDPP6-S, hKChIP2.1 (AF199598), EGFP und hKv4.2 (AH009258) im pcDNA3-Expressionsvektor (Invitrogen) verwendet. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mutanten wurden von Dr. Sven Hartmann kloniert (Hartmann, 2007). Zwei Punktmutanten (Kv4.2A235V und Kv4.2I239W) sowie eine N-terminale Deletionsmutante (Zhu *et al.*, 1999) wurden für die Untersuchungen eingesetzt. In den humanen Klon der Kv4.2- α -Untereinheiten war ein Hämagglutinin (HA)-Epitop (Aminosäuresequenz-YPYDVPDYA) zwischen S1 und S2 (zwischen Aminosäure 216 und 217) eingefügt (Kv4.2wt-HA). Ein HA-Epitop in der selben Position hatten die Punktmutanten Kv4.2A235V-HA und Kv4.2I239W-HA.

2 Zellbiologische Methoden

2.1 Lösungen und Medien

Kulturmedium 500ml Dulbecco's MEM (Minimal Essential Medium)/ NUT Mix F12 (Invitrogen, Karlsruhe) wurde eine Mischung aus 50 ml hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (Seromed Biochrom) und 5 ml einer Penicillin/ Streptomycin/ Glutamin-Lösung (Invitrogen) zugesetzt.

PBS Dulbeccos Phosphatgepufferte Salzlösung (Invitrogen)

Trypsin-Lösung Trypsin-EDTA (1x) in HBSS (Invitrogen)

Transfektionsmedium Optimem (Invitrogen)

Transfektionsreagenz LipofectAMINETM (Invitrogen)

2.2 Routinehaltung von HEK293-Zellen

Im Umgang mit HEK293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen (DSMZ Nr.: ACC305, *human embryonic kidney*, Braunschweig) fanden alle Tätigkeiten mit sterilem Material und in partikelfreier Umgebung (Sterilwerkbank) statt. Als Kulturgefäße wurden Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) mit 25 cm² Fläche sowie Zellkulturplatten (Nunc, Wiesbaden) verwendet. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, 95% relative Luftfeuchtigkeit) in Zellkulturflaschen in einem Brutschrank (Heraeus) kultiviert. Medien und Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt.

Die Passagierung der Zellen erfolgte routinemäßig nach Erreichen einer Konfluenz des Zellrasens von 80-100 %. Dazu wurde das Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt. Nach dem Waschen mit 5 ml PBS wurden 1,5 ml Trypsin-EDTA Lösung zum Ablösen der Zellen zugesetzt. Die anschließende Inkubation für 1–2 Minuten erfolgte bei 37°C im Zellkulturschrank. Die gelösten Zellen wurden unter dem Mikroskop kontrolliert und die enzymatische Reaktion durch Zugabe 5 ml frischen Mediums abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und zentrifugiert (Heraeus, 2 min, 1200 Upm). Das Sediment wurde in frischem Medium (10 ml) resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Für die fortlaufende Kultur wurden die Zellen mit einer Dichte von 2-6 x 10⁴/ml ausplattiert. Diese hatten nach 2-3 Tagen im Brutschrank eine ausreichende Dichte erreicht, so dass sie erneut passagiert werden konnten.

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden 35 mm-Kulturschalen mit 8,8 cm² Kulturfläche (Nunc-Standard-Dishes, Nunc) verwendet. Diese wurden mit Poly-L-Lysin beschichtet, um die Haftung der Zellen am Boden zu erhöhen und somit die elektrophysiologischen Untersuchungen zu erleichtern (Jacobson & Branton, 1977). Für die Beschichtung wurde Poly-L-Lysin Hydrobromid (Sigma) in H₂O gelöst (0,1 mg/ml) und 1 ml der Lösung für ca. 30 min in den Zellkulturschalen belassen. Nach dem Absaugen der Lösung und einer mehrstündigen Trocknungszeit waren die Schalen gebrauchsfertig. Die Kulturschalen wurden mit je 2 ml Medium mit einer Zellkonzentration von 1-4 x 10⁴ Zellen pro ml befüllt.

2.3 Transfektion

Unter Transfektion von Zellen versteht man die Einschleusung und Expression fremden genetischen Materials, entweder vorübergehend (transiente Transfektion) oder dauerhaft (stabile Transfektion). In dieser Arbeit wurde ein chemisches Verfahren verwendet. Das Prinzip der chemischen Transfektionsverfahren basiert auf einer Komplexbildung von positiv geladenen Chemikalien mit den negativ geladenen Nukleinsäuren.

Als Transfektionsreagenz kam LipofectAMINETM (Invitrogen life Technologies, Karlsruhe) zum Einsatz. Die Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte 24 h nach dem Ausplattieren. Dazu wurden die Zellen mit 2 ml Optimem gewaschen und anschließend mit 800 µl Optimem für 30 Minuten inkubiert. Für den Transfektionsansatz wurde Plasmid-DNA vorsichtig mit 100 µl Optimem gemischt und mit einer weiteren frisch angesetzten Mischung aus 2 µl LipofectAMINETM und 100 µl Optimem versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu den vorbehandelten HEK293-Zellen gegeben. Nach einer Transfektionszeit von 5 h unter Standardbedingungen wurde der Transfektionsansatz gegen 2 ml Kulturmedium ausgetauscht. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion für die elektrophysiologischen Experimente verwendet.

Für die alleinige Expression von Kv α -Untereinheiten wurden in der Regel 1,5 µg DNA pro Schälchen eingesetzt. Für die Koexpression von Kv α mit DPP6-S wurden 0,05 µg Kv α -cDNA und 0,25 µg bzw. 2,0 µg DPP6-S-cDNA eingesetzt. Für die Koexpression von Kv α mit DPP6-S und KChIP2.1 wurden 0,05 µg Kv α -cDNA, 1,0 µg DPP6-S-cDNA und 1,0 µg KChIP2.1-cDNA eingesetzt. Bei jeder Transfektion wurden pro Schälchen 0,5 µg EGFP beigegeben. Das „*Green Fluorescent Protein*“ diente als Reporter der erfolgten Plasmidaufnahme der Zellen. Es erstrahlt bei Anregung im UV-Bereich grünlich und ist leicht zu identifizieren. (Chalfie *et al.*, 1994). In dieser Arbeit wurde das „*Enhanced*“ GFP verwendet. Durch eine Punktmutation ist bei dieser Variante die Fluoreszenzintensität erhöht. Die Punktmutation verhindert darüber hinaus ein Ausbleichen. Außerdem ist durch Optimierung der Plasmidstruktur die Expression dieses Proteins gegenüber der Normalvariante erheblich erhöht (Zhang *et al.*, 1996).

3 Elektrophysiologische Methoden

3.1 Die Patch-Clamp-Technik

Die *Patch-Clamp*-Technik ist eine Methode, mit der sich ein Strom durch die einzelnen Ionenkanäle in der Membran lebender Zellen messen lässt (Neher & Sakmann, 1976; Hamill *et al.*, 1981). Diese Technik ist ein spezielles *Voltage-Clamp*-Verfahren (Spannungsklemme). Das Prinzip beruht darauf, Änderungen des Membranpotentials der zu untersuchenden Zelle durch Injektion eines entgegengerichteten Kompensationsstroms zu verhindern. Dies wird bei der *Patch-Clamp*-Technik durch einen besonderen Schaltkreis ermöglicht (Abbildung 5): Der Vorverstärker, der im wesentlichen einen aus Operationsverstärker, OPA, und Rückkopplungswiderstand (R_f) aufgebauten Strom-Spannungs-Wandler darstellt, erzeugt über einen Rückkopplungsmechanismus einen Kompensationsstrom, welcher genauso groß ist wie der Strom, der durch die Membran fließt, diesem jedoch entgegengerichtet ist (I_p). Am Eingang des OPAs wird die Sollspannung (V_{soll}) angelegt. Der OPA schickt dann so viel Strom durch seinen Rückkopplungswiderstand (R_f), dass die am anderen Pol des OPAs anliegende Spannung die gleiche ist wie die Sollspannung. Die Sollspannung ist daher die Kommandospannung der Spannungsklemme für den Membranpatch unter der Pipettenspitze. Auf Grund seines hohen Eingangswiderstandes fließt dabei durch den OPA praktisch kein Strom. Der Strom durch den Rückkopplungswiderstand ist also genauso groß wie der von der Patchpipette aufgenommene Strom (I_p), aber mit entgegengesetztem Vorzeichen. Dieser Kompensationsstrom wird in *Voltage-Clamp*-Experimenten gemessen. Er lässt unmittelbar Schlüsse auf die Leitfähigkeit der Zellmembran zu, die u.a. von den in ihr enthaltenen Ionenkanälen bestimmt wird (Aidley 1996; Numberger 1996).

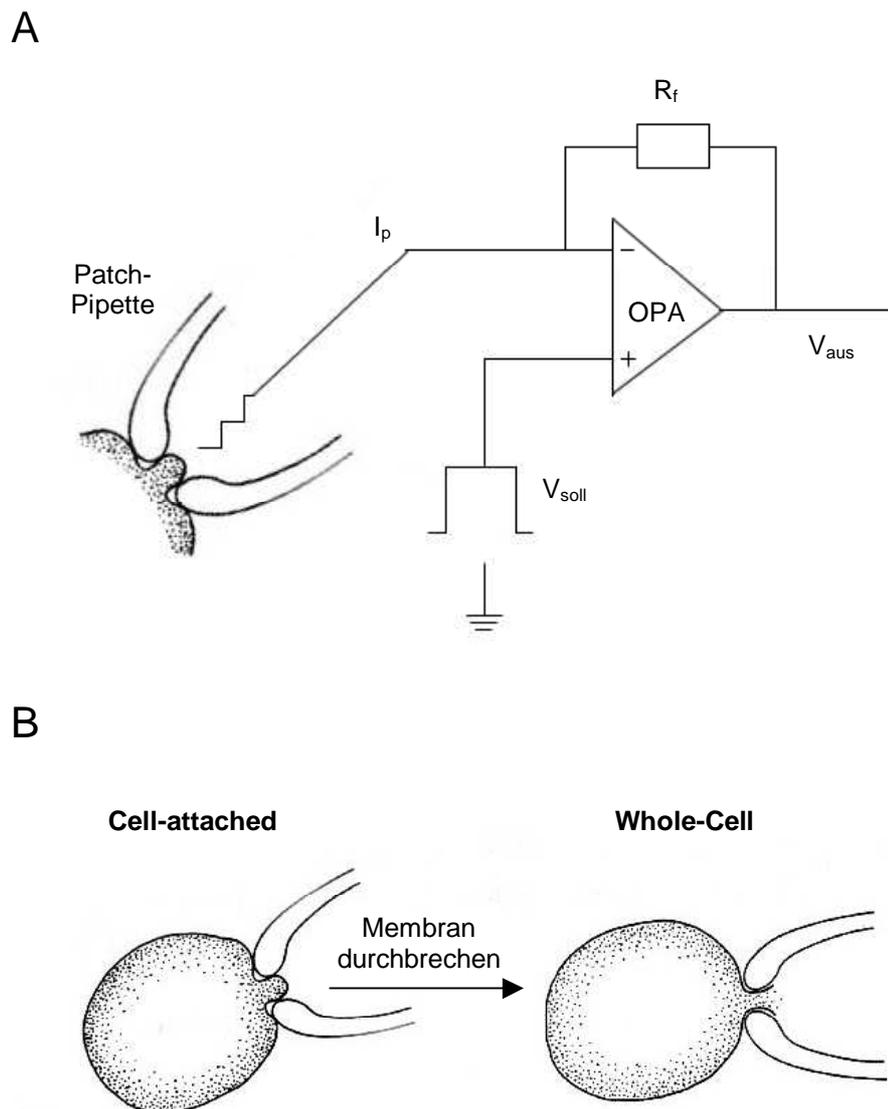


Abbildung 5. Die Patch-Clamp-Technik

A. Schematische Darstellung eines Patch-Clamp-Stromkreises (verändert nach Aidley 1996): Dargestellt ist ein Teil der Zelle (unten links im Bild), der Operationsverstärker (OPA), der Rückkopplungswiderstand (R_f), der aufgenommene Strom (I_p), die Sollspannung (V_{soll}) und die gemessene Spannung (V_{aus}). **B.** Messkonfiguration bei der Whole-Cell Patch-Clamp-Technik: Dargestellt sind die Zellmembran und die aufgesetzte Patchpipette. Nach dem Aufsetzen der Patchpitte wird durch Anlegen eines Unterdrucks das Membranstück unter der Pipettenöffnung zerrissen.

3.2 Patch-Clamp-Messstand

3.2.1 Mikroskop

Der Messstand war mit einem inversen Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Oberkochen) mit bis zu 400-facher Vergrößerung und Kontrastverstärkungsoptik ausgestattet. Für die Identifizierung transfizierter Zellen wurde eine HBO-UV-Lampe (Zeiss, Oberkochen) verwendet.

3.2.2 Messkammer und Superfusionssystem

Die Petrischalen, in denen die Zellen plattiert und transfiziert wurden, dienten zugleich als Messkammer. Sie wurden mit Hilfe einer 100 ml Spritze (Braun) superfundiert. An der dem Zulauf gegenüberliegenden Seite der Messkammer wurde in definierter Höhe eine Absaugung positioniert, so dass der Flüssigkeitsspiegel in der Kammer konstant war. Der Abfluss erfolgte über ein druckluftgetriebenes Saugsystem. Alle Schlauchsysteme bestanden aus inertem Teflon.

3.2.3 Messtisch und mechanische Komponenten

Um die empfindlichen *Patch-Clamp*-Messungen vor mechanischen Schwingungen zu schützen, wurde das Mikroskop auf einem schwingungsgedämpften Tisch (T-250, Physik Instrumente, Waldbronn) gelagert. Durch Abschirmung des Messstandes in einem geerdeten faradayschen Metallkäfig, wurde elektrisches Hintergrundrauschen gering gehalten. Die Patchpipette wurde über einen Pipettenhalter am Vorverstärker montiert. Über einen Teflonschlauch, der mit dem Pipettenhalter verbunden war, konnte ein Über- bzw. Unterdruck angelegt werden. Die Steuerung der Pipette erfolgte mit einem motorisierten Mikromanipulator (Eppendorf, Hamburg).

3.2.4 Elektroden und Patchpipetten

Sowohl die Referenzelektrode, die in die Badlösung eintauchte, als auch die Messelektrode, die als elektrische Verbindung zwischen Pipette und Vorverstärker diente, waren

Silber/Silberchloridelektroden. Die Messelektrode wurde täglich in einer hypochloridhaltigen Bleichlauge (Chlorix) chloriert. Für die Patchpipetten wurde Borosilikatglas (Wandstärke 0,15 mm, World Precision Instruments, Florida, USA) verwendet. Sie wurden mit einem Horizontalpuller (Flaming/Brown Micropipette–Puller, Science Products GmbH, Hofheim) fein ausgezogen. Der Widerstand der Pipetten betrug 2-3 M Ω . Die Lösung zum Füllen der Pipette wurde mit einem Sterilfilter mit dem Porendurchmesser von 0,2 μ m filtriert.

3.2.5 Datenerfassung

Die gemessenen Daten wurden von dem OPA an einen Hauptverstärker (EPC-9, HEKA, Lambrecht) weitergegeben. Für die Steuerung des Verstärkers und die Digitalisierung der gemessenen Signale wurde eine ITC16-AD/DA-Schnittstelle an einem Computer (Apple Macintosh G3) eingesetzt. Das analoge Messsignal wurde mit einer Auflösung von 16 bit und einer Aufnahme­frequenz zwischen 0,2 und 20 kHz digitalisiert. Als Software zur Datenerfassung und zur Kontrolle des Verstärkers diente das Programm PULSE (HEKA Elektronik, Lambrecht).

3.3 Lösungen für die elektrophysiologischen Untersuchungen

Für die Untersuchung der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken befanden sich die Zellen unter ständigem Durchfluss einer Extrazellulär-Lösung, die folgende Bestandteile enthielt:

NaCl	135 mM
KCl	5 mM
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	2 mM
Hepes	5 mM
Saccharose	10 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt und konnte durch die Zugabe von 0,01 mg/ml Phenolrot überwacht werden.

Die Pipetten wurden mit Intrazellulär-Lösung gefüllt, die folgende Bestandteile enthielt:

KCl	125 mM
CaCl ₂	1 mM
MgCl ₂	1 mM
EGTA	11 mM
Hepes	10 mM
Glutathion	2 mM
K ₂ -ATP	2 mM

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,2 eingestellt.

Für die Untersuchung der Deaktivierungskinetik wurden Lösungen eingesetzt, bei denen Rb⁺ als Ladungsträger diente. Die Extrazellulär-Lösung enthielt:

RbCl	135 mM
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	2 mM
Hepes	5 mM
Saccharose	20 mM
Phenolrot	0,01 mg/ml

Der pH-Wert wurde mit RbOH auf 7,4 eingestellt.

Die Intrazellulär-Lösung enthielt:

RbCl	125 mM
CaCl ₂	1 mM
MgCl ₂	1 mM
EGTA	11 mM
Hepes	10 mM
Glutathion	2 mM
Na ₂ ATP	2 mM

Der pH-Wert wurde mit RbOH auf 7,3 eingestellt.

3.4 Ablauf eines Patch-Clamp-Experiments

3.4.1 Sealbildung und Ganz-Zell-Konfiguration

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Vor der Messung wurde das Kulturmedium der zu messenden HEK293-Zellen durch Extrazellulär-Lösung ausgetauscht und die Petrischale auf der Mikroskophalterung befestigt. Anschließend wurde eine am Versuchstag frisch gezogene Pipette luftblasenfrei mit Intrazellulär-Lösung gefüllt und in den Pipettenhalter eingespannt. Ein Überdruck im Pipetteninneren sollte das Verstopfen der Pipette beim Eintauchen in die Badlösung und die Diffusion von Badlösung in die Pipette verhindern. Die Pipette wurde unter optischer Kontrolle mit Hilfe des Mikromanipulators nahe an die Zelloberfläche der zu messenden Zelle geführt und die Pipettenöffnung vorsichtig auf die Zelle aufgesetzt. Wahlweise wurde der Audiomonitor benutzt, der Änderungen der Testpulsamplitude und somit des Widerstandes in Tonsignale umwandelt. Der angelegte Überdruck wurde abgelassen und durch vorsichtiges Saugen wurde eine Abdichtung von Pipette und Zellmembran gegenüber der Badlösung erreicht (*Giga-Seal*). Durch den *Giga-Seal* haftet die Zellmembran so fest an der Glaswand der Pipette, dass verschiedene Manipulationen mit dem Membranfleck möglich sind, ohne dass die Verbindung zwischen Glaswand und Membran abreißt. Das beschriebene Aufsetzen der Pipette auf eine intakte Zelle mit Bildung eines *Giga-Seals* bezeichnet man als *Cell-attached*-Konfiguration (Abbildung 5). In diesem Zustand, in dem sich die Leitfähigkeit des Membranflecks unter der Pipettenöffnung messen lässt, wurde das Membranpotential auf -40 mV geklemmt. Die schnelle Kapazitätskomponente, die im Wesentlichen durch Umladungsvorgänge der Glaspipette entsteht, wurde korrigiert (siehe Abschnitt 3.4.2).

Durch weiteren Unterdruck wurde das Membranstück unter der Pipettenöffnung zerrissen und damit ein physikalischer Zugang zum Intrazellulärraum sowie ein elektrischer Zugang zur gesamten Zellmembran erreicht (*Whole-Cell*- bzw. *Ganz-Zell*-Konfiguration). Die Öffnung der Membran konnte durch eine neu auftretende, größere langsam abfallende Kapazitätskomponente, die durch das Umladen der Zellmembran entstand, erkannt werden. Die kapazitiven Stromsignale und der Serienwiderstand wurden vor den Messungen kompensiert (siehe Abschnitt 3.4.3.). Da die spezifische Kapazität biologischer Membranen mit $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für alle Zellen ungefähr gleich ist, ist der Wert der langsamen Kapazität ein direktes Maß für die Größe der Zelle.

Durch Anlegen einer bestimmten Spannung (*Voltage-Clamp*) wurde der entsprechende Strom über der Membran gemessen. Bei der Ganz-Zell-Ableitung kommt es sehr schnell zu einem Austausch zwischen Pipettenlösung und Zellinnerem. Daher ist es möglich, durch die Wahl der Elektrolytlösung in der Pipette das zytoplasmatische Milieu zu kontrollieren.

3.4.2 Kapazitätskompensation

Die Pipette und die Zellmembran wirken als Isolatoren und trennen die Intra- von der Extrazellulär-Lösung, welches beide leitende Medien sind. Bei Änderungen der Potentialdifferenz zwischen den Medien, werden die Pipette und die Zellmembran als Kondensatoren umgeladen. Der Verlauf dieser Umladung besteht aus einer schnellen und einer langsamen Komponente. Die langsame Zeitkonstante ist dabei abhängig vom Widerstand zwischen Zellmembran und dem Verstärker (R_s), dem Membranwiderstand (R_m) und der Kapazität der Zellmembran (C_m) (Abbildung 6):

$$\tau = R \cdot C .$$

Kapazität ist definiert als die Ladung, die pro Spannungsänderung benötigt wird. Ein idealer Ohmscher Widerstand besitzt keine kapazitive Komponente. An realen Widerständen (R) geht jedoch bei jeder Spannungsänderung etwas Zeit für die kapazitive Umladung von R verloren. Ein Strom–Spannungs–Wandler kann daher auf ein schnelles, fast senkrecht ansteigenden Spannungssignal an einem Eingang nur mit einer exponentiell ansteigenden Kurve antworten. Um auch solche schnellen Signale aufzulösen, sind in den Vorverstärker noch zusätzliche Korrekturschaltkreise eingebaut. Neben der Kapazität des Vorverstärkers spielen auch die kapazitiven Eigenschaften der Patchpipette und der Zellmembran eine Rolle. Bei einer Änderung der Kommandospannung werden zunächst die Kapazitäten von Pipette und Zellmembran umgeladen.

Als Antwort auf den Testpuls zeigen sich schnell ansteigende und exponentiell abfallende, transiente Ströme. Die kurzzeitigen Ströme können die eigentlichen Messsignale stören und werden daher kompensiert. Dabei wird der zur Umladung benötigte Strom nicht mehr durch den Vorverstärker, sondern über einen parallelen Schaltkreis injiziert. Der EPC9–Verstärker besitzt zwei automatische Korrekturmechanismen. Einen mit schneller Zeitkonstante (0,5-8 μ s) zur Korrektur der kapazitiven Ströme der Pipette und einen zweiten mit einer langsamen Zeitkonstante (>5 μ s) zur Korrektur der Umladeströme der Zellmembran.

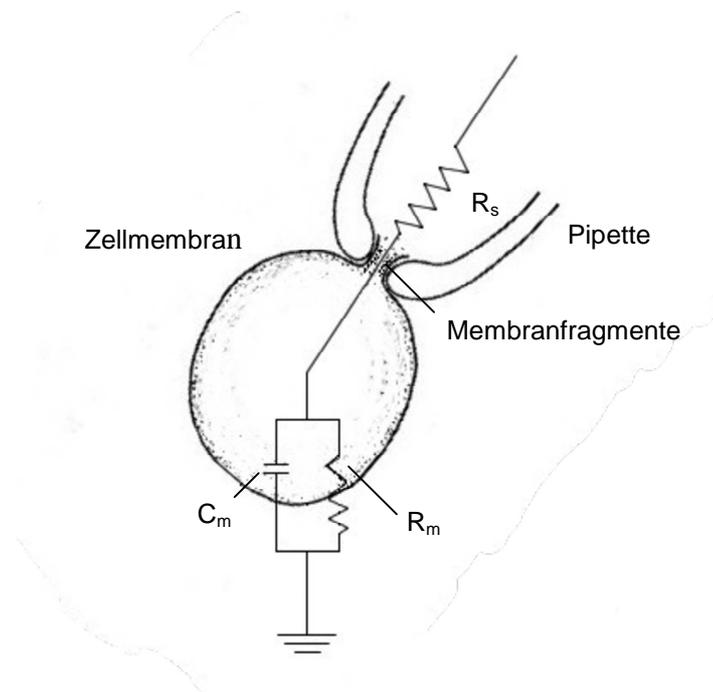


Abbildung 6. Ersatzschaltbild der Ganz-Zell-Konfiguration

Nach dem Durchbrechen der Membran erhält man die Ganz-Zell (*Whole-Cell*)-Konfiguration. Dabei werden Membranfragmente und anderes Zellmaterial in die Nähe der Pipettenmündung gesaugt, was den Serienwiderstand R_s erhöht. R_m ist der Membranwiderstand, C_m die Kapazität der Membran.

3.4.3 Serienwiderstandskompensation

Der Serienwiderstand (R_s), also der Widerstand zwischen Zellmembran und Verstärker, ist abhängig von der Öffnung der Patchpipette. Fließt ein Strom I durch die Pipette, fällt über dem Serienwiderstand R_s eine Spannung (dV) ab. Das Potential der Zellmembran entspricht dann nicht der angelegten Spannung, sondern einem um die über dem Serienwiderstand abgefallene Spannung verminderten Potential. Der Spannungsabfall (dV) ist nach dem Ohmschen Gesetz direkt proportional zum Strom I und zum Pipettenwiderstand R_s :

$$dV = I \cdot R_s$$

Um dem Serienwiderstand entgegenzuwirken, wird dieser elektronisch kompensiert, indem man zur angelegten Spannung noch einen Teil addiert, der proportional zum gerade injizierten Strom ist. In dieser Arbeit wurden Zugangswiderstände von 3 bis 6 $M\Omega$ erreicht, die zu mindestens 85 % kompensiert wurden.

3.4.4 Leckstromkorrektur

Bei *Patch-Clamp*-Messungen wird der gemessene Stromfluss nicht nur durch spannungsaktivierte Ionenkanäle in der Zellmembran vermittelt. In vielen Fällen fließt ein zusätzlicher Leckstrom. Hierbei handelt es sich um spannungsunabhängige Membranleitfähigkeiten durch ständig geöffnete Leckkanäle oder um Leitfähigkeiten, die z.B. durch den Ionenfluss durch den Spalt zwischen Membran und Pipette entstehen. Der Stromfluss ist proportional zur angelegten Spannung (Numberger M., 1996). Um diesen Leckstrom zu bestimmen, wurde im Anschluss an das Testprotokoll ein Leckprotokoll nach der P/n-Methode durchgeführt. Dazu wurden Pulse auf 20 % (P/5) des Spannungssprungs des Testpulses fünfmal hintereinander durchgeführt, aufsummiert und der dadurch bestimmte Strom von dem Testpuls subtrahiert.

Die ebenfalls in HEK293-Zellen vorkommenden endogenen Kanäle (Jiang *et al.*, 2002) verschiedener Arten spielen im Vergleich zu den im Übermaß exprimierten Kanälen aufgrund ihrer geringen Anzahl nur eine untergeordnete Rolle und wurden daher bei den Messungen und Auswertungen vernachlässigt.

3.5 Pulsprotokolle

Klemmt man die Zellmembran auf ein bestimmtes Potential (*Voltage-Clamp*), kann man den entsprechenden Membranstrom kontinuierlich messen und aufzeichnen. Bei unseren Messungen betrug das Haltepotential -80 mV. In Pulsprotokollen werden definierte Änderungen des Membranpotentials vorgegeben. Die auf die Spannungsänderung folgende Stromantwort wird aufgezeichnet.

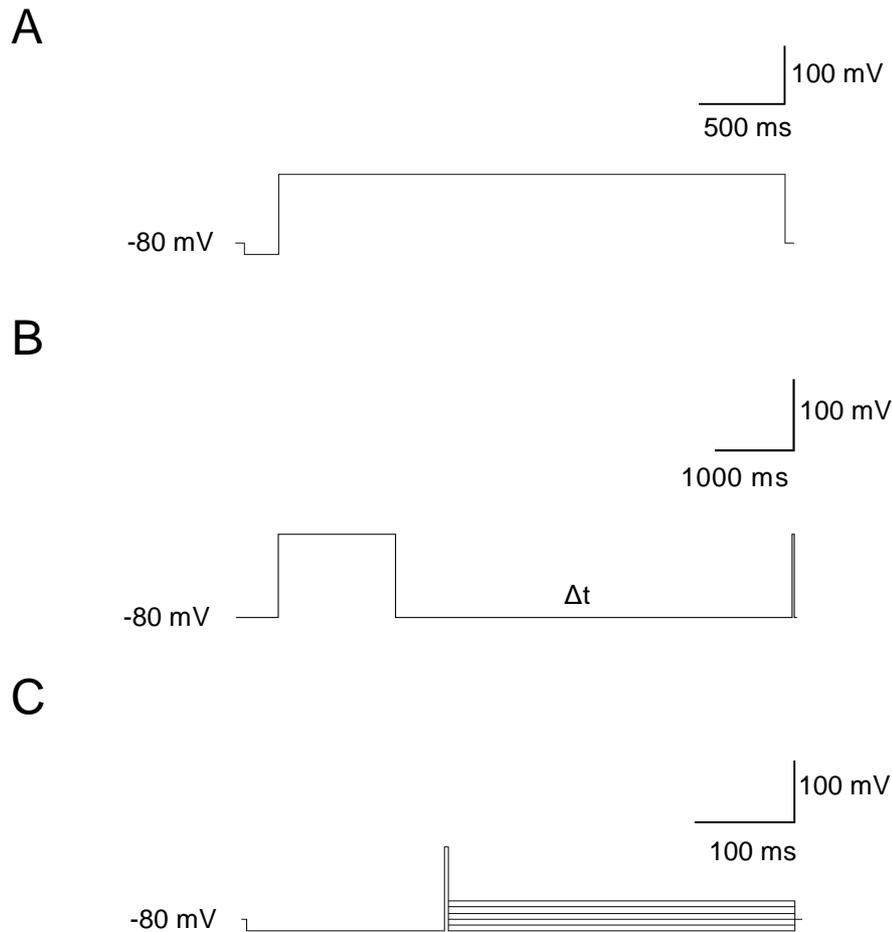


Abbildung 7. Pulsprotokolle

A. Rechteckpulsprotokoll: Vorpuls auf -100 mV (200 ms), anschließender Puls auf $+40$ mV (3000ms). **B.** Protokoll für die Erholung von der Inaktivierung: Spannungssprung auf $+40$ mV (1500 ms) und zurück auf -80 mV. Nach einer Zeit (Δt) zwischen 10 und 5210 ms folgte ein weiterer Puls auf $+40$ mV (25 ms). **C.** *Tail*-Protokoll: Vorpuls auf -100 mV (200 ms), gefolgt von einem Puls auf $+40$ mV (4 ms). Anschließend folgten Spannungssprünge auf Potentiale von -100 mV bis -50 mV (350 ms).

3.5.1 Rechteckpulsprotokoll

Das Rechteckpulsprotokoll dient der Erfassung der Zeitabhängigkeit der Inaktivierung (τ) sowie der Bestimmung von I_{20}/I_{\max} und der Anstiegszeit $t_{(10-90)}$ (siehe 3.6.3). Das Protokoll besteht aus einem 200 ms langen Vorpuls auf -100 mV und einem anschließenden Puls auf $+40$ mV mit einer Dauer von 3000 ms. Im Anschluss folgte ein Leckstromprotokoll.

3.5.2 Recovery-Protokoll

Die Erholung von der Inaktivierung (*Recovery*) ist der Vorgang, bei dem inaktivierte Kanäle in einen aktivierbaren Zustand übergehen. Um die Zeitabhängigkeit der *Recovery* zu bestimmen, wurde folgendes Protokoll angewendet: Auf ein Spannungssprung auf +40 mV (Dauer: 1500 ms) und zurück auf das Haltepotential von -80 mV folgte ein weiterer Puls auf +40 mV (Dauer: 25 ms). Der Zeitabstand zwischen den beiden Pulsen wurde jeweils verdoppelt und variierte zwischen 10 und 5120 ms.

3.5.3 Tail-Protokoll

Um die Deaktivierung des Kanals zu untersuchen wurde ein sogenanntes *Tail*-Protokoll verwendet. Nach einem negativen Vorpuls auf -100 mV für 200 ms wurde für 4 ms auf +40 mV gepulst. Anschließend folgten Spannungssprünge auf verschiedene Potentiale von -100 mV bis -50 mV in 10 mV Schritten für eine Dauer von 350 ms.

3.6 Datenanalyse

Zur Auswertung der Daten und für die Bestimmung der Zeitkonstanten der Inaktivierung und der Deaktivierung wurde das Programm PULSE (HEKA Elektronik, Lambrecht) verwendet. Weiterführende Analysen und graphische Darstellungen erfolgten mithilfe von „Kaleidagraph“ (Synergy Software).

3.6.1 Zeitkonstanten der Inaktivierung und der Deaktivierung

Der Inaktivierungskinetik der Kv4.2-Ströme wurde eine dreifach-exponentielle der Deaktivierungskinetik eine zweifach-exponentielle Funktion angeglichen.

$$I = A_0 + A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} + A_3 e^{-\frac{t}{\tau_3}}$$

für die Inaktivierung

bzw.

$$I = A_0 + A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}}$$

für die Deaktivierung

I = Amplitude, t = Zeit, A_x = Amplitude des Anteils des Abfalls, für den die jeweilige Komponente der Inaktivierung bzw. Deaktivierung verantwortlich ist, τ = Zeitkonstante der Inaktivierung bzw. der Deaktivierung

3.6.2 Erholung von der Inaktivierung

Die Erholung von der Inaktivierung (*Recovery*) wurde analysiert indem die maximale Stromstärke (A_{\max}) des zweiten Pulses auf die des jeweils vorhergehenden ersten Pulses normalisiert wurde. Die normalisierte A_{\max} wurde gegen die Dauer der Repolarisation zwischen den beiden Pulsen aufgetragen. Die Beziehung wurde mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben:

$$y = 1 - e^{-\frac{\Delta t}{\tau_{\text{rec}}}}$$

Δt = Dauer der Repolarisation

τ_{rec} = Zeitkonstante der *Recovery*

y = normalisierte Erholung von der Inaktivierung

3.6.3 Bestimmung von I_{20}/I_{\max} und $t_{(10-90)}$

Mit I_{\max} wurde die maximale Stromstärke im Verlauf des Rechteckpulses bezeichnet. Als I_{20} wurde die Stromstärke nach 20 ms definiert. Für den Vergleich von Kv4.2wt-Kanal und Mutanten wurde der verbleibende Strom 20 ms nach Beginn des Pulses durch die Peakstrom-Amplitude geteilt (I_{20}/I_{\max}). Die Dauer von 20 ms erwies sich als geeignet, weil zu dieser Zeit der Unterschied im Grad der Inaktivierung für Kv4.2 im Vergleich zu Kv4.2/DPP6 am größten war. Der Parameter ermöglichte einen einfachen Vergleich bei einer komplexen, multiexponentiellen Inaktivierungskinetik. Die Anstiegszeit $t_{(10-90)}$ beschreibt die Zeit, die benötigt wurde um von 10 % bis auf 90 % von I_{\max} zu gelangen.

3.6.4 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Originalwerte oder als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM, *standard error of the mean*) dargestellt. Für die graphische Darstellung der Deaktivierung und der Erholung aus der Inaktivierung wurden die Mittelwerte als Kreise, die Standardfehler als Fehlerbalken gezeigt. Werden die Ergebnisse in Form von Säulendiagrammen dargestellt, so zeigt die Höhe der Säule den Mittelwert an, der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler. Die Signifikanz wurde mit einem t-Test nach Student geprüft. Der t-Test wurde mit Excel (Office 2000, Microsoft) durchgeführt.

Für die Berechnung des Standardfehlers (S_C) der n-fachen Änderung (C) eines Wertes im Vergleich zum Messwert für die Kontrolle wird eine lineare und unabhängige Fortpflanzung des Fehlers angenommen (Bevington, 1992). Für den Fehler einer Messgröße $C \pm S_C$ die aus dem Quotienten A/B der Größen $A \pm S_A$ und $B \pm S_B$ berechnet wird, gilt:

$$S_c = C \cdot \sqrt{\left(\frac{S_A}{A}\right)^2 + \left(\frac{S_B}{B}\right)^2}$$

4 Chemikalien und Gebrauchsmaterialien

Alle Chemikalien und Lösungen von den Firmen Gibco (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), Sigma (Schnelldorf) oder AstraZeneca (Södertälje, Schweden) in p.A. oder Reinstqualität bezogen. Verbrauchsmaterialien und Reaktionsgefäße wurden von den Firmen Braun (Kronberg), Nunc (Wiesbaden) oder Sarstedt bestellt.

Ergebnisse

1 Effekt von DPP6 auf das Schaltverhalten von Wildtyp und HA-Epitop-markierten Kv4.2-Kanälen

Eine Besonderheit der Kv4.2-Ströme ist ihre komplexe Inaktivierungskinetik. Diese lässt sich am besten mit der Summe aus drei Exponentialfunktionen beschreiben (Jerng & Covarrubias, 1997; Bähring *et al.*, 2001a). Für den Wildtyp Kv4.2-Kanal (Kv4.2wt) ist dabei bekannt, dass eine schnelle Komponente, $\tau_1 = 14 \pm 1$ ms, für 68 ± 3 % ($n = 8$), eine mittlere Komponente, $\tau_2 = 54 \pm 4$ ms, für 25 ± 3 % und eine langsame Komponente, $\tau_3 = 682 \pm 97$ ms, für 7 ± 3 % des gesamten Stromabfalls verantwortlich ist (Abbildung 8).

Die Beschleunigung der Inaktivierung ist ein bekannter Effekt von DPP6 auf Kv4.2 (Nadal *et al.*, 2003; Jerng *et al.*, 2004b). Zunächst sollte dieser Effekt von DPP6 auf Kv4.2 in transient transfizierten HEK293-Zellen bestätigt werden. Die Daten für Kv4.2 allein und nach Koexpression mit DPP6 wurden gegenübergestellt und die Unterschiede auf Signifikanz geprüft.

1.1 Effekt von DPP6 auf das Kv4.2-Inaktivierungsverhalten in HEK293-Zellen

1.1.1 Onset der Inaktivierung

Die Inaktivierung wurde mit einem Rechteckpulsprotokoll (siehe Methoden, Abbildung 7 A) untersucht. Das Protokoll besteht aus einem 200 ms langen Vorpuls auf -100 mV und einem anschließenden Testpuls auf +40 mV mit einer Dauer von 3000 ms. Die Zeitkonstanten der Inaktivierung wurden durch Angleichung einer dreifach exponentiellen Funktion ermittelt.

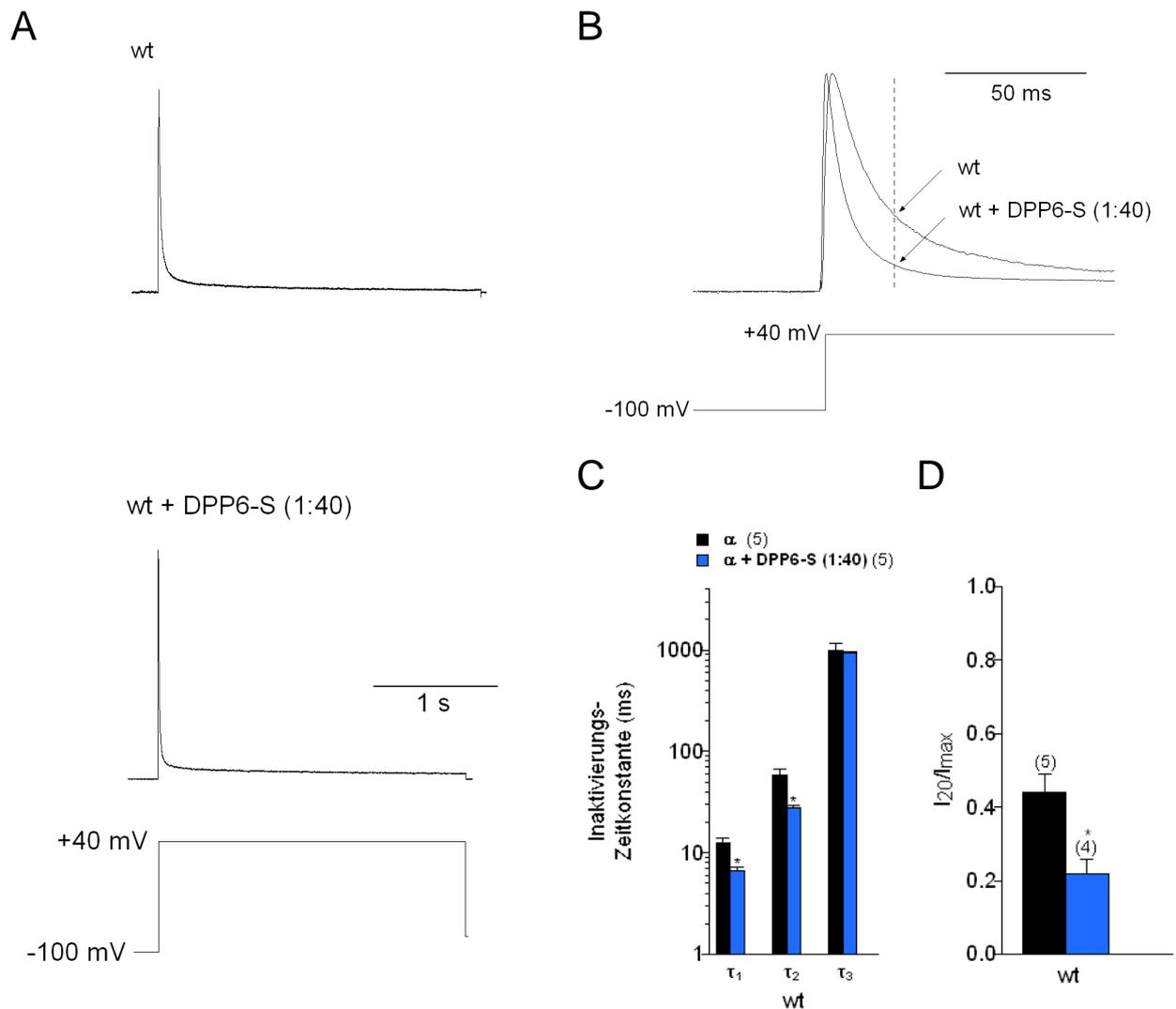


Abbildung 8. Inaktivierungsverhalten von Kv4.2wt \pm DPP6-S

A. Normierte Stromkurven bei einem Puls von -100 mV auf $+40$ mV von Kv4.2wt ohne bzw. mit zwei verschiedenen cDNA-Verhältnissen von DPP6-S zu Kv4.2. bei Transfektion in HEK293-Zellen. **B.** Normierte Stromkurven (siehe A) bei stärkerer Vergrößerung. Die vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt 20 ms nach Beginn des Pulses. Hier wurde der Grad der Inaktivierung (I_{20}/I_{max}) bestimmt. **C.** Zeitkonstanten ermittelt mit einer 3-fach-exponentiellen Beschreibung der Inaktivierungskinetik von Kv4.2-Strömen während einer Depolarisierung nach $+40$ mV. Dargestellt sind die Mittelwerte der schnellen (τ_1), mittleren (τ_2) und langsamen (τ_3) Komponente mit ihren Standardfehlern auf einer logarithmischen Skala. **D.** Inaktivierung nach 20 ms (vertikale gestrichelte Linie in den Stromkurven von B). ■ Kv4.2wt ohne DPP6-S ($n = 4$) und ■ Kv4.2wt + DPP6-S im Verhältnis 1:40 ($n = 5$). * $0,01 < p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit Kanal ohne DPP6-S.

Kotransfektion von DPP6 (im cDNA-Verhältnis 1:40) ergab eine schnelle Zeitkonstante $\tau_1 = 7 \pm 1$ ms (75 ± 4 %), eine mittlere Zeitkonstante $\tau_2 = 26 \pm 2$ ms und eine langsame Zeitkonstante $\tau_3 = 933 \pm 35$ ms (4 ± 1 %). Folglich wurden durch Koexpression von DPP6 die ersten beiden Zeitkonstanten signifikant verkleinert ($p = 0,011$ für τ_1 und $p = 0,016$ für τ_2). Die langsame Zeitkonstante wurde nicht verändert. Der relative Anteil der einzelnen Stromkomponenten wurde durch DPP6 nicht beeinflusst. Der Grad der Inaktivierung nach 20 ms betrug für Kv4.2wt allein $0,61 \pm 0,05$ ($n = 8$) und nach DPP6-Koexpression $0,21 \pm 0,05$ ($n = 4$).

Um in weiteren Experimenten die Bindung von DPP6 und Kv4.2 untersuchen zu können, wurde der Kanal mit einem Hämagglutinin-Epitop markiert. Daher wurden die Kontrollexperimente auch mit einem Kv4.2wt-HA-Kanal durchgeführt. Auch Kv4.2wt-HA war in der Lage funktionell mit DPP6 zu interagieren. Um zu überprüfen, ob der DPP6-Effekt abhängig ist von der eingesetzten cDNA-Konzentration, wurde cDNA in zwei verschiedenen Verhältnissen von α - zu β -Untereinheit verwendet. Die Analyse des HA-Epitop-markierten Kanals lieferte ähnliche Ergebnisse, wie die Analyse des Kanals ohne HA-Epitop. Die ersten beiden Zeitkonstanten von Kv4.2wt-HA ($\tau_1 = 17 \pm 2$ ms (70 ± 5 %), $\tau_2 = 78 \pm 12$ ms (22 ± 3 %), $\tau_3 = 1371 \pm 333$ ms (8 ± 2 %; $n = 12$) wurden durch Koexpression von DPP6 signifikant ($p = 0,0002$ für τ_1 und $p = 0,007$ für τ_2) verkleinert. Der Effekt von DPP6 war unabhängig von der eingesetzten Konzentration. Kotransfektion im cDNA-Verhältnis 1:5 ergab: $\tau_1 = 6 \pm 1$ ms (76 ± 2 %), $\tau_2 = 28 \pm 3$ ms und $\tau_3 = 1168 \pm 108$ ms (4 ± 1 %; $n = 6$). Für DPP6-Kotransfektion im cDNA-Verhältnis 1:40 ergaben sich ähnliche Werte: $\tau_1 = 8 \pm 1$ ms (57 ± 11 %), $\tau_2 = 35 \pm 7$ ms (34 ± 10 %) und $\tau_3 = 1052 \pm 138$ ms (9 ± 2 %; $n = 6$). I_{20}/I_{\max} betrug für Kv4.2-HA $0,61 \pm 0,05$ ($n = 12$) und wurde durch DPP6 verkleinert (Kotransfektion im cDNA-Verhältnis 1:5 $0,21 \pm 0,05$, $n = 6$; $p = 0,00001$; nach DPP6-Kotransfektion im cDNA-Verhältnis 1:40 $0,25 \pm 0,03$, $n = 6$; $p = 0,00001$). Die Ergebnisse zeigen, dass DPP6 die Inaktivierung sowohl der Kv4.2wt- als auch der Kv4.2wt-HA Auswärtsströme deutlich beschleunigt. Dieses ist bereits in den dargestellten Stromspuren erkennbar. Die Beschleunigung spiegelt sich in den ersten beiden Zeitkonstanten (τ_1 und τ_2) und im Grad der Inaktivierung, gemessen nach 20 ms, wider (I_{20}/I_{\max}) (Abbildungen 8, 9 und 20).

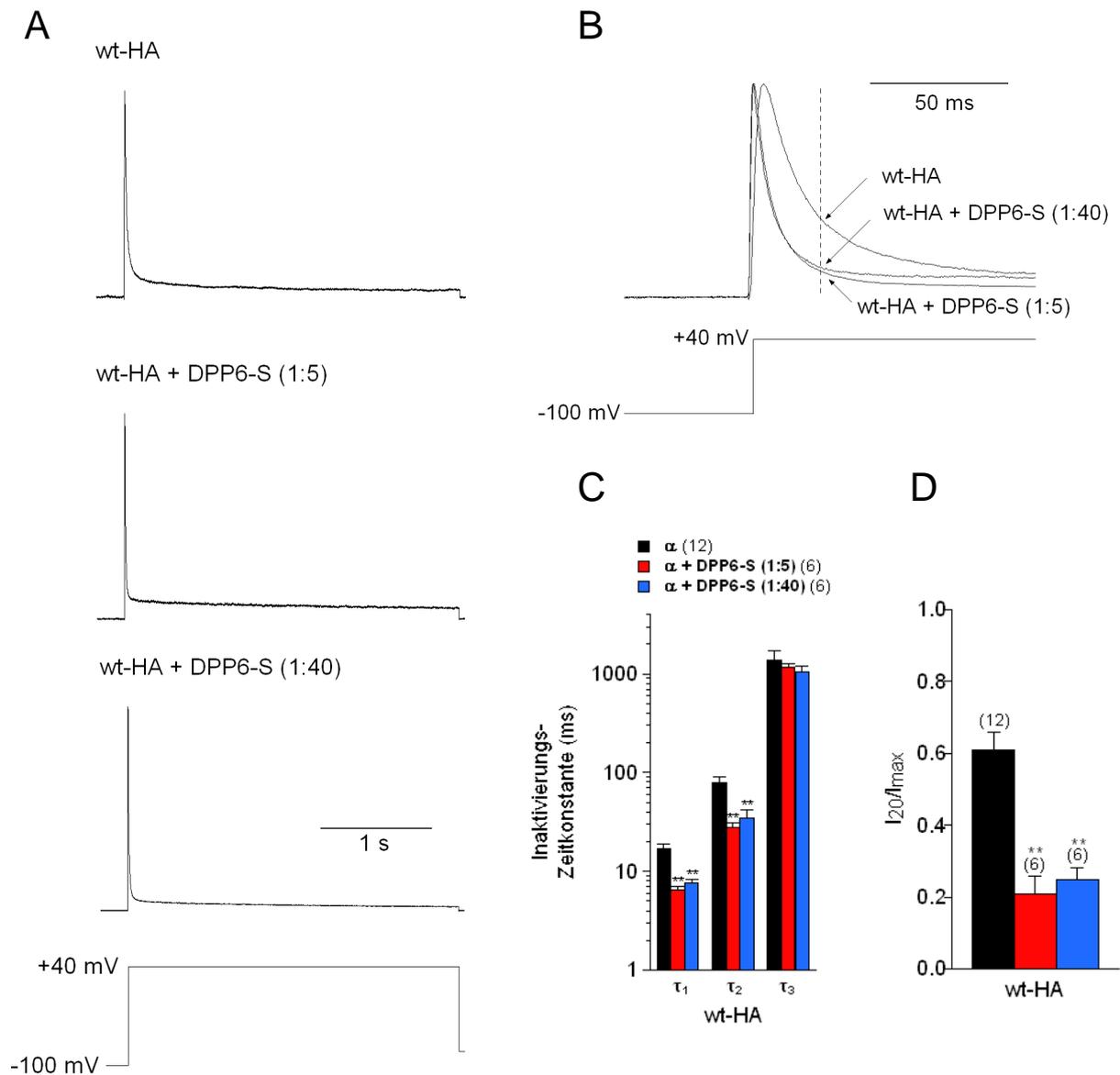


Abbildung 9. Inaktivierungsverhalten von Kv4.2wt-HA \pm DPP6-S

A. Normierte Stromkurven bei einem Puls von -100 mV auf $+40$ mV von Kv4.2wt-HA ohne bzw. mit zwei verschiedenen Konzentrationen von DPP6-S in HEK293-Zellen. **B.** Normierte Stromkurven (siehe A) bei stärkerer Vergrößerung. Die vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt 20 ms nach Beginn des Pulses. Hier wurde der Grad der Inaktivierung (I_{20}/I_{max}) bestimmt. **C** Zeitkonstanten ermittelt mit einer 3-fach-exponentiellen Beschreibung der Inaktivierungskinetik von Kv4.2-Strömen während einer Depolarisierung nach $+40$ mV. Dargestellt sind die Mittelwerte der schnellen (τ_1), mittleren (τ_2) und langsamen (τ_3) Komponente mit ihren Standardfehlern auf einer logarithmischen Skala. **D.** Inaktivierung nach 20 ms (vertikale gestrichelte Linie in den Stromkurven von B. ■ Kv4.2wt-HA ohne DPP6-S ($n = 12$), ■ Kv4.2wt-HA + DPP6-S im Verhältnis 1:5 ($n = 6$) und ■ Kv4.2wt-HA + DPP6-S im Verhältnis 1:40 ($n = 6$). * $0,01 < p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit Kanal ohne DPP6-S

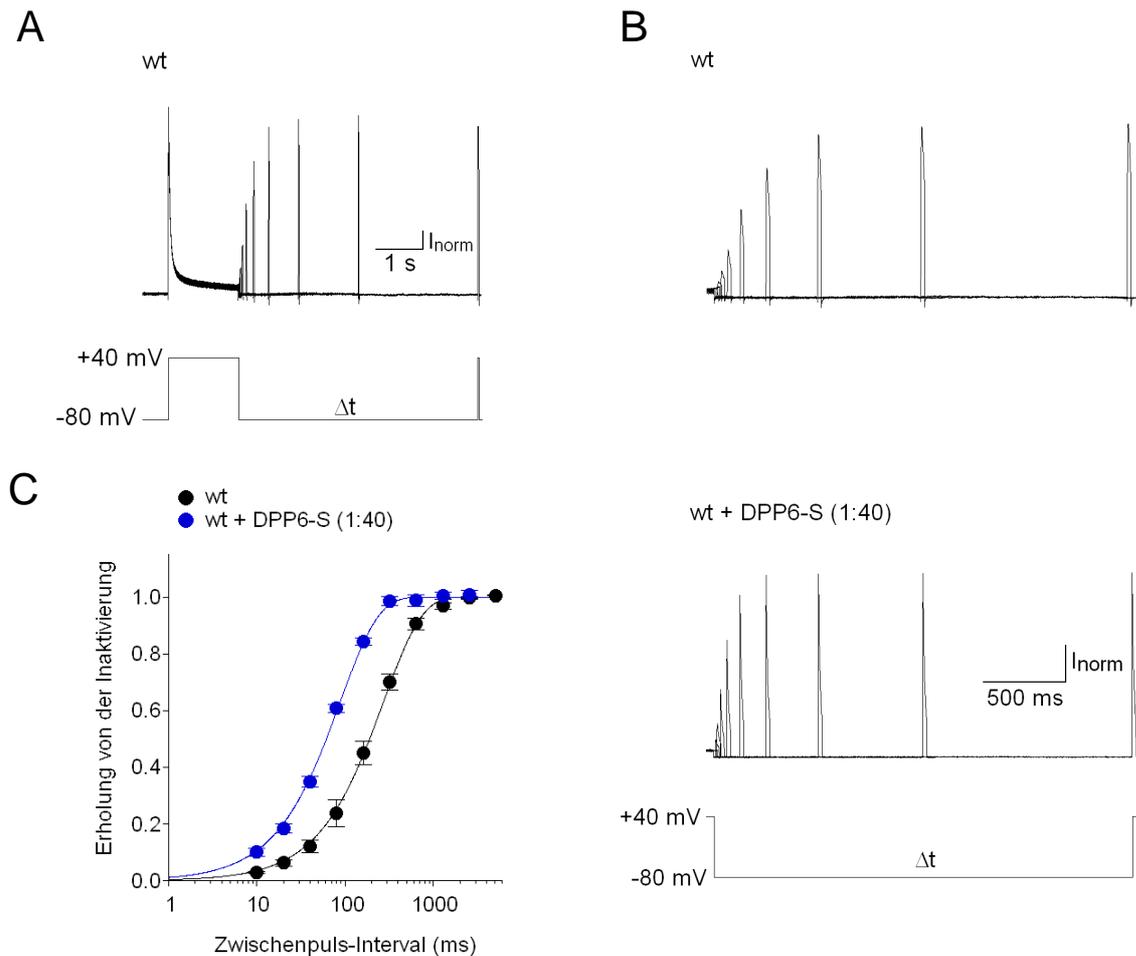


Abbildung 10. Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2wt \pm DPP6-S

A und **B**. Stromkurven von Kv4.2wt-HA \pm DPP6-S, die mit dem Protokoll für die Erholung von der Inaktivierung, evoziert wurden. Die Zeit zwischen zwei Depolarisationen (Δt) verdoppelte sich mit jedem neuen Puls. **C**. Semi-logarithmische Darstellung der Erholung von der Inaktivierung bei -80 mV (τ_{rec}). Die durchgezogene Linie stellt eine mono-exponentielle Funktion zur Annäherung dieser Kinetik dar. ● Kv4.2wt ohne DPP6-S ($n = 4$) und ● Kv4.2wt-HA und DPP6-S (1:40) ($n = 5$). * $0,01 < p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit Kv4.2wt

1.1.2 Erholung von der Inaktivierung

Abbildung 10 zeigt die Stromantwort von Kv4.2wt auf das *Recovery*-Protokoll (siehe Methoden; Abbildung 10). Die auf den Maximalwert normalisierte Stromamplitude der zweiten Depolarisation wurde gegen die Zeit aufgetragen. Mit zunehmender Dauer der Repolarisation zwischen den zwei depolarisierenden Pulsen wurde die Amplitude größer. Diese Beziehung wurde mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben.

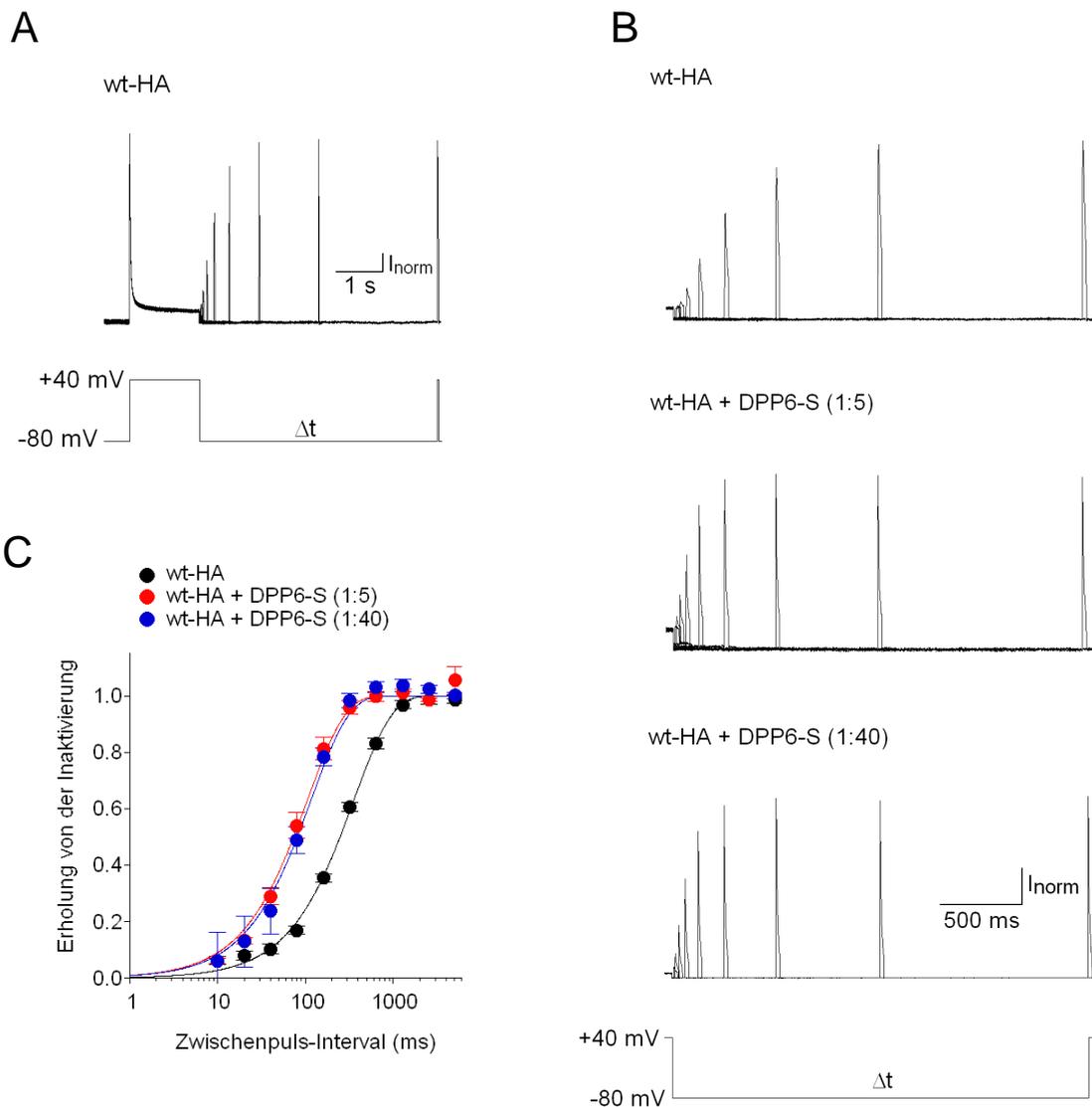


Abbildung 11. Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2wt-HA \pm DPP6-S

A und **B**. Stromkurven von Kv4.2wt-HA \pm DPP6-S, die mit dem Protokoll für die Erholung von der Inaktivierung, evoziert wurden. Die Zeit zwischen zwei Depolarisationen (Δt) verdoppelte sich mit jedem neuen Puls. **C**. Semi-logarithmische Darstellung der Erholung von der Inaktivierung bei -80 mV (τ_{rec}). Die durchgezogene Linie stellt eine mono-exponentielle Funktion zur Annäherung dieser Kinetik dar. ● Kv4.2wt-HA ohne DPP6-S ($n = 10$), ● Kv4.2wt-HA und DPP6-S (1:5) ($n = 5$) und ● Kv4.2wt-HA und DPP6-S (1:40) ($n = 6$). * $0,01 < p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit Kv4.2wt-HA.

Dies ergab für Kv4.2wt ohne DPP6 $\tau_{rec} = 290 \pm 43$ ms ($n = 3$) und nach DPP6-Kotransfektion im cDNA-Verhältnis 1:40 $\tau_{rec} = 91 \pm 8$ ms ($n = 4$). Die Erholung von der Inaktivierung wurde also für Kv4.2wt durch DPP6 etwa zweifach beschleunigt.

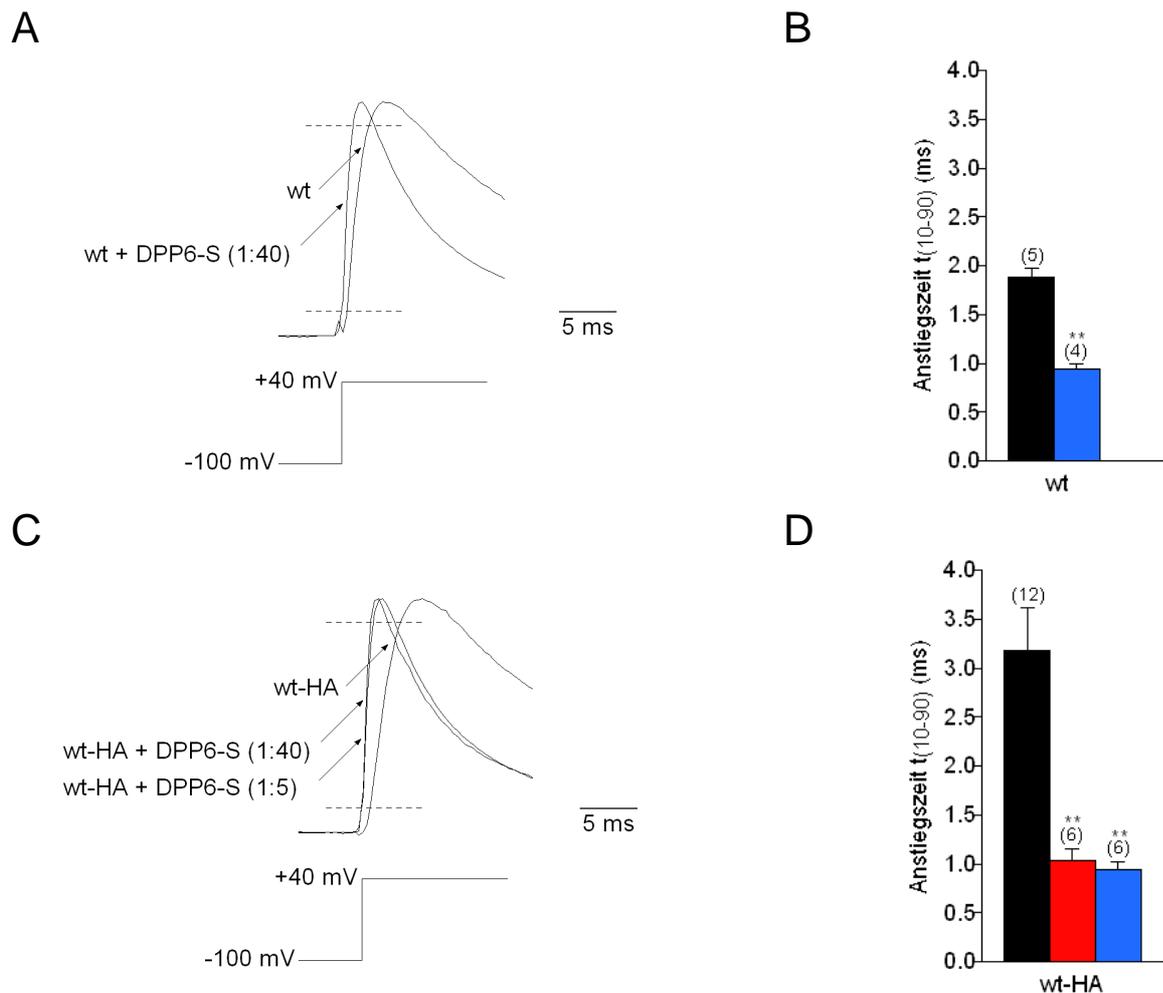


Abbildung 12. Aktivierungskinetik von Kv4.2wt \pm DPP6-S und Kv4.2wt-HA \pm DPP6-S

A und **C**. Normierte Stromkurven von Kv4.2wt \pm DPP6-S (**A**) und Kv4.2wt-HA \pm DPP6-S (**C**). Die horizontalen, gestrichelten Linien markieren 10 und 90 % der Amplitude. **B** und **D**. Mittelwerte und Standardfehler der Anstiegszeit von 10 % auf 90 % der Kv4.2-Peakamplitude bestimmt für **B**. ■ Kv4.2wt ohne DPP6-S ($n = 4$) und ■ Kv4.2wt + DPP6-S im Verhältnis 1:40 ($n = 5$) und **D**. ■ Kv4.2wt-HA ohne DPP6-S ($n = 12$), ■ Kv4.2wt-HA + DPP6-S im Verhältnis 1:5 ($n = 6$) und ■ Kv4.2wt-HA + DPP6-S im Verhältnis 1:40 ($n = 6$). * $0,01 < p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit Kanal ohne DPP6-S.

Für Kv4.2wt-HA allein ergab die Zeitkonstante $\tau_{rec} = 436 \pm 75$ ms ($n = 10$), nach Kotransfektion im cDNA-Verhältnis 1:5 $\tau_{rec} = 113 \pm 11$ ms ($n = 5$) und im cDNA-Verhältnis 1:40 $\tau_{rec} = 110 \pm 11$ ms ($n = 6$; Abbildung 11). Somit war für Kv4.2wt-HA die Erholung von der Inaktivierung in Gegenwart von DPP6 sogar vierfach beschleunigt (Abbildung 20).

1.2 Effekt von DPP6 auf die Kv4.2-Aktivierungskinetik

Als Maß für die Geschwindigkeit der Aktivierung wurde die Zeit bestimmt, die in der initialen Phase der Stromantwort während des Rechteckpulses benötigt wurde um von 10 bis

zu 90 % der maximalen Amplitude zu gelangen (Anstiegszeit $t_{(10-90)}$). Sie betrug für Kv4.2wt $1,9 \pm 0,1$ ms ($n = 5$). Die Koexpression von DPP6 führte zu einer Beschleunigung der Aktivierungskinetik, sodass $t_{(10-90)}$ $0,9 \pm 0,1$ ms betrug ($n = 4$). Die $t_{(10-90)}$ des HA-Epitop-markierten Kanals Kv4.2wt-HA betrug $3,3 \pm 0,3$ ms ($n = 12$). Die Aktivierungskinetik war also langsamer als beim Kanal ohne HA-Epitop ($p = 0,02$). Für den HA-Epitop-markierten Kanal verursachte DPP6 ebenfalls eine Beschleunigung der Aktivierungskinetik. Kotransfektion im cDNA-Verhältnis 1:5 ergab $1,0 \pm 0,1$ ms ($n = 6$) und Kotransfektion im cDNA-Verhältnis 1:40 ergab $0,9 \pm 0,1$ ms ($n = 6$). DPP6 bewirkte also eine 2-3-fache Beschleunigung der Aktivierung (Abbildung 12 und 20).

2 Mutationsanalyse der funktionellen Interaktion zwischen Kv4.2 und DPP6

Unter den bisher bekannten Dipeptidyl-Aminopeptidasen besitzt das DPP10 eine hohe Sequenzidentität mit DPP6 (Jerng *et al.*, 2004b). Es ist bekannt, dass die Effekte von DPP10 auf Kv4.2 und Kv4.3 denen von DPP6 ähneln (Jerng *et al.*, 2004b; Ren *et al.*, 2005). Die Auswirkungen verschiedener Punktmutationen auf die Interaktion zwischen DPP10 und Kv4.3 wurden bereits untersucht (Ren *et al.*, 2005). Ren *et al.* konnten zeigen, dass Mutationen im Bereich des S2-Segmentes des Kv4.3-Kanals zu einer Bindungsdefizienz für DPP10 führen. Um die Interaktion zwischen DPP6 und Kv4.2 zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Punktmutanten homologer Aminosäuren des Kv4.2 Kanals eingesetzt. Diese Mutanten (Kv4.2A235V-HA, Kv4.2I239W-HA) wurden allein und mit DPP6 in HEK239-Zellen exprimiert und die resultierenden Ströme gemessen. Auch bei der Untersuchung der Mutanten wurde cDNA in zwei verschiedenen Verhältnissen von α zu β -Untereinheiten verwendet. Die folgenden Abbildungen zeigen die Inaktivierungs- und Aktivierungskinetiken dieser Mutanten sowie deren Modulation durch DPP6 (Abbildungen 13-19).

2.1 Auswirkung von S2-Mutationen auf die Inaktivierung

2.1.1 Onset der Inaktivierung

Die Punktmutation A235V hatte keine Auswirkung auf die funktionelle Expression des Kanalproteins. Kv4.2A235V-HA zeigte typische A-Typ-Ströme mit $\tau_1 = 19 \pm 2$ ms, $\tau_2 = 90 \pm 13$ ms und $\tau_3 = 1217 \pm 341$ ms ($n = 3$). I_{20}/I_{\max} betrug $0,70 \pm 0,02$ ($n = 3$). Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant von Kv4.2wt-HA ($p = 0,08$). Die Kotransfektion von Kv4.2A235V-HA mit DPP6 zeigte eine Beschleunigung der Inaktivierung sowohl im Verhältnis 1:5 (3,6-fach, $n = 6$, $p = 0,00001$) als auch im Verhältnis 1:40 (3,4-fach, $n = 20$, $p = 0,0000$; Tabelle 1).

Auch die Transfektion der Mutante I239W führte zur Expression funktioneller Kanäle. Allerdings hatte sie im Gegensatz zur Mutation A235V eine signifikante Beschleunigung der Kv4.2-Inaktivierung zur Folge (für I_{20}/I_{\max} $p = 0,01$). Die Zeitkonstante τ_1 der Inaktivierung betrug bei Kv4.2I239W allein $\tau_1 = 13 \pm 0,2$ ms ($n = 7$) und bei DPP6 Kotransfektion im cDNA-Verhältnis 1:5 $\tau_1 = 7 \pm 2$ ms ($n = 7$). Die Inaktivierung war daher im Vergleich zur Mutante allein zweifach ($p = 0,002$) beschleunigt (Abbildungen 14 und 20). I_{20}/I_{\max} wurde durch DPP6 etwa halbiert (Kv4.2I239W-HA: $0,44 \pm 0,05$ und Kv4.2I239W-HA + DPP6 $0,23 \pm 0,05$, $p = 0,002$). Also interagierten beide Mutanten mit DPP6.

2.1.2 Erholung von der Inaktivierung

Als nächstes wurde die Erholung von der Inaktivierung für beide Mutanten untersucht. Die gemessenen Zeitkonstante betrug für Kv4.2A235V-HA allein: $\tau_{\text{rec}} = 497 \pm 45$ ms ($n = 10$). Im Vergleich zu Kv4.2-HA war die Erholung von der Inaktivierung also unverändert ($p = 0,6$). Kotransfektion von Kv4.2A235V-HA und DPP6 im cDNA-Verhältnis 1:5 ergab $\tau_{\text{rec}} = 137 \pm 11$ ms ($n = 4$) und Kotransfektion im cDNA-Verhältnis 1:40 ergab $\tau_{\text{rec}} = 128 \pm 11$ ms ($n = 5$). Folglich wurde die Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2A235V-HA durch DPP6-Koexpression etwa 3,5-fach beschleunigt (Abbildungen 15 und 20).

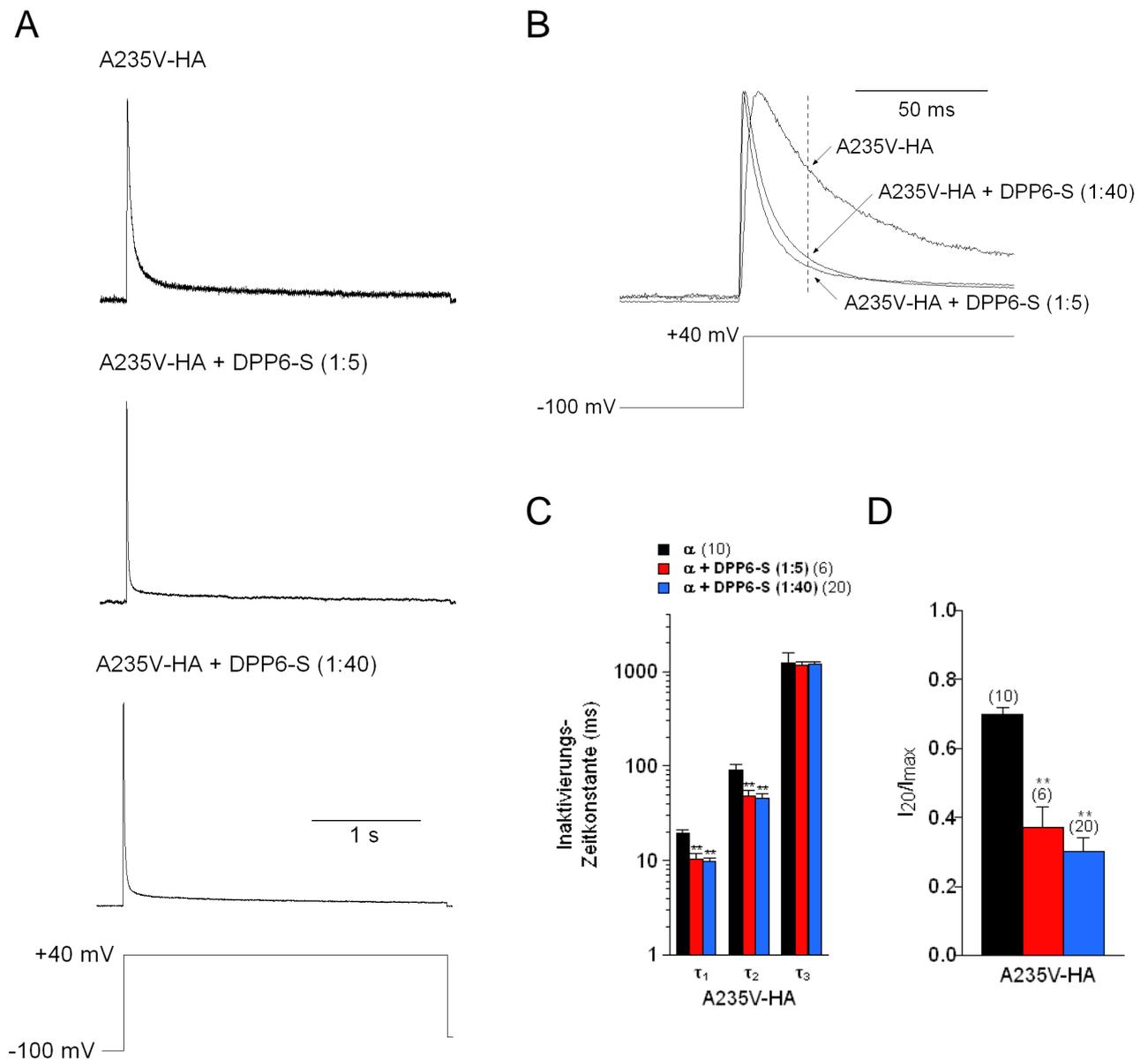


Abbildung 13. Inaktivierungsverhalten von Kv4.2A235V-HA \pm DPP6-S

A und **B**. Inaktivierungskinetik des A-Typ-Stroms von Kv4.2A235V-HA. Die vertikale, gestrichelte Linie in **B** markiert den Zeitpunkt 20 ms nach Beginn des Pulses. **C**. Zeitkonstanten der Inaktivierung von Kv4.2-Strömen während einer Depolarisierung nach +40 mV. Dargestellt sind die Mittelwerte der schnellen (τ_1), mittleren (τ_2) und langsamen (τ_3) Komponente mit ihren Standardfehlern auf einer logarithmischen Skala. **D**. Inaktivierung nach 20 ms (vertikale gestrichelte Linie in den Stromkurven von **B**). ■ Kv4.2A235V-HA ohne DPP6-S ($n = 10$), ■ Kv4.2A235V-HA und DPP6-S (1:5) ($n = 6$) und ■ Kv4.2A235V-HA und DPP6-S (1:40) ($n = 20$). * $0,01 < p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit Kanal ohne DPP6-S.

Die Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung betrug bei der Mutante Kv4.2I235W-HA $\tau_{rec} = 252 \pm 52$ ms ($n = 5$). Während die Mutante Kv4.2A235V-HA sich nicht in der Kinetik der Erholung von der Inaktivierung von dem Kv4.2wt-HA-Kanal unterschied, war bei Kv4.2I239W-HA die Erholung beschleunigt. Diese Beschleunigung war jedoch nicht signifikant ($p = 0,06$).

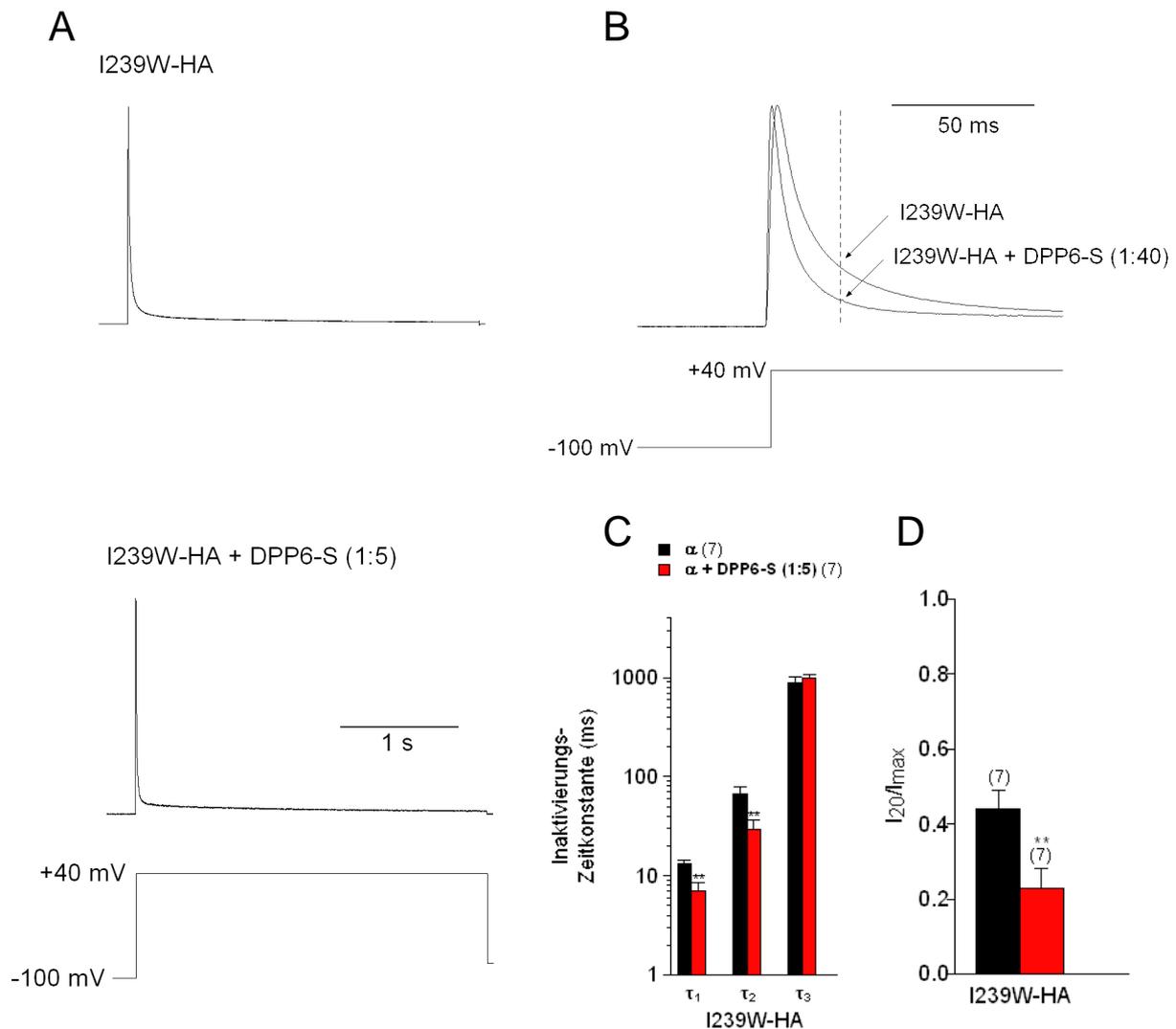


Abbildung 14. Inaktivierungsverhalten von Kv4.2I239W-HA \pm DPP6-S

A und **B**. Inaktivierungskinetik des A-Typ-Stroms von Kv4.2I239W-HA. Die vertikale, gestrichelte Linie in **B** markiert den Zeitpunkt 20 ms nach Beginn des Pulses. **C**. Zeitkonstanten der Inaktivierung ermittelt mit einer 3-fach-exponentiellen Beschreibung der Inaktivierungskinetik von Kv4.2-Strömen während einer Depolarisierung nach +40 mV. Dargestellt sind die Mittelwerte der schnellen (τ_1), mittleren (τ_2) und langsamen (τ_3) Komponente mit ihren Standardfehlern auf einer logarithmischen Skala. **D**. Inaktivierung nach 20 ms (vertikale gestrichelte Linie in den Stromkurven von **B**). ■ Kv4.2I239W-HA ohne DPP6-S ($n = 7$), ■ Kv4.2I239W-HA und DPP6-S (1:5) ($n = 7$). * $0,01 < p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit Kanal ohne DPP6-S.

Da der DPP6-Effekt auf Kv4.2A235V-HA unabhängig vom cDNA-Verhältnis der kotransfizierten α -Untereinheit zur β -Untereinheit war, wurde für die Mutante Kv4.2I239W-HA nur die Kotransfektion im cDNA-Verhältnis 1:5 untersucht. Diese ergab eine Zeitkonstante von $\tau_{rec} = 87 \pm 6$ ms ($n = 10$). Also war die Erholung von der Inaktivierung in Gegenwart von DPP6 dreifach beschleunigt (Abbildung 20).

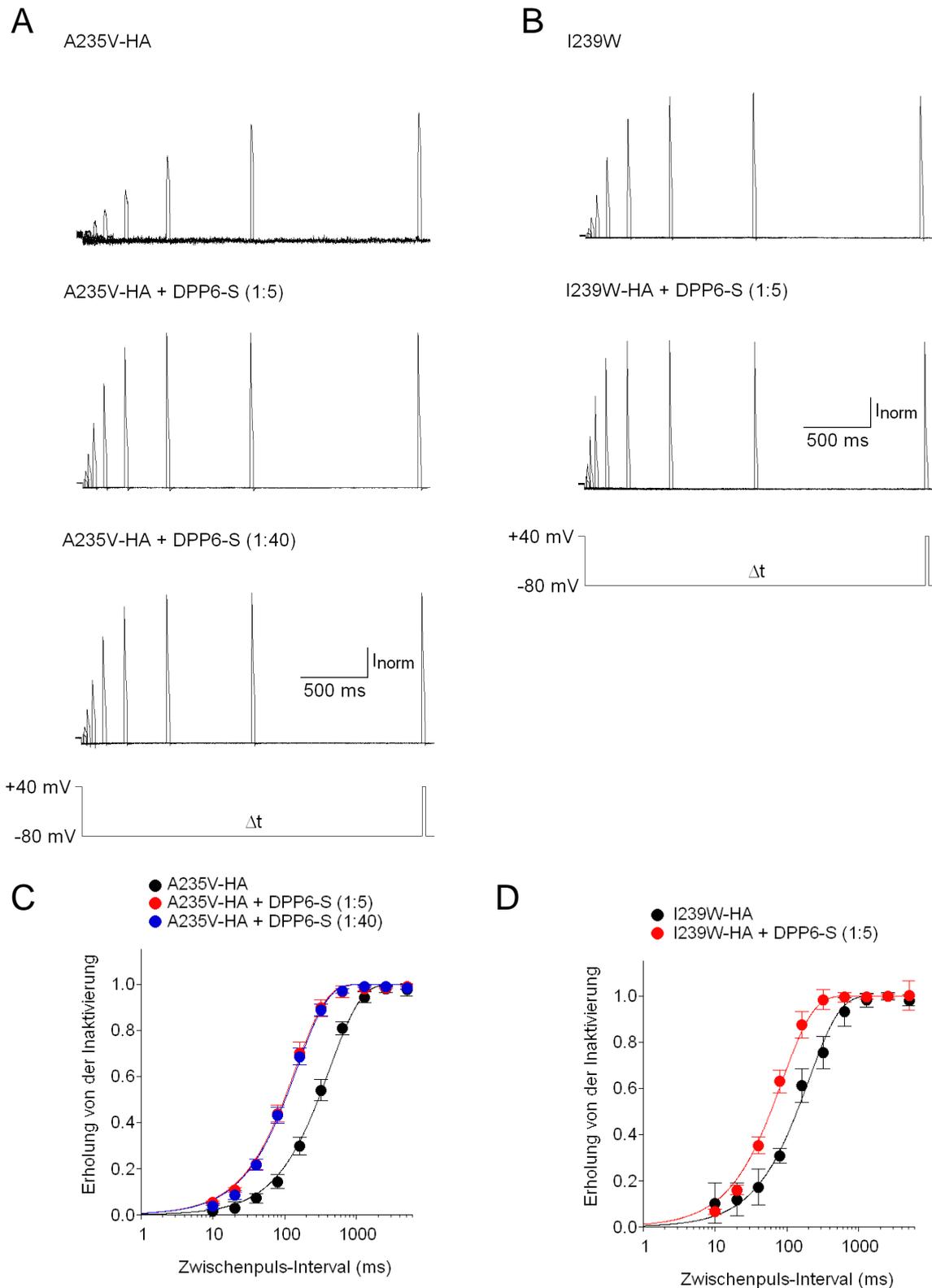


Abbildung 15. Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2A235V-HA \pm DPP6 und Kv4.2I239W \pm DPP6

A und **B.** Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2A235V-HA \pm DPP6 (**A**) und Kv4.2I239W-HA \pm DPP6. **C** und **D.** Semi-logarithmische Darstellung der Erholung von der Inaktivierung bei -80 mV (τ_{rec}). Die durchgezogene Linie stellt eine mono-exponentielle Funktion zur Annäherung dieser Kinetik dar. Für ● Kv4.2A235V-HA ohne DPP6 ($n = 10$), ● Kv4.2A235V-HA und DPP6 (1:5) ($n = 4$) und ● Kv4.2A235V-HA und DPP6 (1:40) ($n = 15$). Für ● Kv4.2I239W-HA ohne DPP6 ($n = 5$), ● Kv4.2I239W-HA und DPP6 (1:5) ($n = 5$).

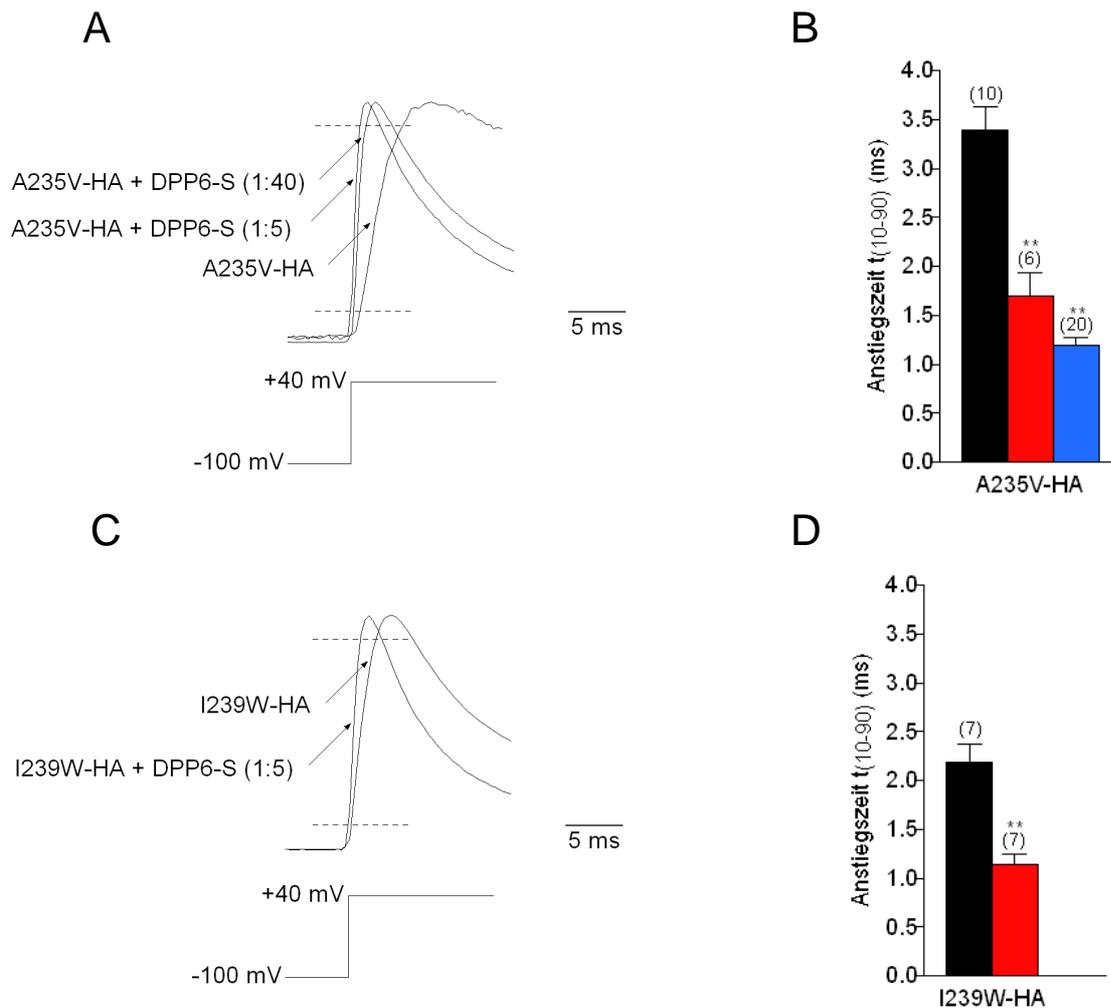


Abbildung 16. Aktivierungskinetik von Kv4.2A235V-HA \pm DPP6 und Kv4.2I239W-HA \pm DPP6

A und **C**. Normierte Stromkurven von Kv4.2A235V-HA \pm DPP6 (**A**) und Kv4.2I239W-HA \pm DPP6 (**C**). Die horizontalen, gestrichelten Linien markieren 10 und 90 % der Amplitude. **B** und **D**. Mittelwerte und Standardfehler der Anstiegszeit von 10 % auf 90 % der Kv4.2-Peakamplitude bestimmt für Kanal ohne DPP6 (■), mit DPP6 im Verhältnis 1:5 (■) und mit DPP6 im Verhältnis 1:40 (■). * $0,01 < p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit Kanal ohne DPP6.

2.2 Auswirkung von S2-Mutationen auf die Aktivierungskinetik

Analog zum Kv4.2wt-HA-Kanal wurde die Anstiegszeit als Maß für die Aktivierung bei den Mutanten untersucht. Bei Kv4.2A235V-HA ($t_{(10-90)} = 3,4 \pm 0,2$ ms, $n = 10$) führte DPP6 zu einer zweifachen Beschleunigung der Aktivierungskinetik bei Kotransfektion im Verhältnis 1:5 ($t_{(10-90)} = 1,7 \pm 0,2$ ms, $n = 10$, $p = 0,0002$) und zu einer etwa dreifachen Beschleunigung bei Kotransfektion im Verhältnis 1:40 ($t_{(10-90)} = 1,2 \pm 0,2$ ms, $n = 20$, $p = 0,0000$). Im Vergleich zu Kv4.2wt-HA wurde durch die Mutation A235V die Aktivierungskinetik nicht verändert ($p = 0,68$).

Im Gegensatz zu Kv4.2A235V-HA führte bei der Mutante Kv4.2I239W-HA (Anstiegszeit_(10-90%) = 2,2 ± 0,2 ms, n = 7) die Mutation bereits zu einer Verkürzung der Anstiegszeit (p = 0,036). Koexpression mit DPP6 (1:5) führte zu einer weiteren Reduzierung (t₍₁₀₋₉₀₎ = 1,7 ± 0,2 ms, n = 10). Bei beiden Mutanten wurde also die Anstiegszeit durch DPP6 verkürzt (Abbildung 20).

2.3 Auswirkung der HA-Epitop-Markierung auf die untersuchten Parameter

Um zu überprüfen, ob die Hämagglutinin-Epitop-Markierung einen Einfluss auf die Kinetik und auf die Modulation des Kv4.2-Kanals durch DPP6 hat, wurde die Kv4.2A235V-Mutante auch ohne HA-Epitop gemessen und sowohl mit dem Kv4.2A235V-HA Kanal als auch mit dem Kv4.2wt-Kanal verglichen. Auf den folgenden Abbildungen sind die Stromspuren und Messdaten für die Inaktivierungs- und Aktivierungskinetiken der Mutante Kv4.2A235V dargestellt. Zum Vergleich werden die Ergebnisse der Mutante Kv4.2A235V-HA, des Kv4.2wt und des Kv4.2wt-HA-Kanals noch einmal gezeigt.

2.3.1 Inaktivierungskinetik

Abbildung 17 zeigt die Inaktivierungskinetik der Mutante Kv4.2A235V. Die Zeitkonstanten waren $\tau_1 = 9 \pm 0$ ms (63 ± 9 %), $\tau_2 = 37 \pm 2$ ms (29 ± 6 %) und eine langsame Komponente $\tau_3 = 890 \pm 59$ ms (8 ± 3 %, n = 3). Die Inaktivierungskinetik der Mutante Kv4.2A235V im Vergleich zur Mutante mit HA-Epitop war also beschleunigt. I_{20}/I_{max} von Kv4.2A235V betrug $0,37 \pm 0,05$ (n = 3) und war damit nur halb so groß wie I_{20}/I_{max} der HA-Epitop-markierten Mutante. Im Vergleich zu Kv4.2wt war die Inaktivierungskinetik nicht signifikant verändert (für I_{20}/I_{max} p = 0,34).

DPP6 zeigte auf Kv4.2A235V einen ähnlichen Effekt wie auf Kv4.2wt. Die Zeitkonstante τ_1 betrug bei Kotransfektion im cDNA-Verhältnis 1:5 $\tau_1 = 6 \pm 1$ (n = 3) und bei Kotransfektion im cDNA-Verhältnis 1:20 $\tau_1 = 8 \pm 1$ (n = 3). I_{20}/I_{max} betrug $0,18 \pm 0,03$ (1:5) und $0,23 \pm 0,01$ (1:40). Folglich wurde die Zeitkonstante τ_1 zweifach und I_{20}/I_{max} etwa 1,5-fach verkleinert. Dieser Effekt von DPP6 auf Kv4.2A235V war weniger stark ausgeprägt als der Effekt auf Kv4.2A235V-HA und Kv4.2wt-HA (Abbildungen 17 und 20).

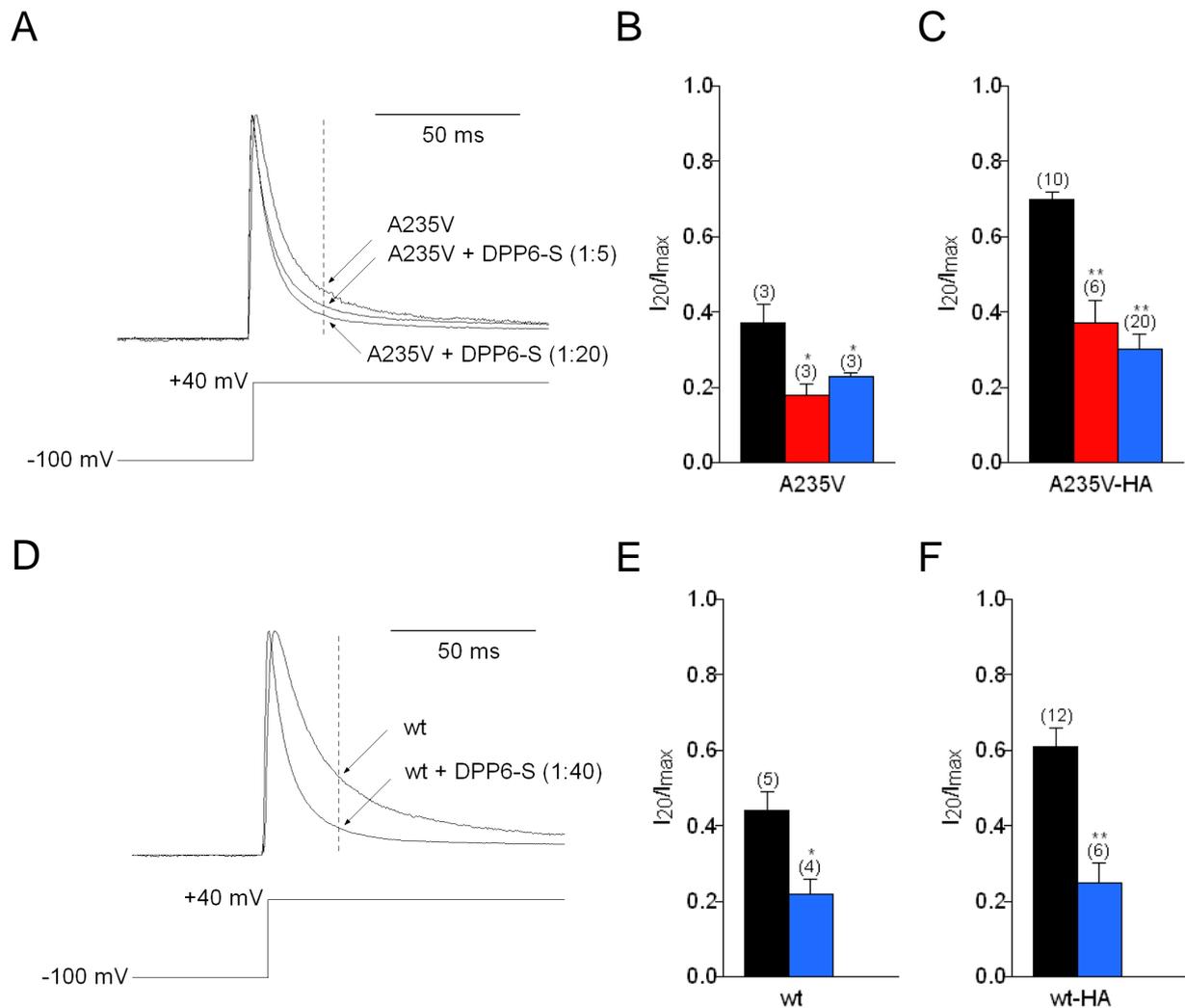


Abbildung 17. Inaktivierungskinetik (I_{20}/I_{max}) von Kv4.2A235V \pm DPP6 und Kv4.2wt \pm DPP6 mit und ohne HA-Epitop im Vergleich

A und **D**. Normierte Stromkurven von Kv4.2A235V \pm DPP6 (**A**) und Kv4.2wt \pm DPP6 (**D**). **B**, **C**, **E** und **F**. Inaktivierung nach 20 ms (vertikale gestrichelte Linie in den Stromkurven von **A** und **D**) ohne DPP6 (■), mit DPP6 im Verhältnis 1:5 (■) und mit DPP6 im Verhältnis 1:40 bzw. 1:20 bei Kv4.2A235V (■). Zum Vergleich: Inaktivierung nach 20 ms von Kv4.2A235V \pm DPP6 (**C**), Kv4.2wt \pm DPP6 (**E**) und Kv4.2wt-HA \pm DPP6 (**F**). Abbildungen **C**–**F** wurden bereits gezeigt. * $0,01 < p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit Kanal ohne DPP6.

Abbildung 18 zeigt die Erholung von der Inaktivierung der Mutante Kv4.2A235V und des Kv4.2wt-Kanals jeweils ohne und mit HA-Epitop-Markierung. Im Vergleich zur Mutante Kv4.2A235V mit HA (gestrichelte Linien in Abbildung 18 **B**) war die Zeitkonstante für Kv4.2A235V ($\tau_{rec} = 223 \pm 34$ ms, $n = 3$) signifikant kleiner ($p = 0,017$). Die Erholung von der Inaktivierung war in Gegenwart von DPP6 sowohl bei der Mutante Kv4.2A235V als auch Kv4.2wt-Kanal ohne HA-Epitop nur etwa zweifach beschleunigt (Tabelle 2). Der Effekt von DPP6 auf die Kanäle ohne HA-Epitop war also weniger stark ausgeprägt als auf die markierten Kanäle (Abbildungen 18 und 20).

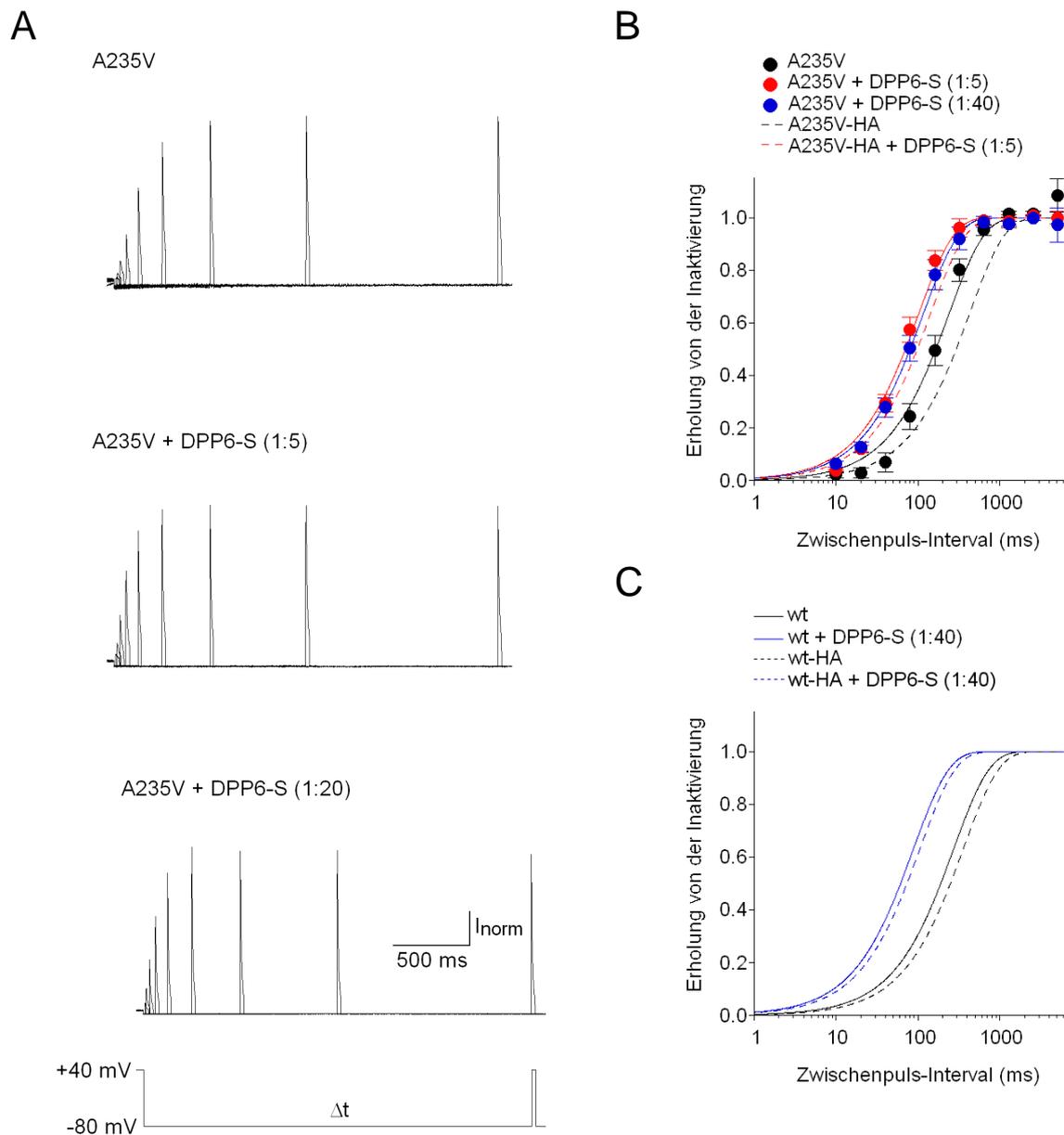


Abbildung 18. Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2A235V \pm DPP6 und Kv4.2wt \pm DPP6 mit und ohne HA-Epitop im Vergleich

A. Stromkurven der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2A235V \pm DPP6. **B** und **C.** Semi-logarithmische Darstellung der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2A235V \pm DPP6 und Kv4.2wt \pm DPP6 bei -80 mV (τ_{rec}). Die durchgezogene Linie stellt eine mono-exponentielle Funktion zur Annäherung dieser Kinetik dar. Die gestrichelten Linien zeigen die Vergleichsdaten des Kanals mit HA. **B.** ● Kv4.2A235V ohne DPP6 ($n = 3$), ● Kv4.2A235V und DPP6 (1:5) ($n = 3$) und ● Kv4.2A235V und DPP6 (1:40) ($n = 3$). # Die in Abbildung C zusammengefassten Ergebnisse wurden bereits gezeigt.

2.3.2 Aktivierungskinetik

Die Anstiegszeit betrug für Kv4.2A235V $1,7 \pm 0,2$ ms ($n = 5$) und war etwa halb so groß wie bei Kv4.2A235V-HA ($p = 0,0006$). Durch Koexpression mit DPP6 wurde sie weiter verkürzt (cDNA-Verhältnis 1:5: $0,8 \pm 0,1$ ms, $n = 3$, $p = 0,006$; cDNA-Verhältnis 1:20: $0,7 \pm 0,1$ ms, $n = 3$, $p = 0,006$). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen des Kv4.2wt-Kanals. Die Aktivierungskinetik sowohl der Mutante Kv4.2A235V als auch des Kv4.2wt-Kanals war schneller als bei Mutante und Kv4.2wt mit HA-Epitop. Durch Koexpression von DPP6-S wurde sie in beiden Fällen zusätzlich beschleunigt (Abbildung 19).

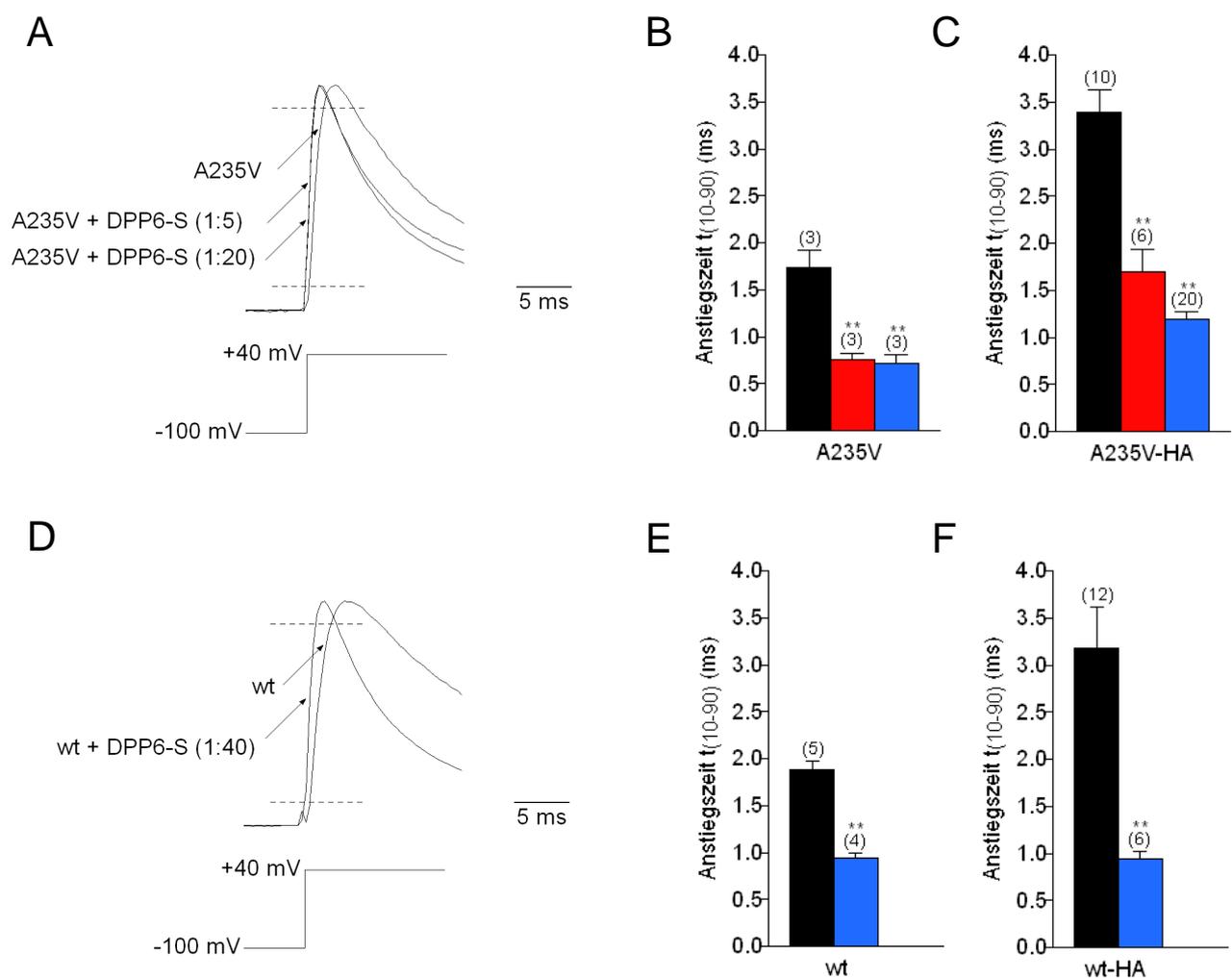


Abbildung 19. Aktivierungskinetik von Kv4.2A235V \pm DPP6-S und Kv4.2wt \pm DPP6-S ohne und mit HA-Epitop im Vergleich

A und D. Normierte Stromkurven von Kv4.2A235V \pm DPP6-S (A) und Kv4.2wt \pm DPP6-S (D). Die horizontalen, gestrichelten Linien markieren 10 und 90 % der Amplitude. **B, C, E und F.** Mittelwerte und Standardfehler der Anstiegszeit von 10 % auf 90 % der Kv4.2-Peakamplitude bestimmt für Kanal ohne DPP6-S (■) mit DPP6-S im Verhältnis 1:5 (■) und mit DPP6-S im Verhältnis 1:40 bzw. 1:20 bei Kv4.2A235V (■). Abbildungen B – F wurden bereits gezeigt. * $0,01 < p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit Kanal ohne DPP6-S.

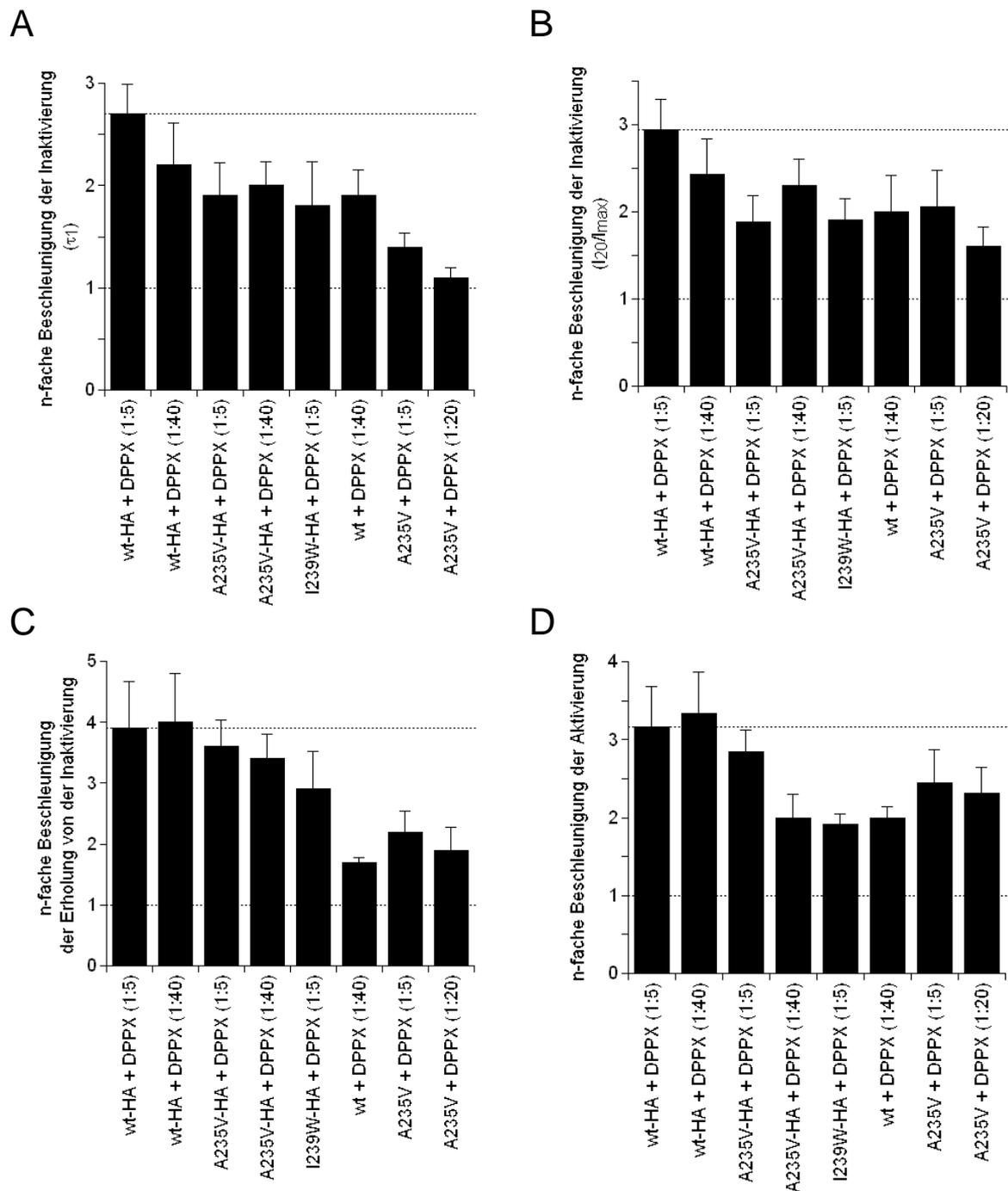


Abbildung 20. DPP6 induzierte Modulation der funktionellen Parameter von Kv4.2wt und Mutanten

Die Werte für **A.** Zeitkonstante τ_1 der Inaktivierung, **B.** Grad der Inaktivierung nach 20 ms, **C.** Erholung von der Inaktivierung und **D.** Aktivierung sind jeweils normiert auf Kv4.2wt-Kanal bzw. Mutante ohne DPP6. Die gestrichelten Linien markieren einen Wert von eins als keine Veränderung des Parameters sowie die DPP6 Modulation bei Kv4.2wt.

3 Eigenschaften des ternären Komplexes Kv4.2/DPP6/KChIP2.1

Kv4-Kanäle bilden das molekulare Korrelat der schnellen Komponente eines transienten Auswärtsstroms (I_{to}) in Kardiomyozyten und des somatodendritischen A-Typ-Stroms (I_{SA}) in Neuronen. Neben den DPPs (DPP6 und DPP10) spielen die sogenannten KChIPs (K-Channel-interacting proteins) eine wichtige Rolle bei der Modulation der funktionellen Eigenschaften der Kv4-Ströme (An *et al.*, 2000; Bähring *et al.*, 2001b). In der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaften des ternären Komplexes bestehend aus Kv4.2wt-HA, DPP6 und KChIP2.1. untersucht. Dabei wurde insbesondere die Frage gestellt, ob die Effekte von DPP6 und KChIP2 additiv sind. Dies wäre ein Hinweis auf verschiedene Mechanismen der Kanalmodulation.

3.1 Inaktivierungskinetik des ternären Komplexes

Während DPP6 die Inaktivierung beschleunigt, ist für KChIPs bekannt, dass sie die initiale Inaktivierung verlangsamen. Für den ternären Komplex Kv4.2-HA+DPP6+KChIP2.1 war eine schnelle Komponente, $\tau_1 = 18 \pm 1$ ms, für 89 ± 5 % des gesamten Abfalls verantwortlich. Eine mittlere Komponente, $\tau_2 = 61 \pm 9$ ms, zeigte sich für 9 ± 4 % und eine langsame Komponente, $\tau_3 = 1052 \pm 138$ ms, für 9 ± 2 % des gesamten Abfalls verantwortlich ($n = 5$). Der Grad der Inaktivierung nach 20 ms betrug $0,48 \pm 0,05$ ($n = 5$). Im Vergleich zur Koexpression von Kv4.2-HA+DPP6-S war I_{20}/I_{max} signifikant vergrößert ($p = 0,0003$) und im Vergleich zum Kv4.2-HA-Kanal allein leicht verkleinert. Diese Veränderung war aber nicht signifikant ($p = 0,06$). Die Ergebnisse zeigen, dass in Gegenwart von KChIP2 die DPP6-induzierte Beschleunigung der Inaktivierung zum Teil aufgehoben wird. Im Vergleich zum Kv4.2wt-HA-Kanal alleine ohne Koexpression einer akzessorischen Untereinheit war kein signifikanter Effekt sichtbar (Abbildung 21). Diese Daten lassen vermuten, dass die Effekte von KChIP2.1 und DPP6 additiv sind.

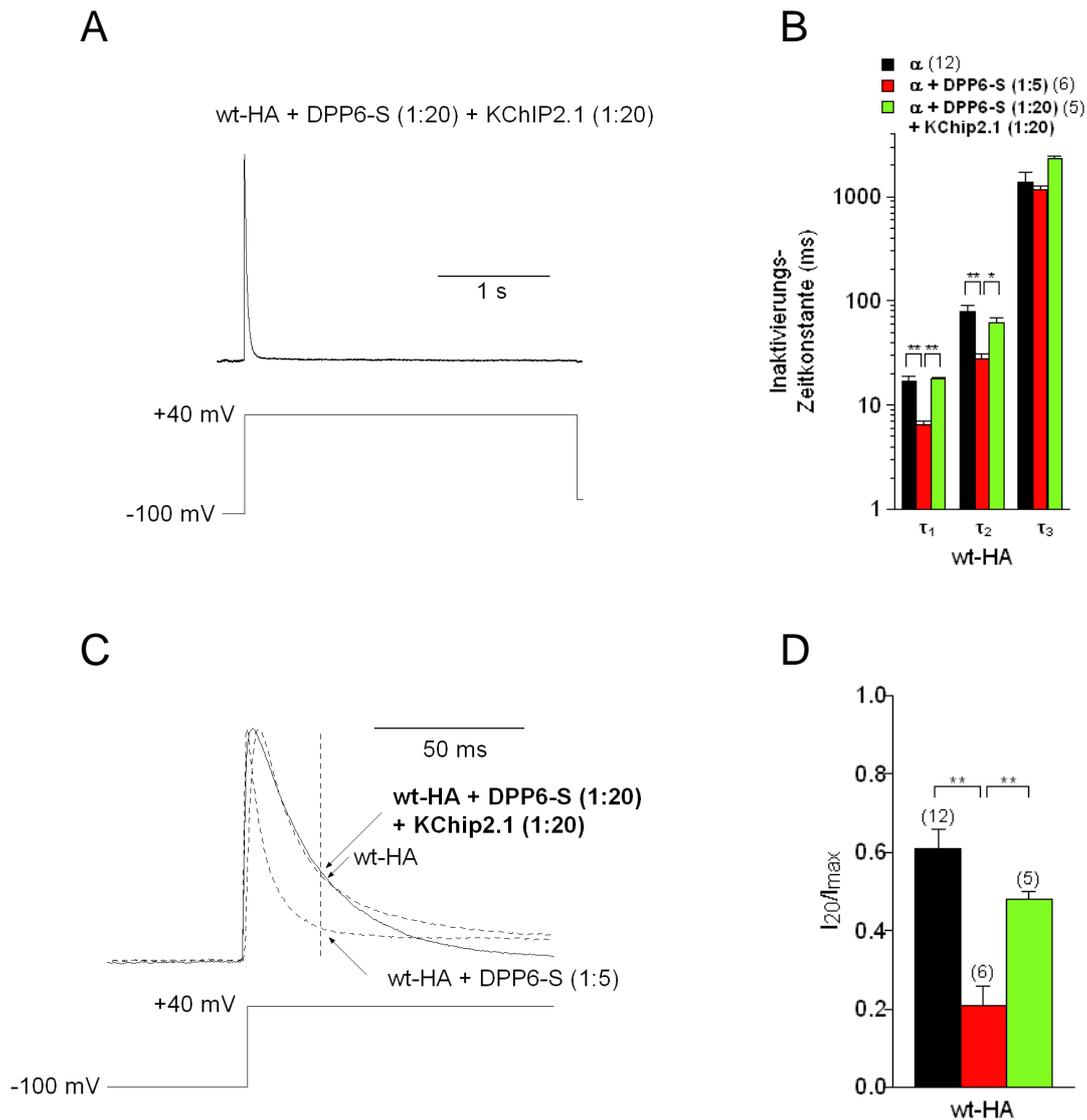


Abbildung 21. Inaktivierung von Kv4.2wt-HA \pm DPP6 \pm KChip2.1

A und **C**. Normierte Stromkurven bei einem Puls von -100 mV auf $+40$ mV von Kv4.2wt-HA \pm DPP6-S \pm KChip2.1 in HEK239-Zellen. **B**. Zeitkonstanten ermittelt mit einer 3-fach-exponentiellen Beschreibung der Inaktivierungskinetik von Kv4.2-Strömen während einer Depolarisierung nach $+40$ mV. Dargestellt sind die Mittelwerte der schnellen (τ_1), mittleren (τ_2) und langsamen (τ_3) Komponente mit ihren Standardfehlern auf einer logarithmischen Skala. **C**. Normierte Stromkurven (siehe A) bei starker Vergrößerung. Die vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt 20 ms nach Beginn des Pulses. Hier wurde der Grad der Inaktivierung (I_{20}/I_{max}) bestimmt. **D**. Inaktivierung nach 20 ms (vertikale gestrichelte Linie in der Stromkurve von C) von ■ Kv4.2wt-HA ohne DPP6 ($n = 12$), ■ Kv4.2wt-HA und DPP6 (1:5) und ■ Kv4.2wt-HA + DPP6 (1:5) + KChip2.1(1:20). * $0,01 < p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Ein additiver Effekt der beiden akzessorischen Untereinheiten zeigte sich auch in der Erholung von der Inaktivierung. Bekannt ist, dass diese sowohl durch DPP6 als auch durch KChip2 beschleunigt wird. Für den ternären Komplex ($\tau_{rec} = 14 \pm 1$ ms, $n = 10$; Abbildung 22) war die Erholung aus der Inaktivierung sowohl im Vergleich zum Kv4.2wt-HA ($p = 0,0005$) als auch im Vergleich zur Koexpression von Kv4.2wt-HA und DPP6 ($p = 0,0001$) deutlich beschleunigt.

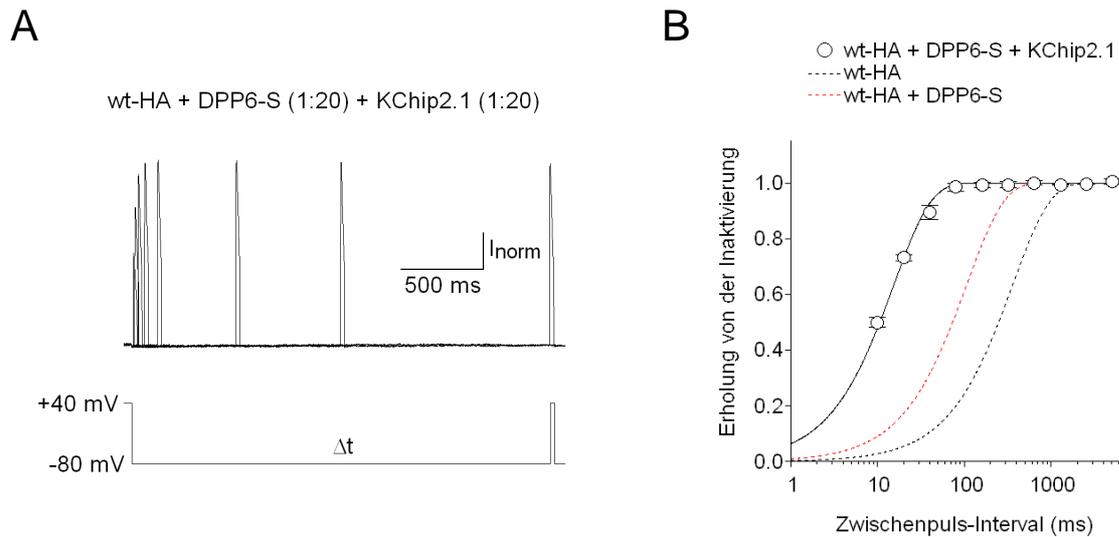


Abbildung 22. Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2wt-HA ± DPP6-S ± KChip2.1

A. Stromkurven von Kv4.2wt-HA + DPP6-S + KCHIP2.1, die mit dem Protokoll für die Erholung von der Inaktivierung, evoziert wurden. Die Zeit zwischen zwei Depolarisationen (Δt) verdoppelte sich mit jedem neuen Puls. **B.** Semi-logarithmische Darstellung der Erholung von der Inaktivierung bei -80 mV (τ_{rec}). Die durchgezogene Linie stellt eine mono-exponentielle Funktion zur Annäherung dieser Kinetik dar. ○ Kv4.2wt-HA + DPP6-S (1:20) + KChip2.1(1:20) ($n = 5$).

3.2 Aktivierungskinetik des ternären Komplexes

Auch $t_{(10-90)}$ des ternären Komplexes unterschied sich deutlich sowohl von Kv4.2-HA als auch von Kv4.2-HA + DPP6. Sie betrug für Kv4.2-HA + DPP6 + KChIP2.1 $1,5 \pm 0,2$ ms ($n = 5$) und war somit im Vergleich zu Kv4.2-HA verkürzt ($p = 0,006$) und im Vergleich zu Kv4.2-HA + DPP6 ($p = 0,027$) verlängert (Abbildung 23).

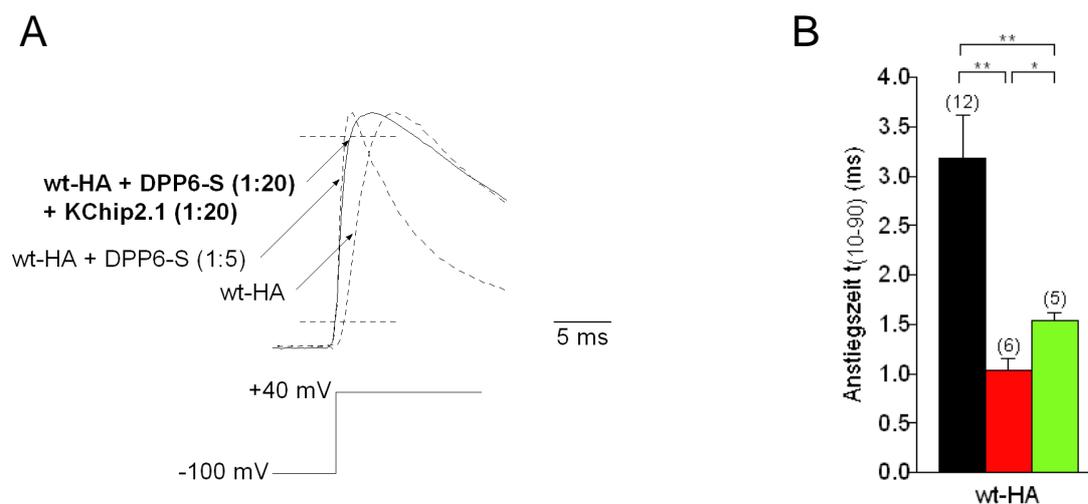


Abbildung 23. Aktivierungskinetik von Kv4.2wt-HA ± DPP6-S ± KChip2.1

A. Normierte Stromkurven von Kv4.2wt-HA ± DPP6-S ± KChip2.1. Die horizontalen, gestrichelten Linien markieren 10 und 90 % der Amplitude. **B.** Mittelwerte und Standardfehler der Anstiegszeit von 10 % auf 90 % der Kv4.2-Peakamplitude bestimmt für ■ Kv4.2wt-HA ohne DPP6-S, ■ Kv4.2wt-HA und DPP6-S (1:5) und ■ Kv4.2wt-HA + DPP6-S + KChip2.1 (1:20). * $0,01 < p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4 Effekt von DPP6 auf die Kanaldeaktivierung

Um den Effekt von DPP6 auf die Deaktivierungskinetik Kv4.2-Kanal vermittelter Ströme zu untersuchen, wurde die Zellmembran 4 ms lang auf +40 mV depolarisiert. Anschließend wurden bei Testpotentialen zwischen -100 mV und -50 mV die *Tail*-Ströme gemessen (Abbildung 24). Der Kinetik der *Tail*-Ströme wurde eine zweifach-exponentiellen Funktion angeglichen. Um die Messgenauigkeit bei dieser sehr schnellen Reaktion zu erhöhen, wurde Rb⁺ in einer Konzentration von 135 mM als Ladungsträger in der Extrazellulärlösung und in einer Konzentration von 125 mM in der Intrazellulärlösung verwendet. Durch die im Vergleich zu K⁺ längere Aufenthaltsdauer in der Pore verlangsamt Rb⁺ das Schließen der Kanäle (Sala & Matteson, 1991).

Bei einem Testpotential von -80 mV bewirkte die Koexpression von Kv4.2 und DPP6 (im cDNA-Verhältnis 1:20) keine signifikante Veränderung der Deaktivierungskinetik im Vergleich zum Kanal ohne DPP6 von $\tau_{-80} = 3,9 \pm 1,8$ ms auf $\tau_{-80} = 3,0 \pm 0,2$ ms ($p = 0,029$). Auch der Anteil der Amplitude der Zeitkonstante τ_1 an der Gesamtamplitude wurde nicht beeinflusst.

Es konnte zuvor gezeigt werden, dass eine Deletion der ersten vierzig Aminosäuren des N-terminalen Endes des Kv4.2-Kanals (Kv4.2 Δ 40) nicht nur zu einer verlangsamt Inaktivierungskinetik, sondern auch zu einer verlangsamt Deaktivierungskinetik der Mutante im Vergleich zum Wildtyp führt (Bähring *et al.*, 2001a).

Möglicherweise verhindert die Wirkung dieses N-Terminus, dass ein Effekt durch DPP6 auf die Deaktivierungskinetik der durch den Kv4.2-Kanal vermittelten Ströme messbar ist. Um diese Hypothese zu prüfen, untersuchten wir die durch den Kv4.2 Δ 40-Kanal vermittelten Rb⁺-*Tail*-Ströme analog zu denen des Wildtyps. Koexpression von Kv4.2 Δ 40 und DPP6 führte zu einer signifikanten Beschleunigung der Deaktivierungskinetik bei -80 mV von $\tau_{-80} = 9,6 \pm 1,4$ ms (Kv4.2 Δ 40) auf $\tau_{-80} = 3,7 \pm 0,2$ ms (Kv4.2 Δ 40 + DPP6).

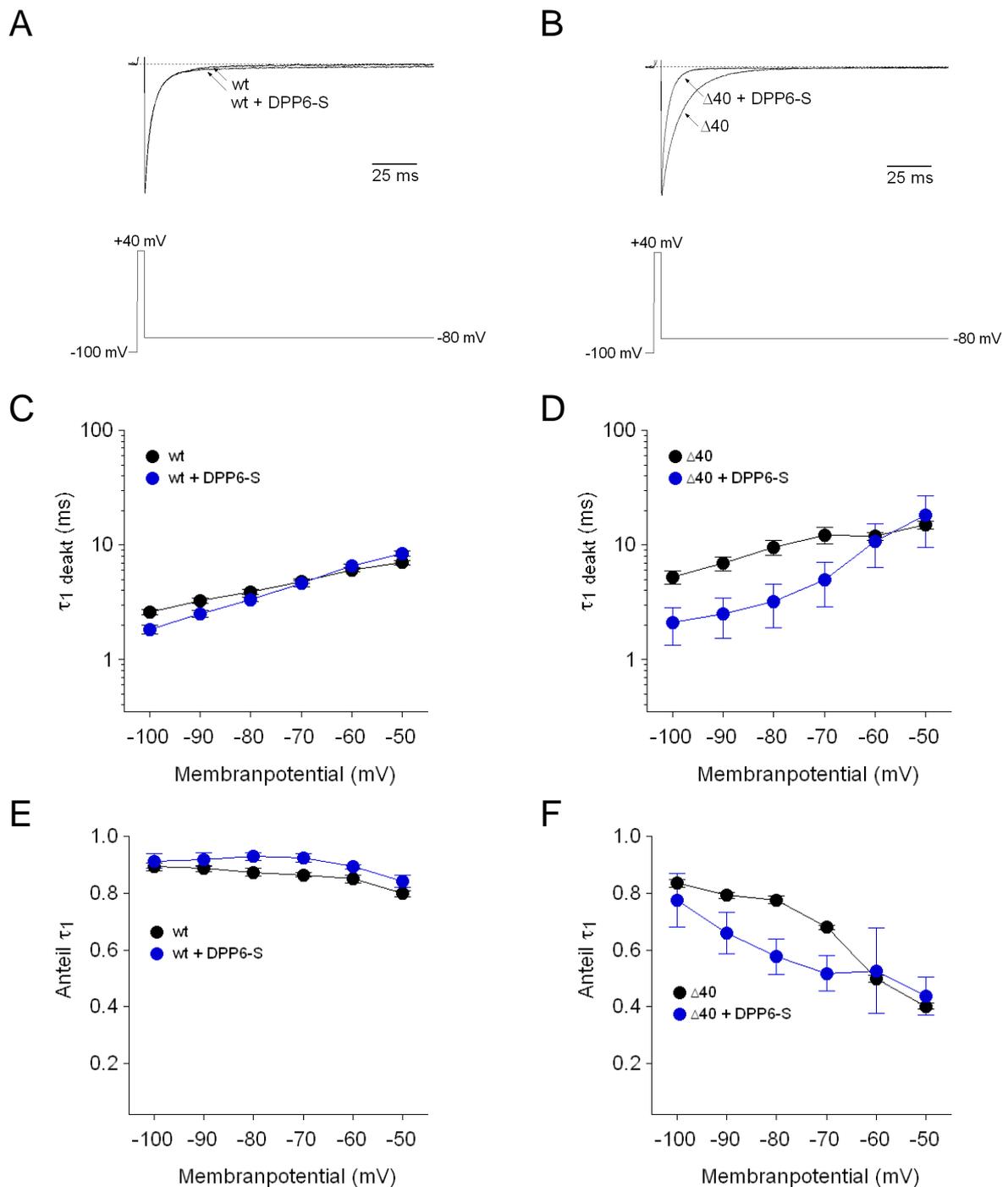


Abbildung 24. Deaktivierung von Kv4.2wt \pm DPP6-S und Kv4.2 Δ 40 \pm DPP6-S

Exemplarische Darstellung von *Tail*-Strömen vermittelt durch den Kv4.2- (A) bzw. Kv4.2 Δ 40-Kanal (C) jeweils ohne und mit DPP6-S gemessen in HEK-Zellen bei -80 mV nach einer Depolarisation auf +40 mV für 4 ms. Die Ströme wurden auf die negative Peakamplitude normiert und in einer Extrazellulärlösung mit 135 mM Rb⁺ und einer Intrazellulärlösung mit 125 mM Rb⁺ gemessen. Die zu jedem Zeitpunkt über der Zellmembran anliegende Spannung in mV ist unter den Stromspuren dargestellt. Als gestrichelte Linie ist die Nulllinie der Stromamplitude gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardfehler der Zeitkonstanten der Deaktivierung wurden für Kv4.2- (B) und Kv4.2 Δ 40-vermittelte Ströme (D) bestimmt und gegen das Testpotential aufgetragen (n = 9 bzw. n = 4). Nach einem 4 ms langem Vorpuls, welcher die Kanäle öffnete, wurden als Testpotentiale Werte zwischen -100 und -50 mV verwendet. Die Zeitkonstanten wurden durch eine zweifach-exponentielle Beschreibung der Deaktivierung bestimmt. E und F: Anteil der Amplitude der Zeitkonstante (τ_1) an der Gesamtamplitude. C und E: ● Kv4.2wt ohne DPP6 (n = 4), ● Kv4.2wt + DPP6 (1:20) (n = 9). D und F: ● Kv4.2 Δ 40-HA ohne DPP6 (n = 4) und ● Kv4.2 Δ 40-HA + DPP6 (1:20) (n = 9).

Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass DPP6 mehrere Effekte auf das Schaltverhalten von Kv4.2-Kanälen hat. Die Effekte auf die Aktivierung und die Inaktivierung waren bereits bekannt und konnten in dieser Arbeit für einen HA-Epitop-markierten Kv4.2-Kanal bestätigt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass DPP6 das Kanalschließverhalten beeinflusst. Für die Bindung von DPP10 an Kv4.3 konnten bereits Struktur determinanten charakterisiert werden (Ren *et al.*, 2005). Die Untersuchung zweier homologer Punktmutanten des S2 Segmentes von Kv4.2 zeigte, dass die Mutationen die Inaktivierungskinetik des Kanals verändern. Allerdings hatte DPP6 auch auf die Mutanten einen Effekt. Die Charakterisierung des ternären Komplexes bestehend aus Kv4.2, DPP6 und KChIP2.1 ergab, dass die Effekte von DPP6 und KChIP2 additiv sind.

1 Effekt von akzessorischen Untereinheiten auf das Schaltverhalten von Kv4.2-Kanälen

Die kinetischen und molekularen Grundlagen der Kv4-Kanal-Inaktivierung werden seit einiger Zeit intensiv untersucht. Kv4-Kanäle bestehen aus 4 porenbildenden α -Untereinheiten und inaktivieren auf zwei verschiedene Arten: (1) Der offene Kanal wird durch die N-terminale Inaktivierungsdomäne verschlossen (Demo & Yellen, 1991) oder (2) der geschlossene Kanal wird inaktiviert (Jerng *et al.*, 1999; Bähring *et al.*, 2001b). Das Inaktivierungspartikel induziert eine schnelle Inaktivierung, die unabhängig ist von der Ladung des Partikels und durch Depolarisierung etwas beschleunigt wird (Jerng & Covarrubias, 1997). Der offen-inaktivierte Zustand ist instabil und daher transient bei Kv4 Kanälen. Während langer Depolarisationen schließen Kv4-Kanäle bevorzugt und akkumulieren im geschlossen-inaktivierten Zustand (Bähring *et al.*, 2001b).

Kv4 vermittelte Ströme haben die Eigenschaft, dass sich ihre Inaktivierungskinetik nur mit einer Summe aus drei Exponentialfunktionen beschreiben lässt (Bähring *et al.*, 2001a). Auch bei Koexpression mit DPP6 ließen sich die ermittelten Daten am besten mit einer Summe aus drei Exponentialfunktionen beschreiben. Dabei konnte der bereits bekannte DPP6-Effekt, die Beschleunigung der Inaktivierung (Nadal *et al.*, 2003; Jerng *et al.*, 2004b), für einen HA-Epitop markierten Kanal bestätigt werden.

Die Eigenschaften Kv4-vermittelter Ströme werden durch akzessorische Untereinheiten, wie z.B. KChIPs oder DPPs, beeinflusst. Die verschiedenen KChIPs haben ähnliche Effekte auf die physiologischen Eigenschaften der Kv4-Kanäle. Meist verschieben sie die Inaktivierungskurve in Richtung Depolarisation, beschleunigen die Erholung aus der Inaktivierung und verlangsamen die initiale Inaktivierung (An *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu KChIPs wird durch DPP6 die Inaktivierung beschleunigt. In HEK293-Zellen konnte gezeigt werden, dass DPP6 in erster Linie die schnelle Komponente der Inaktivierung beschleunigt und dass der relative Anteil der einzelnen Komponenten gleich bleibt. Diese Ergebnisse weichen von den von Jerng publizierten Daten ab (Jerng *et al.*, 2004b). Jerng *et al.* konnten zeigen, dass DPP6 nicht die Zeitkonstante beeinflusst, sondern dem Anteil der schnellen Zeitkonstanten mehr Gewicht verleiht (Jerng *et al.*, 2004b). Darüber hinaus ergaben die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass die Erholung aus der Inaktivierung durch DPP6 ebenfalls beschleunigt wird. Dieser Effekt ist von besonderer Bedeutung, da die schnelle Erholung von der Inaktivierung eine charakteristische Eigenschaft Kv4-vermittelter A-Typ-Ströme ist (Nadal *et al.*, 2006). Nadal *et al.* konnten in Oozyten und CHO Zellen zeigen, dass DPP6 sowohl die Kinetik von Kv4.2 als auch die des verwandten Kv4.3 Kanals in ähnlicher Weise verändert (Nadal *et al.*, 2003).

Die Wirkung von DPP6 auf die Aktivierung, die Inaktivierung und die Erholung aus der Inaktivierung wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht (Nadal *et al.*, 2003). Inwiefern aber beeinflusst DPP6 das Schließverhalten des Kv4.2-Kanals? Ein deutlicher Effekt von DPP6 auf die Deaktivierungskinetik von Kv4.2, konnte nur gezeigt werden, wenn die ersten 40 Aminosäuren des Kanals entfernt wurden (Kv4.2 Δ 40). Bereits frühere Untersuchungen ergaben, dass der N-Terminus nicht nur bei der Inaktivierung, sondern auch bei der Deaktivierung des Kv4.2-Kanals eine wichtige Rolle spielt (Bähring *et al.*, 2001a; Gebauer *et al.*, 2004). Eine Entfernung der ersten 40 Aminosäuren führt zu einer Stabilisierung des geöffneten Zustandes des Kanals, was in einer Verlangsamung der Deaktivierungskinetik resultiert. Eine mögliche Erklärung warum eine Beschleunigung der Deaktivierungskinetik durch DPP6 nur bei der Deletionsmutante (Δ 40), nicht aber beim Wildtyp beobachtet werden konnte, besteht in der Annahme, dass eine weitere Beschleunigung der ohnehin schnellen Deaktivierung des Wildtyp-Kanals nicht möglich ist.

2 Strukturelle Determinanten der Kv4.2-DPP6-Interaktion

Verschiedene Arten der molekularen Interaktion zwischen Poren-bildenden α -Untereinheiten und akzessorischen β -Untereinheiten sind an der Beeinflussung des Kanalschaltverhaltens beteiligt. So beeinflussen zum Beispiel Proteine der KCNE Familie das Kanalschaltverhalten über ihre Transmembranregion, während Kv β und KChIPs von der intrazellulären Seite wirken.

Wie könnte so eine Interaktion zwischen DPP6 und Kv4.2 aussehen? Unter den bisher bekannten Dipeptidyl-Aminopeptidasen besitzt DPP6 eine hohe Sequenzidentität mit DPP10 (Jerng *et al.*, 2004b). Die Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz sind nicht auf bestimmte Regionen beschränkt, sondern verteilen sich über die gesamte Proteinlänge (Jerng *et al.*, 2004b). Es ist bekannt, dass die Effekte von DPP10 auf Kv4.2 und Kv4.3 denen von DPP6 ähneln (Jerng *et al.*, 2004b). Struktur determinanten für die Interaktion von DPP10 und Kv4.3 wurden bereits untersucht (Ren *et al.*, 2005). Ren *et al.* generierten Chimären zwischen Kv1.4 und Kv4.3 und stellten fest, dass die Chimäre, die vom N-Terminus bis zum Ende des S1-Segmentes aus Kv1.4 bestand, nicht mehr in der Lage war, DPP10 zu binden. Eine Eliminierung des S2-Segmentes des Kv4.3 Kanals führte zu einer starken Reduktion der DPP10 Bindung (Ren *et al.*, 2005). Um die Region für die Interaktion zwischen DPP10 und Kv4.3 weiter einzugrenzen, wurden die Auswirkungen verschiedener Punktmutationen des Kv4.3-Kanals auf die Interaktion zwischen DPP10 und Kv4.3 untersucht (Ren *et al.*, 2005). Ren *et al.* konnten zeigen, dass Mutationen im Bereich des S2-Segmentes des Kv4.3-Kanals zu einer Bindungsdefizienz für DPP10 führen. Um die Interaktion zwischen DPP6 und Kv4.2 zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Punktmutanten homologer Aminosäuren des Kv4.2 Kanals verwendet. Diese Punktmutanten (Kv4.2A235V-HA, Kv4.2I239W-HA) wurden allein und mit DPP6-S in HEK293-Zellen exprimiert und die resultierenden Ströme gemessen. Die Messungen ergaben, dass die homologen Mutationen im Kv4.2-Kanal zwar zu geringfügigen Veränderung der Kanaleigenschaften führen, aber der Kanal nicht seine Fähigkeit verliert mit DPP6 zu interagieren. Möglicherweise interagiert DPP6 aufgrund von strukturellen Unterschieden anders mit Kv4-Kanälen als DPP10.

Sowohl die Aminosäuresequenzen von DPP6 und DPP10 als auch die Effekte dieser beiden Dipeptidyl-Peptidase verwandten Proteine auf Kv4-Kanäle sind sich ähnlich, aber nicht identisch. DPPs bestehen aus einem kurzen N-terminalen zytosolischen Peptid, einer

Transmembrandomäne und einer großen extrazellulären Domäne. Die Transmembrandomäne dieser Proteine ist hoch konserviert (Ren *et al.*, 2005). Das am wenigsten konservierte Segment der DPPs ist der N-Terminus (Jerng *et al.*, 2004b). Von den an die Transmembrandomäne angrenzenden 14 Aminosäuren des N-Terminus unterscheiden sich DPP10 und DPP6 in 4 Aminosäuren. Innerhalb der DPP6-Subfamilie (DPP6-S, L und K) sind diese Aminosäuren identisch. An diese 14 Aminosäuren grenzt eine Peptidsequenz unterschiedlicher Länge (variabler N-Terminus), die auch innerhalb der DPP6-Subfamilie verschieden ist (Nadal *et al.*, 2006).

Während der Effekt von DPP10 und DPP6 auf die Anstiegszeit von Kv4-Kanälen fast gleich ist, wird die Inaktivierung durch DPP10 stärker beeinflusst als durch DPP6 (Jerng *et al.*, 2004b). Der N-Terminus scheint eine wichtige Rolle für das Ausmaß des DPP-Effektes zu spielen. Jerng *et al.* konnten zeigen, dass Chimären bestehend aus DPP6 mit dem N-Terminus von DPP10 den gleichen Effekt auf Kv4.2 haben wie DPP10 und umgekehrt (Jerng *et al.*, 2004b). Darüber hinaus konnten sie herausarbeiten, dass ein HA-Epitop am N-Terminus des DPP10 die Beschleunigung der Inaktivierung verhindert, ohne dass weitere Parameter beeinflusst wurden. Auch Ren *et al.* konnten diese Beobachtung für einen Flag-Epitop-markierten N-Terminus bestätigen (Ren *et al.*, 2005). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Beeinflussung der Inaktivierung durch DPP10 anders abläuft (möglicherweise über den N-Terminus) als die Effekte auf andere Parameter, die eventuell über Interaktion mit der Transmembrandomäne verlaufen (Ren *et al.*, 2005). Das N-terminale Peptid der DPPs könnte als Inaktivierungspartikel fungieren (Jerng *et al.*, 2004b) und die Kanalpore von der intrazellulären Seite verschließen, ähnlich wie die Interaktion zwischen Kv β Untereinheiten und Kv1 (Rettig *et al.*, 1994).

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Jerng *et al.* konnten Nadal *et al.* zeigen, dass verschiedene Splicevarianten von DPP6 (S, L und K) sowie eine Mutante, bei der der variable N-Terminus deletiert war, sich nur gering in ihrem Effekt auf Kv4 unterscheiden (Jerng *et al.*, 2004b; Nadal *et al.*, 2006). Die Determinanten für die Bindung der DPPs könnten daher in dem Bereich der 14 Aminosäuren zwischen dem variablen N-Terminus der DPP6-Subfamilie und der bei DPP6 und DPP10 hoch konservierten Transmembrandomäne liegen.

Neben den erwähnten strukturellen Unterschieden zwischen DPP10 und DPP6 könnten Unterschiede zwischen Kv4.2 und Kv4.3 dafür zuständig sein, dass DPP6 mit den Kv4.2-Mutanten interagiert. Der Aminosäurevergleich der Kv4-Kanäle ergibt, dass Kv4.3 dem

Kv4.2-Kanal ähnlicher ist als dem Kv4.1-Kanal. Kv4.3-Kanäle vermitteln ebenfalls schnell inaktivierende A-Typ Ströme. Allerdings sind die kinetischen Eigenschaften von Kv4.2 und Kv4.3 bei Koexpression in HEK293-Zellen verschieden, z.B. inaktiviert Kv4.2 schneller als Kv4.3 (Guo *et al.*, 2002).

3 Ternärer Kanal-Komplex und physiologische Bedeutung

Neben den DPPs (DPP6 und DPP10) spielen die sogenannten KChIPs (*K-Channel-interacting proteins*) eine wichtige Rolle bei der Modulation der funktionellen Eigenschaften der Kv4-Ströme (An *et al.*, 2000; Bähring *et al.*, 2001b). KChIPs sind Ca^{2+} -bindende Proteine, die verwandt sind mit neuronalen Ca^{2+} -Sensoren (NCS) (Braunewell & Gundelfinger, 1999; Berridge *et al.*, 2000). Sie binden an den N-Terminus von Kv4-Kanälen und beeinflussen das Kanalschaltverhalten in charakteristischer Weise (An *et al.*, 2000). Bekannte Effekte von KChIPs sind: verlangsamte initiale Inaktivierung, beschleunigte Erholung aus der Inaktivierung und positive Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung (An *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2004). Ein Fehlen von KChIP kann zu einem fast vollständigen Verlust der Kv4-Ströme führen (Kuo *et al.*, 2001).

Als charakteristische Eigenschaften nativer A-Typ Ströme (z.B. I_{to} in Kardiomyozyten) gelten schnelle Aktivierung, schnelle Inaktivierung und schnelle Erholung aus der Inaktivierung (Jerng *et al.*, 2004b). Koexpression von Kv4.3 mit der β -Untereinheit KChIP2 allein führt nicht zu den charakteristischen Eigenschaften des nativen I_{to} (Deschenes & Tomaselli, 2002). So fehlen zum Beispiel die schnelle Inaktivierung und die schnelle Erholung von der Inaktivierung. Dies lässt vermuten, dass weitere akzessorische Untereinheiten an der Bildung von I_{to} beteiligt sind (Nadal *et al.*, 2003; Radicke *et al.*, 2005).

Möglicherweise stellen DPPs diese weitere Komponente nativer Kanalkomplexe dar. DPP6 konnte sowohl in Rattenneuronen (Kin *et al.*, 2001; Jerng *et al.*, 2005) als auch im menschlichen Herzen gemeinsam mit KChIP nachgewiesen werden (Radicke *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu KChIPs wird durch DPP6 die Inaktivierung beschleunigt (Nadal *et al.*, 2001). Dieser Effekt könnte erklären, warum I_{SA} in Neuronen und I_{to} in Herzmuskelzellen häufig schneller inaktivieren als Ströme heterolog exprimierter Kv4 Proteine (Jerng *et al.*, 2005;

Radicke *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnte bereits nachgewiesen werden, dass DPPs und KChIPs auch in heterologen Expressionssystemen mit Kv4 Proteinen einen Kanalkomplex mit verschiedenen neuen funktionellen Eigenschaften bilden (Jerng *et al.*, 2005).

Es existieren 3 Subfamilien von Kv4 α (Kv4.1, Kv4.2 und Kv4.3 L und S), vier Subfamilien KChIPs mit verschiedenen N-terminalen Splicevarianten (KChIP1a-b, KChIP2a-d, KChIP3, KChIP4a-b) und wie bereits beschrieben verschiedene DPPs. Daraus folgt eine Vielzahl möglicher Kombinationen (Jerng *et al.*, 2005). In Kardiomyozyten von Mäusen stellt Kv4.2 die wichtigste α -Untereinheit für die Bildung von I_{to} dar (Nerbonne & Kass, 2005). Um die Überprüfung der in einem heterologen Expressionssystem generierten Daten in vivo im Mausmodell zu ermöglichen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Eigenschaften des ternären Komplexes bestehend aus Kv4.2wt-HA, DPP6-S und KChIP2.1 untersucht. Verschiedene ternäre Komplexe bestehend aus Kv4 α -Untereinheiten, KChIPs und DPPs sind bereits von anderen Arbeitsgruppen charakterisiert worden. Nadal *et al.* untersuchten einen Komplex bestehend aus Kv4.2 + DPP6 + KChIP1 in *Xenopus* Oocyten (Nadal *et al.*, 2003). Interessanterweise unterschied sich der ternäre Komplex kaum in seiner Inaktivierungskinetik von Kv4.2/DPP6. Auch die Erholung aus der Inaktivierung war nicht signifikant schneller als die von Kv4.2/DPP6 oder Kv4.2/KChIP. Unsere Ergebnisse des in HEK293-Zellen exprimierten ternären Komplexes unterschieden sich von diesen. Der von uns charakterisierte ternäre Komplex inaktivierte langsamer als Kv4.2/DPP6 und erholte sich wesentlich schneller aus der Inaktivierung als Kv4.2/DPP6 bzw. Kv4.2/KChIP2.1. Die Effekte von KChIP und DPP6 im ternären Komplex waren also nahezu additiv. Dies deutet auf verschiedene Wirkmechanismen der beiden akzessorischen Untereinheiten hin. Ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften wies der von Jerng *et al.* in Oozyten und CHO-Zellen charakterisierte ternäre Komplex bestehend aus Kv4.2 + DPP6-S + KChIP3 auf (Jerng *et al.*, 2005).

Die eingesetzte KChIP-Komponente könnte eine Rolle für diese Unterschiede spielen. Die KChIP-Bindung an die N-terminale Inaktivierungsdomäne stört die Offen-Kanal-Inaktivierung (Jerng *et al.*, 2004a) und begünstigt somit die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung (Jerng *et al.*, 2005). Die Effekte von KChIPs auf die Kv4.2-Steuerung unterscheiden sich je nach KChIP-Variante (Jerng *et al.*, 2005). So ist zum Beispiel die Erholung aus der Inaktivierung bei Koexpression von Kv4.2 mit KChIP2.1 und KChIP3.1 schneller als bei Koexpression mit KChIP1.1 (Gebauer, 2004).

Welche Rolle spielt die DPP-Komponente bei der Modulation der Kanaleigenschaften? Koexpression von Kv4.2 mit KChIP3 und entweder DPP6 oder DPP10 führt zu Kanaleigenschaften, die das Vorliegen ternärer Komplexe vermuten lassen. Besonders auffällig ist dabei die beschleunigte Erholung aus der Inaktivierung (Jerng *et al.*, 2005). In dem von Jerng *et al.* untersuchten ternären Komplex bestehend aus Kv4.2 + KChIP3 + DPP10 übte DPP10 einen dominierenden Effekt auf die Inaktivierung aus. Koexpression mit KChIP3 führte nur zu einer geringen Verlangsamung der Inaktivierung (Jerng *et al.*, 2005). Allerdings wurde ähnlich wie bei unseren Versuchen mit DPP6 und KChIP2.1 die Erholung aus der Inaktivierung stärker beschleunigt als bei Koexpression einer β -Untereinheit allein. Im Vergleich zu Kv4.2/DPP6 inaktivierte Kv4.2/DPP10 wesentlich schneller (Jerng *et al.*, 2005). Der ternäre Komplex Kv4.2/KChIP3/DPP6 in CHO-Zellen inaktivierte langsamer als der Komplex mit DPP10 (Jerng *et al.*, 2005). Diese Unterschiede der Inaktivierungskinetik zwischen Kv4.2/KChIP3/DPP6 und Kv4.2/KChIP3/DPP10 lassen vermuten, dass in Gegenwart von KChIPs die eingesetzte DPP-Komponente für die Beeinflussung des Kanalschaltverhaltens eine entscheidene Rolle spielt (Jerng *et al.*, 2005).

Koexpression von Kv4.3, DPP6 und KChIP2 verändert den transienten Auswärtsstrom so, dass er den charakteristischen Eigenschaften des transienten Kaliumauswärtsstroms (I_{to}) nativer Kardiomyozyten ähnelt (Radicke *et al.*, 2005). I_{to} spielt eine Rolle während der schnellen Phase der Repolarisation des Aktionspotentials (Nabauer *et al.*, 1996), beeinflusst den Ca^{2+} Einwärtsstrom und ist damit zumindest zu einem Teil verantwortlich für die Dauer und die Form des Aktionspotentials (Kaab *et al.*, 1998; Volk *et al.*, 1999). Veränderungen des Aktionspotentials haben einen großen Einfluss auf die Kontraktilität des Myokards (Wood *et al.*, 1969).

Verschiedene kardiale Erkrankungen gehen mit Veränderungen des transienten Kaliumauswärtsstroms einher (Kaab *et al.*, 1996). So ist I_{to} z.B. in atrialen Myozyten von Patienten mit chronischem Vorhofflimmern im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus signifikant reduziert (Van Wagoner *et al.*, 1997). Die Herzhypertrophie geht mit einer Aktionspotentialänderung direkt nach dem Maximum einher, die darauf hinweist, dass Ströme der schnellen Phase der Repolarisation wie z.B. I_{to} an der resultierenden Verlängerung des Aktionspotentials beteiligt sind (Hart, 1994). Verschiedene Modelle für Hypertrophie wurden bereits ausführlich untersucht und zeigten eine verlängerte AP-Dauer und eine I_{to} Reduktion (Benitah *et al.*, 1993; Barbieri *et al.*, 1994; Tomita *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 2000).

Auch die korrespondierenden Kv4 und KChIP mRNAs wurden untersucht. Kardiomyozyten z.B. von Ratten mit einem Myokardinfarkt zeigen eine I_{to} Reduktion (Huang *et al.*, 2000, 2001), die mit dem mRNA und Proteingehalt von Kv4.2 und Kv4.3 korreliert (Huang *et al.*, 2000). Im hypertrophen Myokard spontan hypertensiver Ratten korreliert der epi-, endokardiale I_{to} -Gradient ebenfalls mit einer verminderten Expression Kv4.2 und Kv4.3. im Endokard (Goltz *et al.*, 2007). Auch Veränderungen der akzessorischen Untereinheiten der Kv4-Kanäle können ausreichen um die I_{to} Dichte zu reduzieren. So zeigt zum Beispiel eine KChIP2-Knock-out-Maus einen Verlust von I_{to} in ventrikulären Herzmuskelzellen und eine erhöhte Anfälligkeit für experimentell induzierte Arrhythmien (Kuo *et al.*, 2001).

Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass Kv4 und KChIP nicht alleine I_{to} bilden: (1) Schultz *et al.* konnten in ventrikulären Zellen von Ratten zeigen, dass sich in einigen Kardiomyozyten Kv4.2 mRNA, aber keine KChIP mRNA nachweisen lässt (Schultz *et al.*, 2005). Möglicherweise spielen andere Untereinheiten, wie z.B. DPPs, in diesen Zellen eine Rolle. (2) Im menschlichen Herzen wird neben Kv4 und KChIPs auch DPP6 exprimiert. Die Expression von DPP6 ist in insuffizienten Herzen verändert (Radicke *et al.*, 2005).

Abschließend lässt sich sagen, dass die molekularen und elektrophysiologischen Grundlagen des transienten Auswärtsstroms nicht in allen Einzelheiten geklärt sind. Die diesem Strom zugrundeliegenden Kanäle scheinen sich nicht nur von Spezies zu Spezies zu unterscheiden, sondern variieren auch innerhalb eines Herzens, z.B. zwischen Endo- und Epikard. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Koexpression von DPP6 die Inaktivierung des durch den Kv4.2-Kanal vermittelten Stroms beschleunigt. Diese kinetische Eigenschaft ist charakteristisch für den kardialen I_{to} . Daher unterstützen diese Ergebnisse die Annahme, dass DPP6 am kardialen Aktionspotential beteiligt ist. Trotzdem war es nicht möglich durch Koexpression von Kv4.2, KChIP2 und DPP6 den kardialen I_{to} komplett darzustellen. Dies könnte unterschiedliche Ursachen haben: (1) In dieser Arbeit wurden DPP6 bzw. KChIP2 im Überschuss koexprimiert. Möglicherweise lässt sich der kardiale I_{to} durch Einsatz anderer cDNA Mengen reproduzieren. (2) Die unterschiedlichen Expressionssysteme (HEK293 versus Kardiomyozyte) könnten die Unterschiede erklären. (3) Möglicherweise spielen im Herzen weitere Kanal-Untereinheiten für die Bildung von I_{to} eine Rolle.

Zusammenfassung

Spannungsgesteuerte K^+ (Kv)-Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Erregbarkeit von Muskel- und Nervenzellen. Kv4-Kanäle bilden das molekulare Korrelat für die Porenformenden α -Untereinheiten der schnellen Komponente eines transienten Auswärtsstroms ($I_{to,f}$) in Kardiomyozyten und des somatodendritischen A-Typ-Stroms (I_{SA}) in Neuronen. Unter pathophysiologischen Bedingungen wie z. B. bei Hypertrophie, kortikalen Missbildungen oder einer Temporallappenepilepsie ist die Oberflächenexpression der Kv4-Kanäle bzw. die I_{to} -Stromkomponente stark reduziert. Kv4-Kanäle bilden Komplexe mit akzessorischen Untereinheiten, den Ca^{2+} -bindenden Kv-Kanal-Interagierenden Proteinen (KChIPs) und Dipeptidyl-Aminopeptidase-verwandten Proteinen (DPPs). Beide akzessorischen Untereinheiten beeinflussen neben der funktionellen Oberflächenexpression auch das Schaltverhalten der Kv4-Kanäle. Die Interaktion von Kv4-Kanälen mit KChIPs wird bereits seit einiger Zeit im Detail untersucht, und entsprechende molekulare Kv4-Struktur determinanten konnten identifiziert werden. Die Interaktion von Kv4-Kanälen mit DPPs ist dagegen bisher unzureichend erforscht. In der vorliegenden Arbeit wurde daher in HEK293-Zellen mit der Patch-Clamp-Technik zunächst die Auswirkung von DPP6 auf das Kanalschaltverhalten von Kv4.2 untersucht. Bereits bekannte Effekte einer Koexpression auf die Aktivierung und Inaktivierung, welche beide durch DPP6 beschleunigt werden, konnten bestätigt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass DPP6 nicht nur die Inaktivierung, sondern auch die Deaktivierung von Kv4.2 Kanälen beschleunigt. Interessanterweise war der Effekt auf die Deaktivierung bei einer N-terminalen Deletionsmutante besonders ausgeprägt. Für die Untersuchung struktureller Determinanten für die Kv4.2-DPP6-Interaktion wurden Kv4.2 Punktmutanten des S2-Segmentes verwendet, die homolog waren zu Kv4.3 Mutanten mit einer Bindungsdefizienz für DPP10. Die Messungen lieferten Hinweise darauf, dass die Interaktion zwischen Kv4.2 und DPP6 sich von der Interaktion zwischen Kv4.3 und DPP10 unterscheidet. Die funktionelle Charakterisierung ternärer Komplexe bestehend aus Kv4.2 + DPP6 + KChIP2.1 ergab, dass die Effekte der beiden akzessorischen Untereinheiten additiv sind. Dies lässt vermuten, dass die Wirkungen von DPP6 und KChIP2.1 über zwei verschiedene Mechanismen vermittelt werden.

Literaturverzeichnis

- ALLEN, M., HEINZMANN, A., NOGUCHI, E., ABECASIS, G., BROXHOLME, J., PONTING, C. P., BHATTACHARYYA, S., TINSLEY, J., ZHANG, Y., HOLT, R., JONES, E. Y., LENCH, N., CAREY, A., JONES, H., DICKENS, N. J., DIMON, C., NICHOLLS, R., BAKER, C., XUE, L., TOWNSEND, E., KABESCH, M., WEILAND, S. K., CARR, D., VON MUTIUS, E., ADCOCK, I. M., BARNES, P. J., LATHROP, G. M., EDWARDS, M., MOFFATT, M. F. & COOKSON, W. O. (2003). Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nat Genet* **35**, 258-263.
- AN, W. F., BOWLBY, M. R., BETTY, M., CAO, J., LING, H. P., MENDOZA, G., HINSON, J. W., MATTSSON, K. I., STRASSLE, B. W., TRIMMER, J. S. & RHODES, K. J. (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* **403**, 553-556.
- AYDAR, E., PALMER, C. P., KLYACHKO, V. A. & JACKSON, M. B. (2002). The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron* **34**, 399-410.
- BÄHRING, R., BOLAND, L. M., VARGHESE, A., GEBAUER, M. & PONGS, O. (2001a). Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels. *J Physiol* **535**, 65-81.
- BÄHRING, R., DANNENBERG, J., PETERS, H. C., LEICHER, T., PONGS, O. & ISBRANDT, D. (2001b). Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *J Biol Chem* **276**, 23888-23894.
- BARBIERI, M., VARANI, K., CERBAI, E., GUERRA, L., LI, Q., BOREA, P. A. & MUGELLI, A. (1994). Electrophysiological basis for the enhanced cardiac arrhythmogenic effect of isoprenaline in aged spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol* **26**, 849-860.
- BAUKROWITZ, T. & YELLEN, G. (1995). Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* **15**, 951-960.
- BECK, E. J., BOWLBY, M., AN, W. F., RHODES, K. J. & COVARRUBIAS, M. (2002). Remodelling inactivation gating of Kv4 channels by KCHIP1, a small-molecular-weight calcium-binding protein. *J Physiol* **538**, 691-706.
- BENITAH, J. P., GOMEZ, A. M., BAILLY, P., DA PONTE, J. P., BERSON, G., DELGADO, C. & LORENTE, P. (1993). Heterogeneity of the early outward current in ventricular

- cells isolated from normal and hypertrophied rat hearts. *J Physiol* **469**, 111-138.
- BERRIDGE, M. J., LIPP, P. & BOOTMAN, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 11-21.
- BEVINGTON. (1992). *Data reduction and error analysis for the physical science*. WBC/MacGraw-Hill, Bosten, Massachusetts.
- BIRNBAUM, S. G., VARGA, A. W., YUAN, L. L., ANDERSON, A. E., SWEATT, J. D. & SCHRADER, L. A. (2004). Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. *Physiol Rev* **84**, 803-833.
- BRAUNEWELL, K. H. & GUNDELFINGER, E. D. (1999). Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res* **295**, 1-12.
- CHABALA, L. D., BAKRY, N. & COVARRUBIAS, M. (1993). Low molecular weight poly(A)+ mRNA species encode factors that modulate gating of a non-Shaker A-type K⁺ channel. *J Gen Physiol* **102**, 713-728.
- CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W. W. & PRASHER, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- CHANDY, K. G. & GUTMAN, G. A. (1993). Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol Sci* **14**, 434.
- CHOI, K. L., ALDRICH, R. W. & YELLEN, G. (1991). Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5092-5095.
- CONNOR, J. A. & STEVENS, C. F. (1971a). Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under voltage clamp. *J Physiol* **213**, 1-19.
- CONNOR, J. A. & STEVENS, C. F. (1971b). Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J Physiol* **213**, 21-30.
- COVARRUBIAS, M., WEI, A. A. & SALKOFF, L. (1991). Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K⁺ current systems. *Neuron* **7**, 763-773.

- DEMO, S. D. & YELLEN, G. (1991). The inactivation gate of the Shaker K⁺ channel behaves like an open-channel blocker. *Neuron* **7**, 743-753.
- DESCHENES, I., DISILVESTRE, D., JUANG, G. J., WU, R. C., AN, W. F. & TOMASELLI, G. F. (2002). Regulation of Kv4.3 current by KChIP2 splice variants: a component of native cardiac I_(to)? *Circulation* **106**, 423-429.
- DESCHENES, I. & TOMASELLI, G. F. (2002). Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett* **528**, 183-188.
- DIXON, J. E., SHI, W., WANG, H. S., McDONALD, C., YU, H., WYMORE, R. S., COHEN, I. S. & MCKINNON, D. (1996). Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* **79**, 659-668.
- DOLLY, J. O. & PARCEJ, D. N. (1996). Molecular properties of voltage-gated K⁺ channels. *J Bioenerg Biomembr* **28**, 231-253.
- DURELL, S. R. & GUY, H. R. (1992). Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels. *Biophys J* **62**, 238-247; discussion 247-250.
- FAKLER, B. & FAHLKE, C. (2005). Grundlagen zellulärer Erregbarkeit. In *Physiologie des Menschen*, vol. 29. ed. THEWS, G., pp. 57-84. Springer, Heidelberg.
- GEBAUER, M. (2004). Untersuchung der Inaktivierung des humanen Kv4.2-Kanals und der Effekte von Kv-Kanal-interagierenden Proteinen (KChIPs). In *Fachbereich Biologie*, pp. 101. Universität Hamburg, Hamburg.
- GEBAUER, M., ISBRANDT, D., SAUTER, K., CALLSEN, B., NOLTING, A., PONGS, O. & BÄHRING, R. (2004). N-type inactivation features of Kv4.2 channel gating. *Biophys J* **86**, 210-223.
- GOLTZ, D., SCHULTZ, J. H., STUCKE, C., WAGNER, M., BASSALAY, P., SCHWOERER, A. P., EHMKE, H. & VOLK, T. (2007). Diminished Kv4.2/3 but not KChIP2 levels reduce the cardiac transient outward K⁺ current in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* **74**, 85-95.
- GUO, W., MALIN, S. A., JOHNS, D. C., JEROMIN, A. & NERBONNE, J. M. (2002). Modulation of Kv4-encoded K⁽⁺⁾ currents in the mammalian myocardium by neuronal calcium sensor-1. *J Biol Chem* **277**, 26436-26443.

- GUO, W., XU, H., LONDON, B. & NERBONNE, J. M. (1999). Molecular basis of transient outward K⁺ current diversity in mouse ventricular myocytes. *J Physiol* **521 Pt 3**, 587-599.
- 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. *Pflugers Arch* **391**, 85-100.
- HART, G. (1994). Cellular electrophysiology in cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* **28**, 933-946.
- HARTMANN, H. A., KIRSCH, G. E., DREWE, J. A., TAGLIALATELA, M., JOHO, R. H. & BROWN, A. M. (1991). Exchange of conduction pathways between two related K⁺ channels. *Science* **251**, 942-944.
- HARTMANN, L. S. (2007). Funktionelle Interaktion des Kv4.2-Proteins mit akzessorischen Untereinheiten - Rolle für die somatodendritische A-Typ-Kaliumkanal-Expression in hippokampalen Neuronen von Maus und Ratte. Dissertation. Universität Hamburg.
- HEGINBOTHAM, L., ABRAMSON, T. & MACKINNON, R. (1992). A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* **258**, 1152-1155.
- HILLE, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer, Sunderland.
- HOSHI, T., ZAGOTTA, W. N. & ALDRICH, R. W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **250**, 533-538.
- HOSHI, T., ZAGOTTA, W. N. & ALDRICH, R. W. (1991). Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* **7**, 547-556.
- HOUGH, R. B., LENGELING, A., BEDIAN, V., LO, C. & BUCAN, M. (1998). Rump white inversion in the mouse disrupts dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6 and causes dysregulation of Kit expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13800-13805.
- HUANG, B., QIN, D. & EL-SHERIF, N. (2000). Early down-regulation of K⁺ channel genes and currents in the postinfarction heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* **11**, 1252-1261.

- HUANG, B., QIN, D. & EL-SHERIF, N. (2001). Spatial alterations of Kv channels expression and K(+) currents in post-MI remodeled rat heart. *Cardiovasc Res* **52**, 246-254.
- ISACOFF, E. Y., JAN, Y. N. & JAN, L. Y. (1990). Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature* **345**, 530-534.
- JACOBSON, B. S. & BRANTON, D. (1977). Plasma membrane: rapid isolation and exposure of the cytoplasmic surface by use of positively charged beads. *Science* **195**, 302-304.
- JAN, L. Y. & JAN, Y. N. (1994). Potassium channels and their evolving gates. *Nature* **371**, 119-122.
- JERNG, H. H. & COVARRUBIAS, M. (1997). K⁺ channel inactivation mediated by the concerted action of the cytoplasmic N- and C-terminal domains. *Biophys J* **72**, 163-174.
- JERNG, H. H., KUNJILWAR, K. & PFAFFINGER, P. J. (2005). Multiprotein assembly of Kv4.2, KChIP3 and DPP10 produces ternary channel complexes with ISA-like properties. *J Physiol* **568**, 767-788.
- JERNG, H. H., PFAFFINGER, P. J. & COVARRUBIAS, M. (2004a). Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol Cell Neurosci* **27**, 343-369.
- JERNG, H. H., QIAN, Y. & PFAFFINGER, P. J. (2004b). Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys J* **87**, 2380-2396.
- JERNG, H. H., SHAHIDULLAH, M. & COVARRUBIAS, M. (1999). Inactivation gating of Kv4 potassium channels: molecular interactions involving the inner vestibule of the pore. *J Gen Physiol* **113**, 641-660.
- JIANG, B., SUN, X., CAO, K. & WANG, R. (2002). Endogenous Kv channels in human embryonic kidney (HEK-293) cells. *Mol Cell Biochem* **238**, 69-79.
- KAAB, S., DIXON, J., DUC, J., ASHEN, D., NABAUER, M., BEUCKELMANN, D. J., STEINBECK, G., MCKINNON, D. & TOMASELLI, G. F. (1998). Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* **98**, 1383-1393.

- KAAB, S., NUSS, H. B., CHIAMVIMONVAT, N., O'ROURKE, B., PAK, P. H., KASS, D. A., MARBAN, E. & TOMASELLI, G. F. (1996). Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* **78**, 262-273.
- KIN, Y., MISUMI, Y. & IKEHARA, Y. (2001). Biosynthesis and characterization of the brain-specific membrane protein DPPX, a dipeptidyl peptidase IV-related protein. *J Biochem (Tokyo)* **129**, 289-295.
- KUO, H. C., CHENG, C. F., CLARK, R. B., LIN, J. J., LIN, J. L., HOSHIJIMA, M., NGUYEN-TRAN, V. T., GU, Y., IKEDA, Y., CHU, P. H., ROSS, J., GILES, W. R. & CHIEN, K. R. (2001). A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I(to) and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* **107**, 801-813.
- LARSSON, H. P., BAKER, O. S., DHILLON, D. S. & ISACOFF, E. Y. (1996). Transmembrane movement of the shaker K⁺ channel S4. *Neuron* **16**, 387-397.
- LEDERER, W. J. (2005). Cardiac Electrophysiology and the Electrocardiogram. In *Medical Physiology*. ed. BORON W.F., B. E. L., pp. 483-507. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- LI, M., JAN, Y. N. & JAN, L. Y. (1992). Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* **257**, 1225-1230.
- LI-SMERIN, Y., HACKOS, D. H. & SWARTZ, K. J. (2000). A localized interaction surface for voltage-sensing domains on the pore domain of a K⁺ channel. *Neuron* **25**, 411-423.
- LOPEZ-BARNEO, J., HOSHI, T., HEINEMANN, S. H. & ALDRICH, R. W. (1993). Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors Channels* **1**, 61-71.
- NABAUER, M., BEUCKELMANN, D. J., UBERFUHR, P. & STEINBECK, G. (1996). Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* **93**, 168-177.

- NADAL, M. S., AMARILLO, Y., VEGA-SAENZ DE MIERA, E. & RUDY, B. (2001). Evidence for the presence of a novel Kv4-mediated A-type K(+) channel-modifying factor. *J Physiol* **537**, 801-809.
- NADAL, M. S., AMARILLO, Y., VEGA-SAENZ DE MIERA, E. & RUDY, B. (2006). Differential characterization of three alternative spliced isoforms of DPPX. *Brain Res* **1094**, 1-12.
- NADAL, M. S., OZAITA, A., AMARILLO, Y., VEGA-SAENZ DE MIERA, E., MA, Y., MO, W., GOLDBERG, E. M., MISUMI, Y., IKEHARA, Y., NEUBERT, T. A. & RUDY, B. (2003). The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron* **37**, 449-461.
- NEHER, E. & SAKMANN, B. (1976). Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. *J Physiol* **258**, 705-729.
- NERBONNE, J. M. & KASS, R. S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* **85**, 1205-1253.
- NOBLE, D. & TSIEN, R. W. (1969). Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* **200**, 205-231.
- NUMBERGER M., D. A. (1996). *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Verlag, Heidelberg.
- PAPAZIAN, D. M., SCHWARZ, T. L., TEMPEL, B. L., JAN, Y. N. & JAN, L. Y. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* **237**, 749-753.
- PAPAZIAN, D. M., TIMPE, L. C., JAN, Y. N. & JAN, L. Y. (1991). Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* **349**, 305-310.
- PATEL, S. P., CAMPBELL, D. L., MORALES, M. J. & STRAUSS, H. C. (2002). Heterogeneous expression of KChIP2 isoforms in the ferret heart. *J Physiol* **539**, 649-656.
- PONGS, O. (1989). Molecular basis of potassium channel diversity. *Pflugers Arch* **414 Suppl 1**, S71-75.
- PONGS, O., KECSKEMETHY, N., MULLER, R., KRAH-JENTGENS, I., BAUMANN, A., KILTZ, H. H., CANAL, I., LLAMAZARES, S. & FERRUS, A. (1988). Shaker encodes a family of

- putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *Embo J* **7**, 1087-1096.
- POURRIER, M., SCHRAM, G. & NATTEL, S. (2003). Properties, expression and potential roles of cardiac K⁺ channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J Membr Biol* **194**, 141-152.
- QI, S. Y., RIVIERE, P. J., TROJNAR, J., JUNIEN, J. L. & AKINSANYA, K. O. (2003). Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases. *Biochem J* **373**, 179-189.
- RADICKE, S., COTELLA, D., GRAF, E. M., RAVENS, U. & WETTWER, E. (2005). Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative beta-subunit of human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3. *J Physiol* **565**, 751-756.
- REN, X., HAYASHI, Y., YOSHIMURA, N. & TAKIMOTO, K. (2005). Transmembrane interaction mediates complex formation between peptidase homologues and Kv4 channels. *Mol Cell Neurosci* **29**, 320-332.
- RETTIG, J., HEINEMANN, S. H., WUNDER, F., LORRA, C., PARCEJ, D. N., DOLLY, J. O. & PONGS, O. (1994). Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature* **369**, 289-294.
- RODEN, D. M., LAZZARA, R., ROSEN, M., SCHWARTZ, P. J., TOWBIN, J. & VINCENT, G. M. (1996). Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS. *Circulation* **94**, 1996-2012.
- ROSATI, B., PAN, Z., LYPEN, S., WANG, H. S., COHEN, I., DIXON, J. E. & MCKINNON, D. (2001). Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* **533**, 119-125.
- RUDY, B. (1988). Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* **25**, 729-749.
- SALA, S. & MATTESON, D. R. (1991). Voltage-dependent slowing of K channel closing kinetics by Rb⁺. *J Gen Physiol* **98**, 535-554.
- SANGUINETTI, M. C., CURRAN, M. E., ZOU, A., SHEN, J., SPECTOR, P. S., ATKINSON, D. L. & KEATING, M. T. (1996). Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* **384**, 80-83.

- SCHULTZ, J. H., JANZEN, C., VOLK, T. & EHMKE, H. (2005). Kv4.2 and KChIP2 transcription in individual cardiomyocytes from the rat left ventricular free wall. *J Mol Cell Cardiol* **39**, 269-275.
- SCHULZE-BAHR, E., HAVERKAMP, W., BORGGREFE, M., WEDEKIND, H., MONNIG, G., MERGENTHALER, J., ASSMANN, G., FUNKE, H. & BREITHARDT, G. (2000). Molecular genetics of arrhythmias--a new paradigm. *Z Kardiol* **89 Suppl 4**, IV12-22.
- SEWING, S., ROEPER, J. & PONGS, O. (1996). Kv beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits. *Neuron* **16**, 455-463.
- SHEN, N. V. & PFAFFINGER, P. J. (1995). Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K⁺ channel subunit proteins. *Neuron* **14**, 625-633.
- SHIBATA, R., NAKAHIRA, K., SHIBASAKI, K., WAKAZONO, Y., IMOTO, K. & IKENAKA, K. (2000). A-type K⁺ current mediated by the Kv4 channel regulates the generation of action potential in developing cerebellar granule cells. *J Neurosci* **20**, 4145-4155.
- TEMPEL, B. L., PAPAIZIAN, D. M., SCHWARZ, T. L., JAN, Y. N. & JAN, L. Y. (1987). Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* **237**, 770-775.
- TOMITA, F., BASSETT, A. L., MYERBURG, R. J. & KIMURA, S. (1994). Diminished transient outward currents in rat hypertrophied ventricular myocytes. *Circ Res* **75**, 296-303.
- VAN WAGONER, D. R., POND, A. L., MCCARTHY, P. M., TRIMMER, J. S. & NERBONNE, J. M. (1997). Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* **80**, 772-781.
- VOLK, T., NGUYEN, T. H., SCHULTZ, J. H. & EHMKE, H. (1999). Relationship between transient outward K⁺ current and Ca²⁺ influx in rat cardiac myocytes of endo- and epicardial origin. *J Physiol* **519 Pt 3**, 841-850.
- WADA, K., YOKOTANI, N., HUNTER, C., DOI, K., WENTHOLD, R. J. & SHIMASAKI, S. (1992). Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 197-201.

- WANG, Z., YUE, L., WHITE, M., PELLETIER, G. & NATTEL, S. (1998). Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle. *Circulation* **98**, 2422-2428.
- WETTWER, E., AMOS, G. J., POSIVAL, H. & RAVENS, U. (1994). Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res* **75**, 473-482.
- WOOD, E., HEPPNER, R. & WEIDMANN, S. (1969). Inotropic effects of electric currents. I. Positive and negative effects of constant electric currents or current pulses applied during cardiac action potentials. II. Hypotheses: calcium movements, excitation-contraction coupling and inotropic effects. *Circ Res* **24**, 409-445.
- YELLEN, G. (1998). The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q Rev Biophys* **31**, 239-295.
- YOOL, A. J. & SCHWARZ, T. L. (1991). Alteration of ionic selectivity of a K⁺ channel by mutation of the H5 region. *Nature* **349**, 700-704.
- YU, W., XU, J. & LI, M. (1996). NAB domain is essential for the subunit assembly of both alpha-alpha and alpha-beta complexes of shaker-like potassium channels. *Neuron* **16**, 441-453.
- ZHANG, G., GURTU, V. & KAIN, S. R. (1996). An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **227**, 707-711.
- ZHOU, M., MORAIS-CABRAL, J. H., MANN, S. & MACKINNON, R. (2001). Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* **411**, 657-661.
- ZHOU, W., QIAN, Y., KUNJILWAR, K., PFAFFINGER, P. J. & CHOE, S. (2004). Structural insights into the functional interaction of KChIP1 with Shal-type K(+) channels. *Neuron* **41**, 573-586.
- ZHU, X. R., WULF, A., SCHWARZ, M., ISBRANDT, D. & PONGS, O. (1999). Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K⁺ current. *Receptors Channels* **6**, 387-400.

Ein Teil dieser Arbeit wurde publiziert in:

BARGHAAN, J., TOZAKIDOU, M., EHMKE, H. & BÄHRING, R (2008). Role of N-terminal domain and accessory subunits in controlling deactivation-inactivation of Kv4.2 channels. *Biophys J* **94**, 1276-1294

Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

A	Amplitude
A_{\max}	maximaler Strom (in einer Pulsserie)
AP	Aktionspotential
bp	Basenpaare
C	Kapazität
C_p	Pipettenkapazität
C_m	Membrankapazität
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-pierzino)-ethanolsulfonsäure
I	Strom
I_{\max}	maximaler Strom (in einer Stromspur)
KChIP	K^+ -channel interacting protein
K_v	spannungsgesteuerter K^+ -Kanal
MEM	<i>minimal essential medium</i> , Minimalmedium
NaCl	Natrium-Chlorid
NaOH	Natronlauge
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NT	N-Terminus eines Proteins
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
RNA	Ribonukleinsäure
R	Widerstand

R_s	Serienwiderstand
R_f	Rückkopplungswiderstand
R_g	Sealwiderstand
R_m	Membranwiderstand
S1 bis S6	Membransegmente der Kv-Kanäle
t	Zeit
τ	Zeitkonstante
T1	Tetramerisierungsdomäne
V	Spannung
V_m	Membranspannung
kJ	Kilojoule
PD	Potentialdifferenz
SEM	standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwertes
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Upm	Umdrehungen pro Minute
wt	Wildtyp

2 Tabellen

Kv4.2		I_{20}/I_{\max}	τ_1 (ms)	I_1/I_{gesamt}	τ_2 (ms)	I_2/I_{gesamt}	τ_3 (ms)	I_3/I_{gesamt}
Wt-HA	Ohne DPPX	$0,61 \pm 0,05$ (n=12)	17 ± 2	$0,70 \pm 0,05$	78 ± 12	$0,22 \pm 0,03$	1371 ± 333	$0,08 \pm 0,02$
	DPPX (1:5)	$0,21 \pm 0,05$ (n=6)	6 ± 1	$0,76 \pm 0,02$	28 ± 3	$0,19 \pm 0,03$	1168 ± 108	$0,04 \pm 0,01$
	DPPX (1:40)	$0,25 \pm 0,03$ (n=6)	8 ± 1	$0,57 \pm 0,11$	35 ± 7	$0,34 \pm 0,10$	1052 ± 138	$0,09 \pm 0,02$
Wt-HA	DPPX (1:20) KChip2.1 (1:20)	$0,48 \pm 0,02$ (n=5)	18 ± 1	$0,89 \pm 0,05$	61 ± 9	$0,09 \pm 0,04$	2287 ± 630	$0,02 \pm 0,01$
A235V-HA	Ohne DPPX	$0,70 \pm 0,02$ (n=10)	19 ± 2	$0,69 \pm 0,23$	90 ± 13	$0,24 \pm 0,03$	1217 ± 341	$0,07 \pm 0,01$
	DPPX (1:5)	$0,37 \pm 0,06$ (n=6)	10 ± 2	$0,67 \pm 0,05$	48 ± 8	$0,26 \pm 0,04$	1150 ± 128	$0,07 \pm 0,02$
	DPPX (1:40)	$0,30 \pm 0,04$ (n=20)	10 ± 1	$0,75 \pm 0,02$	46 ± 5	$0,21 \pm 0,02$	1197 ± 61	$0,05 \pm 0,01$
I239W-HA	Ohne DPPX	$0,44 \pm 0,05$ (n=7)	13 ± 1	$0,70 \pm 0,04$	67 ± 12	$0,21 \pm 0,03$	899 ± 684	$0,05 \pm 0,01$
	DPPX (1:5)	$0,23 \pm 0,05$ (n=7)	7 ± 2	$0,71 \pm 0,02$	30 ± 7	$0,24 \pm 0,03$	994 ± 72	$0,05 \pm 0,01$
Wt	Ohne DPPX	$0,44 \pm 0,05$ (n=8)	14 ± 1	$0,68 \pm 0,03$	54 ± 4	$0,25 \pm 0,03$	682 ± 97	$0,07 \pm 0,03$
	DPPX (1:40)	$0,22 \pm 0,04$ (n=4)	7 ± 1	$0,75 \pm 0,04$	26 ± 2	$0,21 \pm 0,04$	933 ± 35	$0,04 \pm 0,01$
A235V	Ohne DPPX	$0,37 \pm 0,05$ (n=3)	9 ± 0	$0,63 \pm 0,09$	37 ± 2	$0,29 \pm 0,06$	890 ± 59	$0,08 \pm 0,03$
	DPPX (1:5)	$0,18 \pm 0,03$ (n=3)	6 ± 1	$0,79 \pm 0,03$	35 ± 8	$0,17 \pm 0,03$	1132 ± 235	$0,04 \pm 0,00$
	DPPX (1:20)	$0,23 \pm 0,01$ (n=3)	8 ± 1	$0,80 \pm 0,06$	46 ± 11	$0,15 \pm 0,05$	1423 ± 365	$0,04 \pm 0,01$

Tabelle 1. Inaktivierungsverhalten

Grad der Inaktivierung nach 20 ms und Zeitkonstanten der Inaktivierung sowie die relativen Amplituden (Summe aus 3 Exponentialfunktionen) bei + 40 mV.

Kv4.2		τ_{rec} (ms)	Anstiegszeit (ms)
Wt-HA	Ohne DPPX	436 ± 75 (n=10)	3,2 ± 0,4 (n=12)
	DPPX (1:5)	113 ± 11 (n=5)	1,0 ± 0,1 (n=6)
	DPPX (1:40)	110 ± 11 (n=6)	0,9 ± 0,1 (n=6)
Wt-HA	DPPX (1:20) KChip2.1 (1:20)	14 ± 1 (n=5)	1,5 ± 0,2 (n=5)
A235V- HA	Ohne DPPX	497 ± 45 (n=10)	3,4 ± 0,2 (n=10)
	DPPX (1:5)	137 ± 11 (n=4)	1,7 ± 0,2 (n=6)
	DPPX (1:40)	128 ± 11 (n=15)	1,2 ± 0,1 (n=20)
I239W- HA	Ohne DPPX	252 ± 52 (n=5)	2,2 ± 0,2 (n=7)
	DPPX (1:5)	87 ± 6 (n=5)	1,1 ± 0,1 (n=7)
Wt	Ohne DPPX	290 ± 43 (n=3)	1,9 ± 0,1 (n=5)
	DPPX (1:40)	91 ± 8 (n=4)	0,9 ± 0,1 (n=4)
A235V	Ohne DPPX	223 ± 34 (n=4)	1,7 ± 0,2 (n=3)
	DPPX (1:5)	101 ± 1 (n=3)	0,8 ± 0,1 (n=3)
	DPPX (1:20)	118 ± 14 (n=3)	0,7 ± 0,1 (n=3)

Tabelle 2. Erholung aus der Inaktivierung und Aktivierungsverhalten

Zeitkonstanten der Erholung aus der Inaktivierung bei -80 mV und die Anstiegszeit bei +40 mV.

Kv4.2		τ_1(ms)	τ_1 %	τ_2(ms)
Wt	Ohne DPPX	$3,9 \pm 1,8$ (n=7)	87 ± 1	$22,5 \pm 1,3$
	DPPX	$3,0 \pm 0,2$ (n=4)	96 ± 1	$55,1 \pm 13,7$
$\Delta 2-40$	Ohne DPPX	$9,6 \pm 1,4$ (n=9)	78 ± 3	$35,6 \pm 5,4$
	DPPX	$3,7 \pm 0,2$ (n=11)	96 ± 1	$40,1 \pm 4,6$

Tabelle 3. Kanal-Schließverhalten

Zeitkonstanten der Deaktivierung und relative Amplituden der ersten Zeitkonstante (zweifach exponentielle Funktion) gemessen in Lösungen mit fast symmetrischen Rubidiumkonzentrationen bei -80 mV.

Danksagung

Mein Dank gilt PD Dr. Robert Bähring für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die engagierte Betreuung und die intensive Korrektur meiner Arbeit. Besonders dankbar bin ich dafür, dass Robert mich mit seiner Begeisterung für die wissenschaftliche Arbeit und insbesondere die Elektrophysiologie angesteckt hat.

Herrn Professor Dr. Ehmke danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können, für die freundliche Unterstützung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Hinweise bei der Korrektur dieser Arbeit. Herrn Professor Dr. Pongs danke ich dafür, dass ich Teile der Experimente in seinem Labor durchführen konnte.

Den Mitarbeitern des Institutes für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie und des Instituts für neurale Signalverarbeitung danke ich für die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre. Ganz besonders hervorheben möchte ich Martin Kruse, der mich sehr geduldig in die Patch-Clamp-Technik einführte. Sven Hartmann wies mich in die Zellkultur ein und klonierte die Kv4.2-Mutanten. Jan Barghaan löste zahlreiche KaleidaGraph-Probleme. Peter Bassaláy half bei allen Computerpannen und Heike Kilp sorgte stets für Tee, Kekse und gute Laune.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Magdalini Tozakidou
Geburtsdatum: 21.06.1979
Geburtsort: Soest

Schule und Ausbildung

1998 Abitur, Marienschule Lipperbruch
1998 – 2005 Studium der Medizin in Freiburg, Coimbra und Hamburg
2005 Approbation
2006 – 2007 Assistenzärztin, Universitäts-Kinderklinik Bonn
Seit 2007 Assistenzärztin in der Abteilung für Kinderradiologie und am Institut für vegetative Physiologie und Pathophysiologie, UKE, Hamburg

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Magdalini Tozakidou