

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie
Martinistr. 52
20246 Hamburg

Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

Modulation nativer neuronaler und rekombinanter A-Typ- Kaliumkanäle durch die Sulfonylharnstoff- Verbindung NS5806

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Katrin Witzel
aus Eutin

Hamburg 2014

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 07.10.2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. R. Bähring

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. C. Bauer

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. E. Oetjen

1. Zusammenfassung	6
2. Einleitung	8
2.1 Spannungsaktivierte Ionenleitfähigkeiten in hippocampalen Neuronen.....	8
2.2 Der somatodendritische A-Typ-Strom (I_{SA})	10
2.3 Zusammensetzung der Kv4-Kanalkomplexe.....	12
2.4 Pharmakologie Kv4-vermittelter A-Typ-Ströme	17
2.5 Ziel der vorliegenden Arbeit	18
3. Material und Methoden.....	20
3.1 Primärkultur hippocampaler Neurone	20
3.2 Routinehaltung der HEK293-Zelllinie	20
3.3 Heterologe Expression rekombinanter Kanalkomplexe.....	21
3.3.1 Verwendete Klone.....	21
3.3.2 Transformation kompetenter Zellen.....	22
3.3.3 Plasmidisolierung	22
3.3.4 Transfektion	23
3.4 Elektrophysiologie.....	23
3.4.1 Die Patch-Clamp-Technik.....	23
3.4.2 Elektrolytlösungen	26
3.4.3 Pharmakologie.....	27
3.4.4 Versuchsaufbau und -durchführung.....	28
3.4.5 Kapazitive Ströme, Serienwiderstand, Leckstrom	32
3.4.6 Aufzeichnung und Auswertung der Messdaten	35
4. Ergebnisse	41
4.1 Effekt von NS5806 auf K^+-Ströme in kultivierten hippocampalen Neuronen der Ratte.....	41
4.1.1 Zeitabhängige Ausprägung des NS5806-Effekts	41
4.1.2 Effekt von NS5806 auf den I_{SA}	42
4.1.3 Effekt von NS5806 auf die Stromamplitude des I_R	44
4.1.4 Korrelation der Veränderung der Amplitude des I_{SA} und der Veränderung des Serienwiderstands (R_S).....	45

4.1.5	Effekt von NS5806 auf die Kinetik der Erholung von der Inaktivierung	46
4.1.6	Effekt von NS5806 auf die Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung	47
4.2	Effekt von NS5806 auf ternäre Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Komplexe in HEK293-Zellen	48
4.2.1	Zeitabhängige Ausprägung des NS5806-Effekts	48
4.2.2	Konzentrationsabhängiger Effekt von NS5806 auf die Eigenschaften makroskopischer Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Ströme.....	49
4.2.3	Effekt von NS5806 auf die Erholung der Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Kanäle von der Inaktivierung	51
4.2.4	Effekt von NS5806 auf die Spannungsabhängigkeit von Inaktivierung und Aktivierung der Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Kanäle.....	52
4.3	Effekt von NS5806 auf ternäre Kv4.2-N587fsX1/KChIP3/DPP6-S-Komplexe in HEK293-Zellen	54
4.4	Effekt von NS5806 auf binäre Kv4.2/DPP6-S-Komplexe in HEK293-Zellen	56
4.4.1	Konzentrationsabhängiger Effekt von NS5806 auf die Eigenschaften makroskopischer Kv4.2/DPP6-S-Ströme.....	56
4.4.2	Effekt von NS5806 auf die Erholung der Kv4.2/DPP6-S-Kanäle von der Inaktivierung	58
4.4.3	Effekt von NS5806 auf die Spannungsabhängigkeit von Inaktivierung und Aktivierung der Kv4.2/DPP6-S-Kanäle.....	59
4.5	Effekt von NS5806 auf ternäre Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Komplexe in HEK293-Zellen	60
4.5.1	Konzentrationsabhängiger Effekt von NS5806 auf die Eigenschaften makroskopischer Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Ströme	61
4.5.2	Effekt von NS5806 auf die Erholung der Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Kanäle von der Inaktivierung	62
4.5.3	Effekt von NS5806 auf die Spannungsabhängigkeit von Inaktivierung und Aktivierung der Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Kanäle	63
5.	Diskussion.....	65
5.1	NS5806 als pharmakologisches „Tool“ zur Analyse nativer Kanalzusammensetzungen	65
5.2	Wirkmechanismus von NS5806	72
5.3	Pathophysiologisches Remodelling somatodendritischer A-Typ-Kanäle	76

6. Literatur	80
7. Anhang	89
7.1 Abkürzungsverzeichnis	89
7.2 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	91
7.3 Danksagung	92
7.4 Lebenslauf	93
7.5 Eidesstattliche Versicherung	94

1. Zusammenfassung

Die Funktion von Ionenkanälen und ihre Modifikation durch Transmitter, Toxine und neu synthetisierte pharmakologische Substanzen stehen im Zusammenhang mit der Entstehung aber auch der Therapie multipler Erkrankungen. Solche Stoffe können die zelluläre Erregbarkeit durch Hemmung oder Potenzierung von Ionenkanälen beeinflussen. Während eine Vielzahl an Stoffen hemmend auf Kv4-Kanäle wirkt, ist mit der Sulfonylharnstoff-Verbindung NS5806 zum ersten Mal eine potenzierende Substanz beschrieben worden. Es wurde bereits gezeigt, dass NS5806 den Kv4-vermittelten transienten K^+ -Auswärtsstrom kardialer Myozyten (I_{to}) potenziert und seine Inaktivierung verlangsamt. Noch nicht belegt sind die Effekte von NS5806 im neuronalen Zusammenhang auf den Kv4-vermittelten somatodendritischen A-Typ-Strom (I_{SA}).

In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe der Patch-Clamp-Technik untersucht, wie sich NS5806 auf den I_{SA} kultivierter hippocampaler Neurone und auf unterschiedliche rekombinante Kv4-Kanalkomplexe auswirkt. Hierfür wurden Experimente an Neuronen aus neugeborenen Ratten und an Human Embryonic Kidney (HEK) 293-Zellen, welche unterschiedliche Kv4-Kanalkomplexe exprimierten, durchgeführt. Durch 20 μ M NS5806 wurde die Amplitude des I_{SA} kultivierter hippocampaler Neurone reduziert, die Inaktivierung verlangsamt, die Erholung von der Inaktivierung beschleunigt und die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu negativeren Potenzialen verschoben.

Bei ternären Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Komplexen kam es in Gegenwart von 20 μ M NS5806 zu einer deutlichen Potenzierung der Stromamplitude und zu einer deutlichen Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung, wohingegen es bei binären Kv4.2/DPP6-S-Komplexen zu einer NS5806-vermittelten Suppression der Amplitude und einer nur geringfügigen Verlangsamung der Inaktivierung kam. NS5806 zeigte vergleichbare Effekte auf den Wildtyp-Kanal und die Temporallappenepilepsie-assoziierte Deletionsmutante Kv4.2-N587fsX1 im ternären Komplex. In ternären Komplexen mit der DPP6-E Splice-Variante, welche eine schnelle N-Typ-Inaktivierung vermittelt, zeigte sich kaum ein Effekt von NS5806 auf Amplitude und Inaktivierungskinetik.

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten einige neue Einblicke in den Wirkmechanismus von NS5806 und seine Funktion als pharmakologisches „Tool“ gewonnen werden. Darüber hinaus zeigte sich erstmalig eine potenziell antiepileptische Wirksamkeit von NS5806.

2. Einleitung

2.1 Spannungsaktivierte Ionenleitfähigkeiten in hippocampalen Neuronen

In neuronalen Zellverbänden erfolgt die Modifikation und Weiterleitung von Informationen in Form von elektrischen und chemischen Signalen. Das Neuron nimmt über seine baumartig verzweigten Dendriten erregende (exzitatorische) und hemmende (inhibierende) *afferente* Signale auf und bildet über die Zellmembran des Somas eine Signalsumme. Überschreitet die Signalsumme (resultierend in einem bestimmten Membranpotenzial) einen Schwellenwert, entsteht am Axonhügel (Axon-Initialsegment, AIS) des Somas das *efferente* Signal in Form eines Aktionspotenzials (AP) bzw. einer schnellen Abfolge (Salve) mehrerer APs. Ein neuronales AP ist gekennzeichnet durch eine schnelle Aufstrichphase und eine schnelle Repolarisierung und dauert meist nicht länger als 1 ms. Auf das eigentliche AP folgt, abhängig vom Zelltyp, oft eine sogenannte Nachdepolarisation oder Nachhyperpolarisation. Das AP breitet sich über das Axon bis zu den synaptischen Endigungen aus und führt dort zur Transmitterausschüttung. An den Synapsen wird die Information (Erregung oder Hemmung, abhängig vom Transmitter und den postsynaptischen Rezeptoren) zum nächsten Neuron weitergegeben (Silbernagel & Despopoulos, 2003). Neben der Ausbreitung des APs entlang des Axons findet auch eine retrograde Erregungsausbreitung entlang des Somas und der Dendriten statt (*backpropagating Action Potential*, b-AP). Das Zusammenspiel von synaptischer Aktivität und retrograder Erregungsausbreitung ist die Grundlage für assoziative Prozesse und synaptische Plastizität im Hippocampus, einem Zellverband im Temporallappen, der beim Lernen und der Gedächtnisbildung eine zentrale Rolle spielt. Die Entstehung neuronaler Signale und der elektrische Signalfluss beruhen auf der räumlichen und zeitlichen Summation von Ionenleitfähigkeiten der Zellmembran.

Im Folgenden soll insbesondere auf die spannungsaktivierten Ionenleitfähigkeiten hippocampaler Neurone näher eingegangen werden (Abb. 1). Die neuronale Zellmembran kann durch den Einfluss eines erregenden Neurotransmitters, wie Glutamat,

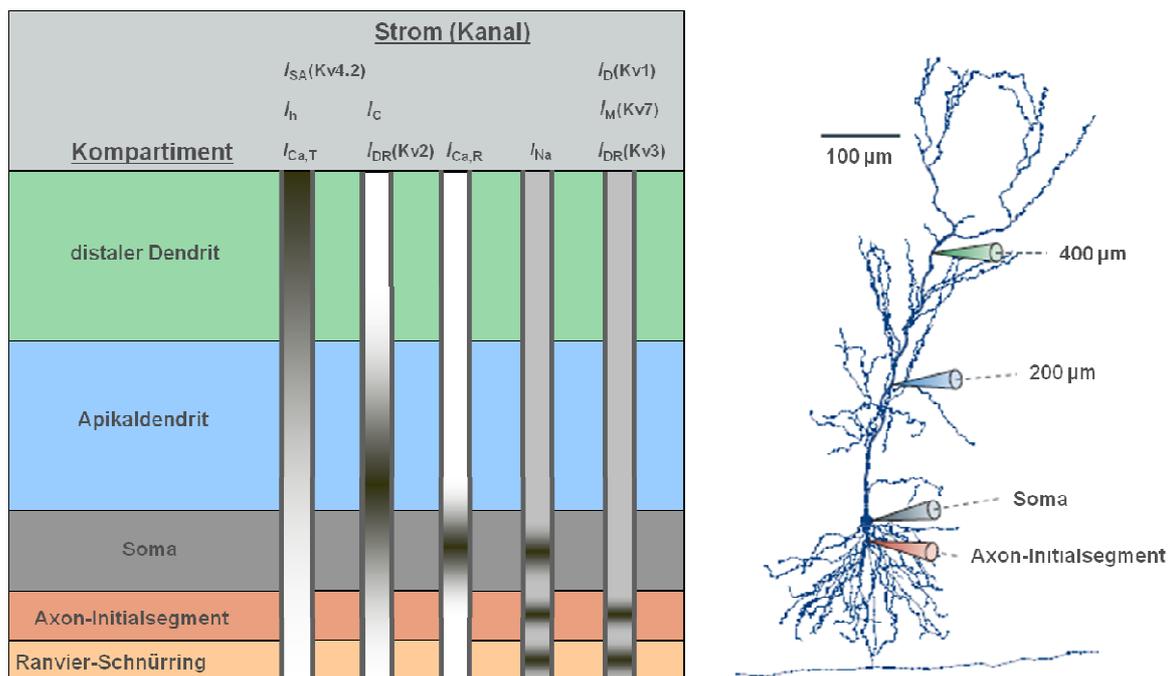


Abbildung 1: Ionenströme hippocampaler Neurone am Beispiel einer CA1-Pyramidenzelle. Lokalisation und Verteilung der Ionenströme in den Kompartimenten einer CA1-Pyramidenzelle mit beispielhafter Morphologie. Schematische Patch-Pipetten zeigen die Lokalisation der einzelnen Kompartimente (modifiziert nach Beck & Yaari 2008).

depolarisiert werden. Nach Überschreiten eines bestimmten Schwellenpotenzials kommt es zu einem Na^+ -Einwärtsstrom (I_{Na}), vermittelt durch spannungsabhängige Na^+ (Nav)-Kanäle. Die Nav-Kanäle sind überwiegend im Soma, im AIS und im Ranvier-Schnürring lokalisiert. Durch Integration synaptischer Signale bilden sie die Grundlage für die Entstehung eines APs und dessen Fortleitung in die Dendriten (Abb. 1; Baranauskas, 2007; Vacher *et al.*, 2008).

Es existieren eine Reihe verschiedener K^+ -Leitfähigkeiten in hippocampalen Neuronen (Abb. 1). Der K^+ -Auswärtsstrom wirkt der neuronalen Erregung entgegen oder führt zu einer Repolarisation der Membran nach einem AP. Die unterschwellig aktivierenden Ströme I_{SA} (*Subthreshold Activating* oder Somatodendritischer A-Typ-Strom) und I_D (*Delay current* bzw. Dendrotoxin-sensitiver K^+ -Strom) verzögern die Entstehung eines APs. Der I_{SA} ist ein schnell aktivierender und inaktivierender Strom, vermittelt durch spannungsabhängige K^+ (Kv)-Kanäle aus der Kv4-Unterfamilie. Seine Dichte nimmt mit der Entfernung vom Soma zu (Abb. 1; Hoffman *et al.*, 1997; Jerng *et al.*, 2004). Der I_D inaktiviert langsam und erholt sich langsam von der Inaktivierung. Er ist vorwiegend am AIS lokalisiert und wird durch Kv1-Kanäle vermittelt (Abb. 1; Storm, 1990; Beck & Yaari,

2008). Der *Delayed-Rectifier* K^+ -Strom (I_{DR}) aktiviert während des APs und leitet zusammen mit dem Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Strom (I_C) die Repolarisation des APs ein. Der I_{DR} wird durch Kv2- und Kv3-Kanäle vermittelt (Baranauskas, 2007). Der I_{DR} , vermittelt durch Kv3-Kanäle, ist überall im Dendriten lokalisiert, jedoch vorwiegend im AIS und im Ranvier-Schnürring. Der Kv2-vermittelte I_{DR} ist im Soma und im proximalen Dendriten lokalisiert (Abb. 1; Vacher *et al.*, 2008). Der I_C ist vorwiegend im Soma und im Apikaldendriten lokalisiert (Storm, 1990; Vacher *et al.*, 2008). Ein unterschwellig aktivierender, nicht inaktivierender und durch muskarinische Acetylcholin-Rezeptoragonisten inhibierbarer K^+ -Strom (I_M) ist überall entlang der Zelle lokalisiert, jedoch vorwiegend im AIS. Er limitiert die Ausprägung einer Nachdepolarisation (Storm, 1990; Beck & Yaari, 2008; Vacher *et al.*, 2008). Schließlich gibt es eine nicht spezifische Kationenleitfähigkeit (Na^+ und K^+), welche durch Hyperpolarisation aktiviert wird (I_h). Der I_h ist ein langsam aktivierender und nicht inaktivierender Strom, der an der Abschwächung erregender postsynaptischer Potenziale (EPSPs) beteiligt ist. Der I_h ist wie der I_{SA} in den Dendriten lokalisiert, ebenfalls mit distal zunehmender Dichte (Abb. 1; Storm, 1990; Beck & Yaari, 2008).

Neben den Leitfähigkeiten für Na^+ und K^+ tragen auch Ca^{2+} -Leitfähigkeiten zur neuronalen Signalverarbeitung bei (Abb. 1). Hierzu gehören unter anderem der $I_{Ca,T}$ (ein transienter Ca^{2+} -Strom), der, wie der I_{SA} , mit distal zunehmender Dichte in den Dendriten lokalisiert ist und der $I_{Ca,R}$ (resistent gegenüber vielen Ca^{2+} -Kanal-Blockern). Die Ca^{2+} -Ströme sind zusammen mit dem I_{Na} an der Vermittlung der Nachdepolarisation beteiligt (Storm, 1990; Beck & Yaari, 2008; Vacher *et al.*, 2008).

2.2 Der somatodendritische A-Typ-Strom (I_{SA})

Durch seine biophysikalischen Eigenschaften (unterschwellige, schnelle Aktivierung und schnelle Inaktivierung) und seine Lokalisation (im Dendriten mit distal zunehmender Dichte) trägt der I_{SA} auf besondere Weise zur Regulation der Erregbarkeit hippocampaler CA1-Pyramidenzellen bei. Der I_{SA} reguliert die neuronale Erregbarkeit durch die Beeinflussung der Repolarisation und damit der AP-Frequenz, die Kontrolle der retrograden Ausbreitung von APs entlang des Apikaldendriten und die Unterdrückung von EPSPs. Dementsprechend wird der I_{SA} auch als „Stoßdämpfer“ der dendritischen Erregung

bezeichnet (Hoffman *et al.*, 1997; Yuste, 1997; Schrader *et al.*, 2002; Bernard & Johnston, 2003). Außerdem begrenzt der I_{SA} die Erregungsausbreitung auf bestimmte dendritische Subsegmente und Verzweigungen (Connor & Stevens, 1971; Hoffman *et al.*, 1997; Ramakers & Storm, 2002; Cai *et al.*, 2004). Die Kv4-Kanäle, die den I_{SA} vermitteln, sind das Ziel vielfältiger, noch unvollständig verstandener Regulationsmechanismen. Durch die lang andauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung (Langzeitpotenzierung) und die Phosphorylierung von Kv4.2-Kanälen durch verschiedene Proteinkinasen zeigte sich eine aktivitätsabhängige Regulation des I_{SA} (Jerng *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2011): Die Proteinkinasenaktivität führt zu einer Abnahme der Oberflächenexpression der Kv4.2-Kanäle und demnach zu einer Abnahme des I_{SA} , was wiederum zu einer Zunahme der Erregbarkeit in hippocampalen Neuronen führt (Lin *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2011). Zudem führt der durch Glutamat vermittelte Ca^{2+} -Einstrom zu einer Clathrin-induzierten Internalisierung von Kv4.2-Kanälen und somit zur Reduktion des I_{SA} (Kim *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2011).

Durch seine zentrale Rolle bei der Regulation neuronaler Erregbarkeit steht der I_{SA} u.a. im Zusammenhang mit der Entstehung von Epilepsien. Eine der häufigsten Epilepsien ist die Temporallappenepilepsie (TLE), bei der gehäuft pharmako-resistente Fälle auftreten, in denen eine chirurgische Therapie zur Anfallskontrolle notwendig ist (Engel, 2001). Die TLE ist zumeist erworben und multifaktoriell bedingt, jedoch sind einige Fälle genetischer Ätiologie beschrieben (Kalachikov *et al.*, 2002; Noebels, 2003; Singh *et al.*, 2006). Im Tiermodell mit Methylazoxymethanol-induzierten hippocampalen Malformationen zeigte sich eine erhöhte epileptische Anfallshäufigkeit im Zusammenhang mit einer verringerten Expression von Kv4.2-Kanälen und einer Reduktion des I_{SA} (Castro *et al.*, 2001). In Pilocarpin-induzierten chronischen Epilepsien zur Rekapitulation der Eigenschaften humaner TLEs, kam es zu einer erhöhten Erregbarkeit von CA1-Pyramidenzellen mit einer verminderten Abschwächung von b-APs (Bernard *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang sind eine verminderte Expression der Kv4.2-Kanäle, eine erhöhte Phosphorylierung und eine Umverteilung der Kv4.2-Kanäle in den Subregionen des Hippocampus beschrieben. Es wurde eine erhöhte Erregbarkeit und eine geringere Schwelle zur Auslösung eines epileptischen Anfalls gezeigt. In diesen Experimenten wurde die Expression, Lokalisation und Funktion von Kv4.2-Kanälen durch epileptische Aktivität beeinflusst, was die Entstehung rezidivierender epileptischer Aktivität in der chronischen Phase begünstigte

(Bernard *et al.*, 2004; Monaghan *et al.*, 2008). Neben diesen tierexperimentellen Befunden wurde eine Deletionsmutation des Kv4.2-Kanals (Kv4.2-N587fsX1) aus einer Patientin mit TLE gewonnen. Ein Aminosäureaustausch führte hier zum Verlust der letzten 44 Aminosäuren des Kv4.2-C-Terminus, und es wurde eine Reduktion der durch den mutierten Kanal vermittelten Stromdichte im Vergleich zum Wildtypkanal beschrieben (Singh *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse lassen eine Beteiligung des Kv4.2-Kanals an der genetischen Ätiologie der Temporallappenepilepsie vermuten.

2.3 Zusammensetzung der Kv4-Kanalkomplexe

Die Familie der Kv-Kanäle wird in mehrere Unterfamilien eingeteilt (Kv1 - Kv12). Die Mitglieder einer Unterfamilie (z. B. Kv4.1, Kv4.2, Kv4.3) zeigen wiederum eine hohe Ähnlichkeit in der Aminosäuren-Sequenz und in den Eigenschaften der vermittelten Ströme (Gutman *et al.*, 2005). Kv-Kanäle setzen sich zusammen aus vier α -Untereinheiten, die die ionenleitende Pore umschließen. Jede α -Untereinheit besteht aus sechs transmembranären Domänen (S1-6), einem zytoplasmatischen N-Terminus und einem zytoplasmatischen C-Terminus. Die Transmembrandomänen S1-4 bilden den Spannungssensor, S5 und S6 das Porenmodul einer α -Untereinheit. Das membrandurchspannende Segment S4 enthält eine Reihe positiv geladener Aminosäuren und spielt eine zentrale Rolle bei der Kanalaktivierung.

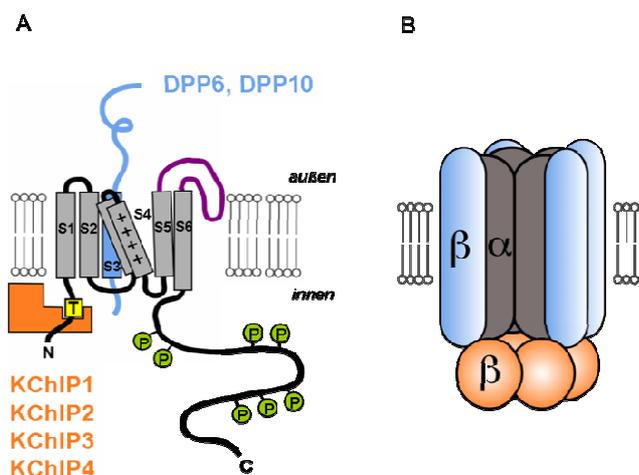


Abbildung 2: α - und β -Untereinheiten des Kv4.2 Kanals.

(A) α -Untereinheit mit sechs transmembranären Domänen S1-6 (grau), einem zytoplasmatischen N- und C-Terminus, einer Tetramerisierungsdomäne (gelb), einem „P-loop“ (violett), C-terminalen Phosphorylierungsstellen (grün) und den β -Untereinheiten DPP (blau) und KChIP (orange). (B) Kv4.2-Kanalkomplex mit vier α -Untereinheiten und jeweils vier DPPs und KChIPs.

Änderungen des Membranpotenzials führen über eine Bewegung des S4-Segments zu einer Konformationsänderung und, durch eine Koppelung zum Porenmodul, zur Öffnung des Kanals (Birnbaum *et al.*, 2004). Zwischen dem Segment S5 und S6 bilden 21 Aminosäuren eine Schleife, welche von außen in die Pore eintaucht (*P-loop*) und als Selektivitätsfilter dient. Der C-Terminus der α -Untereinheit enthält Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen, und der N-Terminus, bei den Unterfamilien Kv1-Kv4, eine Tetramerisierungsdomäne (Abb. 2; Birnbaum *et al.*, 2004; Jerng *et al.*, 2004). Die Tetramerisierungsdomäne dient der Verbindung der vier α -Untereinheiten zu Homo- oder Heterotetrameren (Covarrubias *et al.*, 1991). Die Familien Kv1-Kv4 sind die ersten spannungsabhängigen K^+ -Kanäle, deren Gene aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gewonnen wurden. Sie gelten als die klassischen Vertreter der Kv-Kanäle und werden, den Drosophila-Genen entsprechend, oft als *Shaker*-, *Shab*-, *Shaw*-, und *Shal*-verwandte Kanäle bezeichnet (Gutman *et al.*, 2005; Vacher *et al.*, 2008).

Im Folgenden wird näher auf die Kv4-Kanäle (*Shal*) eingegangen, die vorwiegend im Gehirn, im Herzen und in der glatten Muskulatur vorkommen. Alle Vertreter der Kv4-Unterfamilie (Kv4.1, Kv4.2 und Kv4.3) vermitteln schnell inaktivierende A-Typ-Ströme.

Die porenbildenden α -Untereinheiten der Kv4-Kanäle können mit akzessorischen β -Untereinheiten interagieren (Abb. 2; Birnbaum *et al.*, 2004; Pongs & Schwarz, 2010). Die Kanäle werden in ihrer Funktionalität und ihrer Oberflächenexpression hauptsächlich durch KChIPs (*Kv Channel-Interacting Proteins*) und DPPs (*Dipeptidyl Peptidase-like Proteins*) beeinflusst (An *et al.*, 2000; Nadal *et al.*, 2003). KChIPs sind Ca^{2+} -sensitive Proteine, die über vier EF-Hand-Motive Ca^{2+} binden und zu der Gruppe der Neuronalen-Calcium-Sensoren (NCS) gehören. Sie binden an den N-Terminus der α -Untereinheiten des Kv4-Kanals und beeinflussen so die Oberflächenexpression, Inaktivierung und Erholung von der Inaktivierung des Kanals (An *et al.*, 2000; Bähring *et al.*, 2001b). Durch die Bindung von KChIPs wird die Oberflächenexpression der Kv4-Kanäle und somit die Kv4-vermittelte Stromdichte erhöht. Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung wird zu positiveren Potenzialen verschoben. Zusätzlich wird die makroskopische Inaktivierung der Kv4-Kanäle verlangsamt und die Erholung von der Inaktivierung beschleunigt (An *et al.*, 2000; Bähring *et al.*, 2001b). Es existieren vier verschiedene Gene, die für KChIPs (1-4) kodieren, und eine Vielfalt von Splice-Varianten innerhalb dieser Gruppen. Die KChIPs

unterscheiden sich strukturell durch ihre Länge und die Aminosäuresequenz des N-Terminus und funktionell durch ihre Auswirkungen auf den Kv4-Kanal (Pongs & Schwarz, 2010). KChIP4 unterscheidet sich deutlich in seiner Funktion von den anderen KChIPs. Es bedingt eine Verlangsamung der schnellen Komponente der Inaktivierung ohne potenzierenden Effekt auf die Stromamplitude, die Erholung von der Inaktivierung oder die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung (Holmqvist *et al.*, 2002). Die Expressionsstärke der einzelnen KChIP-Varianten ist für verschiedene Gewebesorten charakteristisch (Tab. 1). Alle KChIP-Varianten sind in unterschiedlicher Ausprägung im Gehirn exprimiert. Einige KChIPs kommen zudem in anderen Organen vor. KChIP1 ist

Tabelle 1: Neuronale Expression von Kv4.2, Kv4.3, KChIPs und DPPs unterschiedlicher Gehirnregionen in Nagetieren

Gehirnregion	Kv4.2/ Kv4.3	KChIP1	KChIP2	KChIP3	KChIP4	DPP6	DPP10
Neocortex							
Lamina I		++	-	-	-		
II-III	+++ / +++	++	++	++	++++	+++	++++
IV	++ / ++	++	++++	+	++	++	++
V	+++ / +++	++	+	+++	+++	+++	++++
VIa	++ / ++	++	+++	++	++	++	+++
VIb	++ / ++	-	+	++++	+++	++	+++
Hippocampus							
CA1	+++ / ++	+	+++	+	+++	++++	+
CA2	++ / ++	+	+++	+	+++	++++	+
CA3	++ / ++	+	++++	+	++	++++	+
Gyrus dentatus	+++ / +++ ++++	+	++++	++++	++	++++	+
Thalamus	+++ / +++	+++	+	+++	+++	+++	+++
Cerebellum							
Körnerzellen	+++ / +++ +++	++	-	++++	-	+++	++
Purkinjezellen	- / +++	+++	-	+++	++++	++	++++

Die Symbole spiegeln die quantitative Expression, ermittelt durch *Northern Blots* und *In-situ Hybridisierung*, wider: - keine Expression, + niedrige Expression, ++ moderate Expression, +++ hohe Expression, ++++ sehr hohe Expression (de Lecea *et al.*, 1994; Serodio & Rudy, 1998; Spreafico *et al.*, 2001; Lilliehook *et al.*, 2003; Xiong *et al.*, 2004; Zaghera *et al.*, 2005).

hauptsächlich im Gehirn exprimiert, KChIP2 sowohl im Herzen als auch im Gehirn, KChIP3 kommt hauptsächlich im Gehirn vor mit geringer Expression im Hoden, und KChIP4 zeigt eine diffuse Expression im gesamten Gehirn (An *et al.*, 2000; Holmqvist *et al.*, 2002). Die neuronale Expression ist spezifisch für die einzelnen KChIPs. Es findet sich eine hohe Expression von KChIP2 im Hippocampus und in Teilen des Neocortex (Tab. 1). KChIP3 ist vor allem im Gyrus dentatus des Hippocampus, im olfaktorischen Cortex und in den Körnerzellen des Kleinhirns exprimiert (Tab. 1; Spreafico *et al.*, 2001; Lilliehook *et al.*, 2003). Im Multiproteinkomplex mit Kv4.2 ist KChIP3 ganz entscheidend an der Vermittlung des I_{SA} beteiligt (Jerng *et al.*, 2005). Versuche mit neuronalem Gewebe von KChIP3 Knock-out-Mäusen zeigten eine stärkere Langzeitpotenzierung im Gyrus dentatus des Hippocampus und eine Suppression des I_{SA} (Lilliehook *et al.*, 2003). KChIP3 ist identisch mit Calsenilin, ein Ca^{2+} und Presinilin bindendes Protein, von dem man vermutet, dass es im Zusammenhang mit der Entstehung von Morbus Alzheimer steht (Buxbaum *et al.*, 1998; Dong-Gyu *et al.*, 2004). Außerdem ist KChIP3 auch identisch mit DREAM (*Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator*), beschrieben als Ca^{2+} -regulierter Transkriptionsfaktor (Carrion *et al.*, 1999), der bei der Nozizeption eine zentrale Rolle spielt (Cheng *et al.*, 2002).

Neben den KChIPs tragen auch DPPs zur Regulation der Kv4-Kanäle bei (Nadal *et al.*, 2003). DPPs sind Glykoproteine mit einem kurzen zytoplasmatischen N-Terminus, einem einzigen transmembranären Segment und einem langen extrazellulären C-Terminus. Eine Coexpression von Kv4-Kanälen mit DPPs bewirkt eine erhöhte Oberflächenexpression, eine beschleunigte Inaktivierung und eine beschleunigte Erholung von der Inaktivierung. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Inaktivierung wird durch DPPs zu negativeren Potenzialen verschoben (Pongs & Schwarz, 2010). Derzeit sind zwei Gruppen von DPPs beschrieben, die nachweislich mit Kv4-Kanälen interagieren: DPP6 (DPPX) und DPP10 (DPPY). Sowohl DPP6 als auch DPP10 weisen eine hohe Expression im Gehirn auf. Im Hippocampus ist DPP6 deutlich stärker exprimiert als DPP10 und im Neocortex weisen beide eine nahezu gleich hohe Expression auf (Tab. 1; Jerng *et al.*, 2005; Pongs & Schwarz, 2010). Innerhalb der beiden DPP-Gruppen entstehen Isoformen durch alternatives Splicen. Diese Isoformen unterscheiden sich in der Sequenz und der Länge des N-Terminus. In der Ratte sind fünf verschiedene Isoformen des DPP6 beschrieben, eine embryonale Isoform (DPP6-E) und vier adulte (DPP6-S, DPP6-L, DPP6-K, DPP6-D;

Nadal *et al.*, 2006). DPP6 ist hauptsächlich im Gehirn exprimiert und nur gering im Ovar, in den Nieren und in den Hoden. Die DPP6-S Splice-Variante zeigt die stärkste Expression im Gehirn, gefolgt von DPP6-K. DPP6-L weist im Vergleich zu den anderen Isoformen nur eine geringe Expression auf und ist vorwiegend im Bulbus olfactorius, im Cerebellum und in der Habenula exprimiert. Im Hippocampus korreliert die Expression von DPP6 (hauptsächlich DPP6-S) mit der Expression der Kv4-Kanäle. Auch DPP6-K zeigt eine starke Expression im Hippocampus. Weiterhin überwiegt die Expression von DPP6-S im Neocortex und im Putamen, wohingegen DPP6-K die meist exprimierte Splice-Variante im Globus pallidus darstellt (Nadal *et al.*, 2006). DPP6 ist essenziell an der Expression der Kv4-Kanäle im Dendriten beteiligt und ausschlaggebend für den Gradienten des I_{SA} im Apikaldendriten. In DPP6 Knock-out-Mäusen zeigte sich eine Reduktion des I_{SA} , insbesondere in den distalen Kompartimenten des Dendriten (Sun *et al.*, 2011). Daraus resultierten eine gesteigerte dendritische Erregbarkeit und eine zunehmende retrograde Ausbreitung von Aktionspotenzialen (Sun *et al.*, 2011). Neben seiner klar definierten Rolle bei der Regulation neuronaler Erregbarkeit scheint DPP6 auch bei verschiedenen neuronalen Krankheiten und Dysfunktionen des Nervensystems involviert zu sein. So zeigten beispielsweise genetische Variationen von DPP6 einen Zusammenhang mit der Entstehung der letal verlaufenden Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) und dem frühkindlichen Autismus (Marshall *et al.*, 2008; van Es *et al.*, 2008).

Die Existenz verschiedener α - und β -Untereinheiten führt zu einer großen Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten für die Bildung eines Kv-Kanals. Unterschiedliche Kombinationen der Untereinheiten führen zu unterschiedlichen Stromeigenschaften. Es wird angenommen, dass der I_{SA} durch ternäre Kanalkomplexe aus Kv4- α -Untereinheiten und den β -Untereinheiten KChIP und DPP vermittelt wird (Jerng *et al.*, 2004; Covarrubias *et al.*, 2008; Maffie & Rudy, 2008). Für die Vermittlung des hippocampalen I_{SA} zeigten sich die α -Untereinheiten Kv4.2 und Kv4.3 und die β -Untereinheiten KChIP2, 3, 4 und DPP6 als dominant (Tab.1; Jerng *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Nadal *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2011). Durch die experimentelle Kombination ganz bestimmter Splice-Varianten der Untereinheiten lassen sich die Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften des I_{SA} zum Teil nachempfinden. Die exakte Kanalzusammensetzung zur Vermittlung des nativen I_{SA} in unterschiedlichen neuronalen Geweben ist jedoch noch nicht vollständig erforscht.

Interessanterweise vermitteln Kv4-Kanalkomplexe nicht nur den neuronalen I_{SA} , sondern auch den transienten K^+ -Auswärtsstrom (I_{to}) kardialer Myozyten (Dixon & McKinnon, 1994; Serodio & Rudy, 1998). KChIP2 ist im Komplex mit dem Kv4.3-Kanal im Herzen als integraler Bestandteil des I_{to} beschrieben (Dixon *et al.*, 1996). KChIP2 weist, in Korrelation mit dem transmuralen Gradienten des I_{to} , eine hohe Expression im Ventrikel-Myokard auf (Rosati *et al.*, 2003). In KChIP2 Knock-out-Mäusen kam es zu einem kompletten Verlust des I_{to} , und die Tiere zeigten eine hohe Anfälligkeit für Arrhythmien (Birnbaum *et al.*, 2004). Eine Beteiligung von DPP6 am Kv4-Kanalkomplex zur Vermittlung des I_{to} wird ebenfalls vermutet (Radicke *et al.*, 2005).

2.4 Pharmakologie Kv4-vermittelter A-Typ-Ströme

Es existiert eine Reihe von pharmakologischen Substanzen, die - mehr oder weniger spezifisch - Kv4-Kanäle und damit die messbaren A-Typ-Ströme blockieren oder in bestimmter Weise modifizieren. Hierzu zählen z. B. 4-Aminopyridin (4-AP) und bestimmte Tarantel-Toxine (Tseng *et al.*, 1996; Diochot *et al.*, 1999; Escoubas *et al.*, 2002; Ebbinghaus *et al.*, 2004). 4-AP und Tarantel-Toxine sind sogenannte *gating modifier* und inhibieren Kv4-vermittelte Ströme durch unterschiedliche Mechanismen. 4-AP wirkt von der Membranninnenseite und bindet bevorzugt an Kv4-Kanäle im geschlossenen Zustand. Die inhibierende Wirkung kommt dadurch zustande, dass 4-AP das Öffnen der Kanäle verlangsamt, ein als *reverse use dependence* bezeichneter Wirkmechanismus (Tseng *et al.*, 1996). Die Tarantel-Toxine interagieren direkt mit dem Spannungssensor und stabilisieren dessen Ruhekonformation und damit den Geschlossen-Zustand des Kanals (Lee *et al.*, 2003; Ebbinghaus *et al.*, 2004). Im Zuge präklinischer Drug-Safety-Testreihen für die Zulassung neuer Medikamente wurden bei zahlreichen Substanzen auch pharmakologische Nebeneffekte auf kardiale Ionenkanäle, einschließlich Kv4-Kanäle, festgestellt. Als Wirkmechanismus wurde meist eine Blockierung des offenen Kanals identifiziert. So blockieren beispielsweise Dihydropyridin-verwandte Cav-Kanal-Antagonisten auch Kv4.2 und Kv4.3 (Hatano *et al.*, 2003) und die Lokalanästhetika Bupivacain und Ropivacain Kv4.3/KChIP2-Komplexe (Friederich & Solth, 2004; Solth *et al.*, 2005). Auch das Anti-Malaria-Medikament Primaquin blockiert Kv4.2/KChIP2-Kanäle und den I_{to} in Rattenmyozyten (Wagner *et al.*, 2010). Dies sind nur einige Beispiele für die

pharmakologische Beeinflussung von Kv4-Kanälen aus einer ständig wachsenden Liste von Substanzen.

Bei der Entwicklung von Substanzen, die den LQT2-assoziierten kardialen Kv11-Kanal potenzieren sollen, wurde von der Firma NeuroSearch die Sulfonyl-Harnstoff-Verbindung NS5806 hergestellt. NS5806 ist eine Kv-Kanal modulierende Substanz, welche keinen Effekt auf Kv11-Ströme hat, aber unter bestimmten Bedingungen Kv4-Ströme potenziert. Die Effekte von NS5806 auf den I_{to} nativer Hundemyozyten und auf entsprechende rekombinante Kv4-Kanalkomplexe, sind in der Literatur bereits beschrieben (Calloe *et al.*, 2010; Lundby *et al.*, 2010). NS5806 führte zu einer Amplitudenzunahme des I_{to} in nativen Hundemyozyten, zu einer Verlangsamung des Stromabfalls und dementsprechend zu einem erhöhten transmembranären Ladungstransfer (Calloe *et al.*, 2009; Calloe *et al.*, 2010). Es wurden die NS5806-Effekte auf Kv4.3/KChIP2/DPP6-Komplexe untersucht, um den Effekt von NS5806 auf die Eigenschaften des I_{to} nachzuempfinden. Diese Experimente zeigten eine Potenzierung der Stromamplitude und eine Verlangsamung der Inaktivierung des Kv4.3-vermittelten Stroms, wenn KChIP2 Bestandteil des Kanalkomplexes war (Calloe *et al.*, 2010; siehe Diskussion).

Die Potenzierung des I_{to} verursachte in nativem kardialem Gewebe die elektrografischen und arrhythmischen Manifestationen des Brugada-Syndroms. Demzufolge wurde NS5806 als pharmakologisches Tool für die Erforschung eines medikamentös induzierten Brugada-Syndroms verwendet (Calloe *et al.*, 2009; Minoura *et al.*, 2011). Die Effekte von NS5806 im neuronalen Zellverband sind dagegen bis jetzt nur ansatzweise untersucht. In CA1-Pyramidenzellen hippocampaler Schnittpräparate der Maus führte NS5806 zu einer verstärkten Abschwächung von b-APs (Minge & Bähring, 2011). In diesem Zusammenhang noch nicht untersucht sind die Effekte von NS5806 auf den für die Regulation der neuronalen Erregbarkeit essenziellen I_{SA} hippocampaler Neurone und auf entsprechende rekombinante Kv4-Kanalkomplexe.

2.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die Beeinflussung des I_{SA} kultivierter hippocampaler Neurone durch NS5806 zu beschreiben. Um den Effekt von NS5806 auf die nativen

Ströme zu rekapitulieren und um einen genaueren Einblick in die molekulare Aktivität von NS5806 zu bekommen, wurden auch Experimente an HEK293-Zellen, transfiziert mit der cDNA rekombinanter Kanalkomplexe, durchgeführt. In diesem Rahmen wurde auch der Effekt von NS5806 auf die TLE-assoziierte C-terminale Deletionsmutante (N587fsX1) des Kv4.2-Kanals untersucht. Die Dysregulation somatodendritischer Erregbarkeit in hippocampalen Neuronen steht im Zusammenhang mit der Entstehung von Temporallappenepilepsien (Bernard *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006; Beck & Yaari, 2008). Eine pharmakologische Potenzierung des I_{SA} und eine eventuelle Inhibition der dendritischen Erregungsausbreitung sind somit von besonderem Interesse.

3. Material und Methoden

3.1 Primärkultur hippocampaler Neurone

Die Primärkulturen hippocampaler Neurone wurden von Michaela Schweizer und Chudamani Raithmore am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) vorbereitet. Die Kulturen wurden von neugeborenen Wistar-Ratten (P0) gewonnen (Neuhoff *et al.*, 1999). Es handelte sich um dissoziierte Mischkulturen, welche eine Vielfalt von Neuronen enthielten. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^5 pro Glasplättchen (Durchmesser: 12 mm) verteilt, die zur besseren Haftung der Zellen mit kurzketzigem Poly-L-Lysin beschichtet waren. Diese Glasplättchen befanden sich in einer Plastikschiene mit 24 Vertiefungen (*24-Well-Plate*) und wurden mit Neurobasal-A-Medium und B27-Zusatz (Invitrogen) bedeckt. Die Zellen wurden 7 Tage unter Standardbedingungen (37° C, 5% CO₂) in einem Inkubator (Heraeus) aufbewahrt. Für die elektrophysiologischen Experimente wurde jeweils ein Glasplättchen mit wenig Vaseline am Boden einer 3,5 cm-Kulturschiene (Fläche = 8,8 cm², *nunc standard dishes*, Nunc) fixiert und die Kulturschiene mit Badlösung befüllt.

3.2 Routinehaltung der HEK293-Zelllinie

Für die Expression rekombinanter Kanalkomplexe (siehe 3.3.4) wurden immortalisierte menschliche embryonale Nierenzellen (*Human Embryonic Kidney*- bzw., HEK293-Zellen) verwendet. Diese Zellen wurden im Inkubator bei Standardbedingungen in Kulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm² (Nunc, Wiesbaden) kultiviert. Das Medium bestand aus 500 ml Dulbecco's MEM (*Minimal Essential Medium*) / NUT Mix F12, 55,5 ml hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (Seromed Biochrom) und 5 ml einer Penicillin/ Streptomycin/ Glutamin-Lösung (Invitrogen). Alle 2-4 Tage hatten sich die Zellen soweit vermehrt (Konfluenz des Zellrasens 80-100 %), dass eine Subkultur angelegt werden konnte (Passagierung). Hierzu wurde das Nährmedium aus der Kulturflasche entfernt und die Zellen mit PBS (Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur mit Trypsin-Lösung inkubiert und schließlich mit

einer Pipette vom Flaschenboden gelöst und vereinzelt. Der gewonnenen Zellsuspension wurde frisches Medium hinzugefügt und die Zellzahl pro ml Nährmedium mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Pro Kulturschale wurden 6 ml Zellsuspension mit einer Zelldichte von $2-6 \times 10^4$ pro ml verwendet. Für die elektrophysiologischen Experimente wurden 3,5 cm-Kulturschalen, beschichtet mit kurzkettigem Poly-L-Lysin, verwendet. Nach Entfernen des überschüssigen Poly-L-Lysins wurden die Schalen mindestens 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und dann mit 2 ml der Zellsuspension ($1-4 \times 10^4$ Zellen pro ml) beschickt.

3.3 Heterologe Expression rekombinanter Kanalkomplexe

3.3.1 Verwendete Klone

Für die heterologe Expression rekombinanter Kanalkomplexe in HEK293-Zellen wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Klone verwendet. Für alle Klone diente pcDNA3, versehen mit einem Gen für Ampicillin-Resistenz, als Vektor.

Tabelle 2: Verwendete Klone

Klon	Erläuterung
Kv4.2 (NM_012281.2; Zhu <i>et al.</i> , 1999)	Humane Kv4.2- α -Untereinheit
Kv4.2-N587fsX1 (Singh <i>et al.</i> , 2006)	Deletionsmutante der humanen Kv4.2- α -Untereinheit, gewonnen aus einer Patientin mit TLE und von Kazuhiro Yamakawa zur Verfügung gestellt. Durch eine Deletion von 5 Basen kommt es zu einem <i>frame-shift</i> und hierdurch zu einer Deletion der letzten 44 Aminosäuren des C-Terminus des Kv4.2-Kanals.
KChIP3a (NM_001936.3; An <i>et al.</i> , 2000)	Kurze Splice-Variante von KChIP3
DPP6-S (NM_001034914.1; Wada <i>et al.</i> , 1992)	Kurze Splice-Variante von DPP6
DPP6-E (bzw. DPP6a; AF092507; Hough <i>et al.</i> , 1998)	Embryonale Isoform von DPP6; von Henry Jerng zur Verfügung gestellt und in der vorliegenden Arbeit als DPP6-E bezeichnet

EGFP (BD Biosciences, Heidelberg)	(Enhanced Green Fluorescent Protein) Das fluoreszierende Protein wurde, zur Identifizierung erfolgreich transfizierter Zellen, mit den Kanälen coexprimiert.
-----------------------------------	--

3.3.2 Transformation kompetenter Zellen

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme freier DNA in kompetente (zur Aufnahme befähigte) Bakterien. Man verwendet die Transformation, um DNA zu vervielfältigen. In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür *Escherichia coli* Zellen aus dem Stamm XL1-Blue verwendet. Zu 50 µl Zellsuspension wurde 1 µl des zu transformierenden Konstrukts gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz für 90 s auf 42 °C erhitzt. Dieser Hitzeschock diente dazu, die Bakterienmembran durchlässig zu machen und somit die Aufnahme des Vektors in die Zelle zu ermöglichen. Nach weiteren 2 min auf Eis wurde 1 ml 37 °C warmes LB-Medium (*Lysogeny Broth*) hinzugefügt und der Ansatz bei 37 °C im Schüttler bebrütet. Schließlich wurden die Bakterien auf einem LB-Ampicillin-Agar (100 µg Ampicillin/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Unter diesen Bedingungen bildeten nur diejenigen Bakterien Kolonien, die das Plasmid mit der DNA und dem Gen für Ampicillin-Resistenz enthielten. Am nächsten Tag wurde eine Bakterienkolonie in 50 ml LB-Medium und 50 µl Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg Ampicillin/ml) in einem Kulturröhrchen vermischt. Zunächst ruhte der Ansatz bei Raumtemperatur und wurde dann über Nacht im Warmluftschüttler bei 37 °C inkubiert.

3.3.3 Plasmidisolierung

Die Isolierung des Plasmids aus dem oben beschriebenen Ansatz erfolgte mithilfe des „Plasmid Midi Kit“ der Firma Qiagen. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde mittels eines Photometers bestimmt. Aus der DNA-Lösung wurden 5 µl mit 95 µl H₂O verdünnt und in eine Plastikkuvette gegeben. Die Absorption der Lösung wurde mit einem Spektralphotometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech) bei 260 nm, dem Absorptionsoptimum von DNA, gegen reines Wasser gemessen. Unter diesen Bedingungen betrug die Absorption bei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml $E_{260} = 1$. Basierend darauf konnte die Konzentration der isolierten DNA ermittelt werden.

3.3.4 Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man den Transfer fremden genetischen Materials in eine Zelle. Für alle beschriebenen Experimente wurde die DNA des Kv4.2-Kanals und seiner β -Untereinheiten mittels Liposomen-Einschlussmethode in die HEK293-Zellen transferiert. Die Liposomen-Einschlussmethode zählt zu den chemischen Verfahren der Transfektion von Zellen. Hierbei transportiert das Liposom die DNA durch Fusion mit der Zellmembran in das Innere der Zelle. Die HEK293-Zellen wurden 24 Stunden nach dem Ausplattieren transfiziert. Als Vorbereitung für die Transfektion wurden das Transfektionsmedium (Optimem), das Kulturmedium und das eigentliche Transfektionsreagenz LipofektAMINE™ im Wasserbad bei 37 °C angewärmt. Für die Transfektion wurden 0,05 μ g Kv4.2, 1 μ g DPP6, 1 μ g KChIP3 und 0,5 μ g EGFP DNA pro Kulturschale verwendet und mit entsprechenden Vielfachen von 100 μ l Optimem vermischt. Parallel dazu wurde eine Mischung aus 3 μ l LipofektAMINE™ pro Kulturschale und entsprechenden Vielfachen von 100 μ l Optimem erstellt. Das LipofektAMINE™-Gemisch wurde nun zu dem DNA-Gemisch gegeben, vermischt und dann 30 min bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Die Kulturschalen wurden währenddessen mit 2 ml Optimem gewaschen und schließlich mit jeweils 800 μ l Optimem bedeckt. Danach ruhten die Kulturschalen ebenfalls für 30 min bei 37 °C im Wärmeschrank. Anschließend wurden 200 μ l LipofektAMINE™-DNA-Gemisch pro Kulturschale hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) im Inkubator. Das Kulturmedium wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Zellen im Inkubator aufbewahrt. Nach fünf Stunden wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch Kulturmedium (2 ml pro Kulturschale) ersetzt. Die Experimente wurden 12-24 Stunden nach der Transfektion durchgeführt.

3.4 Elektrophysiologie

3.4.1 Die Patch-Clamp-Technik

Die Engländer Alan Hodgkin und Andrew Huxley erhielten 1963 den Nobelpreis für die Beschreibung der Entstehung des Aktionspotenzials am Riesenaxon des Tintenfischs mithilfe der Voltage-Clamp-Technik (Hodgkin & Huxley, 1952). Sie wiesen Ionenströme über der Membran nach, die zur Entstehung neuronaler Erregung führten. Hierzu wurden

zwei Elektroden in das Axon injiziert und der Zellmembran eine Spannung aufgezwungen (mit einer Elektrode wurde die Membranspannung gemessen, und mit der anderen Elektrode der nötige Kompensationsstrom injiziert). Der Kompensationsstrom wurde registriert. Er entsprach direkt den Änderungen der Membranleitfähigkeit für Na^+ und K^+ über die Zeit in Abhängigkeit von der angelegten Spannung. Dies war die Erstbeschreibung spannungsaktivierter Na^+ und K^+ -Ströme in erregbaren Membranen.

Die Patch-Clamp-Technik ist eine Weiterentwicklung der Voltage-Clamp-Technik. Sie ist heute eine der wichtigsten physiologischen Arbeitsmethoden zur Erforschung der Funktionen und der Pharmakologie von Ionenkanälen. Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelten diese Technik, um die Eigenschaften von Einzelkanalströmen zu untersuchen. Unter einer Glaspipette isolierten sie einen Flecken (*Patch*) der Zellmembran von der Umgebung. In diesem Membranflecken befanden sich einzelne Ionenkanäle, die elektrisch abgeschirmt auf ihre Eigenschaften untersucht werden konnten. Hierzu enthielt die elektrolytgefüllte Glaspipette eine Mikroelektrode, um sowohl die Spannungs- als auch die Strommessungen durchzuführen. Diese Experimente begründeten den Beginn der Patch-Clamp-Technik. Für ihre Beobachtungen an einzelnen Kanälen erhielten Erwin Neher und

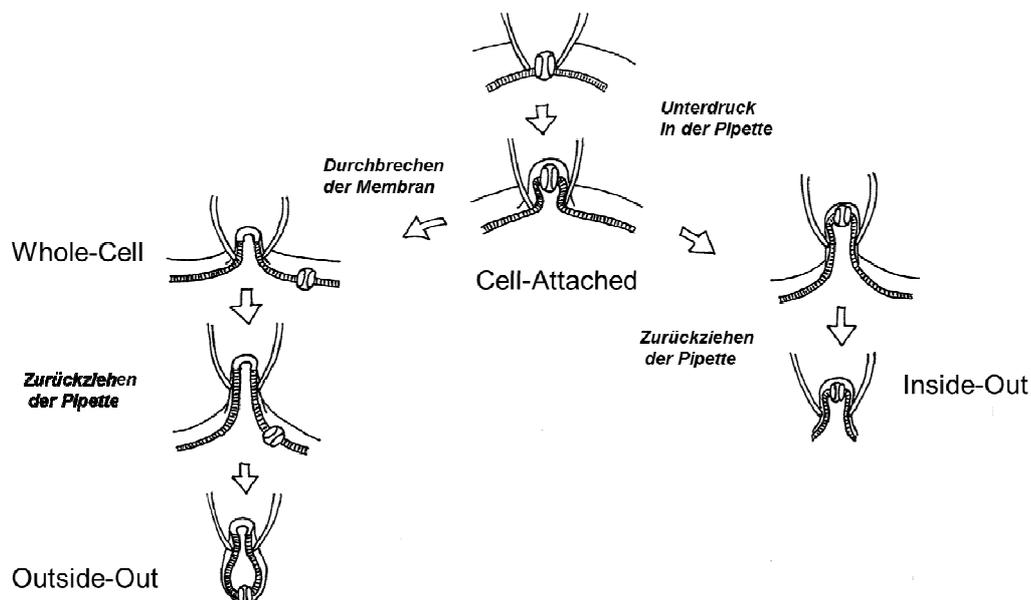


Abbildung 3: Patch-Clamp-Konfigurationen und ihre Entstehung.

Dargestellt sind die Pipette und ein Teil der Zellmembran. Ausgangssituation ist immer die hochohmige „Abdichtung“ (*Giga-Seal*) eines Areals auf der Zellmembran durch die Pipettenmündung. Durch Anlegen eines Unterdrucks in der Pipette, der zum Durchbrechen der Membran führt, und/oder durch das Zurückziehen der Pipette können die Ableitungsformen variiert werden (modifiziert nach Hamill *et al.*, 1981).

Bert Sakmann 1991 den „Nobelpreis für Medizin oder Physiologie“ (Neher & Sakmann, 1976).

Die Patch-Clamp-Technik nutzt unterschiedliche Möglichkeiten der Ableitungen an Zellmembranen (Abb. 3; Hamill *et al.*, 1981; Numberger & Draguhn, 1996). Nach dem Annähern der Pipette an die Zelle wird eine feste Verbindung zwischen der Membran und der Pipette mit Widerständen im Gigaohm-Bereich (*Giga-Seal*) hergestellt. Neben verschiedenen anderen Ableitkonfigurationen ermöglicht der *Giga-Seal* durch Anlegen eines Unterdrucks in der Pipette, den darunterliegenden Membranflecken zu durchbrechen. Hierbei erhält man Zugang zum Intrazellularraum und die Möglichkeit, die intrazelluläre Ionenzusammensetzung anhand der Pipettenlösung festzulegen. Durch eine jeweils definierte Zusammensetzung der intra- und extrazellulären Lösung können so gewünschte Ionengradienten über der Membran erzeugt werden. Diese Ableitkonfiguration wird Whole-Cell-Konfiguration genannt (Abb. 3). Alle Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in der Whole-Cell-Konfiguration durchgeführt.

Zur Messung der Membranströme mit der Patch-Clamp-Technik bedarf es eines speziellen Schaltkreises (Abb. 4; Numberger & Draguhn, 1996). Dieser Schaltkreis stellt einen Strom-Spannungs-Wandler dar und befindet sich im Vorverstärker, der sogenannten *Head-*

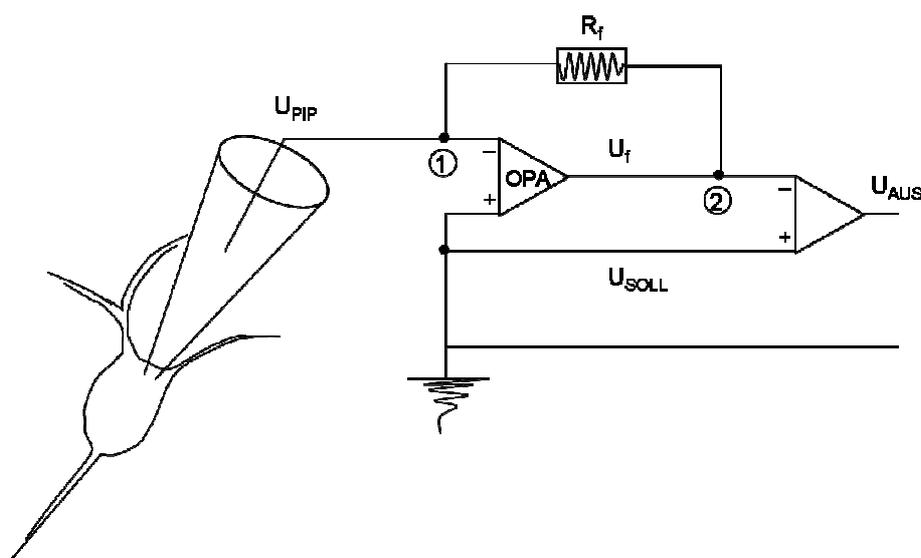


Abbildung 4: Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers (nach Numberger & Draguhn, 1996).

R_f : Rückkopplungswiderstand, OPA: Operationsverstärker, U_{SOLL} : Sollspannung, U_{PIP} : Pipettenspannung, U_{AUS} : Ausgangsspannung zur Umrechnung in den gemessenen Strom.

Stage, des Patch-Clamp-Verstärkers. Von dort werden die Signale über ein Kabel zur Steuereinheit des Verstärkers geleitet. Mithilfe des Strom-Spannungs-Wandlers wird bei Konstanzhaltung einer Membranspannung der hierfür notwendige Kompensationsstrom gemessen. Die wichtigste Einheit dieses Schaltkreises stellt der Operationsverstärker (*Operational Amplifier*, OPA) dar (Abb. 4). An den zwei Eingängen des OPA wird die Pipettenspannung (U_{PIP}) mit der vorgegebenen Sollspannung (U_{SOLL}) verglichen. Besteht eine Spannungsdifferenz, so wird am Ausgang des Operationsverstärkers eine Spannung erzeugt, die proportional zu dieser Spannungsdifferenz ist, allerdings sehr viel größer. Es ergibt sich eine Spannungsdifferenz (U_f) zwischen der Pipettenspannung und der Spannung am Ausgang des OPA (zwischen Punkt 1 und Punkt 2 des Schaltkreises in Abb. 4). Nach den Regeln des Ohmschen Gesetzes ($U_f = R_f \times I$) fließt über den Rückkopplungswiderstand (R_f) der zu messende Kompensationsstrom. Er fließt, solange eine Spannungsdifferenz zwischen U_{SOLL} und U_{PIP} besteht (Abb. 4). Die im Vorverstärker gemessenen Ströme werden in einem Hauptverstärker verstärkt und die Messungen über einen Computer gesteuert.

3.4.2 Elektrolytlösungen

Tabelle 3: Extrazellular- bzw. Badlösungen

	HEK293-Zellen (mM)	Neurone (mM)
NaCl	135	160
KCl	5	2,5
CaCl ₂	2	2
MgCl ₂	2	1
HEPES	5	10
Saccharose	10	-
Glucose	-	10
errechnete Osmolarität (mOsm)	307	354
pH *	7,4	7,3

* der pH wurde mit NaOH eingestellt

Tabelle 4: Intrazellulär- bzw. Pipettenlösungen

	HEK293-Zellen (mM)	Neurone (mM)
K-MeSO ₃	-	140
KCl	125	5
CaCl ₂	1	0,5
MgCl ₂	1	0,5
EGTA	11	5
HEPES	10	10
Saccharose	10	-
<u>Unmittelbar vor den Experimenten:</u>		
Glutathione	2	-
K ₂ ATP	2	-
MgATP	-	2
errechnete Osmolarität (mOsm)	295	308
pH *	7,2	7,2

* der pH wurde mit KOH eingestellt

3.4.3 Pharmakologie

3.4.3.1 NS5806

NS5806 (N- [3,5-bis (Trifluoromethyl) Phenyl] -N' - [2,4-Dibromo-6- (1H-Tetrazol-5-yl) Phenyl] -Harnstoff; Abb. 5) wurde von NeuroSearch A/S, Ballerup, Dänemark

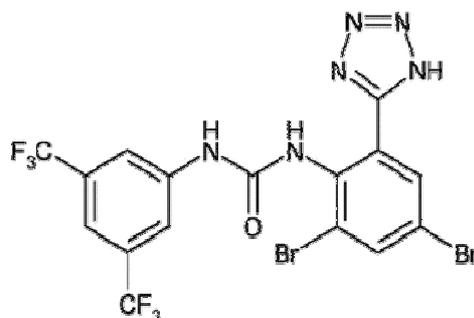


Abbildung 5: Strukturformel von NS5806.

N- [3,5-bis (Trifluoromethyl) Phenyl] -N' - [2,4-Dibromo-6- (1H-Tetrazol-5-yl) Phenyl] -Harnstoff hergestellt von NeuroSearch A/S, Ballerup, Dänemark.

synthetisiert und als Pulver zur Verfügung gestellt. NS5806 wurde in Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) gelöst und als 20 mM Lösung vorrätig gehalten. Aus diesem Vorrat wurden Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen für die Experimente hergestellt. Die meisten Experimente erfolgten durch Superfusion mit nur einer NS5806-Konzentration (z. B. 20 μ M). Zur Erfassung der Konzentrationsabhängigkeit des NS5806-Effekts erfolgte eine Superfusion mit aufsteigender NS5806-Konzentration (z. B. 0,66, 2, 6,6, 20, 66, 200 μ M).

3.4.3.2 Tetrodotoxin

Tetrodotoxin (TTX) ist ein selektiver Blocker von Nav-Kanälen, der in der Natur vor allem in Kugelfischen (*Tetraodontidae*) zu finden ist. In den Experimenten an kultivierten hippocampalen Neuronen wurde den Bad- und Superfusionslösungen TTX in einer Endkonzentration von 500 nM zugefügt. Die Blockierung der schnellen Na⁺-Leitfähigkeit verhinderte die „Kontaminierung“ der Aktivierungsphase spannungsaktivierter K⁺-Ströme. Außerdem unterdrückte die Blockierung von Nav-Kanälen durch TTX in präsynaptischen Zellen die Ausschüttung großer Transmittermengen, was die störende Mitregistrierung postsynaptischer Ströme umging.

3.4.4 Versuchsaufbau und -durchführung

3.4.4.1 Versuchsaufbau

Der Messplatz wurde von mechanischen Schwingungen und elektrischen Signalen der Umgebung abgeschirmt. Hierzu befand sich das Mikroskop mit der Messkammer auf einem schwingungsgedämpften Tisch, der von einem Faradayschen Käfig umgeben war (Abb. 6A). Für die Patch-Clamp-Experimente wurde ein inverses Mikroskop (AXIOVERT 135, Carl Zeiss AG) verwendet. Es wurden Objektive mit 10- und 40-facher Vergrößerung und ein Okular mit 10-facher Vergrößerung verwendet. EGFP-exprimierende HEK293-Zellen wurden durch ihre grüne Fluoreszenz in Gegenwart von UV-Licht (HBO-UV Halogenlampe und entsprechender Filtersatz Grün H 546) identifiziert. Die elektrolytgefüllte Pipette befand sich in einem Pipettenhalter unmittelbar an der *Head-Stage* (Abb. 6B) und wurde durch einen Mikromanipulator gesteuert. Der Mikromanipulator diente zur präzisen Annäherung der Pipettenöffnung an die Zelle unter mikroskopischer Sichtkontrolle. Das Innere der Pipette war mit einem Schlauch zur

Steuerung des Drucks in der Pipette verbunden. Hier konnte vor Einführen der Pipette in die Badlösung ein Überdruck angelegt und zur Ausbildung eines Giga-Seals sowie zum „Öffnen“ der Zelle für die Whole-Cell-Ableitung ein Unterdruck erzeugt werden. Die Pipetten wurden aus dünnwandigen Borosilikatglasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 1,05 mm und einem Außendurchmesser von 1,5 mm (GB150T-8P, Science Products GmbH) hergestellt. Hierzu diente ein Pipettenziehgerät (*DMZ-Universal-Puller*, Zeitz Instruments GmbH), das die Glasröhrchen unter Hitzezufuhr und horizontalem Zug mittig teilte. Die Pipetten wurden unter dreimaligem Erhitzen gezogen und anschließend die

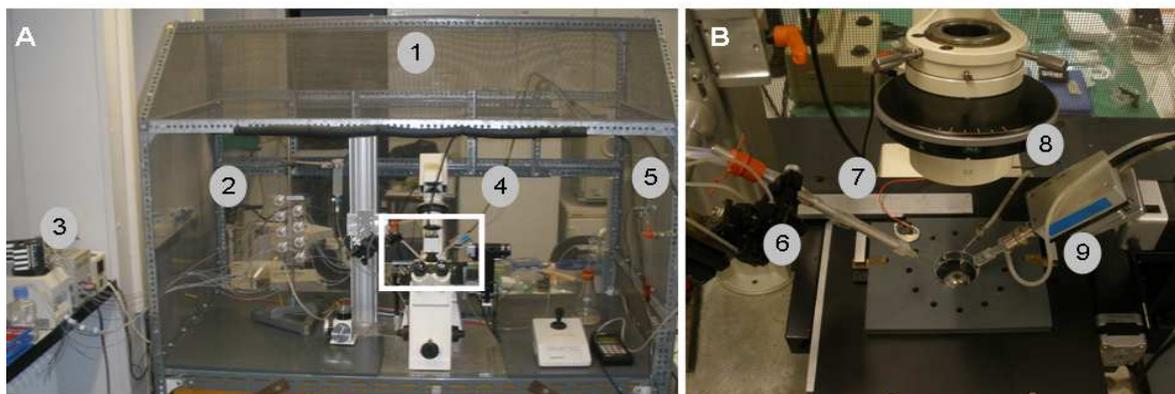
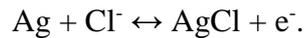


Abbildung 6: Aufbau des Messstands.

(A) 1: Faradayscher Käfig; 2: Multikanal-Superfusionsystem; 3: peristaltische Pumpe; 4: Mikroskop mit Objektisch und Messkammer; 5: Wassersäule und Schlauchsystem für den Pipettendruck; nicht dargestellt: Patch-Clamp Verstärker und Computer (B): Detailvergrößerung von Objektisch und Messkammer; 6: Superfusionspritze; 7: Referenzelektrode; 8: Abfluss der Badlösung; 9: Head-Stage mit Messelektrode und Patch-Pipette.

Spitze „hitzepoliert“. Durch Variation von Hitze, Ziehzeit und Ziehstärke konnte die Form und die Öffnung der Pipette beeinflusst werden. Die Öffnungswiderstände der gefüllten Pipetten in der Badlösung betragen in den beschriebenen Experimenten zwischen 2 und 4 M Ω . Als Messelektrode diente ein chlorierter Silberdraht, der sich in der Pipettenlösung befand und in Verbindung mit dem Vorverstärker (*Head-Stage*) des Patch-Clamp-Verstärkers stand. Das Chlorieren des Silberdrahts erfolgte mit einer automatisierten Elektrolyse-Apparatur (ACI-01, npi). Dazu wurde der Silberdraht zunächst mit feinem Sandpapier abgeschliffen und mit alkoholischer Lösung gesäubert. Der blanke Silberdraht wurde dann in eine 3 M KCl-Lösung getaucht und mit der Anode des Geräts verbunden. Zusätzlich wurde ein Platindraht in die KCl-Lösung getaucht und mit der Kathode verbunden. Durch Anlegen einer definierten Spannung wurden Elektronen gelöst. An dem mit der Anode verbundenen Draht bildete sich Silberchlorid nach der Gleichung:



Als Referenzelektrode (Badelektrode) diente bei den Messungen ein Silber/Silberchlorid-Pellet (*World Precision Instruments*), das in die Badlösung getaucht wurde und über ein Kabel mit dem entsprechenden Eingang der *Head-Stage* verbunden war (Abb. 6B). Die vom Vorverstärker gemessenen Ströme wurden vom Hauptverstärker gefiltert und verstärkt (EPC9-Verstärker, HEKA). Mithilfe eines Computers und der Software PULSE (HEKA *electronics*) wurden Verstärker und Messungen gesteuert.

Als Messkammer diente eine mit Extrazellularflüssigkeit befüllte Kulturschale (siehe 3.2). Zur lokalen Superfusion der Zellen mit pharmakologisch abgewandelten Extrazellularlösungen (NS5806 bzw. TTX) wurde ein Multikanal-Superfusionssystem verwendet (Abb. 6A). Angetrieben durch eine peristaltische Pumpe zirkulierten Extrazellularlösungen mit bis zu acht unterschiedlichen Zusammensetzungen bzw. unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz (NS5806) in gesonderten Kreislaufsystemen aus Silikon-Schläuchen. Die Fließgeschwindigkeit konnte mittels der Pumpe reguliert werden. Durch die magnetische Steuerung von 3-Wege-Ventilen konnte jeweils die gewünschte Lösung aus dem Kreislaufsystem zur Superfusionsspritze umgeleitet werden. Über ein metallenes Mündungsröhrchen wurde Kontroll- bzw. Testlösung (NS5806) präzise unter mikroskopischer Sichtkontrolle auf die zu messende Zelle geleitet (Abb. 6B). Um eine Akkumulation von NS5806 im Messschälchen zu vermeiden, fand ein ständiger Baddurchfluss mit Kontrolllösung statt (Badsuperfusion). Gegenüber dem Badzufluss erfolgte das Absaugen der Badlösung über ein L-förmig gebogenes und blind endendes Glasröhrchen mit seitlicher Öffnung zum Konstanthalten des Flüssigkeitsspiegels (Abb. 6B). Das Glasröhrchen war über einen Schlauch mit einem Auffanggefäß verbunden, dies wiederum über einen weiteren Schlauch mit einer Unterdruckpumpe.

3.4.4.2 Versuchsdurchführung

Zur Vorbereitung der Experimente wurde das Superfusionssystem mit den Lösungen befüllt. Hierzu wurden 50 ml-Röhrchen mit Lösungen unterschiedlicher NS5806-Konzentrationen und der Extrazellularlösung als Kontrolllösung angesetzt und durch die hydraulische Pumpe im Schlauchsystem verteilt. Es wurde als nächstes die

Intrazellulärlösung vorbereitet, in einem 10 ml Reaktionsgefäß auf Eis gelagert und ein Vorrat an Pipetten gezogen. Dann wurde eine Kulturschale mit Zellen aus dem Inkubator entnommen, und unter der Werkbank das Kulturmedium durch die Extrazellulärlösung ausgetauscht. Schließlich wurde die Kulturschale in den Objektisch des Mikroskops eingelassen. Zu Beginn des Experiments wurde eine Pipette mit Intrazellulärlösung befüllt und der Silberdraht der Messelektrode in die Pipette geführt. Mithilfe eines Schlauchs und einer Wassersäule wurde in der Pipette ein Überdruck erzeugt. Dieser verhinderte, dass die Pipettenöffnung beim Einführen in die Badlösung verstopfte. Die Experimente wurden per PULSE-Software über den Computer verfolgt und gesteuert. Beim Einführen der Pipette ins Bad entstanden sogenannte Offset-Potenziale zwischen Messelektrode und Referenzelektrode. Diese können zwischen den Silber/Silberchloridelektroden und den sie umgebenden Lösungen und/oder zwischen der Intra- und Extrazellulärlösung (Liquid-Junction-Potenzial) auftreten. Damit diese Potenziale die Messungen nicht verfälschten, wurde der *Offset* durch Festlegen des Nullpunkts des Potenzials nach Einführen der Pipette ins Bad korrigiert. Im Falle der MeSO_3^- -haltigen Pipettenlösung bestand zwischen der Intra- und Extrazellulärlösung aufgrund der unterschiedlichen Mobilität der Anionen Cl^- und MeSO_3^- ein Liquid-Junction-Potenzial von -7 mV . Der Fehler bei der Offset-Korrektur wurde durch eine im PULSE-Programm implementierte Routine berücksichtigt. Anhand eines wiederkehrenden Testspannungspulses wurde der Pipettenstrom durch das Aufnahmeprogramm kontinuierlich aufgezeichnet. Der daraus errechnete Pipettenwiderstand wurde angezeigt.

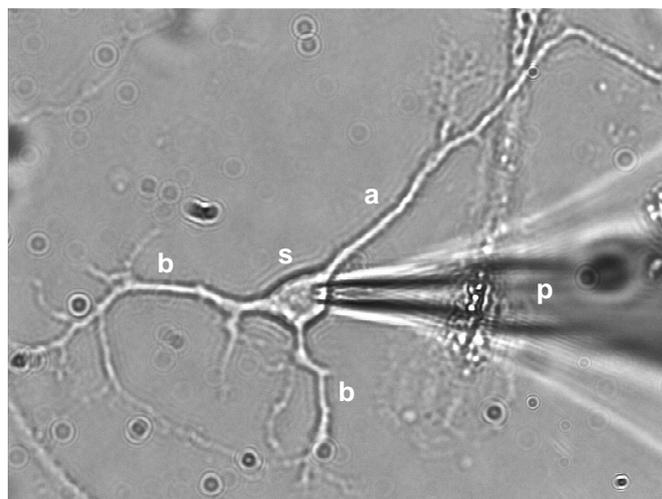


Abbildung 7: Mikroskopisches Foto eines pyramidal-geformten kultivierten hippocampalen Neurons.
(a) Apikaldendrit, (b) Basaldendriten, (p) Pipette, (s) Soma der Zelle.

Nach der Auswahl einer geeigneten Zelle wurde die Superfusionsmündung in unmittelbarer Nähe der Zelle platziert und die Zelle mit der Kontrolllösung superfundiert. Mithilfe des Mikromanipulators und unter mikroskopischer Sichtkontrolle wurde dann die Pipette an die Zelle geführt. Beim Zellkontakt wurde mikroskopisch teilweise eine Einwölbung an der Zelle wahrgenommen, und über das PULSE-Programm wurde durch den zunehmenden Widerstand (R_{SEAL}) eine Abnahme des durch den Testpuls vermittelten Stroms beobachtet. Um eine feste Verbindung zwischen Membran und Pipette herzustellen, wurde durch leichtes Saugen über einen Schlauch ein Unterdruck hergestellt, bis es zu einem Widerstand im Gigaohm-Bereich kam (*Giga-Seal*). Durch Sog wurde der Membran-Patch unter der Pipette eröffnet und ein Zugang zum Inneren der Zelle hergestellt. Dies hatte einen Einstrom der Pipettenlösung in die Zelle zur Folge. In der nun vorliegenden Whole-Cell-Konfiguration war es möglich, die Eigenschaften der in der Membran befindlichen Kanäle durch ausgewählte Spannungspulsprotokolle und Variation der Superfusion zu untersuchen.

3.4.5 Kapazitive Ströme, Serienwiderstand, Leckstrom

Die Aussagekraft der Patch-Clamp-Experimente kann durch eine Reihe von Faktoren beeinträchtigt werden. Um die Messbedingungen zu optimieren und die Korrektheit der Messungen zu gewährleisten, müssen diese Faktoren beachtet und entsprechende Artefakte kompensiert werden. In der Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik ist die Pipette mit der Membran der Zelle verbunden und stellt einen elektrischen Zugang zum Zellinneren her (Abb. 8). Zur Erfassung der Kanaleigenschaften wird die Potenzialdifferenz an der Membran mithilfe rechteckförmiger Spannungspulse variiert. Sowohl die in der Badlösung befindliche Pipettenwand als auch die Zellmembran stellen einen Kondensator dar. Die Zellmembran besitzt also neben ihrem Widerstand auch eine Kapazität (RC-Glied; Abb. 8). Der Kondensator wird bei jeder Spannungsänderung (zu Beginn und zum Ende eines rechteckigen Spannungspulses) auf- und entladen. Bei diesem Ladungsfluss entstehen kapazitive Ströme, die rasch ansteigen und exponentiell abfallen. Dieser Ladungstransfer kann durch eine Zeitkonstante beschrieben werden, die abhängig vom Widerstand und der Kapazität ist ($\tau = R \times C$). Beim Eintauchen der Pipette in die Badlösung entsteht eine schnelle Komponente kapazitiver Ströme durch einen Ladungstransfer an der Pipettenwand. Die langsame Komponente entsteht nach dem

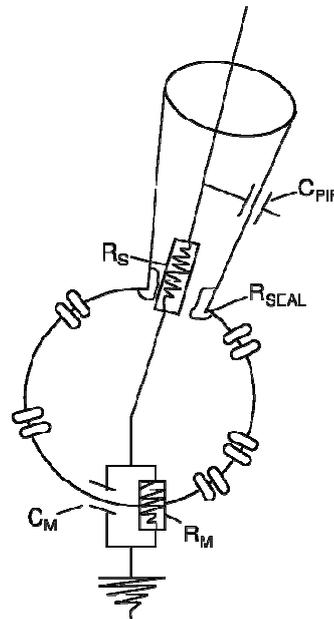


Abbildung 8: Schaltbild elektrischer Eigenschaften der Whole-Cell-Konfiguration (nach Numberger & Draguhn, 1996).

R_S : Serienwiderstand, R_{SEAL} : Verbindungswiderstand zwischen Pipette und Membran, C_{PIP} & C_M : Kapazität der Pipettenwand und der Zellmembran als Kondensator zwischen Intra- und Extrazellulärlösung, R_M : Widerstand über der Zellmembran.

Öffnen der Zelle durch Umladungsvorgänge an der Zellmembran. Bei jeder Änderung der Spannung vergeht Zeit zum Auf- bzw. Entladen des Kondensators. Bei sehr großen Spannungssprüngen kann der Regelkreis zum Konstanthalten der Membranspannung überfordert sein. Zudem stören die kapazitiven Ströme die Aufzeichnung der Kanalströme. Daher wurde eine Kompensation der kapazitiven Artefakte durchgeführt. Die hierfür kompensierenden Ströme werden nicht über den Strom-Spannungs-Wandler, sondern über einen getrennten Schaltkreis injiziert und beeinflussen somit nicht die Messung (Numberger & Draguhn, 1996).

Der oben bereits erwähnte Kompensationsstrom zur Aufrechterhaltung der Sollspannung (U_{SOLL}) wird vom Silberdraht der Messelektrode ausgehend über einen Widerstand ins Innere der Zelle geleitet. Dieser Widerstand wird als Serienwiderstand (R_S) bezeichnet. Er ist abhängig vom Pipettenwiderstand (R_{PIP}) und der Menge an Zellbestandteilen, die durch das Öffnen der Zelle in die Pipettenöffnung gelangen (Abb. 8). An diesem Widerstand erfolgt, proportional zu seiner Größe, bei einer Strominjektion in die Zelle ein Spannungsabfall. Das Ergebnis ist ein sogenannter „Spannungsfehler“, der umso größer

ist, je größer einerseits R_s und andererseits der zu messende Strom ist. Mit steigendem Serienwiderstand dauert es außerdem länger, die Membranspannung der Sollspannung anzupassen, und es werden sprunghafte Leitfähigkeitsänderungen der Membran vom Messsystem verzögert „wahrgenommen“ (Low-Pass-Filter). Den Spannungsfehler über dem Serienwiderstand und dessen Filterfunktion gilt es zu kompensieren. Hierzu wird zum injizierten Strom ein Anteil addiert, der den erwarteten Verlust ausgleicht (Numberger & Draguhn, 1996). Dies ermöglicht schnellere Umladevorgänge des Membrankondensators und eine genauere Annäherung der Membranspannung an die Sollspannung. Nach Kompensation des Serienwiderstandes vergrößern sich wiederum die kapazitiven Ströme, die es auszugleichen gilt. In den Experimenten an Neuronen wurden durch Kompensation Serienwiderstände zwischen 6 und 18 M Ω erreicht. Während der Experimente an HEK293-Zellen betragen die kompensierten Serienwiderstände zwischen 3 und 9 M Ω .

Neben den spannungsaktivierten K⁺-Strömen werden bei der Patch-Clamp-Messung auch sogenannte Leckströme registriert. Diese Ströme fließen am Spalt zwischen Zelle und Pipette und durch unspezifische Leckkanäle der Zellmembran (Numberger & Draguhn, 1996). Zur Erfassung des Kv-Kanal-vermittelten Stroms müssen die unspezifischen Leckströme vom gesamten gemessenen Strom subtrahiert werden. Die Leckströme sind abhängig von der Änderung des Potentials und können mit Hilfe von P/n-Protokollen isoliert werden: Bei den Messungen an Kv4.2-Kanal-exprimierenden HEK293-Zellen wurde ein P/5-Protokoll verwendet. Hierzu wurde im Anschluss an das Messprotokoll dreimal ein Protokoll mit demselben zeitlichen Ablauf ausgehend von -100 mV und 1/5 der Testspannungssprünge durchgeführt. Dadurch wurden keine spannungsgesteuerten Kanäle aktiviert, wohl aber Leckströme gemessen. Diese Leckströme wurden gemittelt, durch Multiplikation mit 5 auf die wahren Testbedingungen extrapoliert und vom gemessenen Teststrom subtrahiert.

Die in den HEK293-Zellen vorkommenden endogenen Ströme (Jiang *et al.*, 2002) wurden in der vorliegenden Arbeit vernachlässigt, da sie durch die Überexpression der heterolog exprimierten Kv4.2-Kanäle eine untergeordnete Rolle spielten.

3.4.6 Aufzeichnung und Auswertung der Messdaten

Zur Beschreibung der Eigenschaften makroskopischer Ströme wurden die Stromamplitude, der Verlauf des Stromabfalls (makroskopische Inaktivierung) und der transmembranäre Ladungstransfer bestimmt. Zur Ermittlung des Aktivierungs- und Inaktivierungsverhaltens der untersuchten Kanäle wurden Fraktionen von Kanälen bestimmt, die sich bei einer bestimmten Membranspannung im inaktivierten oder aktivierten Zustand befanden. Für diese Messungen diente eine Reihe von unterschiedlichen Spannungspulsprotokollen. In den Experimenten an nativen hippocampalen Neuronen und an HEK293-Zellen wurden sehr ähnliche Pulsprotokolle verwendet. Im Folgenden sind Abweichungen der Protokolle für HEK293-Zellen gegenüber denen für hippocampale Neurone in Klammern dargestellt. Die Pulsprotokolle erfolgten ausgehend von einem Haltepotenzial (V_H) von -70 mV.

3.4.6.1 Eigenschaften makroskopischer Ströme

Zur Überprüfung der Ausprägung des NS5806-Effekts wurden die Auswirkungen auf den gesamten Auswärtsstrom hippocampaler Neurone und des Kv4.2-vermittelten Stroms in HEK293-Zellen während des Einwaschens der Substanz verfolgt. Es wurde ein Pulsprotokoll mit einer Reihe von Spannungssprüngen von -110 mV auf $+40$ mV (Abb. 9) gewählt. Die Spannungspulse dauerten 150 ms und das Intervall zwischen den einzelnen Pulsen betrug 2 s. Das Protokoll dauerte insgesamt $21,6$ s und beinhaltete zwölf Spannungspulse. Nach dem vierten Puls wurde die Kontrolllösung durch eine Badlösung mit 20 μ M NS5806 bzw. durch eine Badlösung mit der jeweils nächst höheren NS5806-

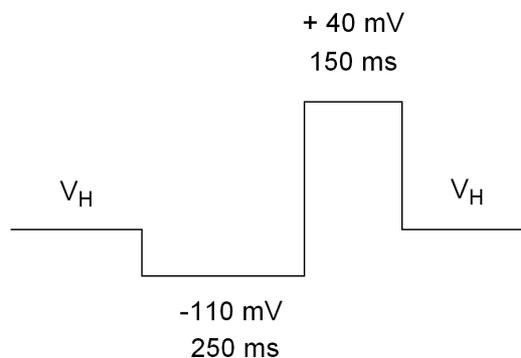


Abbildung 9: Pulsprotokoll zur Erfassung des NS5806-Effekts während des Einwaschvorgangs.

Nach einem Vorpuls auf -110 mV für 250 ms folgte ein Spannungssprung auf $+40$ mV für 150 ms (es wurden 12 solche Spannungssprünge im Abstand von 2 s durchgeführt; nach dem vierten Spannungspuls erfolgte die Applikation von NS5806). Die Datenaufzeichnung erfolgte mit einem Sample-Intervall von 500 μ s.

Konzentration ersetzt. Die Amplituden der ersten vier Ströme, unter Superfusion der Kontrollösung, wurden gemittelt und die relative Amplitudenveränderung der folgenden Ströme gegenüber diesem Mittelwert dargestellt. Über eine längere Zeitdauer (nach 3 - 5 min) war eine leichte Verstärkung der NS5806-Effekte zu beobachten, welche möglicherweise auf einer Akkumulation der Substanz in der Membran bzw. in der Zelle beruhte. Solche Langzeiteffekte wurden nicht untersucht. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass insbesondere die Dosis-Wirkungs-Experimente durch solche Akkumulationseffekte beeinflusst wurden. In den hier beschriebenen Experimenten wurden unmittelbar nach Einstellen eines (Pseudo-) *Steady-States* des NS5806-Effekts auf die I_{gesamt} -Amplitude (Abb. 14B) weitere Pulsprotokolle gestartet.

Um die Eigenschaften des I_{SA} kultivierter hippocampaler Neurone zu untersuchen, wurde ein Subtraktionsprotokoll zur Isolation dieser Stromkomponente vom gesamten neuronalen Auswärtsstrom durchgeführt (Abb. 10). Hierzu wurde zunächst der gesamte neuronale Auswärtsstrom durch einen Spannungssprung von -110 mV auf +40 mV gemessen. Der nicht inaktivierende Anteil wurde dann durch einen Spannungspuls von -30 mV auf +40 mV ermittelt. Durch Subtraktion des nicht inaktivierenden Anteils vom gesamten neuronalen Auswärtsstrom ergab sich die Stromkurve des I_{SA} . Mit Hilfe dieses Subtraktionsprotokolls wurden gleichzeitig kapazitive Komponenten und Leckstromkomponenten eliminiert. In HEK293-Zellen erfolgte ein einzelner Spannungssprung von -110 mV auf +40 mV über 1,5 s zur Ermittlung der Eigenschaften des Kv4.2-vermittelten Stroms. Der Leckstrom wurde hier mit der P/5-Methode

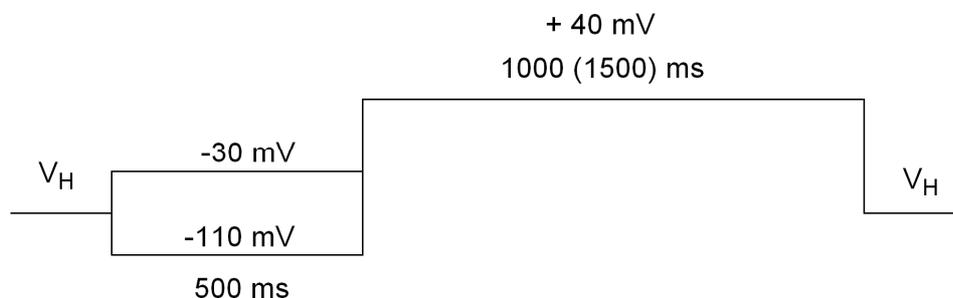


Abbildung 10: Subtraktionsprotokoll zur Isolation des I_{SA} vom gesamten neuronalen Auswärtsstrom.

Nach einem Vorpuls auf -110 mV für 500 ms folgte ein Spannungssprung auf +40 mV für 1000 (1500) ms zur Erfassung des gesamten neuronalen Auswärtsstroms. Durch einen Vorpuls auf -30 mV, gefolgt von einem Spannungssprung auf +40 mV, wurde der nicht inaktivierende Anteil erfasst und anschließend vom gesamten Auswärtsstrom subtrahiert. Die Datenerhebung erfolgte mit einem Sample-Intervall von 500 μs .

subtrahiert. Es wurden zunächst Experimente zur Erfassung der Dosis-Wirkungsbeziehung von NS5806 durchgeführt. Ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die Stromamplitude konnte durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$I/I_{\text{Kontrolle}} = 1/[1 + (C_{50}/C)^h].$$

Der Effekt von NS5806 auf die Amplitude ($I/I_{\text{Kontrolle}}$) ist demnach abhängig von der Konzentration bei halb-maximaler Potenzierung/Inhibierung (C_{50}) und dem Hill-Koeffizienten (h). Für die Beschreibung der makroskopischen Inaktivierung wurde eine doppelt-exponentielle Funktion an die abfallende Phase der Stromkurven angepasst und so die Zeitkonstanten der Inaktivierung ($\tau_{1\text{inact}}$, $\tau_{2\text{inact}}$) und deren prozentualer Anteil an der Gesamtinaktivierung ermittelt. Schließlich wurde der K^+ -vermittelte Ladungstransfer über die Membran (Q_K) als Integral unter der Stromkurve über einen Zeitraum von 1 s erfasst.

3.4.6.2 Erholung von der Inaktivierung

Die Erholung der Kanäle von der Inaktivierung (*Recovery*) wurde mit Hilfe eines Doppelpulsprotokolls untersucht (Abb. 11). Dieses enthielt einen Spannungspuls (Kontrollpuls) über 150 ms (1000 ms) von -100 auf +40 mV, gefolgt von einem Interpulsintervall bei -100 mV mit sich verdoppelnder Zeitdauer (Δt) und einem zweiten Spannungspuls (Testpuls) auf +40 mV über 25 ms (Abb. 11). Die Amplitude der Stromantwort auf den zweiten Puls relativ zur Amplitude der Stromantwort auf den ersten Puls ($I_{\text{Test}}/I_{\text{Kontrolle}}$) wurde jeweils gegen das Interpulsintervall aufgetragen.

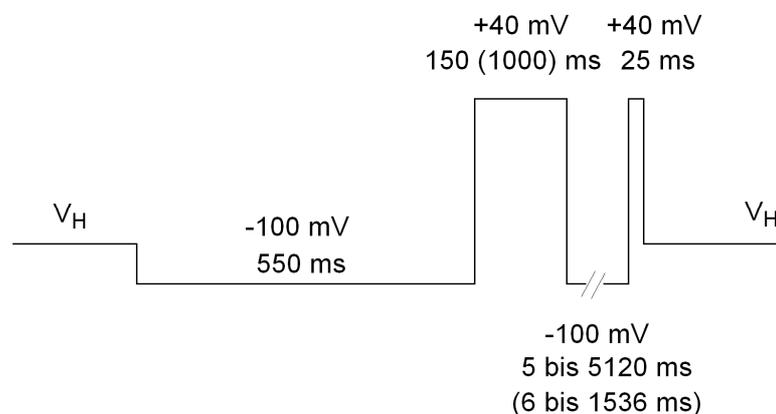


Abbildung 11: Pulsprotokoll zur Erfassung der Erholung von der Inaktivierung.

Auf einen Spannungspuls auf +40 mV über 150 (1000) ms folgte in einem sich jeweils verdoppelnden Abstand (5 ms, 10 ms, 20 ms, 40 ms, etc.) ein zweiter Spannungspuls auf +40 mV über 25 ms. Das Vorpuls- und Interpulsintervall lag bei -100 mV. Das Intervall zwischen den Pulsprotokollen betrug 8 s, die Daten wurden mit einem Sample-Intervall von 1 ms erfasst.

Diese Abhängigkeit wurde entweder durch eine einfach-exponentielle Funktion (ein Großteil der Daten von HEK293-Zellen) oder durch eine doppelt-exponentielle Funktion (Daten von Neuronen und unter bestimmten Bedingungen gemessene Daten von HEK293-Zellen) beschrieben und so die Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung ermittelt ($\tau_{\text{rec}(1)}$, $\tau_{\text{rec}(2)}$).

3.4.6.3 Spannungsabhängigkeiten der Steady-State-Inaktivierung und der Aktivierung

Die Fraktion der Kanäle, die sich im *Steady-State* im inaktivierten Zustand befindet, ist spannungsabhängig. Um diese Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu beschreiben, wurde ein Protokoll mit variierenden Vorpulspotenzialen verwendet. Ausgehend von V_H erfolgte ein Vorpuls über 1000 ms (1500 ms), der gefolgt war von einem Spannungspuls auf +40 mV über 50 ms. Das Vorpulspotenzial variierte zwischen -120 mV (-110 mV) und 0 mV in Intervallen von 10 mV (ΔV ; Abb. 12). Die Amplitude des Stroms im Verhältnis zur maximalen Amplitude (I/I_{max}) wurde in Abhängigkeit vom Vorpulspotenzial dargestellt. Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung der Kv4.2-Kanäle in HEK293-Zellen wurde durch eine einfache Boltzmann-Funktion beschrieben:

$$I / I_{\text{max}} = 1 / \{ 1 + \exp [(V - V_{1/2\text{inact}}) / k_{\text{inact}}] \}.$$

Die relative Amplitude I / I_{max} bei einem bestimmten Vorpulspotenzial (V) ist abhängig von dem Potenzial bei halb-maximaler Inaktivierung ($V_{1/2\text{inact}}$) und dem Steigungsfaktor (k_{inact}). Die Spannungsabhängigkeit des inaktivierenden Anteils (u.a. I_{SA}) des I_{gesamt} kultivierter hippocampaler Neurone wurde durch die Summe zweier solcher Boltzmann-Funktionen beschrieben. Die aktivierten Kanäle vermittelten Ströme in Abhängigkeit von der Größe

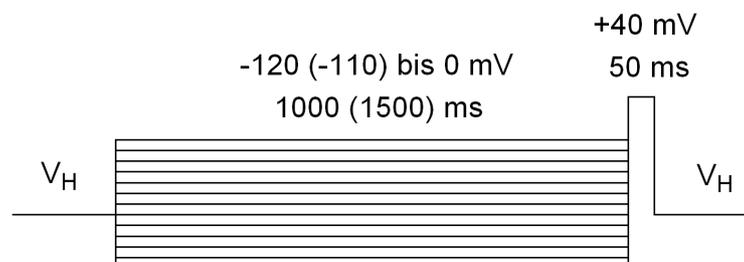


Abbildung 12: Pulsprotokoll zur Ermittlung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung.

Ausgehend von einem variierenden Vorpulspotenzial über 1000 (1500) ms folgte ein Spannungspuls auf +40 mV über 50 ms. Das Vorpulspotenzial variierte zwischen -120 (-110) und 0 mV. Die Spannungssprünge erfolgten im Abstand von 15 s, die Daten wurden mit einem Sample-Intervall von 500 μs erfasst.

der aktivierenden Spannung. Zur Erfassung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurde in den folgenden Experimenten ein Pulsprotokoll mit Spannungssprüngen auf unterschiedliche Potenziale verwendet. Ausgehend von einem Vorpulspotenzial von -110 mV erfolgten aktivierende Spannungssprünge über 500 ms (1000 ms) auf Testpotenziale zwischen -90 mV und +70 mV mit einem Abstand von 10 mV (Abb. 13). Die Leitfähigkeit bei einem bestimmten Testpotenzial (G_V) wurde durch das K^+ -Gleichgewichtspotenzial (E_K), der Peak-Stromamplitude bei diesem Testpotenzial (I_V) und dem jeweiligen Testpotenzial (V) nach folgendem Zusammenhang ermittelt:

$$G_V = I_V / (V - E_K).$$

Die Berechnung der Leitfähigkeiten wurde mit einem K^+ -Gleichgewichtspotenzial (E_K) von -80 mV durchgeführt. Die Leitfähigkeit im Verhältnis zur maximalen Leitfähigkeit (G/G_{max}) wurde in Abhängigkeit vom Testpotenzial dargestellt. Die Daten ließen sich durch eine „offene“ (d.h. das Maximum ist nicht auf 1 fixiert) Boltzmann-Funktion 4. Ordnung beschreiben:

$$G/G_{max} = G_{max} / \{1 + \exp [(V - V_{1/2act}) / k]\}^4.$$

Die Veränderung der Leitfähigkeit (G) durch ein bestimmtes Potenzial (V) ist somit abhängig von der Spannung bei halb-maximaler Aktivierung ($V_{1/2act}$) und dem Steigungsfaktor k . Zur Illustration der G/G_{max} -Kurven wurden die Messdaten auf den theoretisch ermittelten G_{max} -Wert normiert. Die angegebenen $V_{0,5}$ -Werte sind die Potenziale, bei denen die obige Boltzmann-Funktion 4. Ordnung den Wert 0,5 hat.

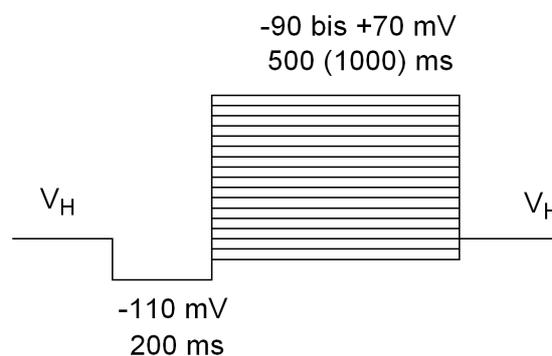


Abbildung 13: Pulsprotokoll zur Ermittlung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung.

Ausgehend von einem Vorpuls auf -110 mV folgten aktivierende Spannungssprünge auf Testpotenziale zwischen -90 und +70 mV über 500 (1000) ms. Die Spannungssprünge in 10 mV-Intervallen erfolgten in einem Abstand von 10 s. Die Daten wurden mit einem Sample-Intervall von 350 μ s erfasst.

3.4.6.4 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM = *Standard Error of the Mean*) dargestellt. Die statistische Signifikanz der Effekte von NS5806 wurde mit Hilfe des gepaarten T-Tests nach Student bzw. einer Varianzanalyse (ANOVA *Analysis of Variance*) mit Hilfe des Tukey-HSD Tests (HSD = *Honestly Significant Difference*) durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ sind durch ein Sternchen (*), P-Werte $< 0,001$ durch zwei Sternchen (**) und P-Werte $< 0,0001$ durch drei Sternchen (***) gekennzeichnet. Die Korrelation zweier Gruppen gemessener Werte erfolgte mit Hilfe der Korrelationsanalyse nach Pearson. Es wurde der Korrelationskoeffizient (r) und der P-Wert für die Signifikanz der Korrelation bestimmt. Die Korrelationsanalyse wurde mit Prism 5 (GraphPad-Software) durchgeführt und alle anderen statistischen Tests mit KaleidaGraph 4.0 (Synergy-Software).

4. Ergebnisse

4.1 Effekt von NS5806 auf K^+ -Ströme in kultivierten hippocampalen Neuronen der Ratte

Es wurden die akuten Auswirkungen einer Applikation der Substanz NS5806 auf K^+ -Auswärtsströme in kultivierten hippocampalen Neuronen der Ratte in der Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik untersucht. Der gesamte neuronale Auswärtsstrom (I_{gesamt}) setzte sich aus einem schnell inaktivierenden A-Typ-Strom (I_{SA}) und einer nicht oder nur langsam inaktivierenden Rest-Strom-Komponente (I_{R}) zusammen.

4.1.1 Zeitabhängige Ausprägung des NS5806-Effekts

Zunächst wurde die Auswirkung von 20 μM NS5806 auf den I_{gesamt} während des Einwaschvorgangs der Substanz verfolgt (Abb. 14). Das Pulsprotokoll während des Einwaschens diente zur Beurteilung der Einstellung eines „Pseudo“-Steady-States des NS5806-Effekts. Die Bezeichnung „Pseudo“-Steady-State nimmt Bezug auf die Tatsache

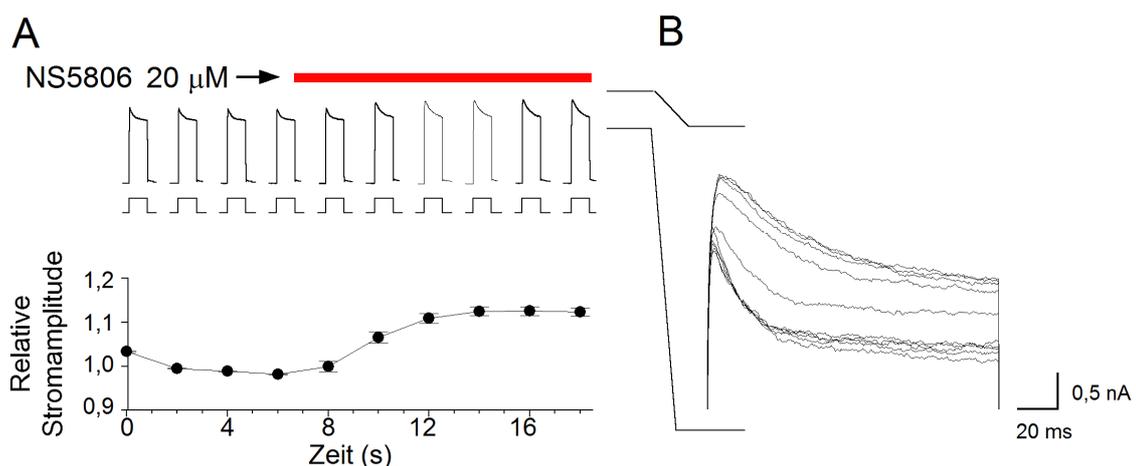


Abbildung 14: Einwasch-Effekte von 20 μM NS5806 auf den I_{gesamt} kultivierter hippocampaler Neurone.

(A) Oben: Das Pulsprotokoll und die entsprechenden Auswärtsströme während des Einwaschens von 20 μM NS5806. Applikation der Substanz nach dem vierten Spannungspuls ($n = 22$). Unten: Relative Amplitudenzunahme während der Superfusion von NS5806. (B) Exemplarische Darstellung des inaktivierenden Anteils der Stromkurven (keine Subtraktion) des I_{gesamt} während der Applikation von 20 μM NS5806.

dass keine potenziellen Langzeiteffekte der lipophilen Substanz NS5806 untersucht wurden. Hierzu wurde ein Protokoll mit 12 repetitiven Spannungssprüngen auf +40 mV im Abstand von 2 s verwendet (siehe 3.4.6.1). Während des Einwaschens von NS5806 kam es zu einer relativen Amplitudenzunahme um 12 % im Vergleich zur Kontrolle (n = 22; $p < 0,0001$; Abb. 14A). Außerdem zeigten die Stromkurven eine deutliche Verlangsamung der Inaktivierung (Abb. 14B). Ferner wurde beobachtet, dass die Amplitude des ersten Stroms unter Superfusion der Kontrolllösung größer war als die folgenden drei Kontrollwerte (Abb. 14A). Vermutlich fand während des Interpuls-Intervalls von 2 s keine vollständige Erholung von der Inaktivierung statt. Dies wurde in Kauf genommen, um die zeitliche Auflösung des Einwaschvorgangs zu gewährleisten.

4.1.2 Effekt von NS5806 auf den I_{SA}

Der Effekt von NS5806 auf den I_{SA} wurde in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht. Der I_{SA} wurde zunächst vom gesamten Auswärtsstrom mit Hilfe eines Subtraktionsprotokolls isoliert (siehe 3.4.6.1; Abb. 15). Zunächst wurde der I_{gesamt} ausgehend von einem Vorpuls auf -110 mV mit Hilfe eines depolarisierenden

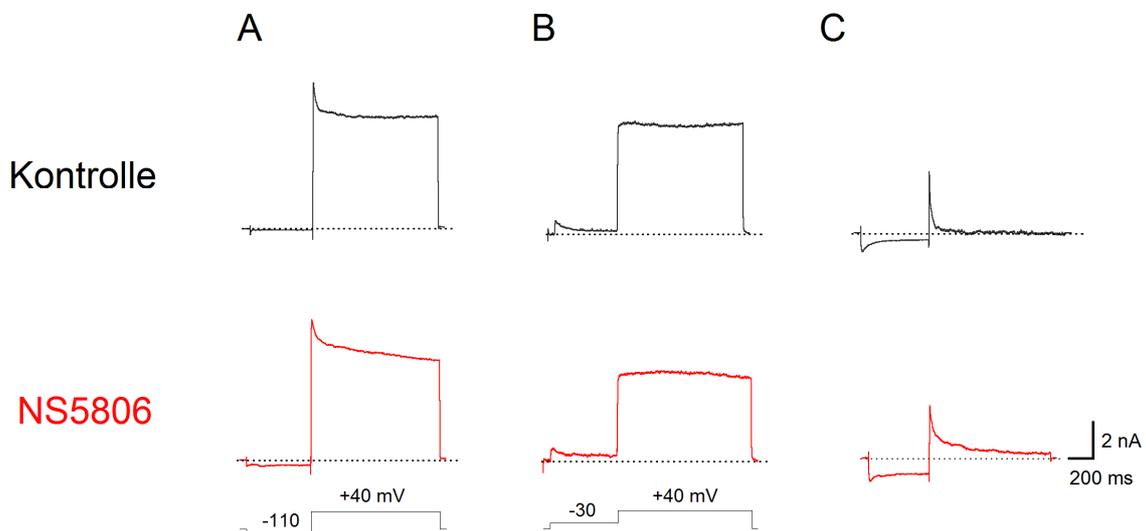


Abbildung 15: Repräsentative Stromkurven kultivierter hippocampaler Neurone unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20 μ M NS5806.

(A) I_{gesamt} unter Kontrollbedingungen (oben) und in Gegenwart von NS5806 (unten) sowie das zugehörige Pulsprotokoll. (B) I_R unter Kontrollbedingungen (oben) und in Gegenwart von NS5806 (unten), ermittelt durch ein Pulsprotokoll mit einem Vorpuls auf -30 mV. (C) I_{SA} , ermittelt durch Subtraktion des I_R (B) vom I_{gesamt} (A) unter Kontrollbedingungen (oben) und in Gegenwart von 20 μ M NS5806 (unten).

Spannungspulses auf +40 mV erfasst (Abb. 15A). Als nächstes wurde durch einen Vorpuls auf -30 mV der I_{SA} vollständig inaktiviert und nur der langsam bzw. nicht inaktivierende I_R aufgezeichnet (Abb. 15B). Die Subtraktion des I_R vom I_{gesamt} ergab den I_{SA} (Abb. 15C) und ermöglichte die Ermittlung seiner Eigenschaften.

Es wurden die Amplitude des I_{SA} , dessen Inaktivierungskinetik und der Ladungstransfer unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20 μM NS5806 verglichen (Abb. 16). Die I_{SA} -Amplituden lagen unter Kontrollbedingungen zwischen 2,6 und 9,2 nA ($4,22 \pm 0,33$ nA; $n = 22$). Der Verlauf der Inaktivierung konnte durch eine doppelt-exponentielle Funktion mit einer schnellen und einer langsamen Komponente beschrieben werden ($\tau_{1inact} = 11,6 \pm 1,6$ ms; $\tau_{2inact} = 143 \pm 31$ ms; $n = 22$). Der Anteil von τ_{1inact} an der gesamten Inaktivierung betrug unter Kontrollbedingungen $79 \pm 2\%$ ($n = 22$). Wurde das Experiment in Gegenwart von 20 μM NS5806 wiederholt, zeigte sich eine leichte Reduktion der I_{SA} -Amplitude und eine deutliche Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung (Abb. 16A, B). Die relative Amplitude im Vergleich zur Kontrolle betrug $0,76 \pm 0,04$ ($n = 22$; $p < 0,0001$). Die Zeitkonstante der schnellen Komponente der

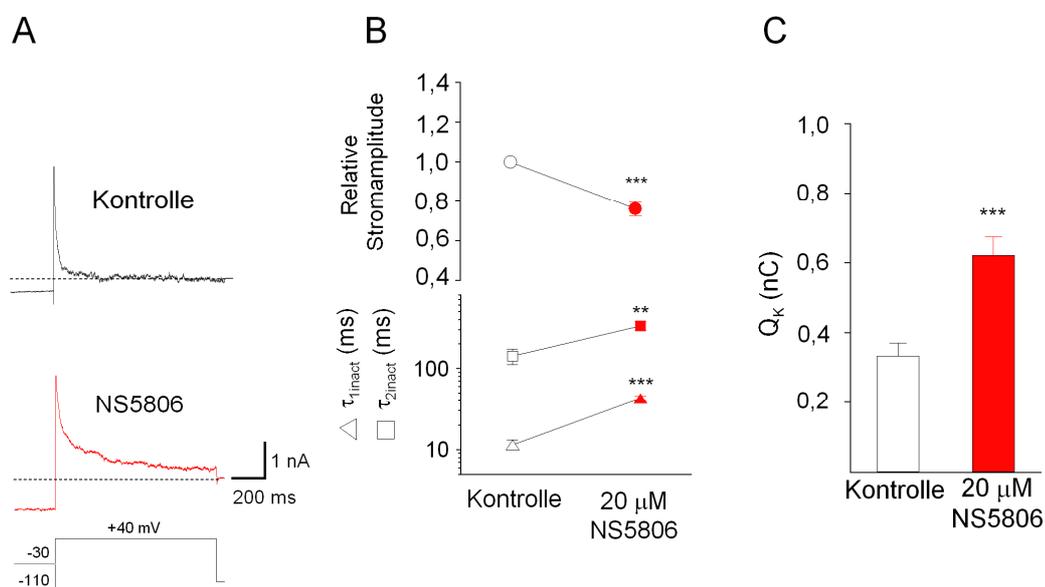


Abbildung 16: I_{SA} -Eigenschaften kultivierter hippocampaler Neurone in Gegenwart von 20 μM NS5806 im Vergleich zur Kontrolle.

(A) Repräsentative Stromkurven des I_{SA} unter Kontrollbedingungen (oben) und in Gegenwart von 20 μM NS5806 (unten). (B) Veränderung der Stromamplitude (oben) und der Zeitkonstanten der Inaktivierung (unten; τ_{1inact} , τ_{2inact}) in Gegenwart von 20 μM NS5806 ($n = 22$). (C) Transmembranärer Ladungstransfer in nC unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20 μM NS5806 (Kontrolle: unausgefüllt; NS5806: rot; $n = 20$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$).

Inaktivierung (τ_{1inact}) betrug in Gegenwart von 20 μM NS5806 $42,7 \pm 3,4$ ms ($p < 0,0001$) und die der langsamen Komponente (τ_{2inact}) 338 ± 44 ms ($p = 0,0008$; $n = 22$; Abb. 16B). Der Anteil von τ_{1inact} an der Inaktivierung war auf 70 ± 3 % reduziert ($n = 22$, $p = 0,0049$). Trotz der Suppression der Stromamplitude kam es durch NS5806 aufgrund der verlangsamten Inaktivierung zu einer deutlichen Zunahme des Ladungstransfers. Die Ladung (Q_K) unter Kontrollbedingungen betrug $0,33 \pm 0,04$ nC und war in Gegenwart von 20 μM NS5806 auf $0,62 \pm 0,05$ nC erhöht ($n = 20$; $p < 0,0001$; Abb. 16C).

4.1.3 Effekt von NS5806 auf die Stromamplitude des I_R

Die Zunahme der Amplitude des gesamten neuronalen Auswärtsstroms bei gleichzeitiger Abnahme der Amplitude des I_{SA} führte zu der Annahme, dass eine zusätzliche Beeinflussung weiterer Anteile des gesamten Auswärtsstroms durch NS5806 stattfand. Deshalb wurde die Auswirkung von NS5806 auf die Amplitude des I_R untersucht (Abb. 17). Die Stromamplitude des I_R lag unter Kontrollbedingungen zwischen 2,9 und 7,8 nA ($5,47 \pm 0,25$ nA; $n = 21$). In Gegenwart von 20 μM NS5806 kam es zu einer geringen, nicht signifikanten Amplitudenabnahme. Die relative Amplitude im Vergleich zur Kontrolle betrug $0,9 \pm 0,04$ ($n = 21$; $p = 0,0531$; Abb. 17B). Aufgrund des geringen Effekts von NS5806 auf den I_R wurde ein anderer Zusammenhang für die Zunahme der Amplitude des I_{gesamt} bei gleichzeitiger Abnahme des I_{SA} vermutet.

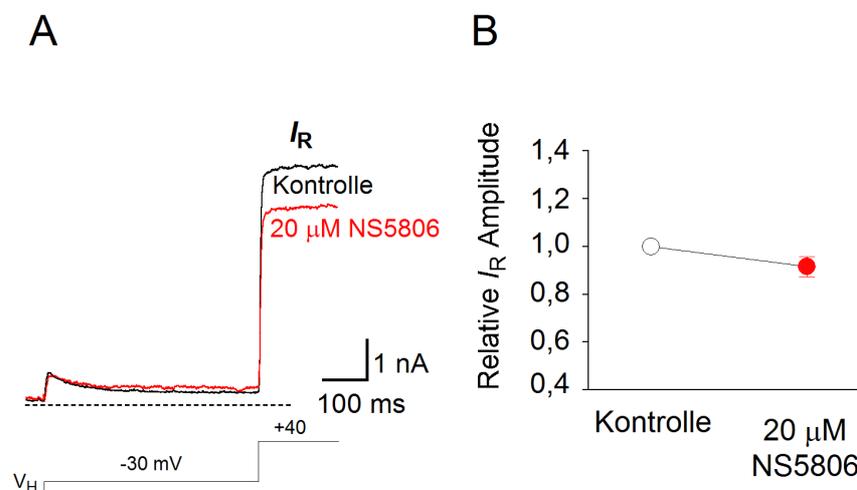


Abbildung 17: Effekt von 20 μM NS5806 auf die Amplitude des I_R hippocampaler Neurone.

(A) Repräsentative Stromkurven des I_R unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20 μM NS5806. (B) Relative Amplitudenabnahme des I_R in Gegenwart von 20 μM NS5806 (Kontrolle: unausgefüllt; NS5806: rot; $n = 21$).

4.1.4 Korrelation der Veränderung der Amplitude des I_{SA} und der Veränderung des Serienwiderstands (R_S)

Im Zusammenhang mit der Amplitudenabnahme des I_{SA} in Gegenwart von NS5806 wurden Serienwiderstandsänderungen (siehe 3.4.5) während der Experimente untersucht. Die Abnahme der Amplitude des I_{SA} wurde mit der Serienwiderstandsänderung mittels einer detaillierten Korrelationsanalyse verglichen, um zu ermitteln, ob die Amplitudenabnahme als Folge eines zunehmenden Serienwiderstands während des Patch-Clamp-Experiments oder als Effekt von NS5806 zu sehen ist. Die Darstellung der relativen Amplitudenveränderung des I_{SA} in Abhängigkeit von der relativen Serienwiderstandsänderung ergab jedoch keine Korrelation ($r = 0,1286$; $n = 22$; $p = 0,5785$; Abb. 18A). Auch die relative Änderung der Zeitkonstanten der Inaktivierung korrelierte nicht mit der relativen Serienwiderstandsänderung ($r_1 = 0,1683$, $r_2 = 0,1456$; $n = 22$; $p_1 = 0,4659$, $p_2 = 0,5289$; Abb. 18B). Da weder die Veränderung der Amplitude noch die der makroskopischen Inaktivierung mit der Serienwiderstandsänderung während

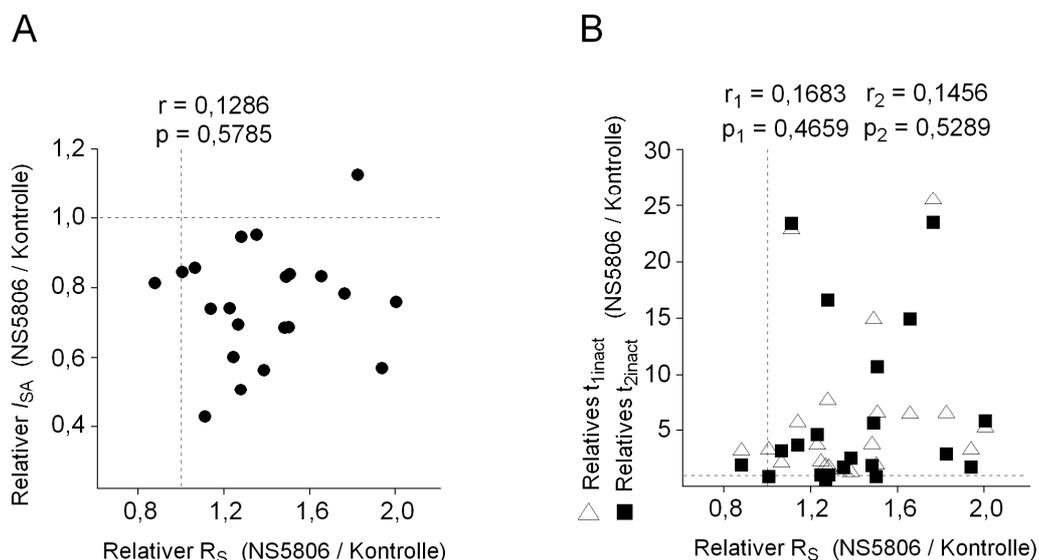


Abbildung 18: Korrelation der relativen Amplitudenveränderung und der relativen Veränderung der Inaktivierungszeitkonstanten mit der Serienwiderstandsänderung während der Experimente an kultivierten hippocampalen Neuronen.

(A) Korrelation des NS5806-Effekts auf die Amplitude des I_{SA} mit der Serienwiderstandsänderung während des Experiments ($n = 22$). (B) Korrelation des NS5806-Effekts auf die Zeitkonstanten der makroskopischen Inaktivierung (τ_{1inact} , τ_{2inact}) mit der Serienwiderstandsänderung während des Experiments ($n = 22$).

des Experiments korrelierte, wurden die beobachteten Effekte auf den I_{SA} als NS5806-vermittelt betrachtet.

4.1.5 Effekt von NS5806 auf die Kinetik der Erholung von der Inaktivierung

Die Kinetik der Erholung von der Inaktivierung (*Recovery*) des I_{gesamt} wurde mit einem Doppelpulsprotokoll unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20 μM NS5806 untersucht und mit einer doppelt-exponentiellen Funktion beschrieben (Abb. 19; 3.4.6.2). Unter Kontrollbedingungen betrug die Zeitkonstante der schnellen Komponente ($\tau_{rec(1)}$) $40,2 \pm 6,0$ ms und die der langsamen Komponente ($\tau_{rec(2)}$) 1443 ± 184 ms ($n = 9$). Der Anteil der schnellen Komponente an der Erholung von der Inaktivierung betrug 66 ± 4 % ($n = 9$). In Gegenwart von 20 μM NS5806 kam es zu einer nicht signifikanten Beschleunigung der schnellen ($\tau_{rec(1)} = 30,6 \pm 3,5$ ms; $n = 9$; $p = 0,1031$), jedoch zu einer deutlichen Beschleunigung der langsamen Komponente der Erholung von der Inaktivierung ($\tau_{rec(2)} = 592 \pm 93$ ms; $n = 9$; $p = 0,0048$; Abb. 19B). Der Anteil der schnellen

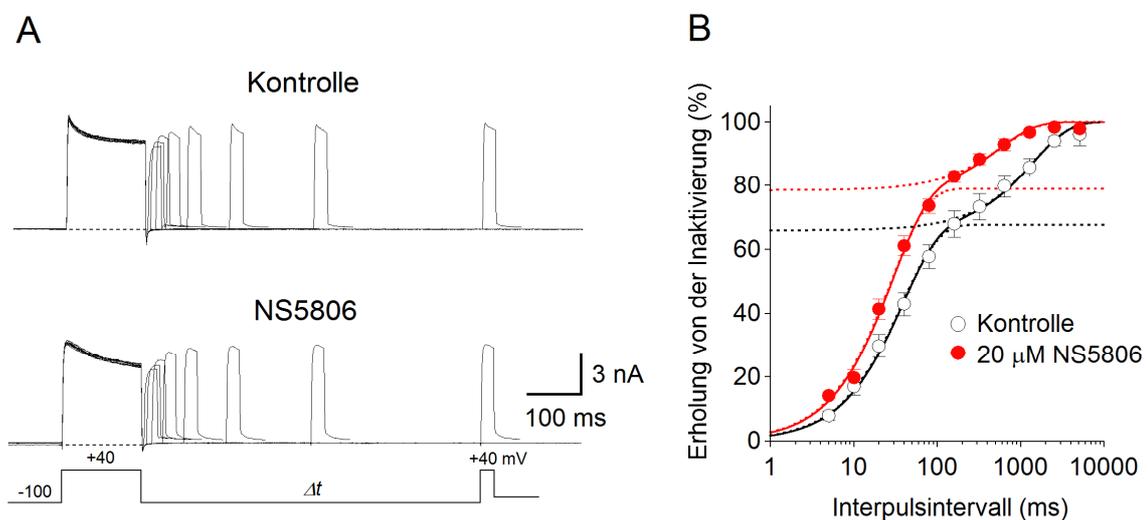


Abbildung 19: Effekt von 20 μM NS5806 auf die Erholung von der Inaktivierung des I_{gesamt} kultivierter hippocampaler Neurone.

(A) Exemplarische Stromkurven unter Kontrollbedingungen (oben) und in Gegenwart von 20 μM NS5806 (unten). (B) Amplitude der zweiten Stromantwort, jeweils normiert auf die Amplitude des vorausgegangenen Kontrollstroms und aufgetragen in Abhängigkeit vom Interpulsintervall unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20 μM NS5806. Die Recovery-Kinetik wurde durch eine doppelt-exponentielle Funktion beschrieben mit einem Anteil von 60-80 % der schnellen Komponente. Gepunktete Linien simulieren den Verlauf der einzelnen Komponenten (Kontrolle: unausgefüllt; NS5806: rot; $n = 9$).

Recovery-Komponente an der Erholung von der Inaktivierung war in Gegenwart von NS5806 auf $78 \pm 2 \%$ erhöht ($n = 9$; $p = 0,0163$).

4.1.6 Effekt von NS5806 auf die Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung

Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung wurde mit einem Vorpulsprotokoll untersucht (3.4.6.3), und die gewonnenen Daten wurden durch die Summe aus 2 Boltzmann-Funktionen beschrieben (Abb. 20). Unter Kontrollbedingungen ergab dies zwei $V_{1/2inact}$ -Werte ($V_{1/2inact(1)} = -77,2 \pm 2,7$ mV, $V_{1/2inact(2)} = -26,7 \pm 4,2$ mV) mit zwei entsprechenden Steigungsfaktoren ($k_{inact(1)} = 7,8 \pm 1,0$ mV, $k_{inact(2)} = 7,9 \pm 0,7$ mV; $n = 4$). In Gegenwart von $20 \mu\text{M}$ NS5806 waren die Spannungsabhängigkeiten der Inaktivierung zum Teil zu negativeren Potenzialen verschoben ($V_{1/2inact(1)} = -86,1 \pm 3,1$ mV, $p = 0,0040$; $V_{1/2inact(2)} = -28,6 \pm 2,8$ mV, $p = 0,6314$; $n = 4$). Die Steigungsfaktoren waren durch NS5806 nicht signifikant beeinflusst ($k_{inact(1)} = 7,8 \pm 0,5$ mV, $p = 0,9920$; $k_{inact(2)} = 14,8 \pm 4,3$ mV, $p = 0,1736$; $n = 4$; Abb. 20B).

Die Inaktivierung des I_{SA} war in Gegenwart von NS5806 deutlich verlangsamt, mit einer

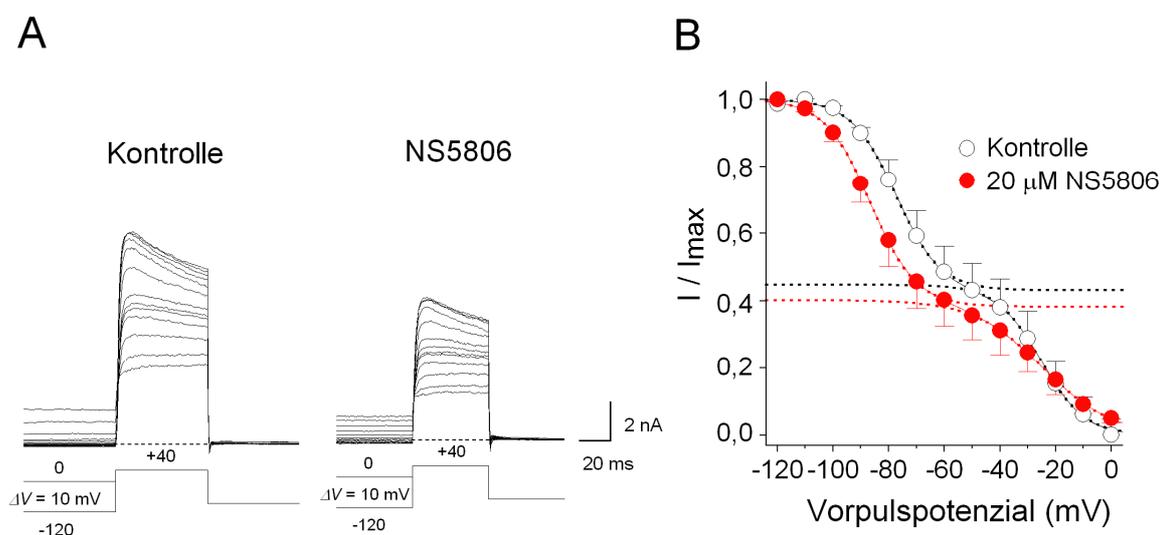


Abbildung 20: Effekt von $20 \mu\text{M}$ NS5806 auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung des I_{gesamt} kultivierter hippocampaler Neurone.

(A) Exemplarische Stromkurven des Inaktivierungsprotokolls unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von $20 \mu\text{M}$ NS5806. (B) Teststromamplitude im Verhältnis zur maximalen Stromamplitude dargestellt als Funktion in Abhängigkeit vom Vorpuls potenzial. Die Daten wurden mit der Summe aus 2 Boltzmann-Funktionen beschrieben. Gepunktete Linien simulieren den Verlauf der einzelnen Komponenten (Kontrolle: unausgefüllt; NS5806: rot; $n = 4$).

signifikanten Zunahme der schnellen (τ_{1inact}) und der langsamen Komponente (τ_{2inact}) der Inaktivierung. Dadurch war der Ladungstransfer des I_{SA} in Gegenwart von NS5806 erhöht. Die Erholung des I_{gesamt} von der Inaktivierung wurde durch NS5806 beschleunigt, mit einem signifikanten Effekt auf die langsame Komponente ($\tau_{rec(2)}$). Schließlich wurde die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung durch NS5806 zu negativeren Potenzialen verschoben.

Zusammenfassend führte NS5806 in kultivierten hippocampalen Neuronen zu einer Modulation des I_{gesamt} und seiner einzelnen Komponenten, insbesondere aber des I_{SA} . NS5806 führte zu einer Zunahme der Amplitude des gesamten Auswärtsstroms, jedoch zu einer deutlichen Abnahme der Amplitude des I_{SA} . Es kam zu keiner signifikanten Beeinflussung des I_R . Es ist nicht auszuschließen, dass sich durch einen bisher unverstandenen Hysterese-Effekt die initial registrierte I_{gesamt} -Amplitudenzunahme durch NS5806 während des Experiments in eine Suppression der Stromamplitude umwandelte.

4.2 Effekt von NS5806 auf ternäre Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Komplexe in HEK293-Zellen

Im Anschluss an die Experimente zur nativen I_{SA} -Komponente kultivierter hippocampaler Neurone wurde der Effekt von NS5806 auf rekombinante Kanalkomplexe in HEK293-Zellen untersucht. Der neuronale I_{SA} ist als Strom beschrieben, welcher durch Kv4-Kanäle im ternären Komplex mit den β -Untereinheiten KChIP und DPP vermittelt wird (Nadal *et al.*, 2003; Jerng *et al.*, 2005). Um den Effekt von NS5806 auf die I_{SA} -Komponente der kultivierten hippocampalen Neurone nachzuempfinden, wurden zunächst ternäre Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Komplexe in HEK293-Zellen exprimiert und in Abwesenheit und Gegenwart von NS5806 funktionell charakterisiert.

4.2.1 Zeitabhängige Ausprägung des NS5806-Effekts

Zunächst wurde zur Beurteilung eines „Pseudo“-Steady-States des NS5806-Effekts die Auswirkung auf die Amplitude des Stroms während des Einwaschvorgangs untersucht. Hierzu wurde, wie bei den Neuronen, ein Pulsprotokoll bestehend aus repetitiven

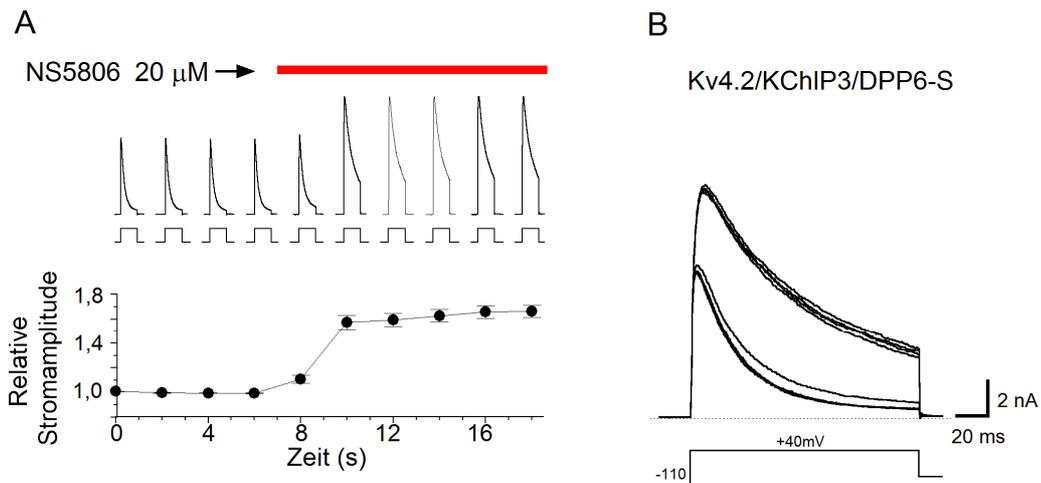


Abbildung 21: Einwasch-Effekte von 20 µM NS5806 auf die Amplitude ternärer Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Komplexe.

(A) Oben: Das Pulsprotokoll und die entsprechenden Auswärtsströme während des Einwaschens von 20 µM NS5806. Applikation der Substanz ab dem vierten Spannungspuls ($n = 26$). Unten: Relative Amplitudenzunahme während der Superfusion von NS5806. (B) Exemplarische Darstellung der Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Ströme während der Applikation von 20 µM NS5806.

Spannungspulsen verwendet (siehe 3.4.6.1). Die Applikation von 20 µM NS5806 führte zu einer relativen Amplitudenzunahme um 66% im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,0001$; $n = 26$; Abb. 21A, B). Die Stromkurven zeigten außerdem eine deutliche Verlangsamung der Inaktivierung (Abb. 21B). Im Gegensatz zum Versuchsverlauf in Neuronen unterschied sich der erste Kontrollstrom nicht von den folgenden drei Kontrollströmen. Weitere Experimente wurden erst nach dem Erreichen eines „Pseudo“-Steady-States des NS5806-Effekts durchgeführt.

4.2.2 Konzentrationsabhängiger Effekt von NS5806 auf die Eigenschaften makroskopischer Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Ströme

Nach dem Einwaschen von NS5806 wurden die Eigenschaften der Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-vermittelten Ströme untersucht. Die NS5806-Konzentration wurde variiert und der NS5806-Effekt in Abhängigkeit von der Konzentration dargestellt. Unter Kontrollbedingungen vermittelten die Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Kanäle schnell aktivierende und inaktivierende Ströme mit Amplituden zwischen 2,2 und 23,8 nA ($8,6 \pm 1,2$; $n = 14$). Die Superfusion von NS5806 mit aufsteigenden Konzentrationen (0,66, 2, 6,6, 20, 66 und 200 µM) führte ab einer bestimmten Konzentration zu einer Modulation der Ströme

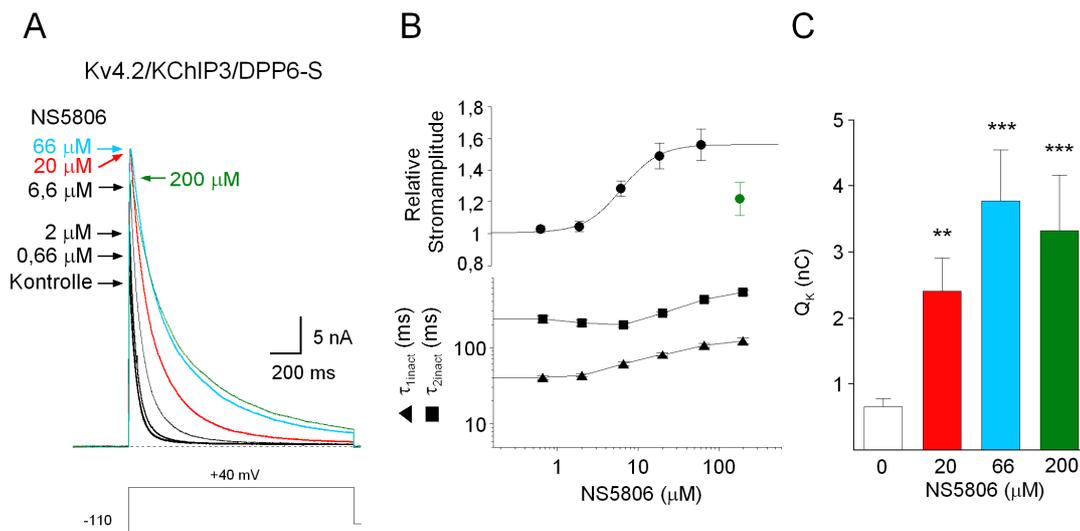


Abbildung 22: Konzentrationsabhängigkeit des Effekts von NS5806 auf ternäre Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Komplexe in HEK293-Zellen.

(A) Repräsentative Stromkurven unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von NS5806 in Konzentrationen von 0,66-200 µM. (B) Oben: Relative Amplitudenzunahme in Abhängigkeit von der NS5806-Konzentration dargestellt durch eine Hill-Funktion. Unten: Zeitkonstanten der Inaktivierung (τ_{1inact} , τ_{2inact}) dargestellt in Abhängigkeit von der NS5806-Konzentration ($n = 14$). (C) Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-vermittelter Ladungstransfer unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20, 66 und 200 µM NS5806 (Kontrolle: unausgefüllt; 20 µM NS5806: rot; 66 µM NS5806: blau; 200 µM NS5806: grün; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; $n = 14$).

(Abb. 22A). NS5806 führte zunächst zu einer konzentrationsabhängigen Potenzierung der Stromamplitude, allerdings war bei höheren Konzentrationen eine Abnahme der Potenzierung zu beobachten. Ab einer Konzentration von 2 µM NS5806 wurde die Stromamplitude erkennbar beeinflusst. In Gegenwart von 20 µM NS5806 zeigte sich eine relative Amplitudenzunahme um 66 % ($p = 0,0016$; $n = 14$; Abb. 22B). Bis 66 µM NS5806 kam es kumulativ zu einer relativen Amplitudenzunahme um 56% im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,0012$; $n = 14$). Eine weitere Steigerung der Konzentration auf 200 µM resultierte nur in einer Potenzierung der Amplitude um 21% im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,108$; $n = 14$). Aus der NS5806-Dosis-Wirkungskurve ließ sich die Konzentration für die halb-maximale Potenzierung und der Hill-Koeffizient ermitteln ($EC_{50} = 6,9 \mu\text{M}$; $h = 1,9$; Abb. 22B).

Die Inaktivierungskinetik der Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-vermittelten Ströme wurde durch eine doppelt-exponentielle Funktion beschrieben. Unter Kontrollbedingungen betrug die Zeitkonstante der schnellen Komponente (τ_{1inact}) $32,8 \pm 1,1$ ms und die der langsamen Komponente (τ_{2inact}) 206 ± 33 ms. Der Anteil der schnellen Komponente an der Inaktivierung betrug $95 \pm 1\%$ ($n = 14$). In Gegenwart von NS5806 zeigte sich eine

deutliche Verlangsamung der Inaktivierung. In Gegenwart von 20 μM NS5806 betrug $\tau_{1\text{inact}}$ $68,7 \pm 3,1$ ms ($p < 0,0001$) und $\tau_{2\text{inact}}$ 224 ± 8 ms ($p = 0,6184$; $n = 14$). Der Anteil der schnellen Komponente an der Inaktivierung betrug $53 \pm 5\%$ ($p < 0,0001$). Mit zunehmender NS5806-Konzentration wurde eine immer stärkere Verlangsamung der Inaktivierung beobachtet (Abb. 22A, B). In Gegenwart von 200 μM NS5806 betrug $\tau_{1\text{inact}}$ 123 ± 11 ms ($p < 0,0001$) und $\tau_{2\text{inact}}$ 520 ± 81 ms ($p < 0,0001$; $n = 14$). Durch Potenzierung der Amplitude und Verlangsamung der Inaktivierung kam es mit zunehmender NS5806-Konzentration zu einer Zunahme der durch den Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Kanal vermittelten transmembranären Ladung (Abb. 22C). Die Ladung (Q_K) betrug unter Kontrollbedingungen $0,66 \pm 0,12$ nC ($n = 14$). In Gegenwart von 20 μM NS5806 kam es zu einer Zunahme der Ladung auf $2,41 \pm 0,5$ nC ($p_1 = 0,0078$) und in Gegenwart von 66 μM NS5806 auf $3,77 \pm 0,79$ nC ($p_2 < 0,0001$; $n = 14$). Trotz der abnehmenden Potenzierung der Amplitude kam es in Gegenwart von 200 μM zu einer Zunahme der Ladung auf $3,32 \pm 0,85$ nC im Vergleich zur Kontrolle ($p_3 < 0,0001$; $n = 14$; Abb. 22C). Der ermittelte Ladungstransfer in Gegenwart von 200 μM war geringer als in Gegenwart von 66 μM , jedoch noch deutlich größer als in Gegenwart von 20 μM NS5806. Dieser Effekt ist als Kombination aus der maximalen Verlangsamung der Inaktivierung des Stroms und der vergleichsweise geringen Umkehr der Amplitudenzunahme zu sehen.

4.2.3 Effekt von NS5806 auf die Erholung der Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Kanäle von der Inaktivierung

Als nächstes wurde die Wirkung von NS5806 auf die Erholung von der Inaktivierung (*Recovery*) der ternären Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Kanäle untersucht. Die Versuche wurden mit 20 und 66 μM NS5806 durchgeführt. Die Recovery-Kinetik wurde mit einer einfach-exponentiellen Funktion beschrieben (Abb. 23B). Die Recovery-Zeitkonstante (τ_{rec}) betrug unter Kontrollbedingungen $11,7 \pm 0,8$ ms ($n = 9$). In Gegenwart von NS5806 war die Erholung von der Inaktivierung konzentrationsabhängig verlangsamt. Die Recovery-Zeitkonstante (τ_{rec}) war in Gegenwart von 20 μM NS5806 auf $21,8 \pm 4,2$ ms ($p = 0,0269$) und in Gegenwart von 66 μM NS5806 auf $50,9 \pm 11,5$ ms erhöht ($p = 0,0046$; $n = 9$). In Gegenwart von NS5806 zeigte der Verlauf der Erholung der Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Kanäle von der Inaktivierung zusätzlich eine langsame Komponente (Abb. 23B). Die

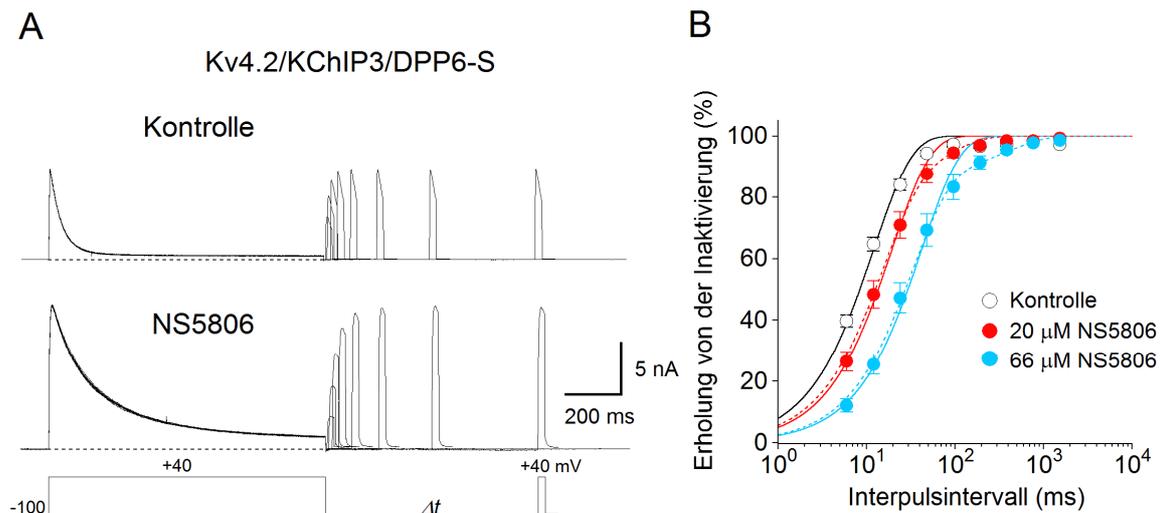


Abbildung 23: Effekt von NS5806 auf die Erholung ternärer Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Komplexe von der Inaktivierung.

(A) Exemplarische Stromkurven unter Kontrollbedingungen (oben) und in Gegenwart von 20 µM NS5806 (unten). (B) Amplitude der zweiten Stromantwort jeweils normiert auf die Amplitude des vorausgegangenen Kontrollstroms und in Abhängigkeit vom Interpulsintervall dargestellt durch eine einfach-exponentielle Funktion. Es wurden Daten unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20 und 66 µM NS5806 erhoben. Gepunktete Linien beschreiben die Daten durch doppelt-exponentielle Funktionen (Kontrolle: unausgefüllt; 20 µM NS5806: rot, 66 µM NS5806: blau; n = 9).

Ergebnisse der Recovery-Kinetik rekombinanter Kv4-Kanalkomplexe stehen im Gegensatz zum Effekt von NS5806 auf die Erholung von der Inaktivierung der nativen neuronalen Kanäle (Abb. 19). Beide Zeitkonstanten des doppelt-exponentiellen Verlaufs der Erholung von der Inaktivierung des I_{gesamt} waren in Gegenwart von NS5806 zum Teil signifikant erniedrigt und nicht erhöht.

4.2.4 Effekt von NS5806 auf die Spannungsabhängigkeit von Inaktivierung und Aktivierung der Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Kanäle

Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung wurde mit einem Vorpulsprotokoll untersucht (Abb. 24A) und die gewonnenen Daten durch eine Boltzmann-Funktion 1. Ordnung beschrieben (siehe 3.4.6.3; Abb. 24B). Die Spannung bei halb-maximaler Inaktivierung ($V_{1/2\text{inact}}$) unter Kontrollbedingungen betrug $-45,7 \pm 0,9$ mV und der Steigungsfaktor (k_{inact}) $8,3 \pm 0,5$ mV (n = 5). NS5806 führte bei einer Konzentration von 20 µM zu einer deutlichen Verschiebung der Inaktivierungskurve zu negativeren Potenzialen ($V_{1/2\text{inact}} = -59,3 \pm 1,1$ mV; $p < 0,0001$) und zu einem steileren Verlauf ($k_{\text{inact}} = 5,4 \pm 0,2$ mV; $p = 0,001$; n = 5). In Gegenwart von NS5806 führten demnach bereits negativere Vorpulspotenziale zur Inaktivierung der Kanäle (Abb. 24B). Die

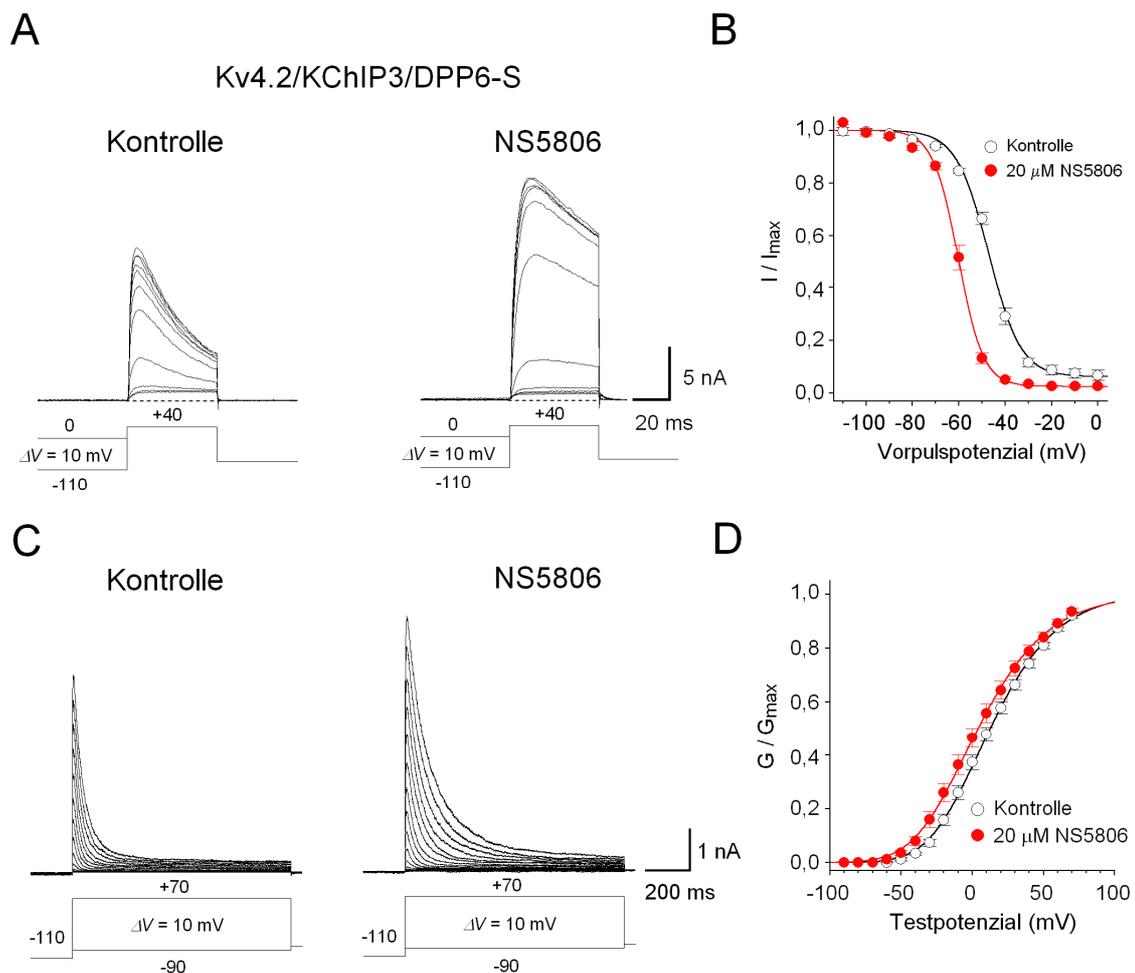


Abbildung 24: Effekt von 20 μM NS5806 auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung und der Aktivierung ternärer Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Komplexe.

(A) Exemplarische Stromkurven des Inaktivierungsprotokolls unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20 μM NS5806. (B) Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung dargestellt durch eine Boltzmann-Funktion 1. Ordnung (Kontrolle: unausgefüllt, NS5806: rot; $n = 5$). (C) Exemplarische Stromkurven des Aktivierungsprotokolls unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20 μM NS5806. (D) Spannungsabhängigkeit der Aktivierung dargestellt durch eine Boltzmann-Funktion 4. Ordnung (Kontrolle: unausgefüllt; NS5806: rot; $n = 9$).

Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurde mit einem Testpulsprotokoll untersucht, und die gewonnenen Daten wurden mit einer Boltzmann-Funktion 4. Ordnung beschrieben (siehe 3.4.6.3; Abb. 24D). Die Spannung bei halb-maximaler Aktivierung ($V_{0,5}$) unter Kontrollbedingungen betrug $14,1 \pm 2,8 \text{ mV}$ und der Steigungsfaktor (k_{act}) $28,5 \pm 0,8 \text{ mV}$ ($n = 9$). In Gegenwart von 20 μM NS5806 betrug $V_{0,5}$ $6,7 \pm 3,1 \text{ mV}$ ($p = 0,0442$) und k_{act} $29,3 \pm 0,7 \text{ mV}$ ($p = 0,2451$; $n = 9$). Offensichtlich bewirkt NS5806 eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu negativeren Potenzialen ohne nennenswerte Auswirkung auf die Steilheit (Abb. 24D).

Zusammenfassend führte NS5806 in ternären Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Komplexen zu einer konzentrationsabhängigen Potenzierung der Stromamplitude mit abnehmender Potenzierung bei höheren Konzentrationen und zu einer deutlichen Modulation der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften. Die Inaktivierung der Ströme wurde mit zunehmender Konzentration deutlich verlangsamt, und der Ladungstransfer war somit in Gegenwart von NS5806 erhöht. Die Erholung von der Inaktivierung wurde in Gegenwart von NS5806 mit zunehmender Konzentration verlangsamt. NS5806 führte zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu negativeren Potenzialen mit einem steileren Kurvenverlauf. Die Effekte von NS5806 in HEK293-Zellen ähnelten den Effekten auf die Ströme kultivierter hippocampaler Neurone, jedoch unterschieden sich die Effekte auf die Stromamplitude und auf die Erholung von der Inaktivierung. Die Stromamplitude rekombinanter Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Kanalkomplexe wurde stark potenziert und nicht inhibiert, wie der I_{SA} kultivierter hippocampaler Neurone. Die Erholung der Kv4-Kanalkomplexe von der Inaktivierung wurde verlangsamt und nicht, wie bei den Kanälen kultivierter hippocampaler Neurone, beschleunigt.

4.3 Effekt von NS5806 auf ternäre Kv4.2-N587fsX1/KChIP3/DPP6-S-Komplexe in HEK293-Zellen

Auch die TLE-assoziierte Deletionsmutante Kv4.2-N587fsX1 wurde zusammen mit KChIP3 und DPP6-S als ternärer Komplex in HEK293-Zellen exprimiert. Unter Kontrollbedingungen zeigten sich schnell aktivierende und inaktivierende Ströme mit Amplituden zwischen 0,9 und 22 nA ($8,49 \pm 3,82$ nA; $n = 6$). Der Verlauf des Stromabfalls wurde mit einer doppelt-exponentiellen Funktion beschrieben. Die schnelle Komponente (τ_{1inact}) betrug $38,8 \pm 4,9$ ms und die langsame Komponente (τ_{2inact}) 397 ± 135 ms ($n = 6$). Der Anteil der schnellen Komponente an der Inaktivierung betrug $91 \pm 1\%$. Die Ladung (Q_K) betrug unter Kontrollbedingungen $0,73 \pm 0,3$ nC ($n = 6$). Wie auch in ternären Komplexen des Wildtyp-Kv4.2-Kanals mit KChIP3 und DPP6-S wurden die vermittelten Ströme durch NS5806 moduliert (Abb. 25A). Ab einer Konzentration von 2 μ M NS5806 zeigte sich eine konzentrationsabhängige Potenzierung der Stromamplitude, und bei höheren Konzentrationen war eine Abnahme der Potenzierung zu beobachten: Bis 66 μ M

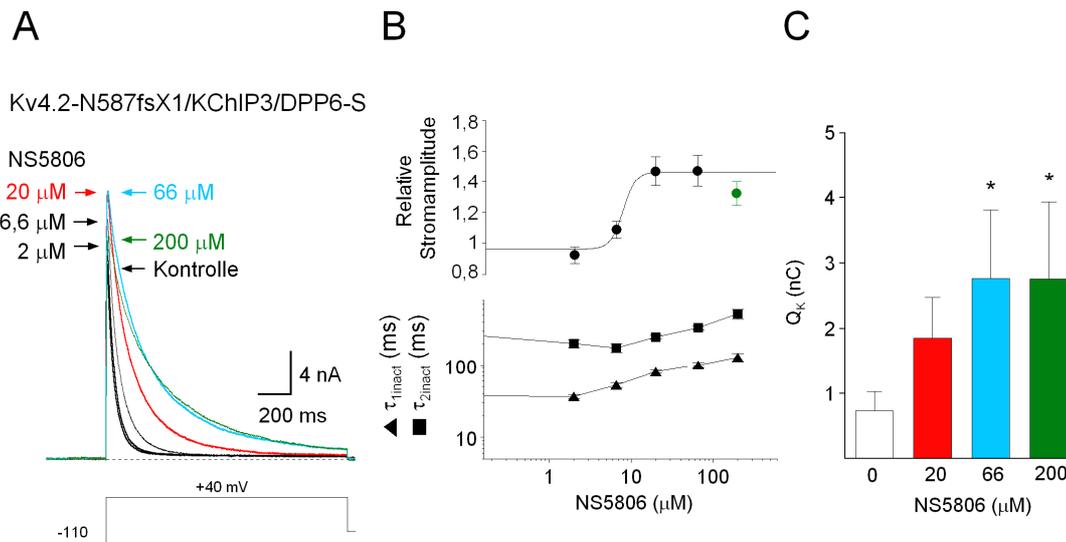


Abbildung 25: Konzentrationsabhängigkeit des Effekts von NS5806 auf ternäre Kv4.2-N587fsX1/KChIP3/DPP6-S-Komplexe.

(A) Repräsentative Stromkurven unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von NS5806 in Konzentrationen von 2 - 200 µM. (B) Oben: Relative Amplitudenzunahme in Abhängigkeit von der NS5806-Konzentration dargestellt durch eine Hill-Funktion. Unten: Zeitkonstanten der Inaktivierung (τ_{1inact} , τ_{2inact}) dargestellt in Abhängigkeit von der NS5806-Konzentration ($n = 6$). (C) Kv4.2-N587fsX1/KChIP3/DPP6-S-vermittelter Ladungstransfer unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20, 66 und 200 µM NS5806 (Kontrolle: unausgefüllt; 20 µM NS5806: rot, 66 µM NS5806: blau; 200 µM NS5806: grün; * $p < 0,05$, $n = 6$).

NS5806 kam es kumulativ zu einer relativen Amplitudenzunahme. In Gegenwart von 20 µM und 66 µM zeigte sich eine Amplitudenzunahme um 47 % ($p = 0,031$; $n = 6$). In Gegenwart von 200 µM NS5806 zeigte sich nur eine nicht signifikante Amplitudenzunahme um 22 % im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,066$; $n = 6$; Abb. 25B). Aus der Dosis-Wirkungskurve von NS5806 ließen sich die Konzentration für die halbmaximale Potenzierung und der Hill-Koeffizient ermitteln ($EC_{50} = 7,97 \mu\text{M}$; $h = 5,5$; Abb. 25B). In Gegenwart von 20 µM NS5806 zeigte sich eine deutliche Verlangsamung der Inaktivierung. Die schnelle Komponente der Inaktivierung (τ_{1inact}) betrug $81 \pm 4 \text{ ms}$ ($p = 0,0045$) und die langsame Komponente (τ_{2inact}) betrug $248 \pm 17 \text{ ms}$ ($p = 0,28$; $n = 6$; Abb. 25B). Der Anteil der schnellen Komponente an der Inaktivierung betrug $52 \pm 5\%$ ($p < 0,0001$). Mit zunehmender Konzentration kam es zu einer immer stärkeren Verlangsamung der Inaktivierung. In Gegenwart von 200 µM NS5806 betrug τ_{1inact} $130 \pm 15 \text{ ms}$ ($p = 0,0042$) und τ_{2inact} $521 \pm 81 \text{ ms}$ ($p = 0,28$; $n = 6$). Durch Potenzierung der Amplitude und Verlangsamung der Inaktivierung nahm mit zunehmender NS5806-Konzentration der Kv4.2-N587fsX1/KChIP3/DPP6-S-vermittelte Ladungstransfer zu. In Gegenwart von 20 µM NS5806 kam es zu einer Zunahme der Ladung auf $1,85 \pm 0,62 \text{ nC}$

($p = 0,2987$) und in Gegenwart von $66 \mu\text{M}$ auf $2,76 \pm 1,05 \text{ nC}$ ($p = 0,0251$; $n = 6$). Trotz der abnehmenden Potenzierung der Amplitude kam es in Gegenwart von $200 \mu\text{M}$ NS5806 ebenfalls zu einer Zunahme der Ladung auf $2,76 \pm 1,17 \text{ nC}$ im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,0224$; $n = 6$; Abb. 25C).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die C-terminale Deletionsmutante Kv4.2-N587fsX1 im ternären Komplex mit KChIP3 und DPP6-S in Bezug auf die funktionelle Expression und das Inaktivierungsverhalten wie der entsprechende Wildtyp-Kanalkomplex verhält. Auch die Effekte von NS5806 sind vergleichbar.

4.4 Effekt von NS5806 auf binäre Kv4.2/DPP6-S-Komplexe in HEK293-Zellen

Um die Rolle von KChIP3 an der Vermittlung der NS5806-Effekte zu untersuchen, wurden binäre Kv4.2/DPP6-S-Komplexe ohne den Zusatz von KChIP3 in HEK293-Zellen exprimiert.

4.4.1 Konzentrationsabhängiger Effekt von NS5806 auf die Eigenschaften makroskopischer Kv4.2/DPP6-S-Ströme

Die Experimente zur Erfassung des konzentrationsabhängigen Effekts von NS5806 auf binäre Kv4.2/DPP6-S-Komplexe wurden wie die für die ternären Komplexe durchgeführt (Abb. 26). Unter Kontrollbedingungen vermittelten die binären Kv4.2/DPP6-S-Kanäle Ströme mit Amplituden zwischen $1,92$ und $33,7 \text{ nA}$ ($15,8 \pm 1,7 \text{ nA}$; $n = 16$). In Gegenwart von $20 \mu\text{M}$ NS5806 kam es zu einer relativen Amplitudenabnahme um 37% im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,0014$; $n = 16$). In Gegenwart von $200 \mu\text{M}$ kam es zu einer Amplitudenabnahme um 74% ($p < 0,0001$; $n = 16$). Es zeigte sich somit, dass die Stromamplitude binärer Kv4.2/DPP6-S-Kanäle im Gegensatz zu den Experimenten mit ternären Komplexen in Gegenwart von NS5806 nicht potenziert, sondern beträchtlich gesenkt wurde. Aus der NS5806-Dosis-Wirkungskurve ließen sich die Konzentration für die halb-maximale Inhibierung und der Hill-Koeffizient ermitteln ($C_{50} = 40,4 \mu\text{M}$; $h = 0,6$; Abb. 26B). Die makroskopische Inaktivierung wurde durch eine doppelt-exponentielle

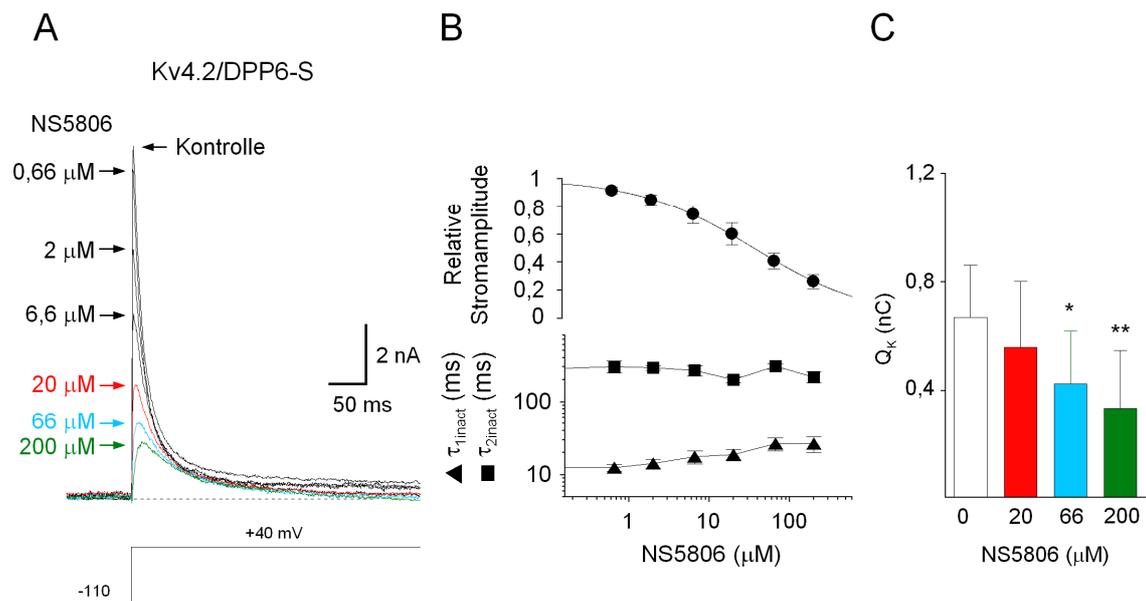


Abbildung 26: Konzentrationsabhängigkeit des Effekts von NS5806 auf binäre Kv4.2/DPP6-S-Komplexe.

(A) Repräsentative Stromkurven unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von NS5806 in Konzentrationen von 0,66 - 200 μM . (B) Oben: Relative Amplitudenabnahme in Abhängigkeit von der NS5806-Konzentration dargestellt durch eine Hill-Funktion. Unten: Zeitkonstanten der Inaktivierung (τ_{1inact} , τ_{2inact}) dargestellt in Abhängigkeit von der NS5806-Konzentration ($n = 16$). (C) Durch den Kv4.2/DPP6-S-Kanal vermittelter Ladungstransfer Q_K unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20, 66 und 200 μM NS5806 (Kontrolle: unausgefüllt; 20 μM NS5806: rot, 66 μM NS5806: blau; 200 μM NS5806: grün; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; $n = 16$).

Funktion, mit einer schnellen Komponente (τ_{1inact}) von $10,3 \pm 0,6$ ms und einer langsamen Komponente (τ_{2inact}) von 241 ± 23 ms unter Kontrollbedingungen, beschrieben ($n = 16$; Abb. 26B). Der prozentuale Anteil von τ_{1inact} an der Inaktivierung betrug $94 \pm 0,4\%$ ($n = 16$). Es zeigte sich kein einheitlicher konzentrationsabhängiger Effekt auf die langsame Komponente der Inaktivierung, allerdings eine leichte Verlangsamung der schnellen Komponente. In Gegenwart von 20 μM NS5806 betragen die Zeitkonstante der schnellen Komponente (τ_{1inact}) $16,8 \pm 1,5$ ms ($p = 0,0002$) und die der langsamen Komponente (τ_{2inact}) 224 ± 11 ms ($p = 0,4239$; $n = 16$). Der Anteil von τ_{1inact} an der Inaktivierung betrug in Gegenwart von 20 μM NS5806 $90 \pm 1\%$ ($p = 0,0002$; $n = 16$). In Gegenwart von 200 μM NS5806 betrug τ_{1inact} $26,5 \pm 6,4$ ms ($p = 0,024$) und τ_{2inact} 218 ± 37 ms ($p = 0,341$; $n = 16$; Abb. 26B). Im Einklang mit der Auswirkung auf die Amplitude zeigte sich eine Reduktion der durch die Kv4.2/DPP6-S-Kanäle vermittelten Ladung in Abhängigkeit von der NS5806-Konzentration (Abb. 26C). Q_K betrug unter Kontrollbedingungen $0,67 \pm 0,19$ nC ($n = 16$). In Gegenwart von 20 μM NS5806 kam es zu einer geringen, nicht signifikanten Reduktion von Q_K auf $0,56 \pm 0,24$ nC im Vergleich

zur Kontrolle ($p = 0,5096$; $n = 16$). In Gegenwart von 66 und 200 μM NS5806 war Q_K allerdings signifikant reduziert. In Gegenwart von 66 μM NS5806 betrug Q_K $0,43 \pm 0,19$ nC ($p = 0,0155$) und in Gegenwart von 200 μM NS5806 $0,33 \pm 0,21$ nC ($p = 0,0004$; $n = 16$; Abb. 26C).

Die Effekte von NS5806 auf die Amplitude, die makroskopische Inaktivierung und die Ladung zeigten also deutliche Unterschiede in Abhängigkeit davon, ob KChIP3 Bestandteil des Kanalkomplexes war oder nicht. Der Strom ternärer Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Komplexe wurde durch NS5806 konzentrationsabhängig potenziert und nur bei sehr hohen NS5806-Konzentrationen supprimiert, wohingegen die Stromamplitude binärer Kv4.2/DPP6-S-Komplexe konzentrationsabhängig ausschließlich supprimiert wurde.

4.4.2 Effekt von NS5806 auf die Erholung der Kv4.2/DPP6-S-Kanäle von der Inaktivierung

Ergänzend zu den NS5806-Effekten auf die Stromamplitude und die makroskopische Inaktivierung wurde der Effekt von NS5806 auf die Erholung von der Inaktivierung

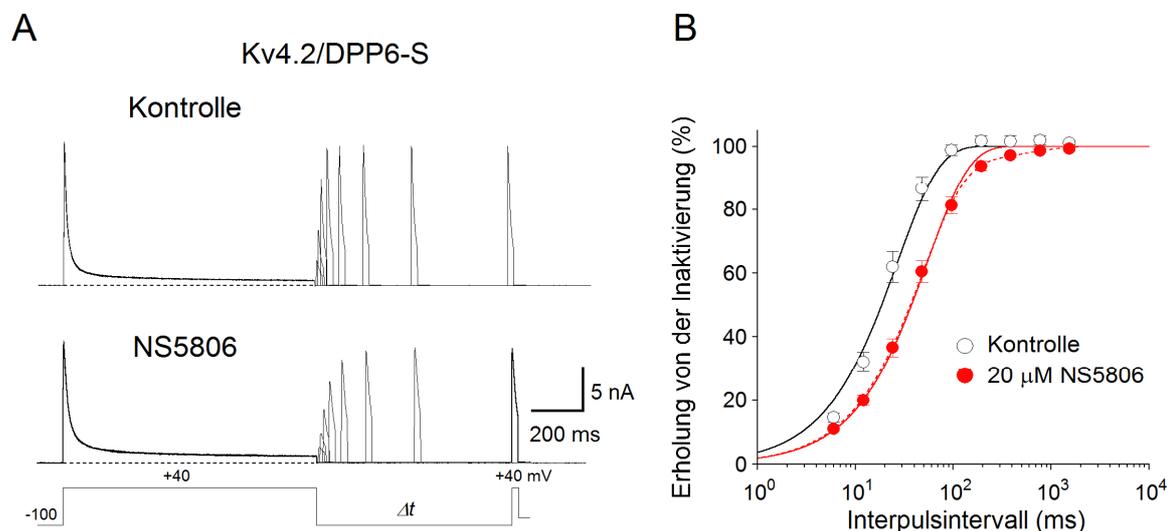


Abbildung 27: Effekt von NS5806 auf die Erholung binärer Kv4.2/DPP6-S-Komplexe von der Inaktivierung.

(A) Exemplarische Stromkurven unter Kontrollbedingungen (oben) und in Gegenwart von 20 μM NS5806 (unten). (B) Die Amplitude der zweiten Stromantwort normiert auf die Amplitude des vorausgegangenen Kontrollstroms, aufgetragen in Abhängigkeit vom Interpulsintervall und durch eine einfach-exponentielle Funktion beschrieben (durchgezogene Linien). Die gepunktete Linie beschreibt die Daten durch eine doppelt-exponentielle Funktion (Kontrolle: unausgefüllt; NS5806: rot; $\tau_{\text{rec}(1)} = 48$ ms, $\tau_{\text{rec}(2)} = 534$ ms; $n = 6$).

binärer Kv4.2/DPP6-S-Komplexe untersucht (Abb. 27A). Die Recovery-Kinetik wurde durch eine einfach-exponentielle Funktion mit einer Zeitkonstante (τ_{rec}) von $30,7 \pm 4,4$ ms unter Kontrollbedingungen beschrieben ($n = 6$). In Gegenwart von $20 \mu\text{M}$ NS5806 kam es, wie auch in ternären Komplexen, zu einer Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung mit einer Zeitkonstante (τ_{rec}) von $57,7 \pm 10,3$ ms ($p = 0,0246$; $n = 6$). In Gegenwart von NS5806 zeigte die Recovery-Kinetik zusätzlich eine langsame Komponente (Abb. 27B). Die Effekte auf die Erholung binärer Kv4.2/DPP6-S-Komplexe von der Inaktivierung glichen den Effekten, die bei ternären Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Komplexen beobachtet wurden.

4.4.3 Effekt von NS5806 auf die Spannungsabhängigkeit von Inaktivierung und Aktivierung der Kv4.2/DPP6-S-Kanäle

Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung binärer Kv4.2/DPP6-S-Komplexe lag unter Kontrollbedingungen bereits bei deutlich negativeren Potenzialen ($V_{1/2\text{inact}} = -66,3 \pm 1,3$ mV; $k_{\text{inact}} = 4,8 \pm 0,8$ mV; $n = 8$; Abb. 28A) als die entsprechenden Kontrollwerte ternärer Komplexe (siehe 4.2.4; Abb. 24). Trotzdem kam es in Gegenwart von $20 \mu\text{M}$ NS5806 zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung binärer Kv4.2/DPP6-S-Kanäle zu negativeren Potenzialen (Abb. 28B). Die Spannung bei halb-maximaler Inaktivierung ($V_{1/2\text{inact}}$) betrug nun $-79,3 \pm 1,2$ mV ($p < 0,0001$) und der Steigungsfaktor (k_{inact}) $6,1 \pm 0,6$ ($p = 0,0402$; $n = 8$). NS5806 beeinflusste die Spannungsabhängigkeit der Kv4.2/DPP6-S-Aktivierung nur leicht (Abb. 28C). Die Spannung bei halb-maximaler Aktivierung ($V_{0,5}$) betrug $-16,7 \pm 2,3$ mV und der Steigungsfaktor (k_{act}) unter Kontrollbedingungen $18,4 \pm 0,7$ ($n = 8$). Die Aktivierungskurve war in Gegenwart von NS5806 geringfügig flacher ($k_{\text{act}} = 24,7 \pm 1,6$; $p = 0,0164$) ohne signifikante Auswirkung auf die Spannung bei halb-maximaler Aktivierung ($V_{0,5} = -19,0 \pm 3,3$ mV; $p = 0,5891$; $n = 8$; Abb. 28D). Im Vergleich zeigten die Effekte von NS5806 auf binäre Kv4.2/DPP6-S und ternäre Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Komplexe, dass KChIP3 eine ausschlaggebende Rolle bei der Vermittlung des NS5806-Effekts auf die Amplitude und die makroskopische Inaktivierung spielt, aber nicht bei der Vermittlung der NS5806-Effekte auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung und der Aktivierung sowie auf die Kinetik der Erholung von der Inaktivierung.

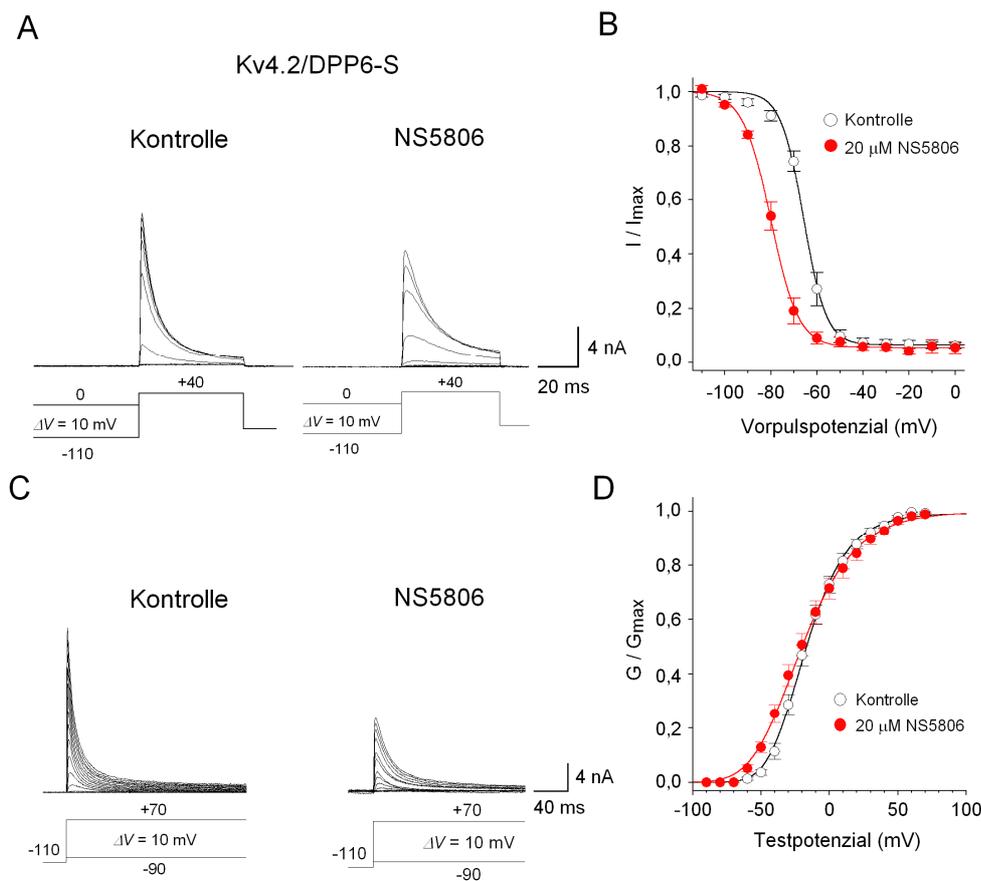


Abbildung 28: Effekt von 20 μ M NS5806 auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung und der Aktivierung binärer Kv4.2/DPP6-S-Komplexe.

(A) Exemplarische Stromkurven des Inaktivierungsprotokolls unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20 μ M NS5806. (B) Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung dargestellt durch eine Boltzmann-Funktion 1. Ordnung (Kontrolle: unausgefüllt; NS5806: rot; $n = 8$). (C) Exemplarische Stromkurven des Aktivierungsprotokolls unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20 μ M NS5806. (D) Spannungsabhängigkeit der Aktivierung dargestellt durch eine Boltzmann-Funktion 4. Ordnung (Kontrolle: unausgefüllt; NS5806: rot; $n = 8$).

4.5 Effekt von NS5806 auf ternäre Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Komplexe in HEK293-Zellen

Die schnelle Inaktivierung des nativen I_{SA} (siehe 4.1.2; Abb. 16) unterschied sich von der deutlich langsameren Inaktivierungskinetik ternärer Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Komplexe (siehe 4.2.2; Abb. 22). Um zu versuchen, das Inaktivierungsverhalten des nativen I_{SA} in einem ternären rekombinanten Kanalkomplex zu rekapitulieren, wurde DPP6-E, welches als Splice-Variante mit einer schnellen N-terminal-vermittelten Inaktivierung beschrieben ist (Jerng *et al.*, 2009), mit Kv4.2 und KChIP3 coexprimiert.

4.5.1 Konzentrationsabhängiger Effekt von NS5806 auf die Eigenschaften makroskopischer Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Ströme

Unter Kontrollbedingungen zeigten die Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-vermittelten Ströme Amplituden zwischen 2,2 und 11,2 nA ($2,7 \pm 0,4$ nA; $n = 4$; Abb. 29A). Die Ströme wurden nur geringfügig durch NS5806 moduliert (Abb. 29A, B). In Gegenwart von 20 μ M NS5806 kam es zu einer Amplitudenzunahme um 12 % im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,0236$; $n = 4$). Nur in Gegenwart von 200 μ M NS5806 zeigte sich eine Abnahme der Amplitude, und zwar um 43% ($p < 0,0001$; $n = 4$; Abb. 29C). Die makroskopische Inaktivierung wurde unter Kontrollbedingungen durch eine doppelt-exponentielle Funktion mit einer extrem schnellen ($\tau_{1inact} = 6,8 \pm 1,4$ ms) und einer langsamen Komponente ($\tau_{2inact} = 318 \pm 26$ ms) beschrieben ($n = 4$). Der Anteil von τ_{1inact} an der Inaktivierung betrug $81 \pm 1\%$ ($n = 4$). Nur in Gegenwart von 200 μ M NS5806 kam es zu einer Verlangsamung der schnellen Komponente der Inaktivierung ($\tau_{1inact} = 12,6 \pm 1,9$ ms) im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,039$; $n = 4$). NS5806 führte, bis zu einer Konzentration von 6,6 μ M, zu einer konzentrationsabhängigen Verlangsamung der langsamen Komponente der Inaktivierung (τ_{2inact}), allerdings zu einer abnehmenden Verlangsamung bei höheren Konzentrationen. In Gegenwart von 6,6 μ M NS5806 betrug die langsame Komponente

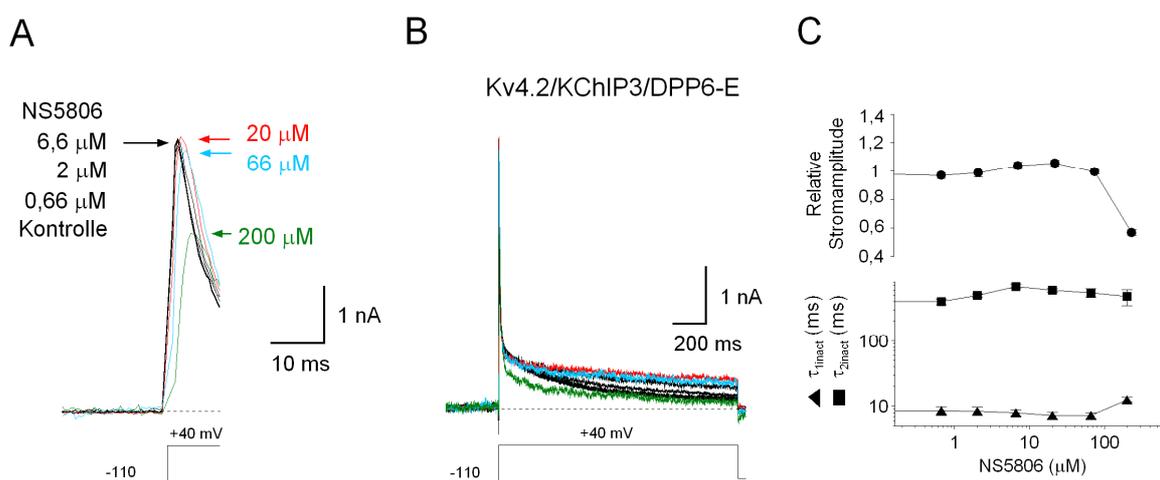


Abbildung 29: Konzentrationsabhängigkeit des Effekts von NS5806 auf ternäre Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Komplexe.

(A) Ausschnitt aus (B) zur besseren Darstellung des NS5806-Effekts auf die Stromamplitude in Konzentrationen von 0,66 - 200 μ M NS5806 (0,66-6,6 μ M & Kontrolle: schwarz, 20 μ M NS5806: rot, 66 μ M NS5806: blau; 200 μ M NS5806: grün). (B) Repräsentative Stromkurven in ganzer Länge unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 0,66 - 200 μ M NS5806. (C) Oben: Relative Amplitude in Abhängigkeit von der NS5806-Konzentration. Unten: Zeitkonstanten der Inaktivierung (τ_{1inact} , τ_{2inact}) dargestellt in Abhängigkeit von der NS5806-Konzentration ($n = 4$).

(τ_{2inact}) $684 \pm 43,8$ ms ($p = 0,0013$) und in Gegenwart von $200 \mu\text{M}$ NS5806 480 ± 131 ms ($p = 0,144$; $n = 4$).

Der NS5806-Effekt auf die Eigenschaften makroskopischer Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Ströme war deutlich geringer ausgeprägt als der Effekt auf die Ströme vermittelt durch Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Komplexe (siehe 4.2.2; Abb. 22). Die Stromamplitude und die schnelle Komponente der Inaktivierung wurden nur unwesentlich beeinflusst. Jedoch zeigte sich deutlich eine konzentrationsabhängige Verlangsamung der langsamen Komponente der Inaktivierung, die bei höheren Konzentrationen schwächer ausgeprägt war.

4.5.2 Effekt von NS5806 auf die Erholung der Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Kanäle von der Inaktivierung

Als nächstes wurde der NS5806-Effekt auf die Erholung der ternären Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Kanäle von der Inaktivierung untersucht (Abb. 30A). Die Recovery-Kinetik wurde unter Kontrollbedingungen durch eine einfach-exponentielle Funktion mit einer Zeitkonstante (τ_{rec}) von $11,0 \pm 1,1$ ms beschrieben ($n = 5$). In

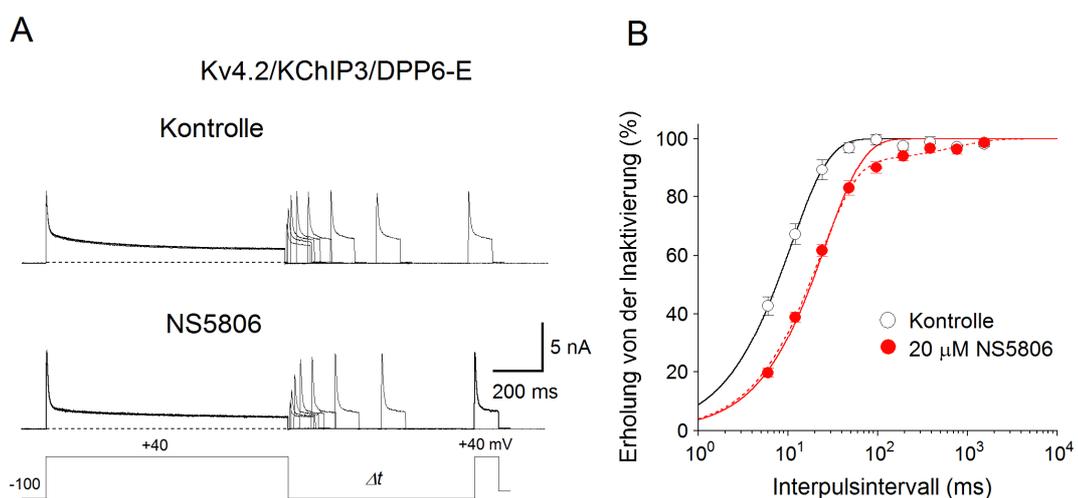


Abbildung 30: Effekt von NS5806 auf die Erholung ternärer Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Komplexe von der Inaktivierung.

(A) Exemplarische Stromkurven unter Kontrollbedingungen (oben) und in Gegenwart von $20 \mu\text{M}$ NS5806 (unten). (B) Amplitude der zweiten Stromantwort jeweils normiert auf die Amplitude des vorausgegangenen Kontrollstroms, aufgetragen in Abhängigkeit vom Interpulsintervall und durch eine einfach-exponentielle Funktion beschrieben. Die gepunktete Linie beschreibt die Daten durch eine doppelt-exponentielle Funktion (Kontrolle: unausgefüllt; NS5806: rot; $\tau_{rec(1)} = 22$ ms, $\tau_{rec(2)} = 711$ ms; $n = 5$).

Gegenwart von 20 μM NS5806 kam es, wie auch bei den zuvor getesteten Kanalkomplexen, zu einer Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung mit einer Zeitkonstante (τ_{rec}) von $26,3 \pm 1,6$ ms ($p = 0,0009$; $n = 5$; Abb. 30B). In Gegenwart von NS5806 zeigte der Verlauf der Erholung der Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Kanäle von der Inaktivierung (siehe 4.2.3; Abb. 23) zusätzlich eine langsame Komponente (Abb. 30B). Zusammenfassend lassen sich die Effekte von NS5806 auf die Erholung ternärer Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Komplexe von der Inaktivierung mit den Effekten auf ternäre Kv4.2/KChIP3/DPP6-S-Komplexe vergleichen.

4.5.3 Effekt von NS5806 auf die Spannungsabhängigkeit von Inaktivierung und Aktivierung der Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Kanäle

Es wurde die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung (Abb. 31A) und der Aktivierung

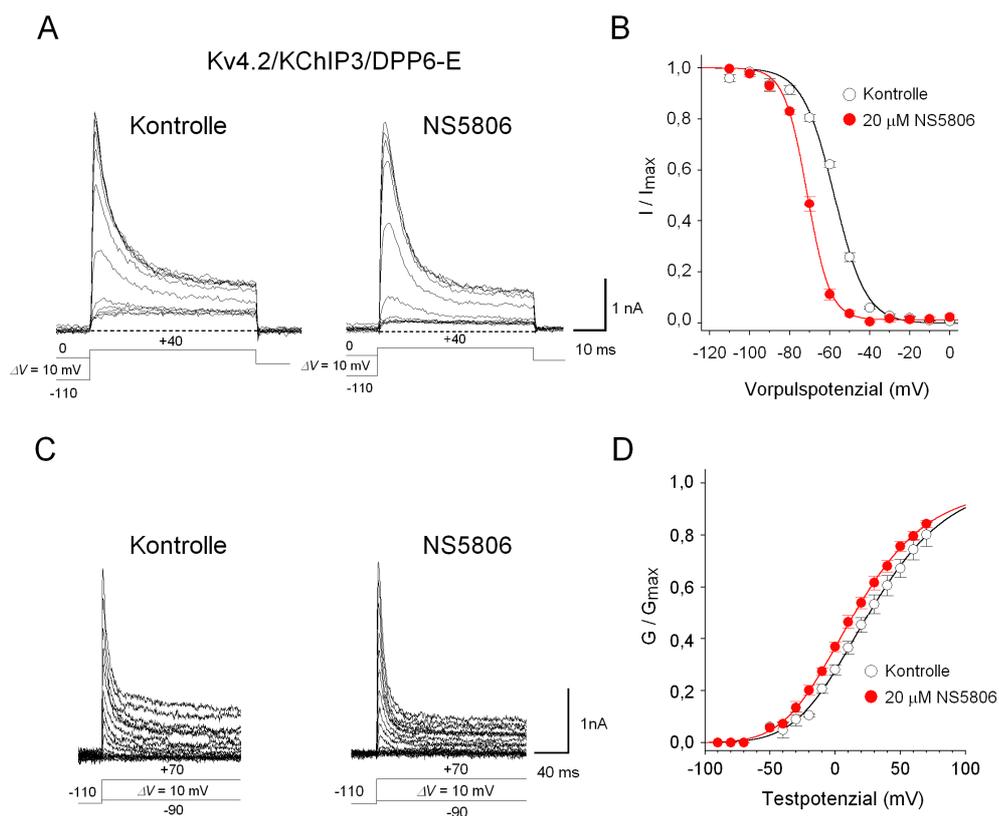


Abbildung 31: Effekt von 20 μM NS5806 auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung und der Aktivierung ternärer Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Komplexe.

(A) Exemplarische Stromkurven des Inaktivierungsprotokolls unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20 μM NS5806. (B) Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung dargestellt durch eine Boltzmann-Funktion 1. Ordnung (Kontrolle: unangefüllt; NS5806: rot; $n = 6$). (C) Exemplarische Stromkurven des Aktivierungsprotokolls unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von 20 μM NS5806. (D) Spannungsabhängigkeit der Aktivierung dargestellt durch eine Boltzmann-Funktion 4. Ordnung (Kontrolle: unangefüllt; NS5806: rot; $n = 5$).

(Abb. 31C) der ternären Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Kanäle untersucht. Unter Kontrollbedingungen betrug die Spannung bei halb-maximaler Inaktivierung ($V_{1/2inact}$) $-57,6 \pm 0,3$ mV und der Steigungsfaktor (k_{inact}) $7,9 \pm 0,4$ mV ($n = 6$). In Gegenwart von $20 \mu\text{M}$ NS5806 kam es zu einer deutlichen Verschiebung der Steady-State-Inaktivierung zu negativeren Potenzialen mit einem steileren Verlauf der Kurve (Abb. 31B). Die Spannung bei halb-maximaler Inaktivierung ($V_{1/2inact}$) betrug nun $-70,9 \pm 0,6$ mV ($p < 0,0001$) und der Steigungsfaktor (k_{inact}) $5,8 \pm 0,4$ mV ($p = 0,0007$; $n = 6$). Die Spannung bei halb-maximaler Aktivierung ($V_{0,5}$) betrug unter Kontrollbedingungen $27,4 \pm 4,1$ mV und der Steigungsfaktor (k_{act}) $37,9 \pm 4,0$ mV ($n = 5$). NS5806 bewirkte eine leichte, aber signifikante Verschiebung der Aktivierungskurve zu negativeren Potenzialen ohne Effekt auf die Steilheit (Abb. 31D). In Gegenwart von $20 \mu\text{M}$ NS5806 betrug die Spannung bei halb-maximaler Aktivierung ($V_{0,5}$) $15,7 \pm 2,7$ mV ($p = 0,0297$) und der Steigungsfaktor (k_{act}) $36,1 \pm 0,9$ mV ($p = 0,6287$; $n = 5$).

Vergleichend lässt sich feststellen, dass die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung ternärer Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Komplexe unter Kontrollbedingungen bereits bei negativeren Potenzialen lag und der Verlauf der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung bei positiveren Potenzialen als die entsprechenden Kontrollwerte des ternären Komplexes mit DPP6-S. Der NS5806-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung und der Aktivierung des ternären Kanal-Komplexes mit DPP6-E ist jedoch vergleichbar mit dem Effekt auf den ternären Kanalkomplex mit DPP6-S (siehe 4.2.4; Abb. 24).

5. Diskussion

5.1 NS5806 als pharmakologisches „Tool“ zur Analyse nativer Kanalzusammensetzungen

Durch seine hemmenden und potenzierenden Eigenschaften unterschiedlichster Ausprägung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Kanaluntereinheiten kann NS5806 als „Tool“ zur Analyse nativer Kanalzusammensetzungen dienen, insbesondere zur Überprüfung einer Beteiligung von KChIP am Kanalkomplex. Ein Vergleich der NS5806-Effekte auf den I_{SA} nativer Neurone und die Ströme rekombinanter Kv4-Kanäle ermöglicht es prinzipiell, die Zusammensetzung der nativen neuronalen Kanäle zu erforschen. Bereits Calloe *et al.* (2009) und Lundby *et al.* (2010) nutzten NS5806, um durch Kombinationen unterschiedlicher Kanaluntereinheiten die Effekte von NS5806 auf den I_{to} nativer Hundemyozyten zu reproduzieren und von den Ergebnissen eine wahrscheinliche Kanalzusammensetzung in nativen Myozyten abzuleiten. Die Ergebnisse der Experimente von Calloe *et al.* (2009, 2010) und Lundby *et al.* (2010) stellen auch eine entscheidende Vergleichsgrundlage für die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse der NS5806-Effekte auf den nativen neuronalen I_{SA} dar. Calloe *et al.* (2009) beschrieben eine 1,8-fache Erhöhung der I_{to} -Dichte und eine ungefähr zweifache Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung durch NS5806, welches wiederum in einer nahezu dreifachen Zunahme des Ladungstransfers resultierte. Darüber hinaus zeigte NS5806 eine Beschleunigung der Recovery-Kinetik der myozytären Ströme und eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu negativeren Potenzialen (Calloe *et al.*, 2009; Calloe *et al.*, 2010).

Die Ergebnisse des NS5806-Effekts auf den I_{SA} kultivierter hippocampaler Neurone sind überwiegend vereinbar mit den Effekten auf den myozytären I_{to} , jedoch zeigte sich im Gegensatz zur Potenzierung der I_{to} -Amplitude eine Suppression der I_{SA} -Amplitude. Bedenkt man nun, dass sich ein potenzierender Effekt von 10 μ M NS5806 auf den I_{to}

(Calloe *et al.*, 2010) und in der vorliegenden Arbeit ein supprimierender Effekt von 20 μM NS5806 auf den I_{SA} zeigte, so ist unter anderem die Verwendung einer höheren Konzentration als Ursache für die Umkehrung des Effekts denkbar, wie auch mit höheren NS5806-Konzentrationen an rekombinanten Kanalkomplexen in der vorliegenden Arbeit gezeigt (siehe 4.4.4; Abb. 22). So führte in ternären rekombinanten Kanalkomplexen eine Konzentration von 200 μM stets zu einer geringeren Potenzierung der Stromamplitude als 20 und 66 μM NS5806 (Abb. 22; Abb. 25). Ebenfalls denkbar als Ursache des unterschiedlichen NS5806-Effekts auf die Amplitude von I_{SA} und I_{to} ist das Vorliegen vieler Kanalpopulationen mit unterschiedlicher Untereinheitenzusammensetzung in nativen Geweben. Sogar in rekombinanten Kv4/KChIP3/DPP6-Komplexen, die per se eine typische neuronale Kanalkomplex-Kombination darstellen, zeigte sich eine deutliche

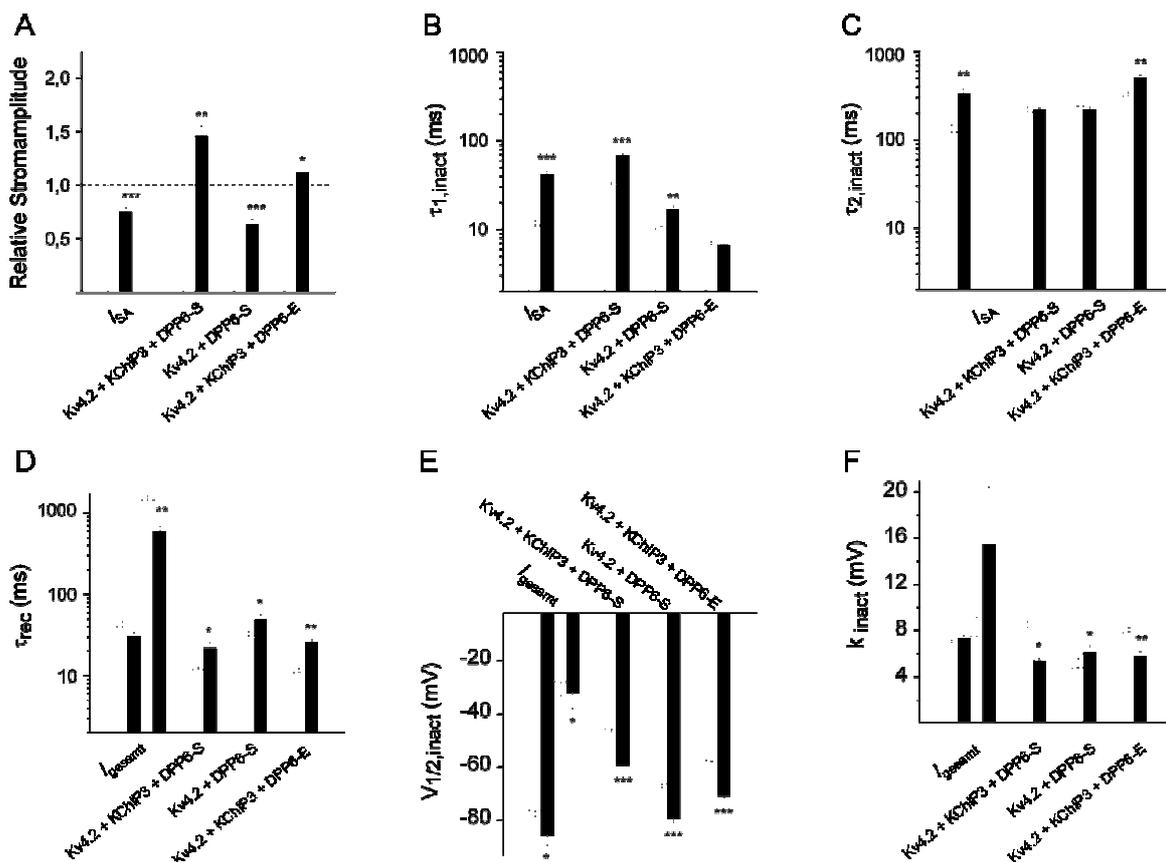


Abbildung 32: Effekte durch Superfusion von 20 μM NS5806 auf den I_{SA} und die Ströme ternärer Kv4.2/KChIP3/DPP6-S, binärer Kv4.2/DPP6-S und ternärer Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Kanäle. NS5806-Effekte auf: (A) die Stromamplitude, (B) die schnelle Komponente der makroskopischen Inaktivierung, (C) die langsame Komponente der makroskopischen Inaktivierung, (D) die Erholung von der Inaktivierung, (E) die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung, (F) den Steigungsfaktor der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung. Die Balkenpaare für I_{gesamt} repräsentieren die Anwendung einer doppelt exponentiellen Funktion (D) und die Anwendung einer Summe aus zwei Boltzmann-Funktionen (E und F).

Potenzierung der Stromamplitude im Vergleich zur Suppression der I_{SA} -Amplitude bei vergleichbarem Effekt auf die Inaktivierung (Abb. 32). Berücksichtigt man nun, dass sich auch in der vorliegenden Arbeit eine Abhängigkeit des potenzierenden NS5806-Effekts auf die Stromamplitude von KChIP zeigte (Tab. 5; Abb. 32A, Calloe *et al.*, 2009, Lundby *et al.*, 2010), so könnte beispielsweise eine Summation von Kanalkomplexen ohne KChIP und von solchen mit KChIP zur Vermittlung des I_{SA} beitragen und zu den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Unterschieden im NS5806-Effekt auf die Amplitude des nativen I_{SA} und die Amplitude der Kv4.2/KChIP3/DPP6-Kanalkomplexe geführt haben (Abb. 32A).

Um eine genauere Aussage über die native Kanalzusammensetzung des I_{SA} machen zu können, werden im Folgenden die Inaktivierungseigenschaften der nativen Ströme mit denen rekombinanter Kv4.2-Kanäle, coexprimiert mit unterschiedlichen β -Untereinheiten, verglichen; gleichzeitig werden die unterschiedlichen NS5806-Effekte auf die nativen Ströme (sowohl I_{SA} als auch I_{to}) und die Ströme rekombinanter Kanalkomplexe einander gegenübergestellt.

Der Effekt auf die Stromamplitude und die makroskopische Inaktivierung des I_{SA} war relativ einfach durch Isolation des I_{SA} vom gesamten neuronalen Auswärtsstrom zu erfassen (Abb. 16; Abb. 32A-C). Der Vergleich der Erholung von der Inaktivierung und der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung des I_{SA} und der Ströme rekombinanter Kanalkomplexe war eingeschränkt, da sich mehrere inaktivierende Stromkomponenten in den kultivierten hippocampalen Neuronen zeigten. Die Erholung des gesamten neuronalen Auswärtsstroms von der Inaktivierung und die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zeigten einen biphasischen Verlauf (Abb. 19; Abb. 20). Ein biphasischer Verlauf der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung lässt auf die Kombination zweier unterschiedlicher Kanalpopulationen schließen. Am wahrscheinlichsten ist in diesem Zusammenhang, dass die Kanalpopulation, die bei negativeren Potentialen inaktivierte ($V_{1/2} = -76,3 \pm 2,4$ mV), dem Kv4-Kanal-vermittelten I_{SA} entspricht (Jerng *et al.*, 2004). Zudem korreliert die NS5806-induzierte Linksverschiebung dieses Anteils der Inaktivierungskurve mit der Linksverschiebung der Inaktivierungskurve der rekombinanten Kv4.2-Kanäle. Eine vergleichbare Verschiebung der Inaktivierungskurve

zu negativeren Potenzialen in Gegenwart von NS5806 zeigte sich auch in den Experimenten am myozytären I_{to} und rekombinanten Kv4.3-Kanälen (Lundby *et al.*, 2010). Der positivere Anteil der Inaktivierungskurve, der nicht signifikant durch NS5806 beeinflusst wurde, könnte beispielsweise durch eine Beteiligung von Kv1-Kanälen am gesamten neuronalen Auswärtsstrom zu Stande kommen (Maletic-Savatic *et al.*, 1995), obwohl diese Kanäle überwiegend im Axon und den Axonterminalen lokalisiert sind (Sheng *et al.*, 1992; Sheng *et al.*, 1993; Monaghan *et al.*, 2008).

Auch der Verlauf der Erholung des gesamten neuronalen Auswärtsstroms von der Inaktivierung zeigte einen biphasischen Verlauf. Dies lässt sich entweder ebenfalls durch das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Kanalpopulationen oder durch die intrinsischen Eigenschaften einer einzigen Kanalpopulation erklären, vergleichbar mit der biphasischen Kinetik der makroskopischen Inaktivierung (Abb. 16B). Unter der Annahme, dass es sich um zwei Kanalpopulationen handelt, erscheint naheliegend, dass die schnelle Komponente der Erholung von der Inaktivierung ($\tau_1 = 40\text{ms}$) dem Kv4-vermittelten I_{SA} zuzuordnen ist (Jerng *et al.*, 2004). Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, dass rekombinante Kv4.2-Kanäle stets (außer in Gegenwart von NS5806 in ternären Kv4.2-Komplexen mit KChIP3) eine schnelle einfach-exponentielle Recovery-Kinetik zeigten (Abb. 32D).

Im Gegensatz zum NS5806-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung war der Effekt auf die Recovery in nativen Neuronen nicht ohne weiteres vergleichbar mit dem Effekt auf die Recovery rekombinanter Kv4.2-Komplexe. Ähnlich wie in den Experimenten am myozytären I_{to} und rekombinanten Kv4.3-Komplexen (Calloe *et al.*, 2009 & 2010) zeigte sich eine Beschleunigung der Recovery-Kinetik des I_{SA} im Gegensatz zu einer deutlichen Verlangsamung der Recovery-Kinetik der rekombinanten Kv4.2-Komplexe. Durch eine Variation der Kanaluntereinheiten der Kv4.2-Komplexe konnte der beschleunigende NS5806-Effekt der Recovery im nativen Gewebe in der vorliegenden Arbeit nicht rekapituliert werden (Lundby *et al.*, 2010). NS5806 führte in allen rekombinanten Komplexen stets zu einer Verlangsamung der Recovery-Kinetik, wohingegen die nativen Ströme nach Applikation von NS5806 sich stets schneller von der Inaktivierung erholten. Als mögliche Erklärung für die

Beschleunigung der Recovery in den nativen Hundemyozyten vermuteten Lundby *et al.* (2010) einen anteilig hemmenden NS5806-Effekt auf eine zusätzliche Stromkomponente mit einer grundsätzlich langsameren Recovery-Kinetik. In diesem Zusammenhang wurden Experimente an Kv1.4-Kanälen, die mit den Eigenschaften einer langsamen Recovery-Kinetik an der Vermittlung des I_{to} beschrieben sind (Patel & Campbell, 2005), durchgeführt. In diesen Experimenten zeigte sich eine starke NS5806-induzierte Suppression der Kv1.4-vermittelten Ströme (Lundby *et al.*, 2010). Wie bereits oben beschrieben, ist eine Beteiligung der Kv1.4-Kanäle am hippocampalen I_{SA} durch eine zusätzliche Lokalisation im Soma des Neurons durchaus denkbar und könnte die Beschleunigung der Recovery des I_{SA} , wie auch des I_{to} , im Gegensatz zur Verlangsamung der Recovery der rekombinanten Komplexe begründen (Maletic-Savatic *et al.*, 1995). Darüber hinaus beeinflusste NS5806 die biphasische Recovery-Kinetik in ihren Komponenten nicht gleichermaßen, sondern beschleunigte überwiegend die langsame Komponente. Dies lässt sich unter der Annahme zweier Kanalpopulationen durch eine höhere Sensitivität für NS5806 der einen Kanalpopulation erklären. Jedoch ist auch eine selektive Beeinflussung der langsamen Komponente einer biphasischen Recovery-Kinetik nur einer Kanalpopulation als Erklärung denkbar. In Zusammenschau aller Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass die kultivierten hippocampalen Neurone Kv4-Kanäle mit einer in der vorliegenden Arbeit nicht getesteten Zusammensetzung von Untereinheiten (heteromere Kombinationen von Subtypen, verschiedene Splice-Varianten) enthalten, da keine der bisher getesteten Kombinationen eine NS5806-induzierte Beschleunigung der Recovery zeigte (Jerng & Pfaffinger, 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine Kombination von Kv4.2-Kanälen mit KChIP3 und DPP6-S als β -Untereinheiten gewählt. Dies geschah aufgrund der Erkenntnis, dass der I_{SA} am ehesten durch Kv4.2/KChIP/DPP-Komplexe vermittelt wird (Jerng *et al.*, 2005). Die Splice-Varianten der Untereinheiten wurden basierend auf deren Expression im Hippocampus (Maletic-Savatic *et al.*, 1995; Jerng *et al.*, 2005; Nadal *et al.*, 2006) gewählt. In diesem Zusammenhang wurden ebenfalls Experimente mit KChIP2 und KChIP4 im ternären Komplex durchgeführt (Witzel *et al.*, 2012). Die Ströme der ternären Kv4.2/KChIP/DPP6-S-Kanäle konnten die intrinsischen Eigenschaften des I_{SA} jedoch nicht vollständig rekapitulieren (Abb. 32; Witzel *et al.*, 2012). Die Ströme der

Kv4.2/KChIP/DPP6-S-Kanäle zeigten stets eine langsamere makroskopische Inaktivierung (Abb. 32B), eine schnellere Erholung von der Inaktivierung (Abb. 32D) und einen Verlauf der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung bei deutlich positiveren Potenzialen (Abb. 32E) als der I_{SA} oder die entsprechenden Komponenten des I_{gesamt} . Aufgrund der beschriebenen KChIP-Effekte auf den Kv4-Kanal (An *et al.*, 2000; Bähring *et al.*, 2001b; Beck *et al.*, 2002) wäre im Vergleich zu den rekombinanten Komplexen eine verminderte Beteiligung von KChIP an der Bildung des I_{SA} -vermittelnden Kanals denkbar. Wie bereits oben beschrieben, gibt es Anhaltspunkte dafür, dass Kv4.2-Kanäle in Kombination mit DPP, aber ohne KChIP, an der Vermittlung des I_{SA} beteiligt sein könnten. Betrachtet man nun die Eigenschaften der Kv4.2/DPP6-S-Ströme unter Kontrollbedingungen, so decken sich die schnelle Komponente der makroskopischen Inaktivierung (Abb. 32B), die Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung (Abb. 32D) und die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung, die bei sehr negativen Potenzialen liegt, nahezu mit den Eigenschaften der neuronalen Ströme. Zudem führte NS5806 zu einer Suppression sowohl der Amplitude der Kv4.2/DPP6-S-vermittelten Ströme als auch der I_{SA} -Amplitude, im Gegensatz zu der NS5806-vermittelten Potenzierung der ternären Kv4.2/KChIP/DPP6-S-vermittelten Ströme (Abb. 32A; Witzel *et al.*, 2012). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass die NS5806-induzierte Potenzierung des I_{to} sich als abhängig von der Lokalisation der isolierten Myozyten und der entsprechenden Expression von KChIP2 erwies (Rosati *et al.*, 2001; Calloe *et al.*, 2010). So zeigte sich eine stärkere Potenzierung der Stromamplitude durch NS5806 an epicardialen Myozyten, in denen die KChIP2 Expression höher ist als in endocardialen Myozyten (Calloe *et al.*, 2010). Die Gegenwart von KChIPs als Voraussetzung für die NS5806-induzierte Potenzierung der Stromamplitude und Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung bestätigte sich in Experimenten in heterologen Expressionssystemen. Die Amplitude der Ströme vermittelt durch Kv4.3-Kanäle in Abwesenheit von KChIP wurde supprimiert und die makroskopische Inaktivierung beschleunigt und nicht verlangsamt (Calloe *et al.*, 2010; Lundby *et al.*, 2010).

Gegen eine Beteiligung der binären Kv4.2/DPP6-S-Kanäle an der Vermittlung des I_{SA} spricht die NS5806-induzierte Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung des I_{SA} (Abb. 16), die sich in den binären Komplexen nicht zeigte (Abb. 26). Anzumerken ist, dass

eine Abnahme der Stromamplitude in Kombination mit einer Verlangsamung der Inaktivierung sich in Experimenten an Kv4.1-Kanälen zeigte (Lundby *et al.*, 2010). Jedoch erscheint eine nennenswerte Beteiligung von Kv4.1-Kanälen an der Vermittlung des I_{SA} unwahrscheinlich, da die Expression von Kv4.1-Kanälen im Hippocampus niedrig ist (Serodio & Rudy, 1998). Darüber hinaus ist die Inaktivierungskinetik des Kv4.1-Kanals unter Kontrollbedingungen durch eine relativ langsame initiale Komponente mit geringem Anteil an der gesamten Inaktivierung charakterisiert, welches nicht vergleichbar ist mit der schnellen Inaktivierungskinetik des I_{SA} (Jerng & Covarrubias, 1997).

Um den schnellen Inaktivierungseigenschaften des I_{SA} näher zu kommen, wurden Experimente mit der Splice-Variante DPP6-E im ternären Komplex mit Kv4.2 und KChIP3 durchgeführt (siehe 4.5). DPP6-E besitzt eine N-terminale Inaktivierungsdomäne und vermittelt im Kanalkomplex eine schnelle N-Typ-Inaktivierung (Jerng *et al.*, 2009). Eine Beteiligung der embryonalen Splice-Variante DPP6-E an der Vermittlung des I_{SA} in den Neuronen erscheint vor dem Hintergrund der Verwendung von P0-Kulturen in der vorliegenden Arbeit plausibel (Hough *et al.*, 1998). Jedoch zeigte sich in den Experimenten, dass die Amplitude der ternären Kv4.2/KChIP3/DPP6-E Komplexe durch NS5806 nicht supprimiert wurde und sich kaum ein Effekt auf die Inaktivierungskinetik zeigte. Auch in ternären Komplexen mit DPP10a (ebenfalls eine Splice-Variante mit einer N-terminalen Inaktivierungsdomäne) zeigte sich lediglich eine geringe Potenzierung der Stromamplitude und kein NS5806-Effekt auf die makroskopische Inaktivierung, während sich eine Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung und eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu negativeren Potenzialen zeigte (Witzel *et al.*, 2012).

In Zusammenschau aller Ergebnisse ergibt sich, dass voraussichtlich eine bisher ungetestete DPP-Splice-Variante entscheidend an der Vermittlung der Eigenschaften des I_{SA} in kultivierten hippocampalen Neuronen beteiligt ist, unter anderem da die KChIP-Abhängigkeit der NS5806-induzierten Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung sich erneut bestätigte. Eine DPP-Splice-Variante, die die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung bereits unter Kontrollbedingungen zu deutlich negativeren Potenzialen verschiebt, könnte beispielsweise an der Vermittlung des I_{SA} kultivierter hippocampaler

Neurone beteiligt sein. DPP6-K könnte als Splice-Variante aufgrund seiner hohen Expression im Hippocampus neben DPP6-S (Nadal *et al.*, 2006) prinzipiell an der Vermittlung des I_{SA} kultivierter hippocampaler Neurone beteiligt sein. Bei einem Vergleich der Eigenschaften der Ströme vermittelt durch Kv4.2 und KChIP im ternären Komplex mit DPP6-S und DPP6-K zeigte sich eine deutlich langsamere Recovery-Kinetik und eine deutlich negativere Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung für Kv4.2/KChIP/DPP6-K-Kanäle im Vergleich zu Kv4.2/KChIP/DPP6-S-Kanälen (Jerng & Pfaffinger, 2012).

Weitere Experimente mit anderen Kanaluntereinheiten, unter anderem verschiedene heteromere Kombinationen, aber auch andere Splice-Varianten der Untereinheiten (Jerng & Pfaffinger, 2012), werden zu einer besseren Korrelation der rekombinanten mit der nativen somatodendritischen A-Typ-Kanal-Pharmakologie führen.

5.2 Wirkmechanismus von NS5806

Die Sulfonyl-Harnstoff-Verbindung NS5806 ist derzeit als einzige Substanz beschrieben, die unter gewissen Bedingungen zu einer Potenzierung von Kv4-vermittelten Strömen führt. Dem gegenüber stehen die Effekte einiger Spinnengifte und der Substanz 4-Aminopyridin, welche eine Inhibition von Kv4-vermittelten Strömen zur Folge haben (Tseng *et al.*, 1996; Diochot *et al.*, 1999; Escoubas *et al.*, 2002; Ebbinghaus *et al.*, 2004). Der molekulare Wirkmechanismus von NS5806 ist noch nicht bekannt. Im Folgenden soll, basierend auf bereits publizierten Befunden und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, ein möglicher Wirkmechanismus von NS5806 auf Kv4-Kanäle diskutiert werden.

Vorweg ist zu erwähnen, dass alle Experimente der vorliegenden Arbeit mit einer kurzzeitigen Superfusion von NS5806 durchgeführt wurden, sodass ein zweizeitiger NS5806-Effekt im Verlauf nicht auszuschließen ist. Um die langfristige Wirkung einer NS5806-Lösung beliebiger Konzentration zu beschreiben, wäre ein Versuchsaufbau mit einer konstanten Konzentration der Extrazellulärlösung über einen längeren Zeitraum nötig. Prinzipiell könnte auch eine Akkumulation von NS5806 und der Trägersubstanz DMSO (Dimethylsulfoxid) in der Zellmembran bei höheren Konzentrationen zu einer

Durchlässigkeit der Zellmembran und somit zur gemessenen Reduktion der Stromamplitude führen, jedoch wird in Zusammenschau aller Ergebnisse im Folgenden von einem NS5806-Effekt ausgegangen.

Die NS5806-Effekte auf die Einzelkanalleitfähigkeiten von Kv4-Kanälen sind derzeit noch nicht untersucht. Jedoch ist naheliegend, dass NS5806 die Öffnungs- und Schließeeigenschaften der Kv4-Kanäle beeinflusst und somit zu der beschriebenen Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung und der Potenzierung der Stromamplitude führt. Die KChIP-Abhängigkeit dieser NS5806-Effekte spielt eine zentrale Rolle bei der Beschreibung des Wirkmechanismus von NS5806. Die bereits zuvor beschriebene Abhängigkeit dieser Effekte von KChIP2 (Lundby *et al.*, 2010) bestätigte sich durch Experimente mit KChIP4 (Witzel *et al.*, 2012) und durch die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Experimente mit KChIP3. Durch seine Bindung am N-Terminus des Kanals führt KChIP unter anderem zu einer Zunahme der Stromdichte und zu einer Verlangsamung der Inaktivierung (An *et al.*, 2000; Bähring *et al.*, 2001b). Denkbar wäre prinzipiell, dass NS5806 durch eine Interaktion diese KChIP-Effekte verstärkt. Eine Interaktion mit dem C-Terminus gilt als unwahrscheinlich, da NS5806 gleiche Effekte auf die C-terminale Deletionsmutante Kv4.2-N587fsX1 im ternären Komplex ausübte, wie auf den Wildtyp-Kanal.

Ähnlich wie in den Experimenten von Lundby *et al.* (2010) an ternären Kv4.3/KChIP2/DPP6-Kanälen zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit eine konzentrationsabhängige Potenzierung der Amplitude mit abnehmender Potenzierung bei höheren Konzentrationen in den Kanalkomplexen mit KChIP (siehe 4.2.2; Abb. 22). Eine Coexpression von Kv4.2 und DPP6 mit KChIP2, KChIP3 oder KChIP4 in HEK293-Zellen zeigte stets eine geringere Potenzierung der Stromamplitude mit 200 μM als mit 66 μM (Witzel *et al.*, 2012). Dies ist vergleichbar mit den Experimenten an binären Kv4.3/KChIP2 und ternären Kv4.2/KChIP2/DPP6-Komplexen in *Xenopus*-Oocyten, in denen bereits 30 μM NS5806 zu einer deutlich geringeren Potenzierung der Stromamplitude führten (Lundby *et al.*, 2010). In den Experimenten mit binären Kv4.2/DPP6-Komplexen führte NS5806 bereits bei niedrigen Konzentrationen zu einer Suppression der Stromamplitude, vergleichbar mit den Experimenten an Kv4.3-Kanälen

ohne coexprimierte β -Untereinheiten (Lundby *et al.*, 2010). Demnach kommt es in Abwesenheit von KChIP zu einem hemmenden NS5806-Effekt, der in Anwesenheit von KChIP nur bei höheren Konzentrationen zu beobachten ist. Die unterschiedlichen Hill-Koeffizienten und Konzentrationen der halbmaximalen Potenzierung im Gegensatz zur halbmaximalen Inhibierung lassen auf unterschiedliche Wirkmechanismen und Bindungsstellen schließen.

Auch die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zum NS5806-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung lassen sich mit dem bereits beschriebenen Effekt an rekombinanten Kv4.3-Kanälen vergleichen. In Experimenten mit Kv4.3/KChIP2/DPP6-Kanälen exprimiert in CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary cells*) führten 10 μ M NS5806 zu einer Linksverschiebung der Inaktivierungskurve um 5-6 mV (Calloe *et al.*, 2010; Lundby *et al.*, 2010). Dies bestätigte sich in den Experimenten an rekombinanten Kv4.2-Kanälen mit 20 μ M NS5806, jedoch zeigte sich bei dieser Konzentration eine deutlich stärkere Linksverschiebung (14-15 mV). Verantwortlich für diese Abweichung könnte die unterschiedliche α -Untereinheit (Kv4.2) oder auch die höhere NS5806-Konzentration (20 μ M) in der vorliegenden Arbeit sein. Es ist anzunehmen, dass der Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung ebenso wie der Effekt auf die Stromamplitude konzentrationsabhängig ist. Wie bereits von Lundby *et al.* (2010) vermutet, kann eine konzentrationsabhängige Linksverschiebung der Inaktivierungskurve zu der beschriebenen Abnahme der Stromamplitude bei höheren Konzentrationen führen. Anzumerken ist, dass KChIP im Komplex mit Kv4-Kanälen stets zu einer Verschiebung der Inaktivierungskurve zu positiveren Potenzialen führt (Bähring *et al.*, 2001b; Beck *et al.*, 2002). Besonders in Kanalkomplexen ohne KChIP und bei höheren NS5806-Konzentrationen ist somit ein Teil der Kanäle beim vorgegebenen Haltepotenzial von -70 mV nicht aktivierbar, und es kommt durch eine verminderte Verfügbarkeit der Kanäle zu einer Reduktion (bzw. geringeren Potenzierung) der Stromamplitude. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass sich in binären Kv4.2/DPP6-S-Komplexen, deren Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung per se bei deutlich negativeren Potenzialen lag, eine konzentrationsabhängige Reduktion der Amplitude durch NS5806 zeigte (siehe 4.4.1; 4.4.3; Abb. 26; Abb. 28).

Es zeigte sich in der vorliegenden Arbeit auch, dass die NS5806-Effekte auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung und Aktivierung, sowie auf die Erholung von der Inaktivierung unabhängig von KChIP sind, welches in Bezug auf den molekularen Wirkmechanismus eine direkte Interaktion mit der Kv4- α -Untereinheit vermuten lässt (Calloe *et al.*, 2010, Lundby *et al.*, 2010).

Der zugrunde liegende NS5806-Effekt auf das Öffnungs- und Schließverhalten des Kv4-Kanals ist noch nicht verstanden. Jedoch liefern die Befunde der vorliegenden Arbeit Hinweise dafür, dass NS5806 zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des Kv4-Kanals führt und somit zu einer verlangsamten makroskopischen Inaktivierung und einer Potenzierung der Stromamplitude. Die Kv4-Kanäle weisen ein komplexes Inaktivierungsverhalten auf, welches sich nicht allein durch eine N-Typ (Ball-and-Chain-Mechanismus) und C-Typ-Inaktivierung ähnlich der Shaker-Kanäle erklären lässt. Die Kv4-Kanäle inaktivieren im Gegensatz zu zahlreichen anderen Kv-Kanälen hauptsächlich aus dem geschlossenen Zustand (Geschlossen-Kanal-Inaktivierung; Bähring *et al.*, 2001a; Barghaan *et al.*, 2008). In Kanalkomplexen mit KChIP, in denen ein N-Typ-Inaktivierungsmechanismus völlig verhindert wird (Gebauer *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007), kann es zu einer Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung und einer Potenzierung der Stromamplitude kommen (Jerng *et al.*, 1999; Bähring *et al.*, 2001a). In Kanälen mit einer schnellen N-Typ-Inaktivierung, wie Kv4-Kanäle ohne β -Untereinheiten (Lundby *et al.*, 2010), Kv4/DPP-Kanalkomplexe ohne KChIP oder ternäre Kv4-Kanäle mit KChIP und DPP6-E oder DPP10a (Witzel *et al.*, 2012) bleibt die N-Typ-Inaktivierung in Gegenwart von NS5806 bestehen und wird gegebenenfalls sogar begünstigt. Eine Zunahme der N-Typ-Inaktivierung, welche abhängig ist von der Öffnung des Kanals, kann somit durch eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit in Gegenwart von NS5806 erklärt werden. Bemerkenswerterweise korrelierte die stärkere N-Typ-Inaktivierung ternärer Kv4.2/KChIP3/DDP6-E-Komplexe im Vergleich zur N-Typ-Inaktivierung ternärer Kv4.2/KChIP3/DPP10a-Komplexe (Witzel *et al.*, 2012), mit einer geringeren Potenzierung unter dem konzentrationsabhängigen Einfluss von NS5806. Dies verdeutlicht, dass die N-Typ-Inaktivierung mit dem potenzierenden Effekt von NS5806 interferiert. Darüber hinaus zeigte sich in ternären Kv4.2/KChIP3/DPP6-E-Komplexen mit der sehr schnellen N-Typ-Inaktivierung eine Verlangsamung der langsamen Komponente der Inaktivierung in

Gegenwart von NS5806 (Abb. 32C). Dies unterstützt die Annahme, dass die Akkumulation der Kv4-Kanäle im geschlossen-inaktivierten Zustand bei positiven Potenzialen (Bähring *et al.*, 2001a) durch die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit verlangsamt ist und die Kanäle länger zwischen dem offenen und dem N-Typ-inaktivierten Zustand pendeln. Neben den Effekten auf die makroskopische Inaktivierungskinetik beschrieben Lundby *et al.* (2010) eine NS5806-induzierte Beschleunigung der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung von Kv4.3-Kanälen. Die Kv4-Kanäle können vom geschlossenen Zustand direkt in einen inaktivierten Zustand übergehen bevor es zur Öffnung des Kanals kommt (Bähring *et al.*, 2012). Eine Beschleunigung dieser Geschlossen-Kanal-Inaktivierung und eine Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung stehen wahrscheinlich in direktem Zusammenhang mit der NS5806-induzierten Verschiebung der Inaktivierungskurve zu negativeren Potenzialen. Es ist somit möglich, dass all diesen Effekten derselbe molekulare Mechanismus zugrunde liegt.

Die strukturellen Komponenten der Kv4-Kanal-Inaktivierung sowohl aus dem geschlossenen als auch aus dem offenen Zustand sind zumindest in Teilen erforscht (Gebauer *et al.*, 2004; Barghaan *et al.*, 2008; Dougherty *et al.*, 2008; Kaulin *et al.*, 2008; Barghaan & Bähring, 2009). Auf der Grundlage der bereits bestehenden Arbeitsmodelle zur Beschreibung der Kv4-Kanal-Inaktivierung (Bähring & Covarrubias, 2011; Bähring *et al.*, 2012) werden zukünftige pharmakologische Experimente helfen, den genauen molekularen Wirkmechanismus von NS5806 aufzuklären.

5.3 Pathophysiologisches Remodelling somatodendritischer A-Typ-Kanäle

An den Dendriten pyramidaler Neurone erfolgt die Integration des synaptischen *Inputs* elektrischer Signale zur Generation eines Aktionspotenzials als elektrischer *Output*, woran dendritische Ionenkanäle, einschließlich Kv4.2, ausschlaggebend beteiligt sind (Magee, 2000). Aktivitätsabhängige Modulation von dendritischen Ionenkanälen führt zur Veränderung der Regulation der synaptischen Signale und der axonalen elektrischen Aktivität, was einen Bezug sowohl zur synaptischen Plastizität als auch zur Epileptogenese

vermuten lässt (Remy *et al.*, 2010). Bereits als epileptogen beschrieben sind vor allem die Änderungen der Eigenschaften des somatodendritischen A-Typ-Stroms (I_{SA}), welcher der Entstehung eines Aktionspotenzials entgegenwirkt und essenziell für die Inhibition der sich retrograd ausbreitenden Aktionspotenziale ist (Beck & Yaari, 2008).

Der Kv4.2-vermittelte I_{SA} ist sowohl im Zusammenhang mit erworbenen als auch in Zusammenhang mit erblich bedingten Epilepsien beschrieben (Bernard *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006; Monaghan *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2008). In Pilocarpin-induzierten chronischen Epilepsien zur Rekapitulation der Eigenschaften humaner Temporallappenepilepsien (TLE), wurde eine Reduktion der somatodendritischen A-Typ-Kanalexpression in CA1-Pyramidenzellen beobachtet, die mit einem Verlust der b-AP-abschwächenden Wirkung im distalen Dendriten einherging (Bernard *et al.*, 2004; Monaghan *et al.*, 2008). Durch epileptische Aktivität zeigte sich eine verminderte Expression von Kv4.2-Kanälen und eine verminderte dendritische Lokalisation der verbliebenen Kv4.2-Kanäle, welches die Entstehung rezidivierender epileptischer Aktivität in der chronischen Phase begünstigte (Bernard *et al.*, 2004; Monaghan *et al.*, 2008). Durch Singh *et al.* (2006) wurde eine Deletionsmutante des Kv4.2-Kanals in einer TLE-Patientin identifiziert. Die Stromamplitude der Kv4.2-N587fsX1-Kanäle zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp-Kanal reduziert ($P < 0,001$) ohne signifikante Unterschiede im Inaktivierungsverhalten (Singh *et al.*, 2006). Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, dass Singh *et al.* (2006) keine β -Untereinheiten mit dem Kv4.2-Kanal coexprimierten. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass der C-Terminus mit Bereichen proximal von Aminosäure 580 entscheidend am Inaktivierungsverhalten des Kv4.2-Kanals beteiligt ist, unter anderem durch eine Interaktion des N-terminal bindenden KChIP mit dem C-Terminus (Jerng & Covarrubias, 1997; Callsen *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit vermittelte der Kv4.2-N587fsX1 im ternären Komplex mit KChIP3 und DPP6-S unter Kontrollbedingungen jedoch keine signifikant geringere oder größere Stromamplitude als der Wildtyp-Kanalkomplex (siehe 4.2.2 und 4.3). Dies ist vereinbar mit den Ergebnissen aus Experimenten an unterschiedlichen N- und C-terminalen Deletionsmutanten des Kv4.2-Kanals (Callsen *et al.*, 2005). Es zeigte sich, dass nicht nur der N-Terminus, sondern auch der C-Terminus entscheidend am KChIP-Effekt beteiligt ist, eine Deletion distal von Aminosäure 580 des

C-Terminus jedoch zu keinem signifikanten Unterschied des KChIP-Effekts im Vergleich zum Wildtyp-Kanal führt (Callsen *et al.*, 2005).

In Anbetracht der Pathophysiologie des Kv4.2-vermittelten I_{SA} könnte ein Kv4.2-potenzierendes Pharmakon antiepileptische Eigenschaften aufweisen. NS5806 führte in der vorliegenden Arbeit zu einer deutlichen Potenzierung der durch den I_{SA} vermittelten transmembranären Ladung durch eine Verlangsamung der Inaktivierung (siehe 4.1.2; Abb. 16). Zudem beschleunigte NS5806 die Erholung des neuronalen K^+ -Auswärtsstroms von der Inaktivierung. Für hippocampale CA1-Pyramidenzellen ist bereits eine Modulation des Aktionspotenzials, eine Hemmung der retrograden AP-Ausbreitung und eine damit einhergehende Reduktion der Erregbarkeit durch NS5806 beschrieben (Minge & Bähring, 2011), sodass ein antiepileptisches Potenzial von NS5806 nicht auszuschließen ist. Durch seine potenzierende Wirkung auf den Kv4.3-vermittelten I_{to} und die hierdurch entstehenden arrhythmischen Eigenschaften des Brugada-Syndroms disqualifiziert sich diese Substanz derzeit jedoch als Antiepileptikum (Callee *et al.*, 2009; Callee *et al.*, 2010). Zudem ist ein inhibierender Effekt von NS5806 auf Kv1-Kanäle beschrieben (Lundby *et al.*, 2010). An Neuronen sind Kv1.4-Kanäle vorwiegend im Axon und an der Präsynapse des terminalen Axons lokalisiert (Vacher *et al.*, 2008) und führen zu einer Dämpfung der Ca^{2+} -vermittelten Transmitterfreisetzung. Eine Hemmung der Kv1.4-Kanäle führt zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom, einer vermehrten Freisetzung von Neurotransmittern an der Synapse und somit zu einer gesteigerten axo-terminalen Erregbarkeit (Dodson & Forsythe, 2004; Vacher *et al.*, 2008). Diese Form von pharmakologischer Beeinflussung wäre nicht im anti-epileptischen Sinne. Darüber hinaus ist eine Inhibition von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen durch NS5806 in nativen Hundemyozyten beschrieben (Callee *et al.*, 2009). Es ist demnach wahrscheinlich, dass auch im neuronalen Gewebe Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme durch NS5806 beeinflusst werden und ihre Funktion an der Entstehung des Aktionspotenzials und der Nachdepolarisation (siehe 2.1) moduliert wird. Diese Effekte sind jedoch nicht untersucht. Die Effekte von NS5806 auf eine Reihe von Kv α - und β -Untereinheiten wurden bereits beschrieben (Lundby *et al.*, 2010). Jedoch sind nicht alle Untereinheiten zur Vermittlung von neuronalen K^+ -Strömen untersucht worden, wie Kv7.2 und Kv7.3 (I_M) und einige den I_D -vermittelnde Kv1-Untereinheiten. Auch in diesem Zusammenhang kann ein neuronaler Effekt von NS5806 nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend könnte eine Substanz mit den Eigenschaften von NS5806 und einer Selektivität für den Kv4.2-Kanal als antiepileptisches Pharmakon an Aufmerksamkeit gewinnen. Weitere Experimente zum molekularen Wirkmechanismus werden zur Erforschung des wissenschaftlichen und medizinischen Nutzens der Sulfonylharnstoff-Verbindung NS5806 beitragen.

6. Literatur

- An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS & Rhodes KJ. (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 403, 553-556.
- Bähring R, Barghaan J, Westermeier R & Wollberg J. (2012). Voltage sensor inactivation in potassium channels. *Front Pharmacol* 3, 100.
- Bähring R, Boland LM, 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 & Covarrubias M. (2011). Mechanisms of closed-state inactivation in voltage-gated ion channels. *J Physiol* 589, 461-479.
- Bähring R, Dannenberg J, Peters HC, 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.
- Barghaan J & Bähring R. (2009). Dynamic coupling of voltage sensor and gate involved in closed-state inactivation of Kv4.2 channels. *J Gen Physiol* 133, 205-224.
- Barghaan J, Tozakidou M, Ehmke H & Bähring R. (2008). Role of N-terminal domain and accessory subunits in controlling deactivation-inactivation coupling of Kv4.2 channels. *Biophys J* 94, 1276-1294.
- Baranauskas G. (2007). Ionic Channel Function in Action Potential Generation: Current Perspective. *Molecular Neurobiology* 35, 129-150.
- Beck EJ, Bowlby M, An WF, Rhodes KJ, Covarrubias M. (2002). Remodelling inactivation gating of Kv4 channels by KChIP1, a small-molecular-weight calcium-binding protein. *J Physiol* 538, 691-706
- Beck H & Yaari Y. (2008). Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. *Nat Rev Neurosci* 9, 357-369.
- Bernard C, Anderson A, Becker A, Poolos NP, Beck H & Johnston D. (2004). Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science* 305, 532-535.
- Bernard C & Johnston D. (2003). Distance-dependent modifiable threshold for action potential back-propagation in hippocampal dendrites. *J Neurophysiol* 90, 1807-1816.

- Birnbaum SG, Varga AW, Yuan LL, Anderson AE, Sweatt JD & Schrader LA. (2004). Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. *Physiol Rev* 84, 803-833.
- Buxbaum JD, Choi E-K, Luo Y, Lilliehook C, Crowley AC, Merriam DE & Wasco W. (1998). Calsenilin: A calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat Med* 4, 1177-1181.
- Cai X, Liang CW, Muralidharan S, Kao JP, Tang CM & Thompson SM. (2004). Unique roles of SK and Kv4.2 potassium channels in dendritic integration. *Neuron* 44, 351-364.
- Calloe K, Cordeiro JM, Di Diego JM, Hansen RS, Grunnet M, Olesen SP & Antzelevitch C. (2009). A transient outward potassium current activator recapitulates the electrocardiographic manifestations of Brugada syndrome. *Cardiovasc Res* 81, 686-694.
- Calloe K, Soltysinska E, Jespersen T, Lundby A, Antzelevitch C, Olesen SP & Cordeiro JM. (2010). Differential effects of the transient outward K⁺ current activator NS5806 in the canine left ventricle. *J Mol Cell Cardiol* 48, 191-200.
- Callsen B, Isbrandt D, Sauter K, Hartmann LS, Pongs O & Bähring R. (2005). Contribution of N- and C-terminal Kv4.2 channel domains to KChIP interaction. *J Physiol* 568, 397-412.
- Carrion AM, Link WA, Ledo F, Mellstrom B & Naranjo JR. (1999). DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* 398, 80-84.
- Castro PA, Cooper EC, Lowenstein DH & Baraban SC. (2001). Hippocampal heterotopia lack functional Kv4.2 potassium channels in the methylazoxymethanol model of cortical malformations and epilepsy. *J Neurosci* 21, 6626-6634.
- Chen X, Yuan LL, Zhao C, Birnbaum SG, Frick A, Jung WE, Schwarz TL, Sweatt JD & Johnston D. (2006). Deletion of Kv4.2 gene eliminates dendritic A-type K⁺ current and enhances induction of long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 26, 12143-12151.
- Cheng HY, Pitcher GM, Laviolette SR, Whishaw IQ, Tong KI, Kockeritz LK, Wada T, Joza NA, Crackower M, Goncalves J, Sarosi I, Woodgett JR, Oliveira-dos-Santos AJ, Ikura M, van der Kooy D, Salter MW & Penninger JM. (2002). DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation. *Cell* 108, 31-43.
- Connor JA & Stevens CF. (1971). Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *J Physiol* 213, 31-53.

- Covarrubias M, Bhattacharji A, De Santiago-Castillo J, Dougherty K, Kaulin Y, Na-Phuket T & Wang G. (2008). The neuronal Kv4 channel complex. *Neurochem Res* 33, 1558-1567.
- Covarrubias M, Wei A & Salkoff L. (1991). Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K⁺ current systems. *Neuron* 7, 763-773.
- de Lecea L, Soriano E, Criado JR, Steffensen SC, Henriksen SJ & Sutcliffe JG. (1994). Transcripts encoding a neural membrane CD26 peptidase-like protein are stimulated by synaptic activity. *Mol Brain Res* 25, 286-296.
- Diochot S, Drici M-D, Moinier D, Fink M & Lazdunski M. (1999). Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of I_{to} in cardiac electrogenesis. *Br J Pharmacol* 126, 251-263.
- Dixon JE & McKinnon D. (1994). Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circ Res* 75, 252-260.
- Dixon JE, Shi W, Wang H-S, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS & 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.
- Dodson PD & Forsythe ID. (2004). Presynaptic K⁺ channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. *Trends Neurosci* 27, 210-217.
- Dong-Gyu J, Joo-Yong L, Yeon-Mi H, Sungmin S, Inhee M-J, Jae-Young K & Yong-Keun J. (2004). Induction of pro-apoptotic calsenilin/DREAM/KChIP3 in Alzheimer's disease and cultured neurons after amyloid- β exposure. *J Neurochem* 88, 604-611.
- Dougherty K, De Santiago-Castillo JA & Covarrubias M. (2008). Gating charge immobilization in Kv4.2 channels: the basis of closed-state inactivation. *J Gen Physiol* 131, 257-273.
- Ebbinghaus J, Legros C, Nolting A, Guette C, C  lerier ML, Pongs O & B  hring R. (2004). Modulation of Kv4.2 channels by a peptide isolated from the venom of the giant bird-eating tarantula *Theraphosa leblondi*. *Toxicon* 43, 923-932.
- Engel J. (2001). Mesial temporal lobe epilepsy: What have we learned? *Neuroscientist* 7, 340-352.
- Escoubas P, Diochot S, C  lerier M-L, Nakajima T & Lazdunski M. (2002). Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies. *Mol Pharmacol* 62, 48-57.
- Friederich P & Solth A. (2004). Interaction of ropivacaine with cloned cardiac Kv4.3/KChIP2.2 complexes. *Anesthesiology* 101, 1347-1356.

- 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.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W & Wang X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57, 473-508.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B & Sigworth FJ. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391, 85-100.
- Hatano N, Ohya S, Muraki K, Giles W & Imaizumi Y. (2003). Dihydropyridine Ca²⁺ channel antagonists and agonists block Kv4.2, Kv4.3 and Kv1.4 K⁺ channels expressed in HEK293 cells. *Br J Pharmacol* 139, 533-544.
- Hodgkin AL & Huxley AF. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117, 500-544.
- Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM & Johnston D. (1997). K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387, 869-875.
- Holmqvist MH, Cao J, Hernandez-Pineda R, Jacobson MD, Carroll KI, Sung MA, Betty M, Ge P, Gilbride KJ, Brown ME, Jurman ME, Lawson D, Silos-Santiago I, Xie Y, Covarrubias M, Rhodes KJ, Distefano PS & An WF. (2002). Elimination of fast inactivation in Kv4 A-type potassium channels by an auxiliary subunit domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 1035-1040.
- Hough RB, 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 USA* 95, 13800-13805.
- Jerng HH & 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 HH, Dougherty K, Covarrubias M & Pfaffinger PJ. (2009). A novel N-terminal motif of dipeptidyl peptidase-like proteins inactivates Kv4.2 channels by a pore-blocking mechanism. *Channels* 3, 448-461.
- Jerng HH, Kunjilwar K & Pfaffinger PJ. (2005). Multiprotein assembly of Kv4.2, KChIP3 and DPP10 produces ternary channel complexes with I_{SA}-like properties. *J Physiol* 568, 767-788.

- Jerng HH & Pfaffinger PJ. (2012). Incorporation of DPP6a and DPP6K variants in ternary Kv4 channel complex reconstitutes properties of A-type K⁺ current in rat cerebellar granule cells. *PLoS One* 7, e38205.
- Jerng HH, Pfaffinger PJ & Covarrubias M. (2004). Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol Cell Neurosci* 27, 343-369.
- Jerng HH, 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.
- Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Boneschi FM, Choi C, Morozov P, Das K, Teplitskaya E, Yu A, Cayanis E, Penchaszadeh G, Kottmann AH, Pedley TA, Hauser WA, Ottman R & Gilliam TC. (2002). Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 30, 335-341.
- Kaulin YA, De Santiago-Castillo JA, Rocha CA & Covarrubias M. (2008). Mechanism of the modulation of Kv4: KChIP-1 channels by external K⁺. *Biophys J* 94, 1241-1251.
- Kim J, Jung SC, Clemens AM, Petralia RS & Hoffman DA. (2007). Regulation of dendritic excitability by activity-dependent trafficking of the A-type K⁺ channel subunit Kv4.2 in hippocampal neurons. *Neuron* 54, 933-947.
- Lee HC, Wang JM & Swartz KJ. (2003). Interaction between extracellular Hanatoxin and the resting conformation of the voltage-sensor paddle in Kv channels. *Neuron* 40, 527-536.
- Lilliehook C, Bozdagi O, Yao J, Gomez-Ramirez M, Zaidi NF, Wasco W, Gandy S, Santucci AC, Haroutunian V, Huntley GW & Buxbaum JD. (2003). Altered Abeta formation and long-term potentiation in a calenilin knock-out. *J Neurosci* 23, 9097-9106.
- Lin L, Sun W, Kung F, Dell'Acqua ML & Hoffman DA. (2011). AKAP79/150 impacts intrinsic excitability of hippocampal neurons through phospho-regulation of A-type K⁺ channel trafficking. *J Neurosci* 31, 1323-1332.
- Lundby A, Jespersen T, Schmitt N, Grunnet M, Olesen SP, Cordeiro JM & Calloe K. (2010). Effect of the I_{to} activator NS5806 on cloned K(v)4 channels depends on the accessory protein KChIP2. *Br J Pharmacol* 160, 2028-2044.
- Maffie J & Rudy B. (2008). Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K⁺ currents in neurons. *J Physiol* 586, 5609-5623.

- Magee JC. (2000). Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nat Rev Neurosci* 1, 181-190.
- Maletic-Savatic M, Lenn NJ & Trimmer JS. (1995). Differential spatiotemporal expression of K⁺ channel polypeptides in rat hippocampal neurons developing in situ and in vitro. *J Neurosci* 15, 3840-3851.
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Thiruvahindrapduram B, Fiebig A, Schreiber S, Friedman J, Ketelaars CEJ, Vos YJ, Ficicioglu C, Kirkpatrick S, Nicolson R, Sloman L, Summers A, Gibbons CA, Teebi A, Chitayat D, Weksberg R, Thompson A, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Baatjes R, Zwaigenbaum L, Roberts W, Fernandez B, Szatmari P & Scherer SW. (2008). Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *American J Hum Genet* 82, 477-488.
- Minge D & Bähring R. (2011). Acute alterations of somatodendritic action potential dynamics in hippocampal CA1 pyramidal cells after kainate-induced status epilepticus in mice. *PLoS One* 6, e26664.
- Minoura Y, JM DID, Barajas-Martinez H, Zygmunt AC, Hu D, Sicouri S & Antzelevitch C. (2011). Ionic and cellular mechanisms underlying the development of acquired brugada syndrome in patients treated with antidepressants. *J Cardiovasc Electrophysiol* 23, 423-432.
- Monaghan MM, Menegola M, Vacher H, Rhodes KJ & Trimmer JS. (2008). Altered expression and localization of hippocampal A-type potassium channel subunits in the pilocarpine-induced model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 156, 550-562.
- Nadal MS, 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 MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Ma Y, Mo W, Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA & 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). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799-802.
- Neuhoff H, Roeper J & Schweizer M. (1999). Activity-dependent formation of perforated synapses in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 11, 4241-4250.
- Noebels JL. (2003). The biology of epilepsy genes. *Annu Rev Neurosci* 26, 599-625.

- Numberger M & Draguhn A. (1996). *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Patel SP & Campbell DL. (2005). Transient outward potassium current, ' I_{to} ', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol* 569, 7-39.
- Pongs O & Schwarz JR. (2010). Ancillary subunits associated with voltage-dependent K^+ channels. *Physiol Rev* 90, 755-796.
- Radicke S, Cotella D, Graf EM, 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.
- Ramakers GM & Storm JF. (2002). A postsynaptic transient K^+ current modulated by arachidonic acid regulates synaptic integration and threshold for LTP induction in hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10144-10149.
- Remy S, Beck H & Yaari Y. (2010). Plasticity of voltage-gated ion channels in pyramidal cell dendrites. *Curr Opin Neurobiol* 20, 503-509.
- Rosati B, Grau F, Rodriguez S, Li H, Nerbonne JM & McKinnon D. (2003). Concordant expression of KChIP2 mRNA, protein and transient outward current throughout the canine ventricle. *J Physiol* 548, 815-822.
- Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE & 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.
- Schrader L, Anderson A, Varga A, Levy M & Sweatt J. (2002). The other half of Hebb - K^+ channels and the regulation of neuronal excitability in the hippocampus. *Mol Neurobiol* 25, 51-66.
- Serodio P & Rudy B. (1998). Differential expression of Kv4 K^+ channel subunits mediating subthreshold transient K^+ (A-type) currents in rat brain. *J Neurophysiol* 79, 1081-1091.
- Shah MM, Hammond RS & Hoffman DA. (2011). Dendritic ion channel trafficking and plasticity. *Trends Neurosci* 33, 307-316.
- Sheng M, Liao YJ, Jan YN & Jan LY. (1993). Presynaptic A-current based on heteromultimeric K^+ channels detected in vivo. *Nature* 365, 72-75.
- Sheng M, Tsaur ML, Jan YN & Jan LY. (1992). Subcellular segregation of two A-type K^+ channel proteins in rat central neurons. *Neuron* 9, 271-284.

- Silbernagel S & Despopoulos A. (2003). *Taschenatlas der Physiologie*, vol. 6. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Singh B, Ogiwara I, Kaneda M, Tokonami N, Mazaki E, Baba K, Matsuda K, Inoue Y & Yamakawa K. (2006). A Kv4.2 truncation mutation in a patient with temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 24, 245-253.
- Solth A, Siebrands CC & Friederich P. (2005). Inhibition of Kv4.3/KChIP2.2 channels by bupivacaine and its modulation by the pore mutation Kv4.3V401I. *Anesthesiology* 103, 796-804.
- Spreadico F, Barski JJ, Farina C & Meyer M. (2001). Mouse DREAM/Calsenilin/KChIP3: Gene structure, coding potential, and expression. *Mol Cell Neurosci* 17, 1-16.
- Storm JF. (1990). Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog Brain Res* 83, 161-900.
- Su T, Cong WD, Long YS, Luo AH, Sun WW, Deng WY & Liao WP. (2008). Altered expression of voltage-gated potassium channel 4.2 and voltage-gated potassium channel 4-interacting protein, and changes in intracellular calcium levels following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience* 157, 566-576.
- Sun W, Maffie JK, Lin L, Petralia RS, Rudy B & Hoffman DA. (2011). DPP6 establishes the A-type K⁺ current gradient critical for the regulation of dendritic excitability in CA1 hippocampal neurons. *Neuron* 71, 1102-1115.
- Tseng GN, Jiang M & Yao JA. (1996). Reverse use dependence of Kv4.2 blockade by 4-aminopyridine. *J Pharmacol Exp Ther* 279, 865-876.
- Vacher H, Mohapatra DP & Trimmer JS. (2008). Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol Rev* 88, 1407-1447.
- van Es MA, van Vught PW, Blauw HM, Franke L, Saris CG, Van den Bosch L, de Jong SW, de Jong V, Baas F, van't Slot R, Lemmens R, Schelhaas HJ, Birve A, Slegers K, Van Broeckhoven C, Schymick JC, Traynor BJ, Wokke JH, Wijmenga C, Robberecht W, Andersen PM, Veldink JH, Ophoff RA & van den Berg LH. (2008). Genetic variation in DPP6 is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 40, 29-31.
- Wada K, Yokotani N, Hunter C, Doi K, Wenthold RJ & Shimasaki S. (1992). Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 197-201.
- Wagner M, Riepe KG, Eberhardt E & Volk T. (2010). Open channel block of the fast transient outward K⁺ current by primaquine and chloroquine in rat left ventricular cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 647, 13-20.

- Wang H, Yan Y, Liu Q, Huang Y, Shen Y, Chen L, Chen Y, Yang Q, Hao Q, Wang K & Chai J. (2007). Structural basis for modulation of Kv4 K⁺ channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat Neurosci* 10, 32-39.
- Witzel K, Fischer P & Bähring R. (2012). Hippocampal A-type current and Kv4.2 channel modulation by the sulfonylurea compound NS5806. *Neuropharmacology* 63, 1389-1403.
- Xiong H, Kovacs I & Zhang Z. (2004). Differential distribution of KChIPs mRNAs in adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 128, 103-111.
- Yuste R (1997). Potassium channels: Dendritic shock absorbers. *Nature* 387, 851-853.
- Zagha E, Ozaita A, Chang SY, Nadal MS, Lin U, Saganich MJ, McCormack T, Akinsanya KO, Qi SY & Rudy B. (2005). DPP10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels. *J Biol Chem* 280, 18853-18861.
- Zhu XR, 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.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridin
AIS	Axon-Initialsegment
AP	Aktionspotenzial
b-AP	<i>backpropagating Action Potential</i>
CA1	Region 1 des Ammonshorns (<i>cornu ammonis</i>) des Hippocampus
C ₅₀	die Konzentration bei halb-maximaler Potenzierung/Inhibierung
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
C _M	Kapazität der Zellmembran als Kondensator
C _{PIP}	Kapazität der Pipettenwand als Kondensator
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DPP	Dipeptidylaminopeptidase-verwandtes Protein
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
E _K	K ⁺ -Gleichgewichtspotenzial
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
h	Hill-Koeffizient
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
I _C	Ca ²⁺ -sensitiver K ⁺ -Strom mit großer Leitfähigkeit
I _{Ca,R}	resistenter Ca ²⁺ -Strom
I _{Ca,T}	transienter Ca ²⁺ -Strom
I _D	Dendrotoxin-sensitiver K ⁺ -Strom
I _{DR}	spät rektifizierender K ⁺ -Strom
I _{gesamt}	gesamter neuronale Auswärtsstrom
I _h	durch Hyperpolarisation aktivierter Strom (Na ⁺ /K ⁺)
I _M	"M-Strom"; durch M1-muskarinische Acetylcholinrezeptoren inhibierbarer K ⁺ -Strom
I _{Na}	spannungsabhängiger Na ⁺ -Strom
I _R	nicht oder langsam inaktivierende Rest-Strom-Komponente
I _{SA}	somatodendritischer A-Typ K ⁺ -Strom

I_{to}	transienter K^+ Auswärtsstrom kardialer Myozyten
k_{act}	der Steigungsfaktor der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung
KChIP	<i>Kv Channel Interacting Protein</i>
k_{inact}	der Steigungsfaktor der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
OPA	<i>Operational Amplifier</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
Q_K	K^+ -vermittelter Ladungstransfer über der Membran
R_f	Rückkopplungswiderstand des Patch-Clamp-Verstärkers
R_M	Widerstand über der Zellmembran
R_{PIP}	Pipettenwiderstand
R_S	Serienwiderstand
R_{SEAL}	Verbindungswiderstand zwischen Pipette und Membran
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler)
TLE	Temporallappenepilepsie
TTX	Tetrodotoxin
τ_{inact}	Zeitkonstante der makroskopischen Inaktivierung
τ_{rec}	Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung (<i>Recovery</i>)
U_{AUS}	Ausgangsspannung zur Umrechnung in den gemessenen Strom
U_{PIP}	Pipettenspannung
U_{SOLL}	Sollspannung
U_f	Spannungsdifferenz zwischen Pipetten- und Sollspannung
$V_{1/2act}$	Spannung bei halb-maximaler Aktivierung basierend auf einer Boltzmann-Funktion 4. Ordnung
$V_{0,5}$	Spannung bei der die Funktion der Leitfähigkeit im Verhältnis zur maximalen Leitfähigkeit 0,5 betrug
$V_{1/2inact}$	Spannung bei halb-maximaler Inaktivierung der Stromamplitude
V_H	Haltepotenzial

7.2 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Witzel K, Fischer P & Bähring R. (2012). Hippocampal A-type current and Kv4.2 channel modulation by the sulfonyleurea compound NS5806. *Neuropharmacology* 63, 1389-1403.

Witzel K, Westermeier R, Fischer P & Bähring R. (2012). Modification of Kv4.2 channel complexes by the diphenylurea compound NS5806. *Posterbeitrag auf dem 65. Jahrestreffen der Biophysical Society in San Diego, California.*

Minge D, Witzel K & Bähring R. (2011). Modulation of somatodendritic A-type channels and spread of dendritic excitation by the Kv4 channel gating modifier NS5806. *Posterbeitrag auf dem 90. Jahrestreffen der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Regensburg.*

7.3 Danksagung

Besonders danke ich PD Dr. Robert Bähring für seine hervorragende Betreuung. Sein Fachwissen, seine Hilfsbereitschaft und seine motivierende Art haben entscheidend zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Dem Leiter des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie Prof. Dr. Ehmke danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation an seinem Institut durchzuführen.

Frau Prof. Dr. Christiane Bauer und Frau Prof. Dr. Elke Oetjen danke ich, dass sie sich Zeit genommen haben für die Begutachtung dieser Arbeit.

Den vielen Mitarbeitern des physiologischen Instituts möchte ich für die Zusammenarbeit, die Hilfe, die vielen bereichernden Gespräche und die Kraft spendenden Kaffeepausen danken. In diesem Rahmen danke ich besonders Daniel Minge für seine technische Unterstützung vieler Art, als inhaltlicher Diskussionspartner und nicht zuletzt als hilfsbereiter Wegbegleiter. Peter Bassalay danke ich für seine Unterstützung in zahlreichen Computer-technischen Fragen. Annett Hasse, Michaela Schweizer und Chudamani Raithmore danke ich für die Bereitstellung der Zellen für die durchgeführten Experimente.

Timm danke ich für viel Verständnis und seine stets bestärkenden Worte.

Meinen Freunden bin ich sehr dankbar für ihre Unterstützung, die vielen aufmunternden Gespräche und die ein oder andere Rechtschreibkorrektur.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt und die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.

7.4 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

7.5 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: