

**Funktionelle Interaktion des
Kv4.2-Proteins mit akzessorischen
Untereinheiten — Rolle für die
somatodendritische
A-Typ-Kaliumkanal-Expression in
hippokampalen Neuronen von
Maus (*Mus musculus*, Linné, 1758)
und Ratte (*Rattus norvegicus*,
Berkenhout, 1769)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
vorgelegt im Department Biologie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

von
L. Sven Hartmann
aus Frankfurt (Oder)

Hamburg 2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. R. BÄHRING
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. K. WIESE
Tag der Disputation: 15. Juni 2007

Hamburg, den 31. Mai 2007



Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Die hier vorgelegte Dissertation wurde am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH), Institut für Neurale Signalverarbeitung, in der Zeit von November 2003 bis September 2006 unter der Anleitung von PD Dr. rer. nat. Robert Bähring angefertigt.

*Science is like sex, sometimes
something useful comes out but that
is not the reason we are doing it.*

Richard P. Feynman

ZUSAMMENFASSUNG

Kv4.2-Kaliumkanäle sind spannungsgesteuert und zeigen eine schnelle Inaktivierung. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der dendritischen Erregung. Mit den Kaliumkanal-interagierenden Proteinen (KChIPs) und den Dipeptidylaminopeptidase-ähnlichen Proteinen (DPPs) wurden zwei wichtige Gruppen von akzessorischen β -Untereinheiten beschrieben, die in heterologen Expressionssystemen in der Lage sind, die elektrophysiologischen Eigenschaften und die funktionelle Oberflächenexpression der Kv4.2- α -Untereinheit nachhaltig zu beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle dieser akzessorischen Untereinheiten für die subzelluläre Lokalisation und die funktionelle Oberflächenexpression der Kv4.2- α -Untereinheit in hippokampalen Neuronen untersucht. Zusätzlich zu einem auf RNA-Interferenz basierenden experimentellen System wurden Punktmutationen in die Kv4.2- α -Untereinheit eingeführt, die die Interaktion mit den akzessorischen β -Untereinheiten verhindern sollten. Weiterhin wurden die Kanaluntereinheiten mit Varianten des Fluoreszenzmarkers EGFP fusioniert und mit Epitopen versehen, die einen einfachen immunzytochemischen Nachweis der Oberflächenexpression ermöglichten.

Mit den in den N-Terminus eingebrachten Punktmutationen konnte ein vollständiger Verlust der KChIP2-Interaktion erzielt werden, der in elektrophysiologischen Experimenten und Koimmunpräzipitationen dokumentiert wurde. In kultivierten hippokampalen Neuronen erwies sich die funktionelle Interaktion mit KChIP2 weder für den Transport des Kv4.2-Kanals in die Dendriten noch für dessen Oberflächenexpression als essentiell. Allerdings konnte eine verstärkte Oberflächenexpression des Kv4.2-Wildtyp-Kanals in Gegenwart von KChIP2 gezeigt werden, die bei einer KChIP2-bindungsdefizienten Kv4.2-Variante nicht erreicht wurde.

Punktmutationen, für die in der Literatur ein Bindungsverlust von DPPY an die Kv4.3- α -Untereinheit beschrieben wurde, zeigten in Kv4.2 keinen Einfluss auf die Wechselwirkung mit DPPX. Daher legen die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente unterschiedliche strukturelle Determinanten für die Wechselwirkung von Kv4.3 und DPPY einerseits bzw. Kv4.2 und DPPX andererseits nahe. Interessanterweise konnte für die akzessorische DPPX-Untereinheit ein Kv4.2-abhängiger Transport an die Oberfläche der Neuronen gezeigt werden.

ABSTRACT

Kv4.2 potassium channels are voltage-gated and show a fast inactivation. They play an important role in the regulation of dendritic excitability. There are two important groups of accessory subunits that are able to modulate the electrophysiological properties and the functional surface expression of Kv4.2- α -subunits in heterologous expression systems. These accessory proteins are the K⁺ channel interacting proteins (KChIPs) and the dipeptidyl-aminopeptidase-like proteins (DPPs). The role of these accessory subunits for the subcellular localization and functional surface expression of the Kv4.2- α -subunit in hippocampal neurons was investigated in this work. A knock-down approach and modified Kv4.2- α -subunits, deficient for binding accessory subunits, were used in parallel to interfere with the interaction of accessory subunits. Moreover, channel-subunits have been tagged with epitopes, allowing easy visualization of localization and functional surface expression.

Point mutations, introduced into the N-terminus of the Kv4.2- α -subunit, lead to a total loss of KChIP2-interaction as shown in electrophysiological recordings and coimmunoprecipitations. The functional interaction of KChIP2 with the Kv4.2 channel was not essential in neurons, with respect to both the transport of the Kv4.2 channel into the dendrites and its surface expression. However, surface expression of Kv4.2 wildtype channels was increased in the presence of KChIP2, a feature which was not found in a KChIP2-binding-deficient Kv4.2 channel.

Point mutations in the Kv4.3- α -subunit for which interference with DPPY-interaction has been reported did not show any effect on the interaction with DPPX when introduced in the Kv4.2- α -subunit. The experiments done in this work imply different structural determinants for the interaction of Kv4.3 and DPPY or Kv4.2 and DPPX, respectively. Interestingly, the accessory DPPX-subunit appeared in a Kv4.2-dependent manner at the neuronal surface.

DANKSAGUNG

Herrn PD Dr. Robert Bähring danke ich für die interessante und herausfordernde Fragestellung, die Einführung in die Geheimnisse der Elektrophysiologie und die Bereitschaft, sein Wissen weiterzugeben. Besonders dankbar bin ich dafür, dass er mich an allen Aspekten des Wissenschaftlerlebens teilhaben ließ, und für die intensive Betreuung meiner Promotion. Bei Herrn Prof. Olaf Pongs bedanke ich mich für die Chance, meine Doktorarbeit unter den hervorragenden Bedingungen des Institutes für Neuronale Signalverarbeitung am Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg (ZMNH) durchzuführen. Für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Herrn Prof. Konrad Wiese. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dirk Isbrandt, der sich immer die Zeit nahm, sich in meine Experimente hineinzuversetzen und mir häufig mit konstruktiver Kritik weiterhalf. Dr. Sabine Hoffmeister-Ullerich half mir bei den FACS-Experimenten und war immer bereit, meine Ergebnisse mit mir zu diskutieren. Birgit Schwanke brachte mir mit viel Geduld die Präparation embryonaler hippocampaler Rattenneuronen bei. Bei Dr. Ulrich Boehm bedanke ich mich für viele interessante Gespräche über die Geschichte der Naturwissenschaften, dafür, dass er mich bis zuletzt in seinem Labor geduldet hat (obwohl ich eigentlich zuerst da war), und dafür, dass er einige der sympatischsten Menschen eingestellt hat, die ich kenne. In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei Tanja Klein und Katja Stein für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Sabine Wehrmann nahm sich immer die Zeit, sich meine Probleme anzuhören, half mir häufig mit ihrem Rat und versorgte mich mit Süßigkeiten. Malte Stockebrand hörte sich beinahe täglich den aktuellsten Stand meiner Experimente an und lieferte viele Denkanstöße. PD Dr. Matthias Kneussel und Dr. Sven Löbrich teilten ihr umfangreiches Wissen über experimentelle Methoden und Zellbiologie mit mir und waren immer eine wertvolle Hilfe. Jan Barghaan, Jaqueline Alig, Christoph Ogradowczyk, Kathrin Sauter, Quyen Le, Sönke Hornig, Stefan Schillemeit und Maggie Tozakidou waren stets Garanten für gute Laune und unterstützten mich, wo immer sie konnten. Dr. Cornelia Siebrands, Gregor Sachse, Joanna Hermainski, Dr. Britta Callsen und Lijuan Ma waren immer bereit, meine Ergebnisse zu diskutieren. Iris Meier war nicht nur ein unerschöpflicher Quell experimenteller Methoden, sie war auch immer bereit, bei administrativen Fragen zu helfen. Sönke Hornig, Jan Barghaan

und Lijuan Ma versorgten mich mit *Xenopus*-Oozyten. Gwen Kollmorgen half mir immer wieder mit kleinen Ideen weiter. Dörte Clausen scannte unzählige Westernblots für mich ein, Dirk Lubrich sorgte für eine reibungslose Versorgung mit Autoklaviergut. Andrea Zaisser unterstützte mich in der Zellkultur, Saskia Siegel und Dr. Michaela Schweizer versorgten mich mit Mausneuronen.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung, auf die ich mich immer verlassen konnte.

Meine Frau Andrea trug einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit bei, indem sie ihre Interessen häufig hinten anstellte und mich während der letzten Jahre auf jede erdenkliche Weise unterstützte. So half sie mir bei der Realisierung der äußeren Form dieser Arbeit und bei der Fehlersuche.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kaliumselektive Ionenkanäle	1
1.2	Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle	4
1.3	Die Kanäle der Kv4-Unterfamilie	5
1.4	Die akzessorischen Untereinheiten der Kv4-Kanäle	7
1.4.1	Die Kv-Kanal-interagierenden Proteine (KChIPs)	8
1.4.2	Die Dipeptidylaminopeptidase-ähnlichen Proteine (DPPs)	12
1.5	Zielsetzung	15
2	Materialien	17
2.1	Chemikalien, Enzyme und Gebrauchsmaterialien	17
2.2	Nährmedien	18
2.3	Bakterienstämme	18
2.4	Vektoren	18
2.5	Verwendete Klone	18
2.6	Größenstandards	20
2.7	Antikörper	21
2.8	Zelllinien	21
2.9	Tiere zur Gewebeentnahme	22
3	Methoden	23
3.1	Molekularbiologische Methoden	23
3.1.1	Herstellung kompetenter Zellen	23
3.1.2	Transformation von Bakterien	23
3.1.3	Präparation von DNA aus Bakterienkulturen	24
3.1.3.1	Präparation aus 3-ml-Bakterienkulturen (Miniprep)	24
3.1.3.2	Präparation aus 50-ml-Bakterienkulturen (Midiprep)	24
3.1.4	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	25
3.1.5	<i>In-vitro</i> -Transkription	25
3.1.6	Nachweis von Nukleinsäuren	25

3.1.6.1	Agarose-Gelelektrophorese	26
3.1.6.2	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration .	26
3.1.6.3	Konzentrationsbestimmung der RNA durch Fluoreszenz- messung	26
3.1.6.4	DNA-Sequenzierung	26
3.1.7	Modifikationen von DNA	27
3.1.7.1	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen . . .	27
3.1.7.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	27
3.1.7.3	Ligation von DNA-Fragmenten	27
3.1.7.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
3.1.8	<i>In-vitro</i> -Mutagenese	29
3.1.8.1	Mutation einer Base	29
3.1.8.2	Deletion mehrerer Basen	29
3.1.9	Computergestützte Sequenzanalysen	30
3.1.10	RNA-Interferenz	30
3.2	Zellbiologische Methoden	31
3.2.1	Zellkultur	31
3.2.1.1	Routinehaltung von immortalisierten Zellen	31
3.2.1.2	Primärkultur hippokampaler Neuronen	32
3.2.2	Transfektion	33
3.2.2.1	Transfektion von immortalisierten Zellen	33
3.2.2.2	Erzeugung stabil transfizierter Zelllinien	33
3.2.2.3	Transfektion primärer Neuronen mit Calcium- phosphat	34
3.2.3	Immunzytochemie	35
3.2.3.1	Immunzytochemische Färbungen intrazellulärer Epitope	35
3.2.3.2	Immunzytochemischer Nachweis extrazellulärer Epitope in unpermeabilisierten Zellen	35
3.2.3.3	Mikroskopische Aufnahmen und Auswertung	36
3.2.4	FACS-Analyse	36
3.2.4.1	Vorbereitung der Zellen für die FACS-Analyse	37
3.2.4.2	Datenaufnahme und Auswertung	37

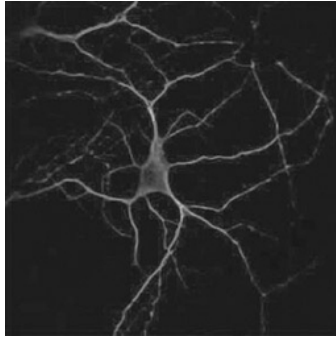
3.2.5	Vorbereitung der Zellen zur Gewinnung von Proteinen	37
3.2.6	Plattieren der Zellen für elektrophysiologische Messungen	38
3.2.7	Präparation und Injektion von <i>Xenopus</i> -Oozyten	38
3.3	Proteinbiochemische Methoden	38
3.3.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
3.3.2	Westernblot-Analyse	39
3.3.2.1	Elektrophoretischer Transfer	39
3.3.2.2	Immunologischer Nachweis der gebundenen Proteine	39
3.3.3	Koimmunpräzipitation	40
3.3.3.1	Kopplung der Antikörper an Dynabeads	40
3.3.3.2	Koimmunpräzipitation aus transient transfizierten CHO-Zellen	40
3.4	Elektrophysiologische Methoden	41
3.4.1	Ganz-Zell-Patch-Clamp-Technik	41
3.4.1.1	Ausstattung des Messstandes	43
3.4.1.2	Datenerfassung	44
3.4.1.3	Versuchslösungen	45
3.4.2	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in <i>Xenopus</i> -Oozyten	45
3.4.2.1	Messplatz	46
3.4.2.2	Datenerfassung	46
3.4.3	Verwendete Stimulationsprotokolle und Datenauswertung	46
3.4.3.1	Testpuls	47
3.4.3.2	Erholung aus der Inaktivierung	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Knockdown akzessorischer Kanal-Untereinheiten durch RNAi	48
4.1.1	Erzeugung fluoreszenzmarkierter akzessorischer β -Untereinheiten	48
4.1.2	Design der siRNA-Vektoren	50
4.1.3	RNAi-Nachweis durch FACS-Analyse	51
4.1.3.1	Stabile Expression der EGFP-Fusionsproteine in Zell- linien	54
4.1.3.2	Knockdown von KChIP2	54
4.1.3.3	Knockdown von DPPX	56

4.1.4	RNAi-Nachweis durch Westernblot-Analyse	57
4.1.4.1	Knockdown von KChIP2	58
4.1.4.2	Knockdown von DPPX	58
4.1.5	Funktionelle Analyse der RNA-Interferenz in stabilen Zelllinien und hippokampalen Neuronen	58
4.2	Modifizierte Kanaluntereinheiten mit extrazellulären Epitopen	64
4.2.1	Verhalten von Kv4.2A14K-HA in heteromultimeren Komplexen	66
4.2.2	Elektrophysiologische Charakterisierung der epitopmarkierten Kv4.2-Konstrukte	69
4.2.3	Oberflächennachweis extrazellulär markierter Kanaluntereinhei- ten im heterologen Expressionssystem	69
4.3	Epitopmarkierte Kanaluntereinheiten in hippokampalen Neuronen . . .	73
4.3.1	Subzelluläre Marker und morphologische Charakterisierung hip- pokampaler Neuronen in Primärkultur	73
4.3.2	Kv4.2-HA-EGFP-Lokalisation und -Oberflächennachweis	76
4.3.3	hDPPX-d2EGFP-Lokalisation und -Oberflächennachweis	80
5	Diskussion	85
5.1	Molekulare Stöchiometrie heteromultimerer Kv4-Kanal-Komplexe . . .	85
5.2	Kv4-Strukturdeterminanten der funktionellen Interaktion mit akzesso- rischen Untereinheiten	91
5.3	Targeting, Transport und funktionelle Oberflächenexpression von Kv-Kanälen	93
6	Literaturverzeichnis	98
 Anhang		
A	Abkürzungen	114
B	Zielsequenzen für RNAi	117
C	Plasmid-Karten	118
D	Puffer und Lösungen	123
E	Publikationen	125
F	Lebenslauf	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Membrantopologie der porenbildenden α -Untereinheiten verschiedener Kaliumkanalfamilien	2
Abbildung 1.2	Prinzipieller Aufbau der Porenregion von Kaliumkanälen . .	3
Abbildung 1.3	Aufbau eines spannungsabhängigen Kaliumkanals	4
Abbildung 1.4	Schematischer Aufbau der akzessorischen KChIP2-Untereinheit	9
Abbildung 1.5	Schematischer Aufbau der akzessorischen DPPX-S-Untereinheit	13
Abbildung 3.1	Mechanismus der RNA-Interferenz	30
Abbildung 3.2	Patchkonfigurationen	42
Abbildung 3.3	Äquivalenzschaltbild einer Ganz-Zell-Ableitung und vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers	43
Abbildung 4.1	Schematische Darstellung der Knockdown-Strategie für KChIPs am Beispiel von KChIP2	49
Abbildung 4.2	Schematische Darstellung der Knockdown-Strategie für DPPX	50
Abbildung 4.3	Expression von humanen d2EGFP-Fusionsproteinen in stabilen HEK293-Flp-In-Zelllinien	52
Abbildung 4.4	Expression von murinen EGFP-Fusionsproteinen in stabilen 3T3-Flp-In-Zelllinien	53
Abbildung 4.5	Untersuchung der KChIP2-RNA-Interferenz mittels FACS-Analyse	55
Abbildung 4.6	Untersuchung der DPPX-RNA-Interferenz mittels FACS-Analyse	56
Abbildung 4.7	Nachweis des mKChIP2-Knockdowns im Westernblot	57
Abbildung 4.8	Nachweis des DPPX-Knockdowns im Westernblot	59
Abbildung 4.9	Erzeugung von Zelllinien, die den Kv4.2-Kanal als Fusionsprotein stabil exprimieren	60
Abbildung 4.10	Elektrophysiologische Untersuchung des KChIP2-Knockdowns in einer stabilen hKv4.2-d2EGFP-Zelllinie	61

Abbildung 4.11	RNA-Interferenz in hippokampalen Neuronen	63
Abbildung 4.12	Untersuchung heteromultimerer Kv4-Komplexe in <i>Xenopus</i> - Oozyten	66
Abbildung 4.13	Koimmunpräzipitation heteromultimerer Kanal-Komplexe . .	68
Abbildung 4.14	Nachweis der Funktionalität der HA-EGFP-Fusionsproteine .	70
Abbildung 4.15	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Kv4.2wt-HA-EGFP in CHO-Zellen	71
Abbildung 4.16	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von hDPPX-d2EGFP in CHO-Zellen	72
Abbildung 4.17	Mikroskopische Charakterisierung der neuronalen Primär- kultur	74
Abbildung 4.18	Lokalisation fluoreszenzmarkierter Kv4.2-Konstrukte in Neuro- nen	77
Abbildung 4.19	Oberflächenexpression fluoreszenzmarkierter Kv4.2-Konstruk- te in Neuronen	79
Abbildung 4.20	Statistische Auswertung der Kv4.2-Oberflächenexpression . .	80
Abbildung 4.21	Charakterisierung der DPPX-Interaktionsfähigkeit	81
Abbildung 4.22	Lokalisation von hDPPX-d2EGFP in Neuronen	82
Abbildung 4.23	Oberflächenexpression von hDPPX-d2EGFP in Neuronen . .	83
Abbildung 5.1	Möglicher Aufbau eines Kv4.2-Kanal-Komplexes	86



1

Einleitung

1.1 Kaliumselektive Ionenkanäle

Unter den verschiedenen Ionenkanälen stellen die Kaliumkanäle die größte und diverseste Gruppe dar (Coetzee *et al.*, 1999). Kaliumkanäle kommen ubiquitär vor, von den Archeae (Smith *et al.*, 1997) bis zu den Tieren (Pongs *et al.*, 1988). Diese Vielfalt entsteht durch eine große Anzahl verschiedener Kaliumkanalgene, deren Transkripte häufig noch alternativ gespleißt werden. Ein minimaler Kaliumkanal besteht in der Regel aus vier porenbildenden α -Untereinheiten. Darüber hinaus können akzessorische β -Untereinheiten die Eigenschaften des minimalen Kanals beeinflussen. Im Gegensatz zu anderen Kationenkanälen (z. B. für Natrium- oder Calciumionen), deren minimale Kanalpore aus nur einer Kanaluntereinheit gebildet wird, können Kaliumkanäle Heteromultimere bilden, wodurch die Anzahl der möglichen Kanäle noch einmal erhöht wird.

Die einfachsten Kaliumkanäle bestehen aus α -Untereinheiten mit lediglich zwei Transmembrandomänen (M1 und M2). Beide Domänen sind durch eine Schleife verbunden, die sich in die Membran zurückfaltet (siehe [Abbildung 1.1 A](#)) und den Kalium-Selektivitätsfilter enthält. Kanäle aus solchen Untereinheiten leiten Einwärtsströme besser als Auswärtsströme und werden daher als Einwärtsgleichrichter oder Kir-Kanäle bezeichnet (Ho *et al.*, 1993; Kubo *et al.*, 1993). Diese Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials und bei der Sekretion und Absorption von Kaliumionen über Zellmembranen (Isomoto *et al.*, 1997).

Eine weitere Gruppe von Kaliumkanälen besteht aus Untereinheiten mit vier Transmembrandomänen (M1 bis M4, siehe [Abbildung 1.1 B](#)) und zwei Porendomänen (P1

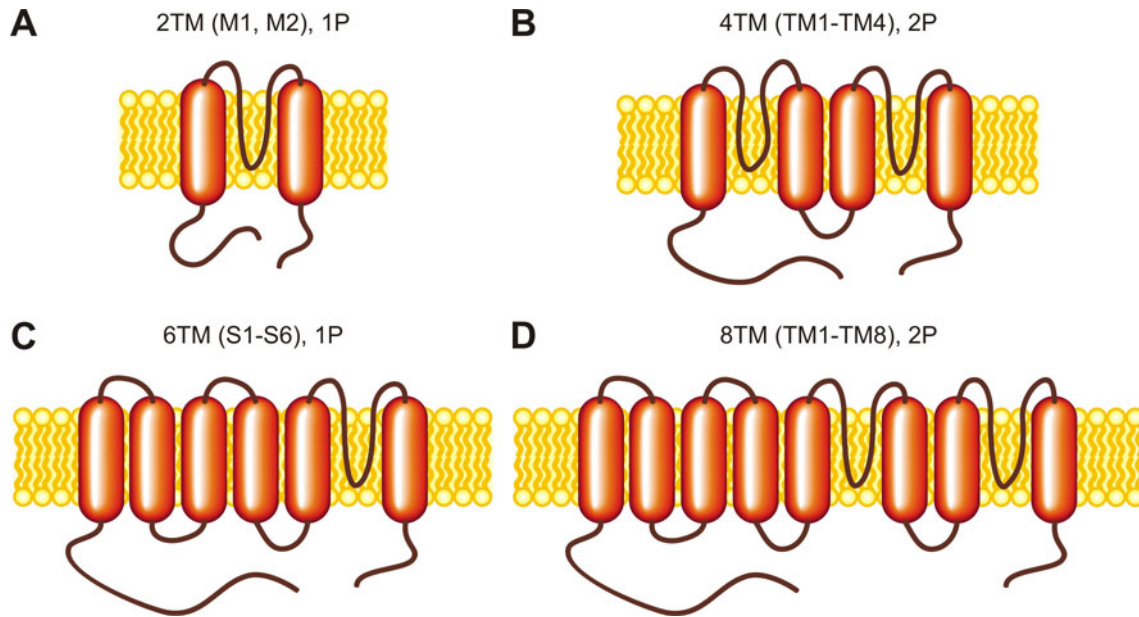


Abbildung 1.1: Membrantopologie der porenbildenden α -Untereinheiten verschiedener Kaliumkanalfamilien.

A: α -Untereinheiten der Kir-Kanäle, wie die prokaryotischen KcsA- oder MthK-Kanäle, haben nur zwei Transmembransegmente (TM) mit einer Porenschleife. **B:** α -Untereinheiten mit zwei porenbildenden Domänen und vier Transmembransegmenten (z. B. TWIK, TREK) bilden als Dimere funktionelle Kanäle. **C:** Spannungsgesteuerte Kanäle wie die Kv-Kanäle haben eine Pore (P) und sechs Transmembransegmente. **D:** K^+ -Kanal mit zwei porenbildenden Domänen und acht Transmembransegmenten (z. B. TOK).

und P2) (Lesage *et al.*, 1996a; Goldstein *et al.*, 1998). Man geht davon aus, dass diese Kanäle dimerisieren, um einen minimalen Kanal zu formen (Lesage *et al.*, 1996b; Goldstein *et al.*, 1998). In elektrophysiologischen Untersuchungen zeigen diese Kanäle ein von den Kir-Kanälen abweichendes Verhalten. Da der durch diese Kanäle vermittelte Strom allein durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung vorhersagbar ist, werden diese Kanäle als Leck- K^+ -Kanäle bezeichnet (Goldstein *et al.*, 1998). Leck- K^+ -Kanäle werden sowohl von erregbaren als auch von nicht erregbaren Zellen exprimiert. Man nimmt an, dass diese Kanäle, zusammen mit den Kir-Kanälen, einen wesentlichen Beitrag zum Ruhemembranpotential leisten. Diese Kanäle scheinen durch eine breite Palette von Substanzen und anderen Proteinen reguliert zu werden (Lesage und Lazdunski, 2000). Neuere Untersuchungen deuten auf eine Rolle der Leck- K^+ -Kanäle bei Apoptose und Tumorgenese hin (Patel und Lazdunski, 2004).

Die größte Gruppe der Kaliumkanäle verfügt über sechs transmembrane Helices (S1 bis S6). Die Helices S5 und S6, die durch die Porenschleife verbunden sind, bilden das Porenmodul (siehe [Abbildung 1.1 C](#)). Die vier zusätzlichen Helices bilden eine regulato-

rische Domäne und haben als Spannungssensor Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle. Die Mitglieder dieser Kanalgruppe werden als Kv-Kanäle bezeichnet. Bei den BK-Kanälen, die zusätzlich zur Spannungsabhängigkeit auch durch Calcium reguliert werden, durchquert der N-Terminus die Membran ein weiteres Mal, so dass eine Struktur mit sieben Transmembrandomänen entsteht.

Die Kanäle mit sechs bzw. sieben Transmembrandomänen übernehmen im Organismus eine Vielzahl unterschiedlichster Aufgaben. Sie sind unter anderem maßgeblich an Muskel- und Herzaktionspotentialen beteiligt (Gutman *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005).

Allen Kaliumkanälen ist eine kurze Aminosäuresequenz im Selektivitätsfilter gemein. Diese Sequenz (-TXXTXGYG-) wird als Kaliumkanal-Signatur bezeichnet. Mutationen in diesem Bereich können die Selektivität für Kaliumionen aufheben (Heginbotham *et al.*, 1994). Der prinzipielle Aufbau der Porenregion von Kaliumkanälen ist seit der Kristallisation des bakteriellen Kaliumkanals KcsA sehr gut verstanden (Doyle *et al.*, 1998). Da aufgrund der hohen Homologie zwischen eukaryotischen und prokaryotischen Kaliumkanälen davon ausgegangen werden kann, dass sich alle Kaliumkanäle in ihrer Porenstruktur gleichen, konnten die ersten Kristallstrukturen prinzipiell auf alle Kaliumkanäle übertragen werden (Doyle *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2001). Die Porenstruktur

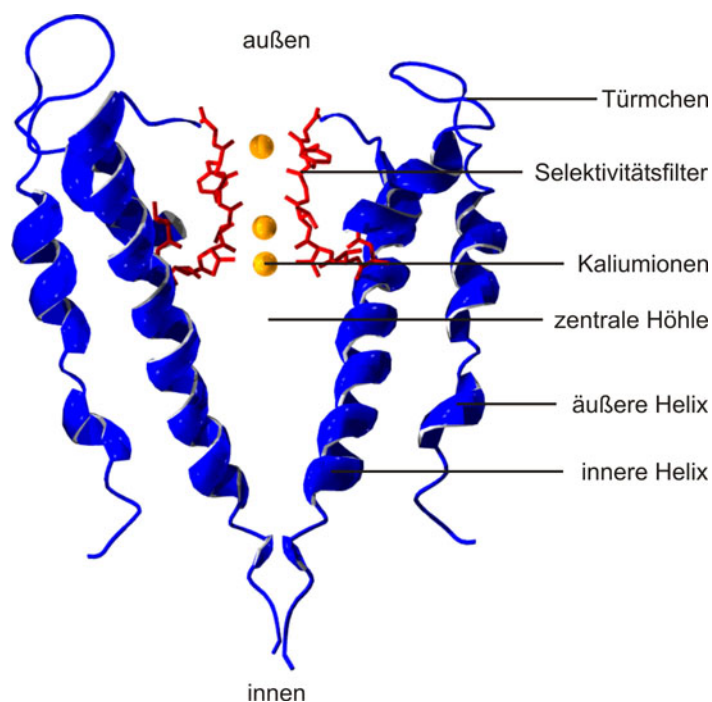


Abbildung 1.2: Prinzipieller Aufbau der Porenregion von Kaliumkanälen.

Die Kristallstruktur (Auflösung: 3,2 Å) des bakteriellen KcsA-Kanals (Doyle *et al.*, 1998) zeigt den generellen Aufbau der Kanalpore. In Blau sind die innere und die äußere Helix abgebildet, die Porenschleife mit Selektivitätsfilter wurde in Rot wiedergegeben. Die Lage von drei Kaliumionen ist durch gelbe Kugeln markiert. Grundlage dieser Abbildung ist die PDB-Datei 1BL8. Zur besseren Übersicht sind nur zwei der vier porenbildenden α -Untereinheiten abgebildet. Die PDB-Datei wurde mit Swiss-PdbViewer bearbeitet und mit Pov-Ray 3.6 gerendert.

wird durch die inneren Helices der vier Kanaluntereinheiten gebildet. Dabei erinnert die Form der Pore an einen Kegel. Anschaulich wurde sie auch als „umgekehrtes Tipi“ bezeichnet (Doyle *et al.*, 1998), wobei sich der Selektivitätsfilter an der breiten Basis befindet. Dieser ist lediglich 12 Å lang. Ein großer, mit Wasser gefüllter Hohlraum befindet sich im Zentrum des Kanals (siehe [Abbildung 1.2](#)).

1.2 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle

Die Mitglieder der Superfamilie der Kaliumkanäle unterscheiden sich nicht nur im Aufbau (siehe [Abschnitt 1.1](#)), sondern auch in ihrer Reaktion auf verschiedene Stimuli. So gibt es Kaliumkanäle, die in der Lage sind, auf mechanische Reize, auf Änderungen des pH-Wertes, auf Schwankungen des Membranpotentials oder auf *second messenger* zu reagieren.

Bei spannungsgesteuerten Kanälen wird das Öffnungsverhalten durch Änderungen im Membranpotential beeinflusst. Der erste spannungsgesteuerte Kaliumkanal wur-

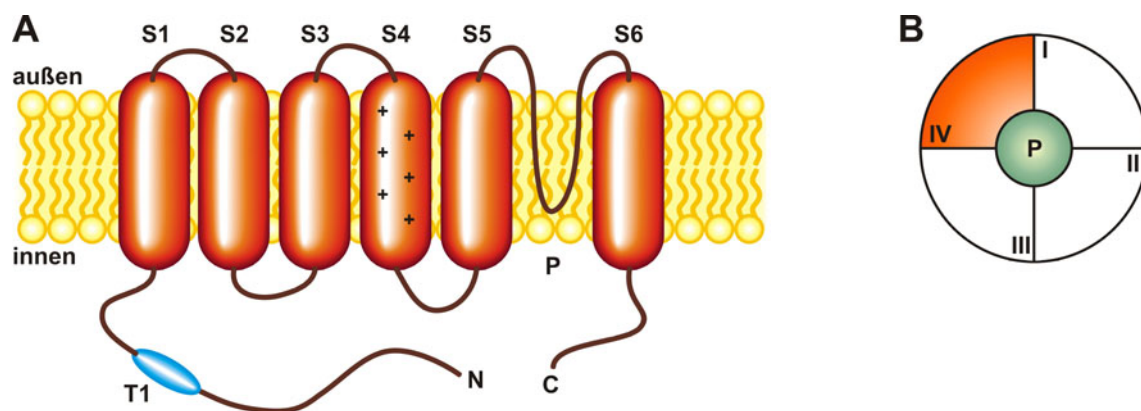


Abbildung 1.3: Aufbau eines spannungsabhängigen Kaliumkanals.

A. Aufbau einer einzelnen α -Untereinheit. Ein solches Protein verfügt über sechs Transmembrandomänen (S1 bis S6), wobei S5 und S6 die Porenregion bilden, während die positiv geladene Helix S4 als Spannungssensor dient. Die Porenregion (P) enthält den Selektivitätsfilter und ist für die Spezifität des Kanals verantwortlich. N- und C-Termini sind in der Abbildung verkürzt dargestellt und enthalten verschiedene Bindungsstellen für modulierende Faktoren. Die Tetramerisierungsdomäne (T1) ist für die Selektivität bei der Zusammenlagerung zu Tetrameren von Bedeutung. **B.** Aufsicht auf einen minimalen Kaliumkanal. Für die Bildung eines funktionellen Kanals sind vier α -Untereinheiten mit je einer Porenschleife nötig. Dabei erfolgt die Interaktion über die T1-Domäne, die gleichzeitig dafür sorgt, dass nur nahe verwandte α -Untereinheiten miteinander einen Kanal bilden können. Die α -Untereinheiten (I bis IV) liegen rotations-symmetrisch um die zentrale Pore (P). Wenn der Kanal aus vier gleichen α -Untereinheiten aufgebaut ist, spricht man von einem Homomultimer, ist der Kanal aus unterschiedlichen α -Untereinheiten aufgebaut, wird er als Heteromultimer bezeichnet.

de 1987 aus *Drosophila melanogaster* kloniert (Tempel *et al.*, 1987; Kamb *et al.*, 1988; Pongs *et al.*, 1988). Dieser Kanal wurde nach der entsprechenden *Drosophila*-Mutante *Shaker*-Kanal genannt und gilt bis heute als Prototyp der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle. Allgemein werden spannungsgesteuerte Kanäle als Kv-Kanäle bezeichnet. Innerhalb der spannungsgesteuerten Kanäle unterscheidet man die Unterfamilien Kv1 (*Shaker*) bis Kv12 (ELK). Die α -Untereinheiten der Kv-Kanäle haben sechs Transmembrandomänen (S1 bis S6). Dabei bilden S5 und S6 die Porenregion, wohingegen S4 eine Reihe positiv geladener Aminosäuren trägt und als Spannungssensor fungiert (siehe [Abbildung 1.3 A](#)). Wenn die Zellmembran depolarisiert wird, wirkt eine Kraft auf S4, die zu einer Konformationsänderung und damit zum Öffnen des Kanals führt (Sigworth, 1994; Durell *et al.*, 1998; Bezanilla, 2002). Trotz anhaltender Debatten über den exakten molekularen Mechanismus dieses Vorganges (Blaustein und Miller, 2004; Tombola *et al.*, 2005) herrscht mittlerweile weitgehend Einigkeit darüber, dass die Spannungssensoren, im Gegensatz zur früher favorisierten Schraubenbewegung entlang ihrer Längsachse, beim Öffnen des Kanals kippen (Jiang *et al.*, 2003; Blaustein und Miller, 2004).

Kanäle, die aus vier gleichen α -Untereinheiten aufgebaut sind, werden als Homomultimere bezeichnet (siehe [Abbildung 1.3 B](#)). Kv-Kanal- α -Untereinheiten einer Unterfamilie können Heteromultimere bilden. Bei Kv1-, Kv2-, Kv3- und Kv4-Kanälen vermittelt die T1-Domäne die selektive Assemblierung der Unterfamilienmitgliedern (Li *et al.*, 1992; Shen und Pfaffinger, 1995; Xu *et al.*, 1995). Die tetramerisierten T1-Domänen befinden sich auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran und erinnern in ihrer Form an eine hängende Gondel (Kobertz *et al.*, 2000; Sokolova *et al.*, 2001). Neben ihrer Rolle bei der Zusammenlagerung der α -Untereinheiten sind die T1-Domänen auch an der Bindung akzessorischer Untereinheiten beteiligt.

1.3 Die Kanäle der Kv4-Unterfamilie

Kv4-Kanäle übernehmen unter anderem im Herzmuskel und im Gehirn wichtige Aufgaben (Baldwin *et al.*, 1991). Diese Kanäle vermitteln einen Strom, der bei einer Depolarisation der Membran schnell aktiviert und dann, ohne dass ein äußerer Reiz nötig

ist, schnell inaktiviert. Der auf diese Weise erzeugte Strom wird als A-Typ-Strom bezeichnet. Kv4-Kanäle sind in Kardiomyozyten entscheidend an der Vermittlung eines schnellen transienten Auswärtsstromes I_{TO} beteiligt, der zur initialen Repolarisierungsphase des Herzaktionspotentials beiträgt (Dixon und McKinnon, 1994; Dixon *et al.*, 1996).

In Neuronen zeigen Kv4-Kanäle eine somatodendritische Verteilung (Sheng *et al.*, 1992; Maletic-Savatic *et al.*, 1995), wobei die Dichte des durch diese Kanäle vermittelten Stroms mit zunehmender Entfernung zum Soma ansteigt (Hoffman *et al.*, 1997). Außerdem wurde eine postsynaptische Anhäufung dieser Kanäle beobachtet (Alonso und Widmer, 1997; Kim *et al.*, 2005). In diesen Zellen vermitteln Kv4-Kanäle einen unterschwellig aktivierenden A-Typ-Strom, der als I_{SA} bezeichnet wird (Serodio *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2006b; Lauver *et al.*, 2006). A-Typ-Kanäle aktivieren bereits unterhalb der Aktivierungsschwelle für Aktionspotentiale. Darüber hinaus können diese Kanäle bei moderater Depolarisierung ohne vorheriges Öffnen in einen inaktiven Refraktärzustand gelangen (Jerng *et al.*, 1999; Bähring *et al.*, 2001a). Aufgrund ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften und ihrer subzellulären Verteilung sind diese A-Typ-Kanäle in der Lage, die retrograde Ausbreitung von Aktionspotentialen zu dämpfen (Hoffman *et al.*, 1997). Sie wirken auf diese Weise als „dendritische Stoßdämpfer“ (Yuste, 1997). Darüber hinaus gewährleisten Kv4-Kanäle besonders an dendritischen Verzweigungspunkten den Block Calcium-getragener dendritischer Potentiale (Cai *et al.*, 2004).

Es gab mehrere Versuche, die Rolle von Kv4.2 im Mausmodell zu untersuchen (Barry *et al.*, 1998; Wickenden *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2000, 2005; Chen *et al.*, 2006b; Hu *et al.*, 2006). Die gewebetypspezifische Expression einer dominant negativen Kv4.2-Porenmutante zeigte, dass Kv4-Kanäle im Mausherzen für den schnellen transienten Auswärtsstrom verantwortlich sind (Barry *et al.*, 1998). Bei einer Reduzierung dieser Stromkomponente kam es in den transgenen Tieren zu einer Verlängerung der Herzaktionspotentialdauer und des QT-Intervalls. Darüber hinaus wurde in den transgenen Mäusen ein transienter Kaliumstrom gemessen, der nicht molekular identifiziert werden konnte und in Wildtyp-Tieren des gleichen Wurfes nicht auftrat (Barry *et al.*, 1998). In einer zweiten Studie wurde eine ebenfalls dominant negativ wirkende verkürzte Form

gewebsspezifisch exprimiert (Wickenden *et al.*, 1999). Neben der bereits erwähnten Verlängerung der Herzaktionspotentialdauer wurden bei etwas älteren Mäusen eine Erweiterung des linken Vorhofs und interstitielle Fibrose beobachtet (Wickenden *et al.*, 1999). Eine Kv4.2-Knockout-Maus zeigte zwar einen Verlust des schnellen transienten Auswärtstromes, entwickelte aber keine Hypertrophie (Guo *et al.*, 2005). Darüber hinaus zeigte diese Maus bei gleichbleibender Kv4.3-Expression eine starke Verringerung der KChIP2-Expression in den Ventrikeln, während die langsame Komponente des I_{TO} anstieg (Guo *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse wurden in einer Folgestudie an der gleichen Mauslinie bestätigt (Chen *et al.*, 2006b). Darüber hinaus zeigten die Hippokampi der Knockout-Mäuse eine Verringerung der Level von KChIP1, KChIP2 und KChIP3 um 30 bis 70 % (Chen *et al.*, 2006b; Menegola und Trimmer, 2006). Außerdem wurde der A-Typ-Strom im distalen Dendriten von CA1-Neuronen nahezu vollständig eliminiert. In solchen Zellen war es einfacher, mittels Tetasignalpaarungsprotokoll, nicht aber mittels Sättigungsprotokoll LTP zu induzieren (Chen *et al.*, 2006b). In einer weiteren Studie wurde in diesen Kv4.2-Knockout-Mäusen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Schmerz beschrieben (Hu *et al.*, 2006).

1.4 Die akzessorischen Untereinheiten der Kv4-Kanäle

In heterologen Expressionsstudien, z. B. in *Xenopus*-Oozyten (Baldwin *et al.*, 1991), zeigten reine Kv4.2- α -Ströme deutliche Unterschiede zu nativen A-Typ-Strömen in Neuronen (Nadal *et al.*, 2001). Da nach der Transfektion cerebellärer Granulazellen mit Kv4.2 ebenfalls ein anderer Strom gemessen wurde als in untransfizierten Zellen des gleichen Typs (Shibata *et al.*, 2000), konnte eine Modifikation der Kv4- α -Untereinheiten im Laufe der Translation als Ursache für die beobachteten Effekte ausgeschlossen werden (Nadal *et al.*, 2003). Die Koinjektion von niedermolekularen mRNA-Fractionen aus dem Rattenhirn führte in *Xenopus*-Oozyten zu einer Änderung in den kinetischen Eigenschaften der gemessenen Kv4-Ströme. Es wurde daher die Existenz weiterer Proteine postuliert, die das Schaltverhalten von Kv4-Kanälen modulieren können (Chabala *et al.*, 1993; Serodio *et al.*, 1994).

1.4.1 Die Kv-Kanal-interagierenden Proteine (KChIPs)

Mit den KChIPs wurde im Jahr 2000 eine erste Gruppe solcher modulierenden akzesorischen Untereinheiten beschrieben (An *et al.*, 2000). Inzwischen umfasst die Genfamilie vier Mitglieder (An *et al.*, 2000; Holmqvist *et al.*, 2002), die jeweils in mehreren Splice-Varianten vorkommen. KChIPs sind kleine Proteine (etwa 250 Aminosäuren), die zur Proteinfamilie der neuronalen Calcium-Sensoren (NCS) gehören (Burgoyne und Weiss, 2001). Eng mit den KChIPs verwandt ist das Frequentin (NCS-1), welches auch mit Kv4-Kanälen interagieren kann (Nakamura *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003). Die KChIPs unterscheiden sich in ihren N-Termini, während die C-terminale Domäne zu etwa 70% konserviert ist (An *et al.*, 2000). In diesem konservierten Bereich liegen vier EF-Hand-Motive, von denen drei intakt sind und Calciumionen binden können (siehe [Abbildung 1.4](#)). Alle vier Mitglieder der Familie können mit Kv-Kanälen interagieren (An *et al.*, 2000; Holmqvist *et al.*, 2002).

KChIP1 ist wie alle anderen Mitglieder der NCS-Familie, jedoch im Gegensatz zu allen anderen KChIPs, am N-Terminus myristoyliert (Hasdemir *et al.*, 2005). Von KChIP1 sind drei humane Splice-Varianten beschrieben, die bioinformatische Analyse des Gens lässt aber vermuten, dass weitere Splice-Varianten gebildet werden können (An *et al.*, 2000; Boland *et al.*, 2003; Van Hoorick *et al.*, 2003; Pruunsild und Timmusk, 2005). Die Variante KChIP1a (auch KCNIP1-Ib Δ II) ist im humanen Gehirn und im Rückenmark stark exprimiert (Pruunsild und Timmusk, 2005). Dagegen konnte keine KChIP1-Splice-Variante im Herzen von Mensch oder Nager nachgewiesen werden (An *et al.*, 2000; Boland *et al.*, 2003; Pruunsild und Timmusk, 2005). In der Maus ist diese Splice-Variante im Gehirn exprimiert, dort ist sie allerdings, verglichen mit den anderen KChIP1-Isoformen, in deutlich geringeren Mengen zu finden (Pruunsild und Timmusk, 2005). KChIP1b (auch KCNIP1-Ib) ist im humanen Gehirn auf einem sehr niedrigen Level exprimiert, in Maus und Ratte dagegen deutlich stärker (Boland *et al.*, 2003; Pruunsild und Timmusk, 2005). Die dritte Variante KCNIP1-Ia Δ II ist im Menschen hauptsächlich in Kleinhirn, Rückenmark und Hoden exprimiert, darüber hinaus finden sich schwache Expressionen in Großhirn, Prostata, Milz und einigen anderen Geweben (Pruunsild und Timmusk, 2005). In der Maus wird diese Variante sehr stark im Gehirn exprimiert, darüber hinaus auch in Lunge und Hoden (Pruunsild und Timmusk, 2005).

Die Expression von KCNIP1-Ia Δ II ist in der Maus an E15 kaum nachweisbar und steigert sich bis P14 zur maximalen Expression (Pruunsild und Timmusk, 2005).

KChIP1 ist in der Lage, die Stromdichte von Kv4.2 im heterologen Expressionssystem zu erhöhen (Boland *et al.*, 2003; Van Hoorick *et al.*, 2003). Es wurde berichtet, dass die Isoform KChIP1a die Erholung aus der Inaktivierung beschleunigt, während KChIP1b diese verlangsamt (Van Hoorick *et al.*, 2003). Die frequenzabhängige Akkumulation der Inaktivierung wurde durch KChIP1b erhöht und durch KChIP1a reduziert (Van Hoorick *et al.*, 2003). In einer zweiten Arbeit konnte die gegensätzliche Wirkung dieser beiden KChIP1-Splice-Varianten nicht bestätigt werden. Allerdings zeigte KChIP1b fast keinen Effekt auf die Erholung aus der Inaktivierung, während diese durch KChIP1a stark beschleunigt wurde (Boland *et al.*, 2003).

In heterologen Expressionssystemen konnte gezeigt werden, dass KChIP1 in der Lage ist, den Transport des Kv4.2-Kanals vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran zu begünstigen. Mutationen, die die Funktion der EF-Hand-Motive oder Myristoylierungsstellen zerstören, beeinträchtigten diesen Effekt (O'Callaghan *et al.*, 2003; Hasdemir *et al.*, 2005).

Von KChIP2 sind viele Splice-Varianten bekannt. Mit RT-PCR konnten sieben humane und vier murine Varianten nachgewiesen werden (Pruunsild und Timmusk, 2005), in der Gendatenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/) sind darüber hinaus noch weitere Sequenzen hinterlegt. Die humane Splice-Variante KChIP2a (auch KChIP2.4 oder KCNIP2-Ia) ist hauptsächlich im Gehirn exprimiert, die entsprechende Maus-Variante darüber hinaus noch im Herzen (Pruunsild und Timmusk, 2005). KChIP2b (auch KChIP2.1 oder KCNIP2-Ia Δ IIb) weist im Menschen nur eine schwache Expression in einigen Geweben des Zentralnervensystems auf. In der Maus ist diese Variante ebenfalls stark im Herzen exprimiert (Pruunsild und Timmusk, 2005). KChIP2c (auch

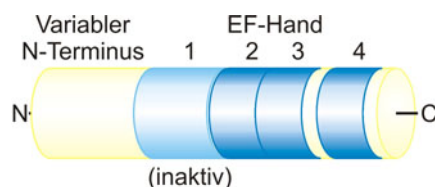


Abbildung 1.4: Schematischer Aufbau der akzessorischen KChIP2-Untereinheit.

KChIPs gehören zur Familie der Calcium-bindenden Proteine. Die Bindung erfolgt über EF-Hände, von denen das Protein drei aktive (dunkelblau) und eine degenerierte (hellblau) enthält. Es gibt vier verschiedenen KChIP-Gene. Diese unterscheiden sich vor allem im N-Terminus, während die C-terminale Calcium-bindende Region konserviert ist.

Darüber hinaus sind von allen vier KChIPs mehrere Splice-Varianten bekannt, die sich ebenfalls meist im N-Terminus unterscheiden.

KChIP2.2 oder KCNIP2-Ia Δ IIab) wird am stärksten im humanen Herzen, darüber hinaus aber auch im Thymus und in der Luftröhre exprimiert. Bei Mäusen ist diese Form relativ schwach im Herzen exprimiert (Pruunsild und Timmusk, 2005). Die Splice-Varianten KChIP2e und KChIP2f (auch KChIP2.5) wurden in geringer Menge im linken Atrium des humanen Herzen nachgewiesen (Decher *et al.*, 2004). KChIP2g (auch KCNIP2-Ib Δ IIab) kommt beim Menschen im Gehirn vor, bei der Maus in Gehirn und Hoden. Dort taucht die Splice-Variante erst zwei Wochen nach der Geburt auf (Pruunsild und Timmusk, 2005). Das humane KChIP2-Ic Δ IIab ist in mehreren nichtneuronalen Geweben exprimiert, vorrangig in Herz und Hoden, im Zentralnervensystem konnte eine Expression dieser Isoform nicht nachgewiesen werden, in der Maus fehlte sie völlig.

Für KChIP2 wurden starke Effekte auf Kv4-Kanäle beschrieben (An *et al.*, 2000; Bähring *et al.*, 2001b; Decher *et al.*, 2004). So wird die A-Typ-Stromdichte bei Koexpression mit KChIP2.2 im heterologen Expressionssystem enorm erhöht, gleichzeitig wird eine Umverteilung der Kv4-Kanäle in die Peripherie der Zelle beobachtet (Bähring *et al.*, 2001b). Die initiale Phase der Inaktivierung wird verlangsamt, die Erholung aus der Inaktivierung dagegen enorm beschleunigt (Bähring *et al.*, 2001b). Ein weiterer Effekt von KChIP2.2 ist die Verschiebung der *steady-state*-Inaktivierung zu positiveren Werten, wodurch das Aktivierungsfenster des Kanals vergrößert wird (Bähring *et al.*, 2001b). Darüber hinaus wurde berichtet, dass KChIP2e die Stromdichte absenkt, die Zeitkonstante der Inaktivierung beschleunigt und die Erholung aus der Inaktivierung verlangsamt (Decher *et al.*, 2004). Die verschiedenen Wirkungen auf die Kv4-Kanäle gestatten eine sensible Einstellung der elektrophysiologischen Eigenschaften und erweitern somit das physiologische Repertoire dieser Kanal-Komplexe. Der im Herzen von Mensch und Hund beobachtete I_{TO} -Gradient korreliert nicht etwa mit unterschiedlichen Kanalmengen, sondern mit einem KChIP2-Gradienten (Rosati *et al.*, 2001). Eine KChIP2-Knockout-Maus zeigte einen nahezu vollständigen Verlust des I_{TO} (Kuo *et al.*, 2001).

Für KChIP3 wurden zwei häufige Splice-Varianten gefunden. KChIP3-Ia (auch KChIP3) ist im Menschen hauptsächlich im Zentralnervensystem, in den Nieren sowie in den Speichel- und Brustdrüsen exprimiert. In der Maus dagegen ist diese Variante

auf das Gehirn beschränkt, kommt dort aber, wie beim Menschen, in allen Regionen vor (Pruunsild und Timmusk, 2005). Außerdem wurde eine weitere Splice-Variante (KChIP3-Ib Δ II) beschrieben, die eine sehr breite Expression aufweist und unter anderem in Herz, Nieren und glatten sowie quergestreiften Muskeln nachgewiesen wurde (Pruunsild und Timmusk, 2005).

KChIP3 ist in elektrophysiologischen Experimenten ebenfalls in der Lage, die Kv4-Stromdichte zu erhöhen, die Erholung aus der Inaktivierung zu beschleunigen und die initiale Phase der Inaktivierung zu verlangsamen (An *et al.*, 2000). Für den Transport von Kv4.2 zur Plasmamembran, der in HEK293-Zellen von KChIP3 reguliert werden kann, spielt die Phosphorylierung durch GRK2 eine wichtige Rolle (Ruiz-Gomez *et al.*, 2007). KChIP3 ist identisch mit Calsenilin (Buxbaum *et al.*, 1998) und gleicht zu 99% dem Calcium-regulierten Transkriptionsfaktor DREAM (Carrion *et al.*, 1999). Calsenilin ist in der Lage, Calciumionen und Präseniline zu binden und die proteolytische Spaltung von Präsenilin 2 zu beeinflussen (Buxbaum *et al.*, 1998). Da Calsenilin darüber hinaus proapoptotisch wirken kann (Lilliehook *et al.*, 2002), wird spekuliert, dass die chronische Steigerung des Calsenilin-Levels einen Risikofaktor für die Alzheimer-Krankheit darstellt (Jo *et al.*, 2004).

DREAM war das erste bekannte EF-Hand-Protein, das DNA binden und die Transkription in Calcium-abhängiger Art und Weise regulieren kann (Mellstrom und Naranjo, 2001). Es wurde ursprünglich als Transkriptionsrepressor für das humane Prodynorphin-Gen entdeckt (Carrion *et al.*, 1998, 1999). In Abwesenheit von Calcium bindet DREAM mit hoher Affinität an eine regulatorische Sequenz des Prodynorphin-Gens, während es nach Calcium-Bindung eine Konformationsänderung erfährt, die diese Affinität drastisch reduziert (Osawa *et al.*, 2001).

Eine DREAM-Knockout-Maus zeigte eine normale Entwicklung ohne anatomische Defekte, darüber hinaus waren weder Herzfunktion, Präsenilin-Abbau noch Lernfähigkeit oder Erinnerungsvermögen verändert (Cheng *et al.*, 2002). Als gravierender Unterschied zum Wildtyp wurde allerdings eine starke Erhöhung der Schmerztoleranz festgestellt (Cheng *et al.*, 2002). Eine weitere Gruppe bestätigte die herabgesetzte Schmerzempfindlichkeit, war aber nicht in der Lage, das dafür vorgeschlagene Wirkmodell zu bestätigen (Lilliehook *et al.*, 2003). Diese zweite Gruppe fand stark vermin-

derte Mengen der Präsenilin-Abbauprodukte A β 40 und A β 42 im Cerebellum. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass Calsenilin *in vivo* in der Lage ist, die Spaltung der Präseniline durch γ -Sekretase zu beeinflussen. Außerdem wurde eine Erhöhung der Langzeitpotenzierung gemessen, die der Rolle des DREAM/Calsenilin/KChIP3 als Kv-Kanal-modulierendes Protein zugeschrieben wurde (Lilliehook *et al.*, 2003).

Von KChIP4 sind im Menschen sechs wichtige Isoformen bekannt. KCNIP4-Ia (auch KChIP4bl oder CALP₂₅₀) zeigt eine starke Expression, die in Mensch und Maus auf das Gehirn beschränkt ist (Pruunsild und Timmusk, 2005). KCNIP4-Ia Δ II (auch CALP₂₁₆) wurde ausschließlich im menschlichen Gehirn gefunden (Pruunsild und Timmusk, 2005). Im Maushirn wird es ebenso wie KCNIP4-Ib Δ II und KCNIP4-Ic Δ II nicht exprimiert, KCNIP4-Ib Δ II zeigt eine Expression in Gehirn, Rückenmark, Dünndarm und Magen, KCNIP4-Ic Δ II zeigt eine starke Expression, die auf die Nieren beschränkt ist (Pruunsild und Timmusk, 2005). KCNIP4-Id Δ II (auch KChIP4a) und KCNIP4-Ie Δ II wurden dagegen sowohl beim Menschen als auch bei der Maus ausschließlich im Zentralnervensystem gefunden (Pruunsild und Timmusk, 2005).

KChIP4 ist in der Lage, die Stromdichte von Kv4.2 zu erhöhen, die initiale Phase der Inaktivierung extrem zu verlangsamen und die Erholung aus der Inaktivierung zu beschleunigen (Morohashi *et al.*, 2002). Darüber hinaus bindet KChIP4 an Präsenilin 2, hat aber im Gegensatz zu KChIP3 keinen Einfluss auf die Stabilität des Präsenilin-Komplexes (Morohashi *et al.*, 2002).

1.4.2 Die Dipeptidylaminopeptidase-ähnlichen Proteine (DPPs)

Eine zweite Gruppe von akzessorischen Untereinheiten wurde mit den Dipeptidylaminopeptidase-ähnlichen Proteinen im Jahr 2003 entdeckt (Nadal *et al.*, 2003). Für zwei Mitglieder dieser Proteinfamilie (DPPX und DPPY), die jeweils in mehreren Splice-Varianten vorkommen (Wada *et al.*, 1992; Jerng *et al.*, 2004b; Chen *et al.*, 2006a; Nadal *et al.*, 2006; Takimoto *et al.*, 2006), wurde eine Interaktion mit Kv4 gezeigt (Nadal *et al.*, 2003; Jerng *et al.*, 2004b; Radicke *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2005; Zagha *et al.*, 2005). Beide Proteine wurden bei ihrer Erstbeschreibung nicht aufgrund ihrer

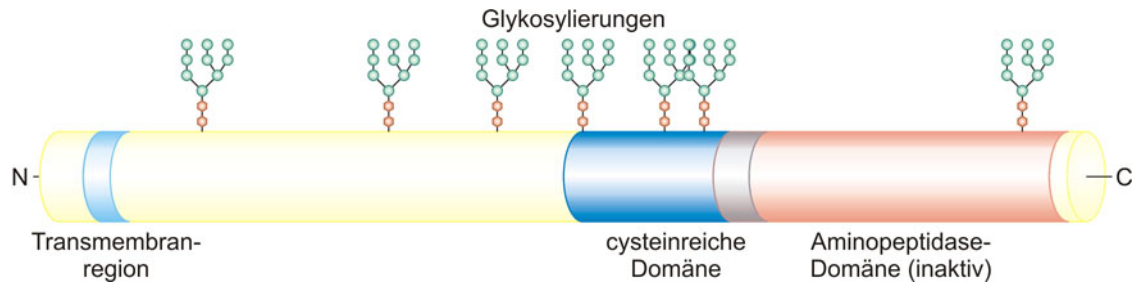


Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau der akzessorischen DPPX-S-Untereinheit.

DPPX verfügt über eine Transmembranregion (hellblau), die das Protein in einen kurzen cytoplasmatischen und einen langen extrazellulären Anteil untergliedert. Der extrazelluläre Teil enthält neben einer inaktiven Aminopeptidase-Domäne (altrosa) eine cysteinreiche Domäne (dunkelblau) und mehrere Glykosylierungsstellen. Von DPPX sind fünf humane Splice-Varianten bekannt, die sich in ihren N-Termini unterscheiden. Darüber hinaus existiert mit DPPY ein weiteres, nahe verwandtes Protein, das ebenfalls in der Lage ist, als akzessorische Untereinheit an Kv4-Kanäle zu binden. Von DPPY sind vier humane Splice-Varianten bekannt, die sich ebenfalls nur im N-Terminus unterscheiden.

Funktion als β -Untereinheiten von Kaliumkanälen, sondern wegen ihrer Homologie zu der Serin-Protease DPPIV identifiziert (Wada *et al.*, 1992; Allen *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2003). Allerdings konnte weder für DPPX noch für DPPY eine enzymatische Aktivität gezeigt werden (Wada *et al.*, 1992; Qi *et al.*, 2003).

Das zuerst entdeckte DPPX, welches auch als DPP6 bezeichnet wird, ist ein großes transmembranäres Protein, von dem in der Ratte fünf Isoformen bekannt sind (Nadal *et al.*, 2006). Während die große extrazelluläre Domäne in allen Splice-Varianten identisch ist und eine cysteinreiche Domäne sowie eine inaktive Aminopeptidasedomäne enthält, unterscheiden sich die Isoformen in ihren intrazellulären N-Termini (siehe [Abbildung 1.5](#)). Die Kristallstruktur der Extrazellulärdomäne des DPPX enthüllte eine achtblättrige β -Propellerstruktur und erhöhte Elektronendichten an sechs der sieben putativen Glykosylierungsstellen (Strop *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde in der Kristallstruktur eine veränderte Geometrie des aktiven Zentrums der Enzymdomäne festgestellt, so dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass entsprechende Substrate binden können (Strop *et al.*, 2004). Ähnliche Beobachtungen wurden von einer anderen Arbeitsgruppe gemacht, die eine starke Glykosylierung von DPPX in CHO-Zellen feststellte (Kin *et al.*, 2001). In enzymatischen Tests erwies sich die Aminopeptidase-Domäne als inaktiv, auch der Austausch des Aspartats gegen ein Serin, wodurch das aktive Zentrum des DPPIV simuliert wurde, führte nicht zu einer erhöhten enzymatischen Aktivität von DPPX (Kin *et al.*, 2001).

Eine DPPX-Variante ist auf das embryonale Stadium beschränkt (Hough *et al.*, 1998) und wird als DPPX-E (Nadal *et al.*, 2006) oder DPPX-O (Ren *et al.*, 2005) bezeichnet. Eine zweite Spliceform (DPPX-D) wird ausschließlich in dorsalen Wurzelganglien exprimiert (Nadal *et al.*, 2006). Während zwei weitere Isoformen, DPPX-L und DPPX-K (auch DPPX-N, Ren *et al.*, 2005), fast ausschließlich auf das Gehirn beschränkt sind (Wada *et al.*, 1992; Nadal *et al.*, 2006), wurde DPPX-S zusätzlich in den Nieren und den Geschlechtsorganen nachgewiesen (Wada *et al.*, 1992). Im Herzen wurde in verschiedenen Studien keine der DPPX-Isoformen gefunden (Wada *et al.*, 1992; Nadal *et al.*, 2006). Allerdings berichtete eine Gruppe von einer Steigerung der DPPX-Expression im Endokard von Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz (Radicke *et al.*, 2005). Wenn DPPX mit einem Kv4-Kanal koexprimiert wird, kommt es zu einer drastischen Erhöhung der Stromamplitude, zudem werden die Zeit bis zum Erreichen des Maximalstromes verkürzt und die Inaktivierung beschleunigt (Nadal *et al.*, 2003). Darüber hinaus werden sowohl die Aktivierung als auch die *steady-state*-Inaktivierung zu negativeren Potentialen verschoben und die Erholung aus der Inaktivierung stark beschleunigt. Da besonders die schnelle Aktivierung durch DPPX, die weder bei Kv4.2 allein noch in Gegenwart von KChIP beobachtet wird, an native neuronale Ströme erinnert, wird vermutet, dass DPPX ein Bestandteil nativer neuronaler Kv-Kanal-Komplexe ist (Nadal *et al.*, 2001, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass DPPX in COS-1-Zellen an die Zelloberfläche gelangt (Kin *et al.*, 2001) und in CHO-Zellen den Transport des Kv4.2-Kanals zur Zellmembran reguliert (Nadal *et al.*, 2003). Verglichen mit der Steigerung der Oberflächenexpression des Kv4.2-Kanals durch KChIPs (An *et al.*, 2000; Bähring *et al.*, 2001b), ist DPPX drei bis fünf mal so effizient (Nadal *et al.*, 2003).

Ein weiteres Mitglied der Familie der DPPs ist DPPY, das auch als DPP10 bezeichnet wird. Von diesem Protein sind im Menschen vier Splice-Varianten bekannt (Ren *et al.*, 2005), von denen je drei auch in der Ratte und in der Maus beschrieben sind (Takimoto *et al.*, 2006). Wie bei DPPX unterscheiden sich diese Isoformen lediglich im intrazellulären N-Terminus. DPPX und DPPY haben einen sehr ähnlichen Aufbau. So liegt die Homologie auf Aminosäure-Ebene in der Extrazellulärdomäne bei etwa 50 %, während die Extrazellulärdomänen von DPPY und DPPIV lediglich zu einem Drittel übereinstimmen. Ebenso wie DPPX ist DPPY glykosyliert (Chen *et al.*, 2006a) und

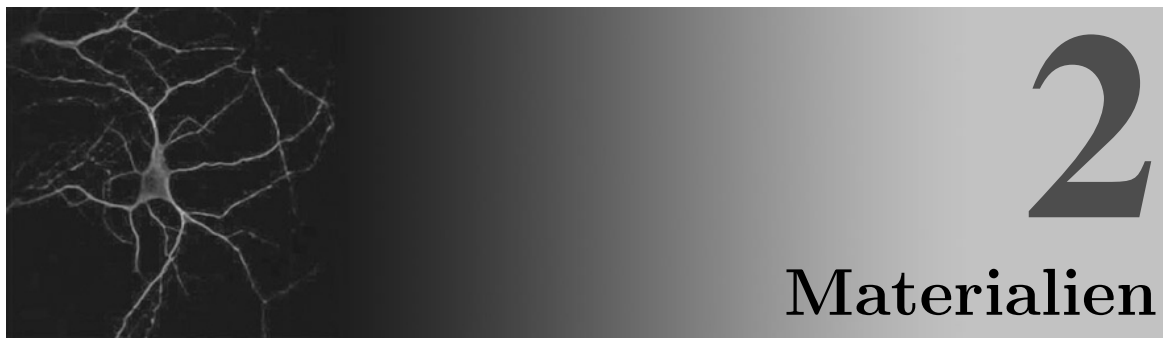
besitzt kein enzymatisch aktives Zentrum in der Aminopeptidase-Domäne (Qi *et al.*, 2003). Im Menschen wird DPPY im Gehirn, in den dorsalen Wurzelganglien, im *Ganglion nodosum*, in der Bauchspeicheldrüse, in den Nebennieren und in den Mandeln exprimiert (Allen *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006a). Obwohl DPPY ursprünglich in einem Asthma-Screening kloniert wurde (Allen *et al.*, 2003), konnte eine Expression in der Lunge nicht nachgewiesen werden (Ren *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006a). Darüber hinaus konnte keine Expression im Herzen und nur eine schwache Expression im Hippokampus gezeigt werden (Chen *et al.*, 2006a). Es gibt Hinweise darauf, dass sich die Expression des DPPY in verschiedenen Spezies unterscheidet. So konnte in den Nebennieren von Ratten keine Expression nachgewiesen werden (Takimoto *et al.*, 2006). Im humanen Gehirn konnten alle vier humanen und im Gehirn der Ratte alle drei Ratten-Splice-Varianten nachgewiesen werden (Takimoto *et al.*, 2006). Dagegen wurden in den Nebennieren und in der Bauchspeicheldrüse des Menschen nur die Splice-Varianten C und D gefunden, Gleiches gilt für die Bauchspeicheldrüse der Ratte (Takimoto *et al.*, 2006). In der Elektrophysiologie zeigen die untersuchten Splice-Varianten nahezu gleiche Effekte auf Kv4-Kanäle (Takimoto *et al.*, 2006). Ähnlich wie DPPX steigert DPPY die Stromdichte, verkürzt die Zeit bis zum Erreichen des Maximalstroms und beschleunigt die Inaktivierung und die Erholung aus der Inaktivierung (Jerng *et al.*, 2004b; Ren *et al.*, 2005). Analog zu DPPX wurde außerdem eine Verschiebung der *steady-state*-Inaktivierung von Kv4.2 und Kv4.3 um -20 mV beobachtet (Jerng *et al.*, 2004b; Ren *et al.*, 2005). Für Kv4.1 konnten die meisten dieser Effekte ebenfalls gezeigt werden, allerdings hatte die Koexpression von DPPY keinen Effekt auf die *steady-state*-Inaktivierung dieses Kanals (Jerng *et al.*, 2004b). Ebenso wie DPPX ist DPPY in der Lage, die Zelloberfläche zu erreichen und die Oberflächenexpression von Kv4.2 zu erhöhen (Jerng *et al.*, 2004b; Chen *et al.*, 2006a).

1.5 Zielsetzung

Der Einfluss akzessorischer β -Untereinheiten, wie KChIPs oder DPPs, auf das Transportverhalten von Kv4.2- α -Untereinheiten ist in heterologen Expressionssystemen gut dokumentiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle einer direkten funktio-

nellen Interaktion mit diesen β -Untereinheiten für die subzelluläre Lokalisation und die funktionelle Oberflächenexpression von Kv4.2- α -Untereinheiten in hippocampalen Neuronen aufzuklären.

- (1) Es sollte eine Knockdown-Strategie erarbeitet werden, mit deren Hilfe die Menge einzelner β -Untereinheiten in den Neuronen herunterreguliert und somit ihr Effekt auf die subzelluläre Lokalisation der Kv4.2- α -Untereinheit eliminiert werden kann.
- (2) Es sollten außerdem modifizierte Kanal-Untereinheiten erzeugt werden, die zum einen eine Bindungsdefizienz aufweisen und zum anderen eine einfache Visualisierung ihrer funktionellen Integration in die Zellmembran ermöglichen.



2.1 Chemikalien, Enzyme und Gebrauchsmaterialien

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen ist in [Anhang D](#) angegeben.

Enzyme, Kits, Nukleosidtriphosphate und sonstige Verbrauchsmaterialien wurden bei Ambion Europe (Großbritannien), GE Healthcare (München), BD Biosciences (Heidelberg), Invitrogen (Karlsruhe), Macherey-Nagel (Düren), MBI-Fermentas (St. Leon-Rot), Millipore (Schwalbach), New England Biolabs (Frankfurt a. M.), Qiagen (Hilden) und Stratagene (Niederlande) erworben. Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg), Invitrogen (Karlsruhe) oder Biomers (Ulm) synthetisiert, die synthetischen siRNAs wurden bei Ambion Europe (Großbritannien) bestellt.

Gibco Invitrogen Corporation (Karlsruhe) lieferte die Zellkulturmedien und die Transfektionsreagenzien. Darüber hinaus wurde Fugene6 (Roche Diagnostics, Penzberg) verwendet.

Als Zentrifugen dienten die Modelle 5415R bzw. 5804R (beide Eppendorf, Hamburg) und für Zellsuspensionen eine Minifuge GL (Heraeus, Hanau). Das Rollrad wurde von Gerlinde Kisker (Steinfurt) bezogen.

Geschützte Waren- und Gebrauchsnamen sind nicht besonders gekennzeichnet. Das Fehlen eines entsprechenden Hinweises berechtigt nicht zu der Annahme, dass es sich um freie Warenzeichen und Marken handelt.

pDsRed (Clontech, USA). Dieses Plasmid wurde zur Transfektionskontrolle eingesetzt.

hKv4.2 (AH009258, [Zhu et al., 1999](#)) Klon der humanen Kv4.2- α -Untereinheit. Das in diesem Plasmid kodierte Protein bildet die minimale Pore des Kv4.2-Kanals.

hKv4.2wt-HA. In diesen humanen Klon der Kv4.2- α -Untereinheit wurde ein Hämagglutinin-Epitop (HA-Epitop, Aminosäuresequenz -YPYDVPDYA-) in die erste extrazelluläre Schleife (zwischen Aminosäure 216 und 217) kloniert ([Callsen et al., 2005](#)). Dieses Epitop ist immunzytochemisch im Extrazellulärraum zugänglich, wenn diese Kanaluntereinheit in die Plasmamembran integriert ist.

hKv4.2A14K-HA. Dieses Konstrukt enthält zusätzlich zum extrazellulären HA-Epitop eine Punktmutation, die die Interaktion mit KChIP2 verhindert ([Callsen et al., 2005](#)).

hKv4.2wt-HA-EGFP. Dieser Kanal entstand durch Fusion von EGFP an den C-Terminus von hKv4.2wt-HA.

hKv4.2F11K-HA-EGFP. In das hKv4.2wt-HA-EGFP wurde die Mutation F11K eingefügt, die die KChIP2-Interaktion verhindert ([Callsen et al., 2005](#)).

hKv4.2A14K-HA-EGFP. In das hKv4.2wt-HA-EGFP wurde die Mutation A14K eingefügt, die die KChIP2-Interaktion verhindert ([Callsen et al., 2005](#)).

hKv4.2-600 Δ -HA-EGFP. Durch Deletion der letzten 30 Aminosäuren des Kanals entstand ein Konstrukt, das nicht mehr in der Lage war, das Transportprotein Kif17 zu binden ([Chu et al., 2006](#)).

hKv4.3wt-HA. In den hKv4.3-Kanal (NM_004980, [Serodio et al., 1996](#)) wurde analog zu hKv4.2wt-HA ein HA-Signal eingefügt.

Die folgenden akzessorischen β -Untereinheiten wurden in dieser Arbeit verwendet.

hKChIP2.1 (NM_014591, [An et al., 2000](#)).

hKChIP2.2 (NM_173191, [Bähring et al., 2001b](#)).

hDPPX-S (NM_001936, [Wada et al., 1992](#)). In dieser Arbeit wurde ausschließlich die kurze Splice-Variante hDPPX-S verwendet. Im Folgenden wird diese nur noch als hDPPX bezeichnet.

Um die verwendeten Kanaluntereinheiten leichter untersuchen zu können, wurden die folgenden Fusionsproteine mit dem destabilisierten Fluoreszenzmarker d2EGFP hergestellt. Dabei wurden die humanen Zielproteine am C-Terminus markiert. Das d2EGFP selbst ist ebenfalls ein Fusionsprotein aus EGFP und der PEST-Sequenz der murinen Ornithindecaboxylase (MODC). Die PEST-Sequenz markiert das Fusionsprotein für die Degradation. Dadurch haben diese Proteine eine Halbwertszeit von nur zwei Stunden (Li *et al.*, 1998).

hKv4.2-d2EGFP.

hKChIP1-d2EGFP.

hKChIP2.1-d2EGFP.

hKChIP3.1-d2EGFP.

hKChIP4.1-d2EGFP.

hDPPX-d2EGFP.

Analoge Fusionsproteine wurden mit den murinen Kanaluntereinheiten hergestellt. Hier kam allerdings der Fluoreszenzmarker EGFP zum Einsatz. Die Fusion des EGFP erfolgte an den C-Terminus der murinen Kanaluntereinheiten.

mKv4.2-EGFP.

mKChIP1-EGFP.

mKChIP2.1-EGFP.

mKChIP3.1-EGFP.

mKChIP4.1-EGFP.

mDPPX-EGFP.

2.6 Größenstandards

Smart DNA Ladder	14 Banden von 200-10.000 bp mit unterschiedlichen Intensitäten zur Abschätzung der DNA-Konzentration (15-100 ng) (Eurogentec, Köln).
MultiMark Proteinstandard	9 Banden von 3-185 kDa mit unterschiedlichen Farben (Invitrogen, Karlsruhe).

2.7 Antikörper

Erstantikörper

anti-HA	1:500 für Westernblot, monoklonaler Antikörper aus Ratte, Klon 3F10, gerichtet gegen das Epitop YPYDVDPYA (Roche Diagnostics, Penzberg)
panKChIP	1:500 für Westernblot, polyklonales Serum aus Kaninchen (Callsen <i>et al.</i> , 2005)
anti-MAP2	1:1.000 für Immunzytochemie, polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, gerichtet gegen MAP2 aus dem Rattenhirn (Chemicon, Großbritannien)
anti-NFH	1:500 für Immunzytochemie, monoklonaler Antikörper aus Maus (Klon N52), gerichtet gegen die H-Kette aus Schwein (Chemicon, Großbritannien)
anti-GFP	1:1.000 für Westernblot, Mischung zweier monoklonaler GFP-Antikörper (Klone 7.1 und 13.1) aus Maus (Roche Diagnostics, Penzberg)

Zweitantikörper

anti-Maus Alexa546	1:2.500, (IgG ₁) aus Ziege, affinitätsgereinigt und kreuzadsorbiert (Invitrogen, Karlsruhe)
anti-Maus Cy5	1:1.000, (H+L) aus Esel, affinitätsgereinigt und kreuzadsorbiert (Jackson Immuno Research Europe, Großbritannien)
anti-Kaninchen Cy3	1:2.000, (H+L) aus Esel, affinitätsgereinigt und kreuzadsorbiert (Jackson Immuno Research Europe, Großbritannien)
anti-Ratte Cy5	1:2.000, (H+L) aus Maus, affinitätsgereinigt und kreuzadsorbiert (Jackson Immuno Research Europe, Großbritannien)
anti-Ratte Alexa546	1:2.500, (H+L) aus Ziege, affinitätsgereinigt und kreuzadsorbiert (Invitrogen, Karlsruhe)
anti-Maus HRP	1:5.000, aus Schaf (Dianova, Hamburg)
anti-Ratte HRP	1:1.000, F(ab'2) Fragment aus Ziege (Dianova, Hamburg)
anti-Kaninchen HRP	1:5.000, aus Ziege (Vector Laboratories, USA)

2.8 Zelllinien

CHO	Dehydrofulat-Reduktase-defiziente Hamster-Zelllinie (DSMZ Nr. ACC 126) aus <i>Cricetulus griseus</i> .
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen (DSMZ Nr. ACC 305).

Für die Herstellung stabiler Zelllinien wurden Zellen verwendet, die eine vorgeformte Integrationsstelle besitzen, wodurch das Einbringen zusätzlicher DNA ins Genom erleichtert wird. Diese Zellen wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

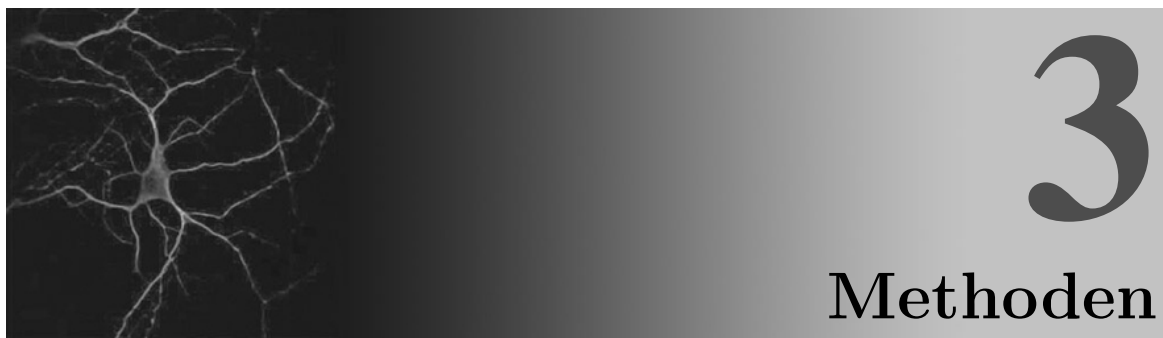
HEK293-Flp-In	Humane embryonale Nierenzellen
3T3-Flp-In	Embryonale Mausfibroblasten

2.9 Tiere zur Gewebeentnahme

Afrikanischer Krallenfrosch (*Xenopus laevis*). Die aus weiblichen afrikanischen Krallenfröschen gewonnenen Oozyten wurden für die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme verwendet. Um Kanalproteine zu exprimieren, wurde entsprechende cRNA in die Eizellen injiziert.

Maus (*Mus musculus*). Für die Kultur von murinen hippocampalen Neuronen wurden neugeborene C57/BL6-Mäuse (P0) verwendet.

Ratte (*Rattus norvegicus*). Für die Kultur von hippocampalen Rattenneuronen wurden embryonale Wistar-Ratten an Tag 18 nach der Begattung (E18) verwendet.



3.1 Molekularbiologische Methoden

In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Methoden verwendet, um DNA zu amplifizieren und zu modifizieren.

3.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Aus einer bei -80°C gelagerten Dauerkultur von *E.-coli*-XL1-Blue-Zellen wurde ein Aliquot entnommen, auf einer LB-Platte ohne Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einzelnen Kolonien dieser Platte wurden Vorkulturen (3 ml LB-Medium) gemacht, aus denen dann 50-ml-Kulturen angeimpft wurden. Die Bakterienkulturen wurden bei 37°C und 225 upm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 10 Minuten auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (10 min, $5.000\times g$, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 % des ursprünglichen Kulturvolumens eiskalten TSS-Puffers aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde sofort danach in 500- μl -Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

3.1.2 Transformation von Bakterien

Für die Transformation der kompetenten *E.-coli*-XL1-Blue-Zellen wurden die gefrorenen Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Für einen Transformationsansatz wurde die entsprechende DNA mit 20 μl 5 $\times$ KCM gemischt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 μl gebracht. Nach Zugabe von 100 μl aufgetauter Bakteriensuspension

und vorsichtigem Mischen inkubierten die Ansätze 20 Minuten auf Eis. Nach einem Hitzeschock (5 min, 37°C) wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium ohne Antibiotikum zum Ansatz gegeben, es folgte eine weitere Inkubation (40 min, 37°C). Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Platten mit einem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für eine weitere Vermehrung der Bakterien wurden einzelne Kolonien gepickt. Die Platten wurden bei 4°C gelagert.

3.1.3 Präparation von DNA aus Bakterienkulturen

Um schnell große Mengen eines Plasmid zu erhalten, kamen Bakterienkulturen zum Einsatz. Plasmide verfügen normalerweise über mindestens ein Resistenzgen, so dass durch die Gegenwart eines Antibiotikums ein Selektionsdruck erzeugt werden kann. Durch die Anwesenheit des Antibiotikums wird sichergestellt, dass sich nur Bakterien vermehren können, die das Plasmid tragen. Darüber hinaus haben die meisten heute verwendeten Plasmide einen *high-copy*-Promotor, der dazu führt, dass sich in einem einzelnen Bakterium mehrere hundert Plasmide ansammeln.

3.1.3.1 Präparation aus 3-ml-Bakterienkulturen (Miniprep)

Für die Minipräparation wurden 3 ml LB-Medium unter Zusatz eines entsprechenden Antibiotikums mit einer Einzelkolonie des plasmidtragenden *E.-coli*-Stammes angeimpft und über Nacht im Wärmeschüttler inkubiert (37°C, 225 upm). Anschließend wurden 2 ml dieser Kultur mit einem Miniprep-Kit (GE Healthcare, München) aufgearbeitet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl H₂O aufgenommen und bei 4°C gelagert.

3.1.3.2 Präparation aus 50-ml-Bakterienkulturen (Midiprep)

Die Präparation der DNA aus einer 50-ml-Kultur wurde mit dem Nucleobond AX-System (Macherey-Nagel, Düren) nach dem entsprechenden Protokoll durchgeführt. Die Ausbeute der DNA wurde photometrisch (siehe [Abschnitt 3.1.6.2](#)) bestimmt und die Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt.

3.1.4 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA erfolgte nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (siehe [Abschnitt 3.1.6.1](#)) und dem Ausschneiden des DNA-haltigen Gelstücks. Nach Auflösen der Gelmatrix in 300 μl *Capture*-Puffer (10 min bei 60°C) wurde die DNA über GFX-Säulen (alles Amersham-Bioscience, Freiburg) aufgereinigt.

3.1.5 *In-vitro*-Transkription

Um das Risiko der Degradation der RNA zu minimieren, wurden alle Arbeiten unter Verwendung entsprechender Vorschriften durchgeführt. Glasgeräte wurden über Nacht ausgebacken (240°C), Einweggeräte aus gesonderten Vorräten genommen und wässrige Lösungen mit Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser angesetzt. Es kamen ausschließlich Filterspitzen zum Einsatz.

Durch Restriktionsverdau (siehe [Abschnitt 3.1.7.1](#)) wurden 2 μg des entsprechenden Vektors in einem Volumen von 100 μl linearisiert. Nach einer Extraktion mit Phenol und Chloroform wurde die DNA durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) sowie 3 Volumen absolutem Ethanol für eine Stunde bei -80°C gefällt. Das nach der Zentrifugation verbleibende Pellet wurde mit 500 μl 70% Ethanol gewaschen und die DNA in 6,5 μl DEPC-Wasser aufgenommen.

Nach der Aufreinigung folgte die *in-vitro*-Transkription der mRNA. Hierzu wurden nach Herstellerangaben 6 μl der aufgereinigten DNA-Lösung mit Hilfe des mMESSAGE mMACHINE *in vitro* Transcription Kit (Ambion, USA) transkribiert. Die synthetisierte RNA wurde einer Extraktion mit Phenol und Chloroform unterzogen, gefällt (siehe oben), in 20 μl DEPC-Wasser aufgenommen und bei 57°C gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.1.6 Nachweis von Nukleinsäuren

Für viele Versuche ist die Qualität und Quantität der Nukleinsäuren von entscheidender Bedeutung. Die experimentellen Möglichkeiten, eine Aussage über die Eigenschaf-

ten der Nukleinsäuren zu treffen, reichen dabei von der einfachen Konzentrationsbestimmung im Photometer bis zur Sequenzierung.

3.1.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Identifizierung und zur Analyse von DNA-Fragmenten wurden diese je nach Größe in horizontalen Agarose-Gelen (1-2% (w/v) Agarose) in TAE-Puffer aufgetrennt. TAE diente ebenfalls als Laufpuffer. Zum Nachweis der DNA wurde den Gelen 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid zugesetzt, welches in DNA interkaliert und diese unter UV-Licht (356 nm) sichtbar macht (Gel-Dokumentationssystem BioDoc II, Biometra, Göttingen).

3.1.6.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Ausbeute der präparierten DNA (siehe [Abschnitt 3.1.3.2](#)) wurde mit dem GeneQuant-RNA/DNA Calculator (Amersham-Bioscience, Freiburg) bestimmt. Die DNA-Lösung wurde mit einer ausreichenden Menge Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm gegen Wasser als Blindwert gemessen. Das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm gilt als Maß für die Reinheit der DNA-Präparation.

3.1.6.3 Konzentrationsbestimmung der RNA durch Fluoreszenzmessung

Die Konzentration von *in-vitro*-transkribierter RNA wurde mit dem RiboGreen RNA Quantification Kit (Molecular Probes, USA) bestimmt. Die Fluoreszenzmessung ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$, Perkin Elmer LS 50B) der mit RiboGreen versetzten und in TE-Puffer ausreichend verdünnten RNA-Lösung (siehe [Abschnitt 3.1.5](#)) erfolgte gegen den mitgelieferten RNA-Standard.

3.1.6.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde mit dem ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing ready Kit und dem ABI-377-DNA-Sequenziergerät (Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim) durchgeführt. Die Aufarbeitung der Sequenzierproben und die Bedienung

des Sequenziergerätes erfolgten durch die Mitarbeiter des Sequenzierservice-Labors des ZMNH.

3.1.7 Modifikationen von DNA

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden die für Kanaluntereinheiten kodierenden cDNAs manipuliert, um so gezielt Änderungen in die Kanalproteine einzufügen.

3.1.7.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Da Restriktionsendonukleasen von verschiedenen Herstellern angeboten werden und unterschiedliche Anforderungen an die Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Ionenkonzentrationen) stellen, ist es schwierig, ein allgemein gültiges Protokoll für die Restriktionsverdaue anzugeben. Verallgemeinert lässt sich sagen, dass bei der Wahl von Puffern, Enzymmenge und Reaktionstemperatur auf die Herstellerangaben zurückgegriffen wurde. Die Reaktion erfolgte für etwa 2 Stunden, anschließend wurde der Ansatz nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert, über eine Säule gereinigt oder direkt in einem Agarosegel aufgetrennt (siehe [Abschnitt 3.1.6.1](#)). Bei gleichzeitigem Verdau mit unterschiedlichen Enzymen wurden die Pufferbedingungen nach Herstellerangaben angepasst. War ein Parallelverdau aufgrund unterschiedlicher Anforderungen der Enzyme nicht möglich, wurde sequentiell verdaut.

3.1.7.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Terminale Phosphatgruppen wurden mit alkalischer Phosphatase entfernt. Dazu wurde die DNA mit CIAP (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) für 2 Minuten bei 37°C inkubiert.

3.1.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Das einzufügende DNA-Fragment wurde im Überschuss mit dem geschnittenen Vektor gemischt und in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l mit 1 *unit* T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) inkubiert. Die Reaktion erfolgte entweder 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C.

3.1.7.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 25 μl durchgeführt. Es gibt eine Vielzahl von PCR-Anwendungen, die je nach Ziel des Experiments unterschiedliche Polymerasen erfordern. In der vorliegenden Arbeit wurden Polymerasen mit und ohne Korrekturlesefunktion sowie Gemische aus beiden unter den unterschiedlichsten Bedingungen verwendet. Daher ist es schwierig, ein allgemein gültiges PCR-Protokoll anzugeben. Stellvertretend soll hier ein typischer PCR-Ansatz für eine Polymerase ohne Korrekturlesefunktion wiedergegeben werden:

- 20 bis 50 ng DNA,
- 25 pM 5'-Primer,
- 25 pM 3'-Primer,
- 1 mM dNTPs (Amersham-Bioscience, Freiburg),
- 2,5 μl 10-fach PCR-Puffer,
- 2,5 mM MgCl_2 ,
- 1 μl DMSO,
- 0,5 bis 1 *unit* Taq-Polymerase und
- Wasser ad 25 μl .

Das verwendete Programm des Thermocyclers war abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide und von der Länge des zu amplifizierenden

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Prädenaturierung	95°C	30 s	1×
Denaturierung	95°C	30 s	} 25×
Hybridisierung	$T_m - 5^\circ\text{C}$	30 s	
Elongation	72°C	1 min/kb	
Abschluss-Synthese	72°C	2 min	1×

Tabelle 3.1: Standardprogramm für die PCR.

Dieses beispielhafte Programm besteht aus 25 Amplifikationszyklen. Die Schmelztemperatur T_m muss je nach verwendeten Primern variiert werden, mit Erhöhung dieser Temperatur steigt die Spezifität der PCR. Eine zweite Variable ist die Elongationszeit. Sie ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments und von der Art der verwendeten DNA-Polymerase.

DNA-Fragmentes. War die Schmelztemperatur der verwendeten Primer unterschiedlich, wurde im PCR-Programm die niedrigere Temperatur verwendet. Als Standardprogramm für die PCR diente das Schema in [Tabelle 3.1](#).

3.1.8 *In-vitro*-Mutagenese

Punktmutationen und rekombinante DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der PCR-Technik erzeugt.

3.1.8.1 Mutation einer Base

Zur Einführung der verwendeten Punktmutationen in den Kv4.2-N-Terminus wurde eine *overlap*-Strategie verwendet. Dazu wurden zwei Primer designt, die komplementär zur Umgebung der zu mutierenden Stelle waren, aber die Mutation trugen. Darüber hinaus wurden zwei flankierende Primer verwendet. In zwei parallelen PCR-Reaktionen, in denen jeweils ein mutierter und der korrespondierende flankierende Primer verwendet wurden, entstanden DNA-Fragmente, die die Mutation trugen und im Mutationsbereich überlappend waren. Aufgrund dieser Tatsache konnten in einer zweiten Reaktion die in den beiden vorhergehenden PCRs entstandenen DNA-Fragmente miteinander hybridisieren und ein neues langes DNA-Fragment generieren, welches die Mutation trug und mit klassischen Methoden in einen Vektor kloniert werden konnte. Durch Sequenzierung wurden das Vorhandensein der Mutation nachgewiesen und Fehler an anderer Stelle ausgeschlossen.

3.1.8.2 Deletion mehrerer Basen

Die Deletion mehrerer Basen folgte dem Prinzip, nach dem einzelne Mutationen in ein Plasmid eingefügt werden können (siehe [Abschnitt 3.1.8.1](#)). An Stelle der mutierten Primer wurden Primer verwendet, die komplementär zu den die Deletion flankierenden Bereichen waren.

3.1.9 Computergestützte Sequenzanalysen

Die Analyse von DNA-Sequenzen erfolgte mit den Programmen Seqman (DNASTar, USA), BioEdit (Hall, 1999) und VectorNTI (Invitrogen, Karlsruhe). Datenbankrecherchen wurden mit Medline, BLASTN, BLASTP vom NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov) und ExPASy vom SIB (*Swiss Institute for Bioinformatics*, www.expasy.org) ausgeführt.

3.1.10 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz ist ein Phänomen, das Anfang der 90er Jahre durch Zufall entdeckt wurde (Napoli *et al.*, 1990). In den folgenden Jahren wurde der molekulare Mechanismus weitgehend aufgeklärt (Fire *et al.*, 1998; Tuschl *et al.*, 1999). Obwohl inzwischen einige gute Übersichtsartikel existieren (Hannon, 2002; Arenz und Schepers, 2003; Dykxhoorn *et al.*, 2003), soll hier kurz auf den Mechanismus eingegangen werden.

Mittels RNA-Interferenz können mRNAs spezifisch zerstört werden, so dass die Bildung des zugehörigen Proteins unterbunden wird. Die spezifischen Auslöser für die

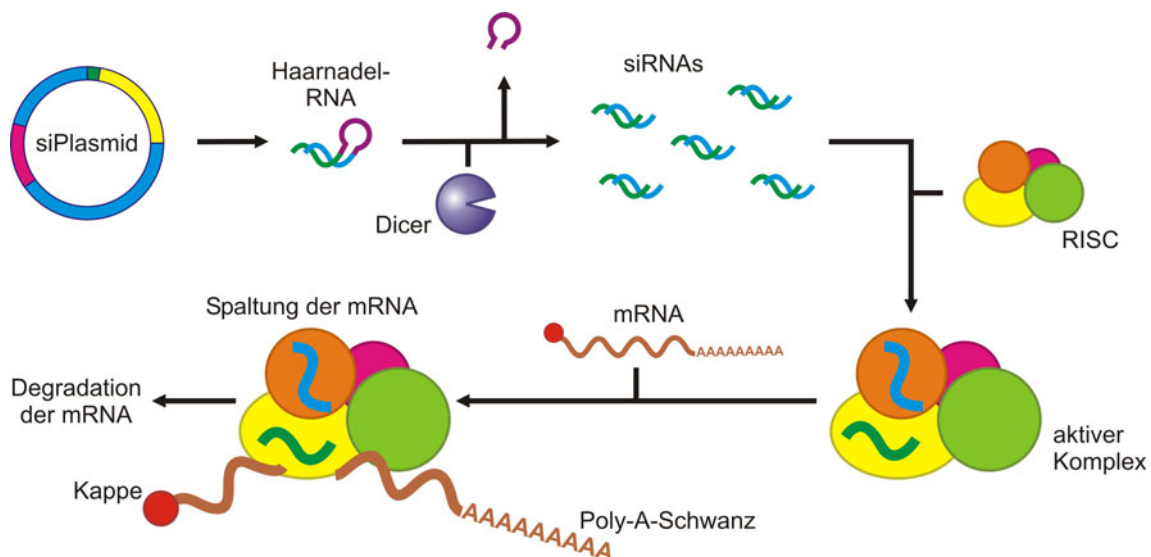


Abbildung 3.1: Mechanismus der RNA-Interferenz.

Für das Auslösen einer RNA-Interferenz werden siRNAs benötigt. In dieser Arbeit wurden synthetische siRNAs eingesetzt. Außerdem wurden siPlasmide verwendet, die Haarnadel-Konstrukte erzeugten, die durch Dicer zu siRNAs abgebaut wurden. Die RNA-Interferenz wird durch einen aktiven Komplex aus RISC und der siRNA vermittelt. Dabei kommt es zur Hybridisierung der siRNA mit ihrer komplementären Zielsequenz in der mRNA, woraufhin diese vom RISC-Komplex gespalten wird. Die durch diese Spaltung entstehenden ungeschützten Enden sind Angriffspunkte für endogene RNasen, die die mRNA effizient abbauen.

RNA-Interferenz sind kurze doppelsträngige RNAs, die am 3'-Ende einen Zwei-Basen-Überhang besitzen. Die Länge dieser sogenannten siRNAs beträgt 21 bis 23 Nukleotide (Elbashir *et al.*, 2001). Neben der direkten Applikation von siRNAs kann jede beliebige doppelsträngige RNA RNA-Interferenz auslösen, muss dazu allerdings von dem Enzym Dicer zu siRNAs abgebaut werden (Zamore *et al.*, 2000). Die siRNAs werden in einen Enzymkomplex (RISC) integriert, der in der Lage ist, mRNAs zu spalten, die komplementär zu den siRNAs sind (Elbashir *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl doppelsträngige synthetische siRNAs als auch durch Transkription aus Plasmiden erzeugte Haarnadel-Konstrukte verwendet. Letztere müssen durch Dicer prozessiert werden, um in der Zelle als wirksame siRNAs vorzuliegen.

3.2 Zellbiologische Methoden

Durch die Verwendung von kultivierten Zellen war es möglich, die verwendeten Proteine in einer physiologischen Umgebung zu untersuchen.

3.2.1 Zellkultur

Für diese Arbeit wurden sowohl immortalisierte Krebszelllinien als auch primäre Neuronen verwendet. Im Gegensatz zu immortalisierten Linien ist die Kultur von Primärzellen aufwendiger, durch die begrenzte Lebensdauer müssen in regelmäßigen Abständen neue Zellen aus Versuchstieren gewonnen werden. Dafür entsprechen Primärzellen deutlich eher den nativen Zellen im Organismus.

3.2.1.1 Routinehaltung von immortalisierten Zellen

Die Zellen wurden in 7 ml Nährmedium in 25 cm² großen Zellkulturflaschen (Nunc, Dänemark) kultiviert. Als Nährmedien dienten MEM-alpha-Medium für die CHO-Zellen und Dulbeccos MEM/NUT-Mix F12 für 3T3- und HEK293-Zellen (beide Gibco, Invitrogen, Karlsruhe), denen jeweils 10 % fetales Kälberserum (v/v) (Biochrom, Berlin) und 1 % PSG-Lösung (v/v) (Invitrogen, Karlsruhe) zugesetzt wurden.

Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂). Bei einer Konfluenz von 80 bis 100% wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums mit 1 bis 2 ml Trypsin/EDTA (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) vom Untergrund gelöst. Nach 2 bis 5 Minuten wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 5 ml frischem Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15-ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert (2 min, 1.200 upm). Das Sediment wurde in frischem Medium resuspendiert und die Zellkonzentration mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die fortlaufende Kultur wurden die Zellen in der Regel mit einer Dichte von $4 \cdot 10^4$ Zellen je ml ausgesät und hatten nach 2 bis 3 Tagen im Brutschrank eine ausreichende Dichte erreicht, so dass sie erneut passagiert werden konnten.

3.2.1.2 Primärkultur hippokampaler Neuronen

Schwangere Wistar-Ratten wurden 18 Tage nach der Begattung (E18) mit Trockeneis betäubt und dekapitiert. Das Fell der Ratten wurde desinfiziert, der Bauchraum geöffnet und die beiden Hörner des Uterus wurden entfernt. Die Embryonen wurden herauspräpariert und ebenfalls dekapitiert. Anschließend wurden die Gehirne aus den Schädeln entfernt, die Hippokampi wurden präpariert und von den sie umgebenden Hirnhäuten befreit. Die Gehirne lagerten während der Präparation in HBSS mit PS. Anschließend wurden die Hippokampi in einem 15-ml-Röhrchen gesammelt und in einem Gesamtvolumen von 5 ml mit 0,5 ml 2,5%iger Trypsin/EDTA-Lösung verdaut. Nach dem Entfernen der Protease durch mehrere Waschschrte wurden die Hippokampi mit rund geschmolzenen Pasteur-Pipetten trituriert. Die Neuronen wurden mit Plattierungsmedium auf $1,5 \cdot 10^5$ Zellen je ml eingestellt und auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausgesät. Nach 3 Stunden wurde das Plattierungsmedium gegen komplettiertes Neurobasalmedium getauscht. Das Medium wurde zweimal in der Woche gewechselt. Dabei enthielt das neu zugegebene Medium kein Glutamat, dafür aber AraC (5 μ M). Es wurde lediglich die Hälfte des Mediums entfernt und durch neues ersetzt, um von den kultivierten Zellen abgegebene Faktoren nicht vollständig auszuwaschen. Die Zeit, die sich die Neuronen in Kultur befanden, wird in DIV (Tagen in Kultur) angegeben.

3.2.2 Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen. Auf diese Weise können Zellen zum Beispiel gezwungen werden, ein spezifisches Protein zu exprimieren. Auch wenn die Transfektion im Detail noch nicht vollständig verstanden ist, stellt sie eine sehr wertvolle experimentelle Methode dar.

3.2.2.1 Transfektion von immortalisierten Zellen

Immortalisierte Zellen wurden mit Hilfe der Lipofektion transfiziert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Komplexbildung zwischen negativ geladenen Nukleinsäuren und positiv geladenen Reagenzien und der Verschmelzung dieser Komplexe mit der Zellmembran. Als Transfektionsreagenzien kamen LipofectAMINE bzw. dessen Nachfolgepräparat LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) und Fugene6 (Roche Diagnostics, Penzberg) zum Einsatz. Die Transfektion erfolgte einen Tag nach Ausplattieren der Zellen in den Kulturschälchen. Die Menge des einzusetzenden Transfektionsreagenzes war abhängig von der Größe des Kulturschälchens, der DNA-Menge und der Zelldichte. Für die Lipofektion wurden 1 bis 6 μg DNA und 1 bis 5 μl Transfektionsreagenz jeweils mit 150 μl OPTI-MEM I (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) verdünnt. Die beiden verdünnten Lösungen wurden nach 5 Minuten vereinigt, vorsichtig gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung auf die Zellen gegeben, deren Medium zuvor gegen OPTI-MEM I ausgetauscht worden war. Nach einer Transfektionszeit von 1 bis 5 Stunden unter Standardbedingungen im Brutschrank wurde die Transfektionslösung durch Vollmedium für den entsprechenden Zelltyp ersetzt (siehe [Abschnitt 3.2.1.1](#)). Die Zellen wurden 1 bis 2 Tage nach der Transfektion für die entsprechenden Experimente genutzt.

3.2.2.2 Erzeugung stabil transfizierter Zelllinien

Stabile Zelllinien wurden im Flp-In-Hintergrund (Invitrogen, Karlsruhe) erzeugt. Diese Zellen besitzen eine vorgefertigte Rekombinationsstelle im Genom. Darüber hinaus tragen sie eine Zeocin-Resistenz. Das einzubringende Gen wurde in einen Vektor kloniert,

der ebenfalls über diese Rekombinationsstelle verfügte. Dieser Vektor besaß zusätzlich ein Gen für eine Hygromycin-Resistenz, der allerdings das Startcodon fehlte. Für die Herstellung stabiler Zelllinien wurden die Flp-In-Zellen mit dem einzubringenden Gen im Rekombinationsvektor pcDNA5/FRT bzw. pEF5/FRT/V5 und einem Vektor zur Expression einer FLP-Rekombinase (pOG44) kotransfiziert. Durch die Expression der Rekombinase kam es zur Integration des pcDNA5/FRT- bzw. pEF5/FRT/V5-Plasmids in die vorgefertigte Rekombinationsstelle. Im Zuge dieser Integration gelangte das Hygromycin-Resistenz-Gen im Leseraster hinter das Startcodon des Zeocin-Resistenz-Gens. Auf diese Weise wechselte die Resistenz der Flp-In-Zellen, die das Plasmid in die entsprechende Stelle ihres Genoms integriert hatten, von Zeocin auf Hygromycin, was eine einfache Selektion der stabilen Zellen ermöglichte. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte wie in [Abschnitt 3.2.1.1](#) beschrieben.

3.2.2.3 Transfektion primärer Neuronen mit Calciumphosphat

Die Transfektion mit Calciumphosphat stellt eine schonende, effiziente und kostengünstige Methode zur Transfektion von Zellen dar. Die Neuronen wurden meist zwischen Tag 7 und Tag 10 transfiziert, da hier die beste Transfektionseffizienz erreicht wurde. Für eine Transfektion wurden 2 μg DNA mit Wasser auf 9 μl aufgefüllt. Anschließend wurden 3,125 μl einer frisch angesetzten 1 M Calciumchlorid-Lösung zugegeben und solange auf und ab pipettiert, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Daraufhin wurden 12,5 μl zweifach HBS-Puffer zugegeben und der Ansatz durch vorsichtiges Pipettieren von Luftblasen gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsmix auf Neuronen gegeben, denen zuvor ein Großteil des adaptierten Mediums abgenommen worden war. Nach einer einstündigen Inkubation (37°C, 5 % CO₂) wurde das Medium mit dem Transfektionsmix abgenommen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in dem vor der Transfektion abgenommenen, adaptierten Medium weiter kultiviert. Die Zellen wurden ein bis zwei Tage nach der Transfektion weiter verwendet.

3.2.3 Immunzytochemie

Mittels Immunzytochemie werden Proteine mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern markiert („gefärbt“), um ihre Lokalisation innerhalb der Zelle zu visualisieren. Dazu werden Antikörper verwendet, von denen ein Erstantikörper das Zielprotein direkt erkennt, während ein Zweitantikörper den Erstantikörper erkennt und eine Reportergruppe trägt. Neben dieser häufigsten Konstellation gibt es aber auch immunzytochemische Färbungen, die mit weniger oder mehr verschiedenen Antikörpern funktionieren. In der vorliegenden Arbeit wurden fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper verwendet, wodurch streng genommen nicht von Immunzytochemie, sondern von Immunfluoreszenz gesprochen werden müsste. Da diese Trennung in der Literatur jedoch nicht konsequent durchgeführt wird, werden hier beide Begriffe gleichbedeutend verwendet.

3.2.3.1 Immunzytochemische Färbungen intrazellulärer Epitope

Die zu färbenden Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit HistoFix (Roth, Karlsruhe) fixiert (12 min bei RT). Die Neuronen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Triton X-100 für 3 Minuten permeabilisiert. Daraufhin wurden die Deckgläschen für eine Stunde mit BSA-Lösung blockiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit dem Erstantikörper in BSA-Lösung für mehrere Stunden inkubiert (2 bis 3 h bei RT oder über Nacht bei 4°C). Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen und mit dem verdünnten Zweitantikörper (in 2 % BSA in PBS) im Dunkeln inkubiert (1 bis 2 h bei RT). Die Deckgläschen wurden dreimal mit PBS und einmal mit Wasser gewaschen und anschließend mit Aqua-Poly/Mount (Polysciences, USA) auf Objektträgern eingedeckelt.

3.2.3.2 Immunzytochemischer Nachweis extrazellulärer Epitope in unpermeabilisierten Zellen

Die zu färbenden Zellen wurden für 20 Minuten bei 4°C mit dem Antikörper in HEPES-Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit HistoFix (Roth, Karlsruhe) fixiert (12 min bei RT). Der weitere Ablauf entspricht dem in [Abschnitt 3.2.3.1](#) angegebenen Protokoll.

3.2.3.3 Mikroskopische Aufnahmen und Auswertung

Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde ein Leica TCS SP2 Konfokalmikroskop mit $63\times$ Plan-Apochromat ($NA=1,32$) oder $40\times$ Plan-Apochromat ($NA=1,25$) Öl-Immersionsobjektiven verwendet. Das Rauschen wurde bei der Aufnahme durch mehrfaches Scannen der einzelnen Bildzeilen minimiert (normalerweise 2 bis 6 Wiederholungen), die Bilder hatten eine Auflösung von 1024×1024 Bildpunkten. Bei Verwendung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte die Aufnahme sequentiell. Die Bilder wurden im tiff-Format gespeichert. Für die weiteren quantitativen Auswertungen wurden die Rohbilder verwendet. Für die Wiedergabe in dieser Arbeit wurden teilweise Kontrast und Helligkeit mit der Software LCS Lite (Leica Microsystems, Wetzlar) geändert. Die Intensitätsprofile wurden ebenfalls mit diesem Programm ermittelt.

Für die Berechnung der Oberflächenexpression wurden die Neuronen vollkommen gleich behandelt und mit einem Mastermix gefärbt. Anschließend wurden entsprechende Bilder an aufeinander folgenden Tagen aufgenommen, wobei die selben Laser- und Verstärkereinstellungen verwendet wurden. Die Intensitätsprofile für die HA-Oberflächen- und die EGFP-Eigenfluoreszenz wurden in den Rohbildern entlang proximaler Dendritenabschnitte bestimmt. Von den auf diese Weise erhaltenen Kurven wurde der Hintergrund subtrahiert. Darüber hinaus wurden HA-Signale, die keine Entsprechung im EGFP-Kanal hatten, nicht in die Betrachtung eingeschlossen, denn es wurde davon ausgegangen, dass es sich um Artefakte handelte. Für die semiquantitative Auswertung wurden die Anteile der Flächen unter den HA-Oberflächenfluoreszenz-Kurven an den EGFP-Eigenfluoreszenz-Kurven berechnet. Von diesen Werten wurden Mittelwerte berechnet und mit dem SEM wiedergegeben.

3.2.4 FACS-Analyse

Bei der FACS-Analyse, die auch als Durchflusszytometrie bezeichnet wird, werden bestimmte Eigenschaften einzelner Zellen gemessen. Dazu werden Zellen, die sich in Lösung befinden, in einem laminaren Strom vereinzelt, so dass die zu untersuchenden Eigenschaften für jede Zelle individuell gemessen werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen verwendet, die ein fluoreszierendes Fusionsprotein stabil

exprimierten. Nach dem Auslösen von RNA-Interferenz wurden die Zellen im Durchflussszytometer gemessen und die Fluoreszenzintensität als Maß für die verbleibende Proteinmenge verwendet.

3.2.4.1 Vorbereitung der Zellen für die FACS-Analyse

Die stabilen Linien wurden wie unter [Abschnitt 3.2.2.1](#) und [Abschnitt 3.2.2.2](#) beschrieben hergestellt und mit RNA-Interferenz induzierenden Nukleinsäuren transfiziert. Am Tag der Analyse wurden die Zellen mit EDTA in PBS abgelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt (1.000 upm, 5 min, 4°C) wurden die Überstände abgesaugt und die Zellen auf Eis gelagert.

3.2.4.2 Datenaufnahme und Auswertung

Die Messung erfolgte in einem FaxCalibur (Becton and Dickinson, USA). Dazu wurden die Zellen in 500 μ l PBS aufgenommen. Aufnahmeparameter waren Vorwärts- sowie Seitwärtsstreulicht und die Fluoreszenz des Fusionsproteins. Die Daten wurden mit WinMDI 2.8 (Scripps Research Institute, USA) aufbereitet und in das txt-Format überführt, so dass die weitere Auswertung mit Excel 2003 (Microsoft, USA) und die grafische Darstellung mit SigmaPlot 8.0 (SPSS, USA) erfolgen konnte.

3.2.5 Vorbereitung der Zellen zur Gewinnung von Proteinen

CHO-Zellen wurden in einer Dichte von $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml in 50-mm-Kulturschalen ausplattiert und am folgenden Tag transfiziert (4 μ g DNA, 5 μ l LipofectAMINE 2000, siehe [Abschnitt 3.2.2.1](#)). Als Transfektionskontrolle wurde ein Kulturschälchen mit EGFP transfiziert. Nach einem weiteren Tag wurden die Zellen mit PBS (4°C) gewaschen, in 250 μ l Lysispuffer aufgenommen und 1,5 Stunden auf dem Rollrad (10 upm, 4°C) inkubiert. Anschließend wurden die Proben 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert (14.000 upm), um Zelltrümmer zu pelettieren. Der Überstand wurde entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

3.2.6 Plattieren der Zellen für elektrophysiologische Messungen

Für elektrophysiologische Messungen wurden die CHO- oder HEK293-Flp-In-Zellen in einer Dichte von $2 \cdot 10^4$ Zellen/ml ausgesät und nach einem Tag transfiziert. Dabei wurden die Zellen so trituriert, dass die überwiegende Anzahl der Zellen für die elektrophysiologischen Messungen als Einzelzellen zugänglich war.

3.2.7 Präparation und Injektion von *Xenopus*-Oozyten

Nach chirurgischer Entnahme aus *Xenopus-laevis*-Fröschen wurden die Oozyten in Ca^{2+} -freier Oozyten-Ringer-Lösung mit Kollagenase A (1,3 mg/ml, Boehringer Ingelheim, Ingelheim) inkubiert (2-4 h, 100 upm, Horizontalschüttler, RT), um die Follikelzellschicht zu entfernen. Anschließend wurden die Oozyten selektiert, in Gentamycin-Lösung überführt und über Nacht bei 18°C gehalten. Am folgenden Tag wurden die Oozyten in Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung mit je 50 nl cRNA-Lösung injiziert (Stühmer, 1992). Es wurden 0,5 ng Kanal-cRNA und je nach Experiment keine oder 2,5 ng KCHIP2.2-cRNA pro Oozyte injiziert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

Mit Hilfe proteinbiochemischer Methoden lassen sich unter anderem die qualitative und quantitative Expression spezifischer Proteine sowie deren Interaktion mit anderen Proteinen nachweisen.

3.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine aus transfizierten CHO-Zellen (siehe [Abschnitt 3.2.5](#)) wurden auf NUPAGE Novex Bis-Tris (4-12 %) Gradientengelen in XCell SureLock Mini-Elektrophoresezellen (alles Invitrogen, Karlsruhe) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proben wurden mit 4-fach NUPAGE LDS-Probenpuffer und 10-fach NUPAGE Reduktionsmittel (alles Invitrogen, Karlsruhe) 12 Minuten bei 70°C erhitzt, abgekühlt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 bis 120 mA in

NUPAGE MES SDS Laufpuffer unter Zusatz von 500 μ l NUPAGE Antioxidans (Invitrogen, Karlsruhe). Die Auftrennung konnte durch Verwendung eines farbigen Markers verfolgt werden.

3.3.2 Westernblot-Analyse

Als Westernblot wird eine experimentelle Methode bezeichnet, bei der die Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf die Oberfläche einer Membran übertragen werden, wo sie im Gegensatz zum Gel für weitere Untersuchungen gut zugänglich sind.

3.3.2.1 Elektrophoretischer Transfer

Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran (0,45 μ m, Whatman, Großbritannien) diente eine Mini Trans-Blot Transferzelle (Bio-Rad, München). Die Übertragung der Proteine erfolgte im Nassverfahren bei 4°C für 5 Stunden bei 400 mA oder über Nacht bei 40 mA. Anschließend erfolgte der spezifische Nachweis der Proteine durch Immunfärbung.

3.3.2.2 Immunologischer Nachweis der gebundenen Proteine

Nach elektrophoretischem Transfer (siehe [Abschnitt 3.3.2.1](#)) wurde die Membran in 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST blockiert (60 min, 100 upm, Horizontalschüttler, RT) und anschließend mit entsprechendem Primärantikörper in geeigneter Verdünnung in 1 % (w/v) Magermilchpulver in PBST über Nacht inkubiert (100 upm, Horizontalschüttler, 4°C). Danach wurde die Membran mit PBST gewaschen (dreimal 5 min, 100 upm, Horizontalschüttler) und mit einem an HRP gekoppelten Zweitantikörper in 1 % (w/v) Magermilchpulver in PBST inkubiert (1 h, 100 upm, Horizontalschüttler, RT). Anschließend wurde die Membran viermal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Detektion der markierten Proteine erfolgte durch Chemilumineszenz. Dazu wurde die Membran zunächst in frisch hergestellter ECL-Lösung für 1 Minute inkubiert. Anschließend wurde sofort ein Film (Amersham-Bioscience, Freiburg) belichtet oder das Signal mit Hilfe der Gel Doc 2000 (Bio-Rad, München) quantifiziert. Die Expositionszeit lag zwischen 10 Sekunden und 1 Minute bei den Filmen und zwischen 2 und 10

Minuten bei der Geldokumentationsanlage. Die Auswertung der Daten, die mit Hilfe der Geldokumentation gewonnen worden waren, erfolgte mit Quantify one (Bio-Rad, München), Filme wurden gescannt und mit ImageJ ([Abramoff et al., 2004](#)) analysiert.

3.3.3 Koimmunpräzipitation

Für die vorliegende Arbeit war das bessere Verständnis der Bindung der akzessorischen β -Untereinheiten an Kaliumkanäle von großer Bedeutung. Um die Interaktion von α - und β -Untereinheiten zu untersuchen, wurde die Methode der Koimmunpräzipitation eingesetzt. Dabei wird ein Protein präzipitiert und der Niederschlag auf Vorhandensein des Bindungspartners untersucht.

3.3.3.1 Kopplung der Antikörper an Dynabeads

Für die Koimmunpräzipitation wurden gekoppelte Antikörper eingesetzt. Dazu wurden entsprechende Mengen Antikörper (5 μ l anti-KChIP bzw. 10 μ l anti-HA je Probe) mit Protein-G-Dynabeads (Dyna, Invitrogen, Karlsruhe), die zuvor einmal mit PBS und einmal mit HEPES (+ 0,5 % Triton X-100) gewaschen worden waren, gemischt und über Nacht bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert. Anschließend wurden die Dynabeads mit dem immobilisierten Antikörper abmagnetisiert und zweimal mit 0,2 M TEA (pH 8,2) gewaschen. Für die eigentliche kovalente Bindung wurden die abmagnetisierten Dynabeads in 0,2 M TEA mit 20 mM DMP aufgenommen und bei Raumtemperatur 30 Minuten auf dem Rollrad inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze abmagnetisiert und zum Stoppen der Reaktion in 50 mM Tris (pH 7,5) inkubiert (Rollrad, 15 min, RT). Die nun kovalent an die Dynabeads gebundenen Antikörper wurden dreimal mit PBST gewaschen und anschließend für wenige Tage bei 4°C gelagert oder direkt für die Koimmunpräzipitation ([Abschnitt 3.3.3.2](#)) eingesetzt.

3.3.3.2 Koimmunpräzipitation aus transient transfizierten CHO-Zellen

Zunächst wurden die Signalintensitäten aus dem Westernblot (siehe [Abschnitt 3.3.2.2](#)) mit dem Programm Quantify one (Version 4.2) ausgewertet, um gleiche Proteinmengen der verschiedenen Konstrukte einsetzen zu können. Insgesamt wurde jeweils 120 μ l

Volumen für die Koimmunpräzipitationen eingesetzt und dieses mit 5 bis 10 μl gekoppeltem Antikörper (siehe [Abschnitt 3.3.3.1](#)) über Nacht bei 4°C auf dem Rollrad (10 upm) inkubiert. Danach konnten die Dynabeads abmagnetisiert und mit eiskaltem Lyse-Puffer gewaschen werden (zweimal 10 min, 10 upm, Rollrad, 4°C). Anschließend wurden die Proben mit reduzierendem NUPAGE-Probenpuffer (Invitrogen, Karlsruhe) bei 70°C für 12 Minuten denaturiert. Die Proben wurden abmagnetisiert und der Überstand wurde für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe [Abschnitt 3.3.1](#)) eingesetzt.

3.4 Elektrophysiologische Methoden

Alle elektrophysiologischen Experimente fanden bei Raumtemperatur (20-25°C) statt. Das Haltepotential lag bei -80 mV. Für die Programmierung der Protokolle zur Aktivierung der Kanäle wurde PULSE (HEKA Elektronik, Lambrecht) verwendet. Zur Auswertung der Stromaufnahmen dienten die Programme PULSEFIT (HEKA Elektronik, Lambrecht) und Excel 2003 (Microsoft, USA). Mittelwerte sind mit SEM angegeben. T-Tests nach Student wurden mit Excel 2003 (Microsoft, USA) durchgeführt, die graphische Darstellung erfolgte mit SigmaPlot 8.0 (SPSS, USA).

Für die Berechnung des Standardfehlers s_C einer Größe C , die von den fehlerbehafteten Größen $A \pm s_A$ und $B \pm s_B$ abhängt, wurde eine unabhängige Fortpflanzung des Fehlers angenommen. Ist C der Quotient A/B , so berechnet sich der Fehler s_C wie folgt:

$$s_C = \sqrt{\left(\frac{s_A}{A}\right)^2 + \left(\frac{s_B}{B}\right)^2}$$

3.4.1 Ganz-Zell-Patch-Clamp-Technik

Die von Bert Sakmann und Erwin Neher entwickelte Patch-Clamp-Technik hatte ursprünglich das Ziel, die Aktivität einzelner Ionenkanäle in biologischen Membranen nachzuweisen ([Neher und Sakmann, 1976](#)). Um solche und ähnliche Messungen durchführen zu können, ist es essentiell, das Rauschen der Messanordnung auf ein Minimum zu reduzieren und das elektrische Signal zu verstärken. Dazu wird der Messplatz durch einen Faraday-Käfig elektrisch abgeschirmt. Zur Vermeidung von Artefakten durch

Leckströme ist ein enger Kontakt (*seal*) zwischen Zellmembran und mit Elektrolyt gefüllter Glaskapillare wichtig. Die Qualität dieses Kontaktes kann als Widerstand zwischen Pipette und Badlösung gemessen werden und sollte im Idealfall bei mehreren $G\Omega$ liegen (*giga-seal*). Nach der Bildung eines solchen *giga-seals* befindet sich das Präparat in der *cell-attached*-Konfiguration (siehe [Abbildung 3.2](#)).

Durch Anlegen von Unterdruck kann das Membranstück (*patch*) unter der Pipettenöffnung durchbrochen werden. Man spricht dann von der *whole-cell*-Konfiguration bzw. Ganz-Zell-Ableitung. Im Gegensatz zur *cell-attached*-Konfiguration, die lediglich die Membranfläche unter der Pipettenöffnung erfasst, misst man hier den Strom durch die gesamte Zellmembran. Die Lösung im Pipetteninneren ist in der *whole-cell*-Konfiguration in direktem Kontakt mit dem Cytoplasma, so dass nach kurzer Zeit eine klar definierte Ionen-Zusammensetzung des Zellinneren erreicht ist. Daher wird diese Lösung auch als Intrazellulärlösung bezeichnet. Der Zugangswiderstand (Serienwiderstand R_s) zum Inneren der Zelle sollte möglichst gering sein, um ein schnelles Klemmen der Membranspannung zu erreichen und den artifiziellen Spannungsabfall gering zu halten. Im Idealfall ist R_s nur wenig größer als der durch die Pipettenöffnung vorgegebene Pipettenwiderstand R_{pip} , der bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten bei etwa 2 bis 3 $M\Omega$ lag.

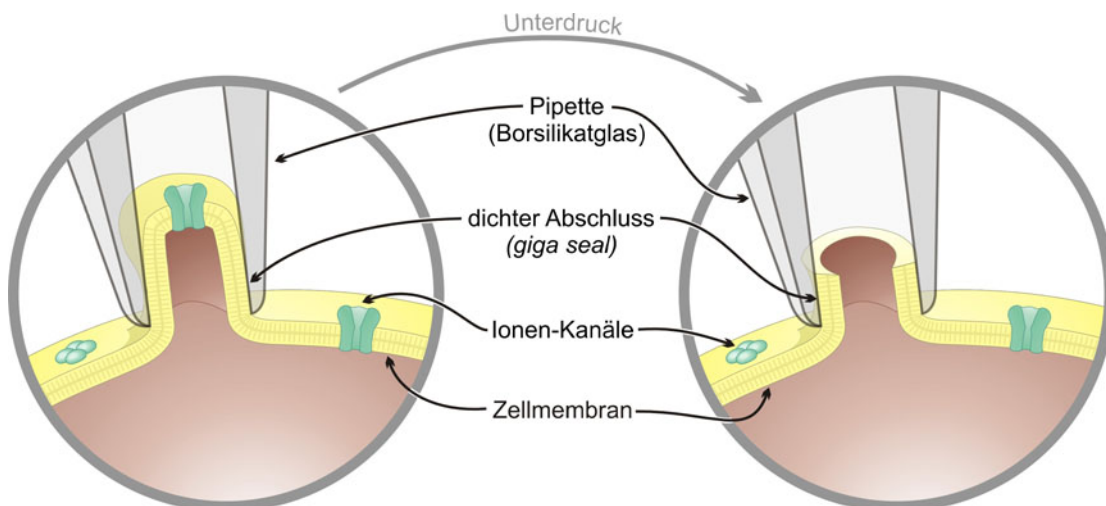


Abbildung 3.2: Patchkonfigurationen.

Die Zeichnungen stellen die *cell-attached*- und die *whole-cell*-Patchkonfiguration dar. Eine genauere Beschreibung findet sich im Text (modifiziert nach [Numberger und Draguhn, 1996](#)).

Bei der Patch-Clamp-Technik wird eine Kommando-Spannung V_{soll} vorgegeben. Um die gemessene Membranspannung V_m immer auf V_{soll} zu „klemmen“, ist die Injektion eines Kompensationsstroms nötig. Dieser Kompensationsstrom wird registriert. Er entspricht in seinem Zeitverlauf exakt dem Ionenstrom, der primär zur Differenz von V_m und V_{soll} führt. Um dieses mit nur einer Pipettenelektrode bewerkstelligen zu können, wird ein so genannter Strom-Spannungswandler eingesetzt. Er besteht aus einem Operationsverstärker (OPA), der seine beiden Eingangssignale V_{soll} (+) und V_m (–) miteinander vergleicht. Bei jeder Differenz zwischen V_m und V_{soll} generiert der OPA eine Spannung, die proportional zur Differenz zwischen V_m und V_{soll} ist, allerdings hoch verstärkt. Danach entsteht ein Spannungsabfall über den Rückkopplungswiderstand R_f und es fließt ein entsprechender Strom in die Zelle. Gemessen wird eine Spannungsdifferenz $V_{soll} - \text{Ausgangsspannung am OPA}$, die wiederum dem Kontrollstrom proportional ist. Eine entsprechende Kalibrierung des Messstroms erlaubt die Berechnung des Kontrollstroms (siehe [Abbildung 3.3](#)).

3.4.1.1 Ausstattung des Messstandes

Für die hochempfindlichen *Patch-Clamp*-Messungen ist ein erschütterungsfreier Arbeitsplatz Voraussetzung. Dafür wurde die Messapparatur auf einem schwingungsgedämpften Tisch (T250, Physik Instrumente, Waldborn) gelagert. Die Einstreuung

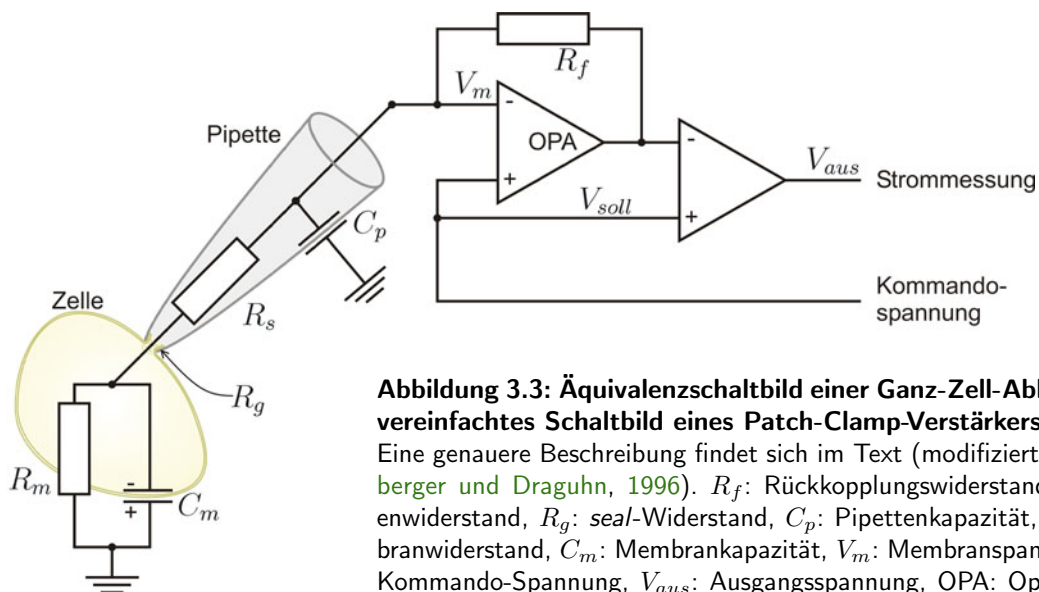


Abbildung 3.3: Äquivalenzschaltbild einer Ganz-Zell-Ableitung und vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers.

Eine genauere Beschreibung findet sich im Text (modifiziert nach [Numberger und Draguhn, 1996](#)). R_f : Rückkopplungswiderstand, R_s : Serienwiderstand, R_g : seal-Widerstand, C_p : Pipettenkapazität, R_m : Membranwiderstand, C_m : Membrankapazität, V_m : Membranspannung, V_{soll} : Kommando-Spannung, V_{aus} : Ausgangsspannung, OPA: Operationsverstärker.

des elektrischen Hintergrundrauschens wurde dadurch reduziert, dass der Messstand mit einem Faraday-Käfig umgeben war.

Mikroskop. Der Vorgang des Heranfahrens der *Patch*-Pipette an die Zelle wurde durch ein inverses Mikroskop (Axiovert-25, Zeiss, Jena) mit bis zu 400-facher Vergrößerung und Kontrastverstärkung optisch verfolgt. Eine HBO-UV-Lichtquelle diente zum Nachweis von DsRed bzw. EGFP, welche kotransfiziert wurden und somit als Indikatorproteine für erfolgreich transfizierte Zellen dienten. Auf dem Kreutztisch des Mikroskopes war eine Kammer aus Plexiglas befestigt, in die die 35-mm-Kulturschalen direkt eingesetzt werden konnten.

Patch-Pipetten und Elektroden. Als *Patch*-Pipetten dienten aus Borsilikatglas (Wandstärke 0,15 mm, World Precision Instruments, USA) mit einem horizontalen Pipettenziehgerät (DMZ-Puller, Zeitz, Augsburg) ausgezogene Glaskapillaren mit Filament. Der Durchmesser der Spitzenöffnung betrug etwa 1 μm , so dass sich mit den verwendeten Lösungen ein Pipettenwiderstand von 2 bis 3 $\text{M}\Omega$ ergab. Die Lösung zum Füllen der Pipette (siehe [Abschnitt 3.4.1.3](#)) wurde mit einem 0,2- μm -Sterilfilter filtriert. Der Pipettenhalter war direkt am Vorverstärker befestigt. Im Pipettenhalter stellte ein chlorierter Silberdraht die elektrische Verbindung zwischen Pipettenlösung und Verstärker her. Auch das Anlegen eines Über- bzw. Unterdruckes erfolgte über den Pipettenhalter. Die Verbindung der Badlösung zum Erdleiter wurde mit einem Ag/AgCl-Pellet hergestellt (World Precision Instruments, USA). Die Benutzung von Ag/AgCl-Elektroden soll Polarisierungen der Silber-Elektrode im umgebenden Elektrolyt vermeiden. Die Steuerung der Pipette erfolgte über einen motorisierten Mikromanipulator (Patchman, Eppendorf, Hamburg).

3.4.1.2 Datenerfassung

Die gemessenen Signale wurden vom OPA an einen Hauptverstärker (EPC-9, HEKA Elektronik, Lambrecht) weitergegeben. Für die Steuerung des Verstärkers und die Digitalisierung der gemessenen Signale wurde eine ITC16-AD/DA-Schnittstelle an einem Apple MacIntosh G3 eingesetzt. Das analoge Messsignal wurde mit einer Auflösung

von 16 bit und einer Aufnahmefrequenz zwischen 0,2 und 20 kHz digitalisiert. Als Software zur Datenerfassung und zur Kontrolle des Verstärkers diente das Programm PULSE (HEKA Elektronik, Lambrecht). Pipettenkapazität C_p und Membrankapazität C_m konnten durch die entsprechende Funktion des Verstärkers kompensiert werden.

Der Leckstrom zeigt eine lineare Abhängigkeit von der angelegten Spannung. Um diesen von den tatsächlich zu messenden spannungsaktivierten Strömen subtrahieren zu können, wurde er nach jedem Spannungstestpuls durch entsprechende Leckprotokolle mit der P/n -Methode bestimmt. Dabei wurden die Stromantworten auf kleine Spannungspulse (Amplitude = $1/n \times$ Testpuls in mV) gemessen, bei denen die zu untersuchenden Kanäle noch nicht aktivierten. Die registrierten Stromantworten wurden mit n multipliziert und für jedes Testpotential gemittelt. Sie konnten sowohl online als auch offline von der Stromantwort auf den eigentlichen Testpuls subtrahiert werden. Die Serienwiderstände R_s waren kleiner als $6 \text{ M}\Omega$ und wurden durch den Verstärker maximal kompensiert.

3.4.1.3 Versuchslösungen

CHO- und HEK293-Zellen. Die Zellen befanden sich in Extrazellulärlösung, die durch Perfusion ständig ausgetauscht wurde. Die Pipetten wurden mit Intrazellulärlösung gefüllt.

Neuronen. Die Neuronen befanden sich in NEC mit TTX (500 nM). Als Intrazellulärlösung wurde NIC verwendet.

3.4.2 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in *Xenopus*-Oozyten

Zur elektrophysiologischen Analyse der in Oozyten exprimierten Kanalproteine wurde die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme verwendet. Bei dieser Methode wird das Membranpotential durch zwei intrazelluläre Mikroelektroden kontrolliert. Eine Elektrode misst das aktuelle Membranpotential (Spannungselektrode), während die andere entsprechend Strom injiziert, um das gewünschte Potential aufrecht zu erhalten.

3.4.2.1 Messplatz

Die Messapparatur war auf einer Metallplatte auf einem Tisch aufgebaut. Die beiden Messelektroden konnten mit mechanischen Manipulatoren bewegt werden. Die Mikroelektroden wurden aus Borsilikatglas (Wandstärke 0,15 mm, World Precision Instruments, USA) mit Hilfe eines vertikalen Elektroden-Ziehgerätes hergestellt und anschließend mit einer Microforge (Narishige, USA) abgebrochen. Ein Spitzendurchmesser von 15 μm entsprach in der verwendeten OEC-Lösung einem Elektrodenwiderstand von 0,2 bis 0,3 M Ω . Zum Füllen der Mikroelektroden diente 3 M KCl-Lösung. Die Diffusion der 3 M KCl-Lösung aus der Pipette wurde durch Agar minimiert. Die elektrische Verbindung zur Pipettenlösung wurde durch einen chlorierten Silberdraht hergestellt, die Verbindung der Badlösung zum Erdleiter erfolgte mit einem Ag/AgCl-Pellet (World Precision Instruments, USA). Zum Austausch der Badlösung in der Messkammer dienten ein Perfusionssystem und eine Absaugvorrichtung. Mit Hilfe eines Binokulars (Wild M3C, Heerbrugg) konnten die Glaselektroden unter visueller Kontrolle in die Oozyten eingestochen werden.

3.4.2.2 Datenerfassung

Die Signale wurden über den Vorverstärker an den Hauptverstärker (Oocyte-Clamp OC-725, Warner Instruments, USA) geleitet. Zur Digitalisierung der Signale und zur Steuerung des Versuchsablaufes war der Hauptverstärker über eine ITC-16-AD/DA-Schnittstelle mit einem Apple MacIntosh G3 verbunden. Das analoge Messsignal wurde bei 16 bit Auflösung mit Aufnahmefrequenzen von 1,7 bis 5 kHz digitalisiert und auf der Festplatte gespeichert.

3.4.3 Verwendete Stimulationsprotokolle und Datenauswertung

Um das Verhalten der Kanalproteine in Zellen elektrophysiologisch zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Stimulationsprotokolle verwendet.

3.4.3.1 Testpuls

Mit Hilfe eines einfachen Testpulses lassen sich bereits viele Eigenschaften spannungsgesteuerter Kaliumkanäle untersuchen. Dazu wurden die Kv4.2-Kanäle nach einem 200 ms langen Vorpuls auf -100 mV mit einem Sprung auf +40 mV aktiviert. Der Quotient aus dem Strom nach 30 ms (nach Pulsbeginn) und dem maximalen Strom (I_{30}/I_{peak}) ist eine Kenngröße, die durch Interaktion mit KChIP stark beeinflusst wird (Callsen *et al.*, 2005).

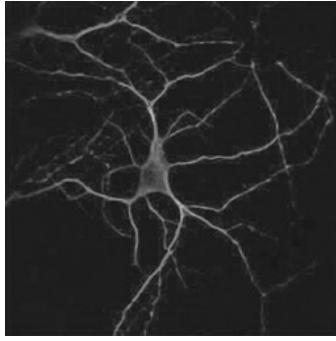
Zur Bestimmung des funktionellen Expressionslevels in Säugerzellen wurde die maximale Amplitude der Stromantwort auf einen solchen Testpuls herangezogen. Zur Berechnung der Stromdichte wurde die maximale Stromamplitude auf die Ganzzellkapazität bezogen. In Oozyten wurden in analogen Experimenten die absoluten Stromamplituden verwendet, da hier deutlich geringere Schwankungen der Zellgröße auftreten als bei kultivierten Säugerzellen.

3.4.3.2 Erholung aus der Inaktivierung

Zur Bestimmung der Kinetik der Erholung aus der Inaktivierung wurde ein Doppelpulsprotokoll verwendet. Das Zeitintervall zwischen Kontroll- und Testpuls (Zwischenpulsdauer t) wurde dabei variiert (vergleiche [Abbildung 4.10 A](#)). Das Verhältnis der Strommaxima aus einem Kontrollpuls I_{max} und dem zugehörigen Testpuls I_n wurde gegen die Zwischenpulsdauer t aufgetragen. Die so erhaltenen Messpunkte können durch die Gleichung

$$\frac{I_n}{I_{max}} = 1 - e^{\frac{-t}{\tau_{rec}}}$$

beschrieben werden (I_n : Maximum des Testpulses, I_{max} : Maximum des Kontrollpulses, t : Zwischenpulsdauer, τ_{rec} : Zeitkonstante für die Erholung aus der Inaktivierung).



4

Ergebnisse

4.1 Knockdown akzessorischer Kanal-Untereinheiten durch RNAi

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der akzessorischen β -Untereinheiten auf den Transport und die funktionelle Lokalisation der Kv4.2- α -Untereinheit in kultivierten hippocampalen Neuronen zu untersuchen. Für eine Bearbeitung dieser Frage in Neuronen ist es wünschenswert, ein experimentelles System zur Verfügung zu haben, das keine endogenen β -Untereinheiten enthält, sonst aber so wenig wie möglich Unterschiede zu nativen Neuronen aufweist. Um ein entsprechendes System zu generieren, fand die Methode der RNA-Interferenz Anwendung, mit der gezielt die Bildung einzelner Proteine unterbunden werden kann. Die RNA-Interferenz hat gegenüber der alternativen Verwendung von Knockout-Mäusen den Vorteil, schneller, flexibler und kostengünstiger zu sein. Als Nachteil der Methode ist die oftmals noch verbleibende Restmenge des Zielproteins zu nennen. Im Gegensatz zum Knockout spricht man bei der RNA-Interferenz daher auch von einem Knockdown.

4.1.1 Erzeugung fluoreszenzmarkierter akzessorischer β -Untereinheiten

Zum einfachen fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der humanen akzessorischen Untereinheiten wurden diese mit dem Marker d2EGFP versehen, einer destabilisierten Form des EGFP mit einer Halbwertszeit von etwa 2 Stunden (Li *et al.*, 1998). Das d2EGFP-Protein wurde jeweils an den C-Terminus des zu untersuchenden Proteins angehängt, das Konstrukt wurde durch einen CMV-Promotor kontrolliert. Der gene-

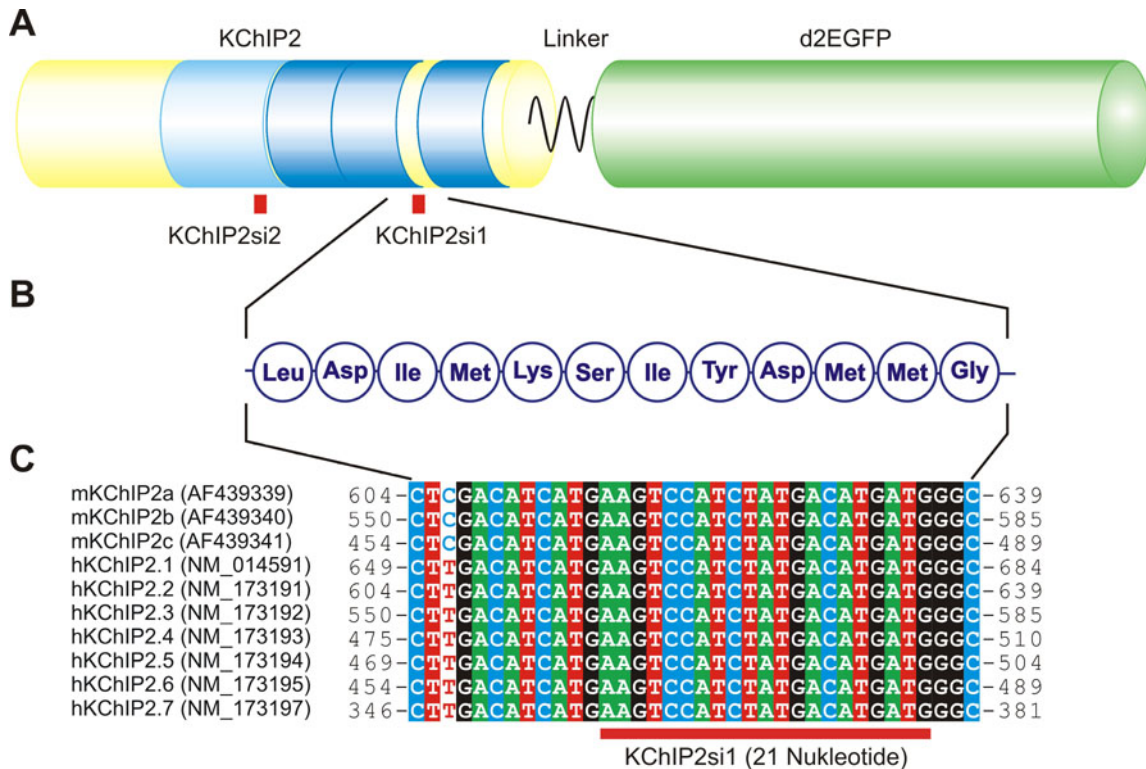


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Knockdown-Strategie für KChIPs am Beispiel von KChIP2.

A. Schematischer Aufbau des hKChIP2-d2EGFP-Fusionsproteins. Für die detaillierte Beschreibung der KChIP2-Domänen siehe [Abbildung 1.4](#). Die einzelnen Domänen sind maßstabsgetreu dargestellt, allerdings ist der Linker stark vergrößert. Die roten Markierungen symbolisieren die Lage der beiden Zielsequenzen für die RNA-Interferenz. **B.** Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz des KChIP2-Proteins. Auf dieser Ebene herrscht in diesem Bereich vollständige Homologie zwischen Maus und Mensch. **C.** Sequenzvergleich der verschiedenen murinen und humanen KChIP2-Spliceformen. Das Alignment der cDNA-Sequenzen von murinen und humanen KChIP2-Splice-Varianten ergibt einen hohen Konservierungsgrad zwischen den verschiedenen Spezies. Farblich hinterlegte Basen stellen konservierte Bereiche dar, nicht hinterlegte Basen differieren zwischen Maus und Mensch. Als Ziele für die RNA-Interferenz wurden ausschließlich Sequenzen verwendet, die keine Abweichung zwischen Maus und Mensch aufweisen (roter Balken unter den Sequenzen). In Klammern sind die Datenbankbezeichnungen der jeweiligen Splice-Variante angegeben, die Zahlen vor und nach den Sequenzen bezeichnen die Position der ersten und letzten Base der angegebenen Sequenz in der zugehörigen cDNA.

relle Aufbau der Fusionsproteine ist in den [Abbildungen 4.1 A](#) und [4.2 A](#) zu sehen. Darüber hinaus wurden Fusionsproteine erzeugt, in denen EGFP an den C-Terminus der entsprechenden Mausproteine fusioniert wurde, dabei stand das Fusionsprotein unter der Kontrolle des EF-1 α -Promotors. Neben der einfachen fluoreszenzmikroskopischen Kontrolle der Expression und Lokalisation der Untereinheiten in transient transfizierten Zellen ermöglicht diese Strategie eine einfache Übertragung experimenteller Methoden auf alle verwendeten Untereinheiten, da alle Fusionsproteine eine Eigenfluoreszenz haben bzw. im Westernblot mit nur einem Antikörper gegen EGFP nachweisbar sind.

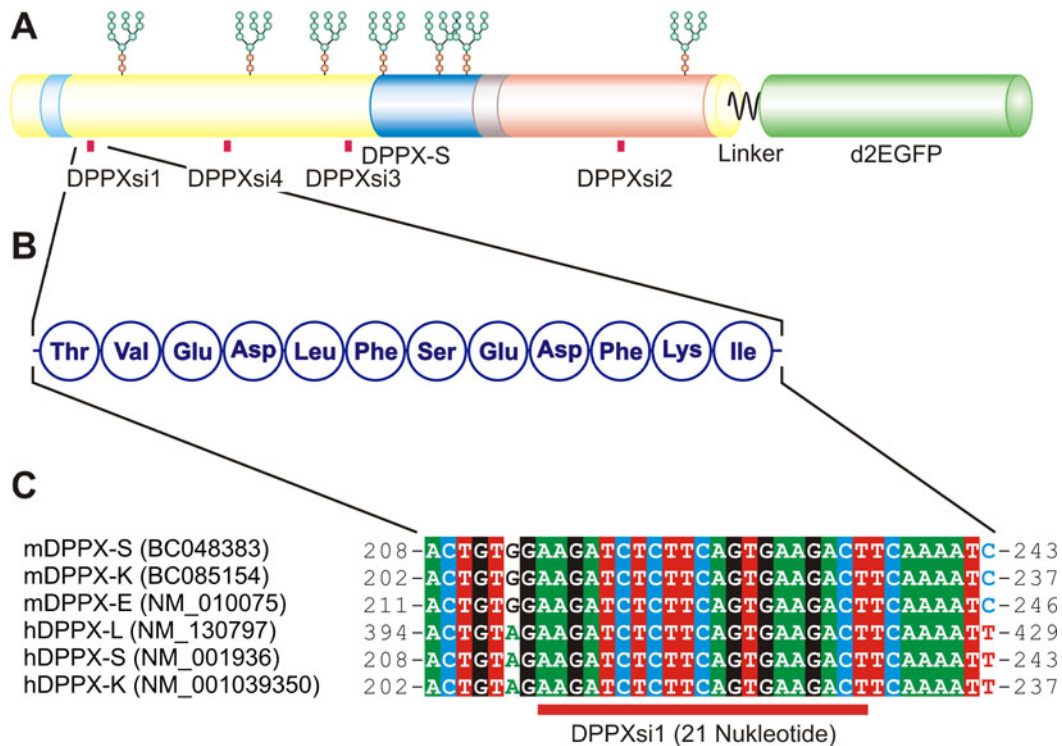


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Knockdown-Strategie für DPPX.

A. Schematischer Aufbau des hDPPX-d2EGFP-Fusionsproteins. Für die detaillierte Beschreibung der DPPX-Domänen siehe [Abbildung 1.5](#). Die einzelnen Domänen sind maßstabsgetreu dargestellt, allerdings ist der Linker stark vergrößert. Die roten Markierungen symbolisieren die Lage der vier Zielsequenzen für die RNA-Interferenz. **B.** Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz des DPPX-Proteins. Auf dieser Ebene herrscht in diesem Bereich vollständige Homologie zwischen Maus und Mensch. **C.** Sequenzvergleich der verschiedenen murinen und humanen DPPX-Spliceformen. Das Alignment der cDNA-Sequenzen von murinen und humanen DPPX-Splice-Varianten ergibt einen hohen Konservierungsgrad zwischen den verschiedenen Spezies. Farblich hinterlegte Basen stellen konservierte Bereiche dar, nicht hinterlegte Basen differieren zwischen Maus und Mensch. Als Ziele für die RNA-Interferenz wurden ausschließlich Sequenzen verwendet, die keine Abweichung zwischen Maus und Mensch aufweisen (roter Balken unter den Sequenzen). In Klammern sind die Datenbankbezeichnungen der jeweiligen Splice-Variante angegeben, die Zahlen vor und nach den Sequenzen bezeichnen die Position der ersten und letzten Base der angegebenen Sequenz in der zugehörigen cDNA.

4.1.2 Design der siRNA-Vektoren

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, RNA-Interferenz auszulösen. Allen ist gemein, dass die letztendlich wirksame Substanz doppelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von etwa 21 Nukleotiden sind, die als *small interfering* RNAs oder siRNAs bezeichnet werden ([Elbashir et al., 2001](#)). Die gebräuchlichsten Methoden, solche siRNAs herzustellen, sind einerseits die chemische Synthese, andererseits die Verwendung von Haarnadelvektoren, die ein entsprechendes Konstrukt erzeugen, das sich auf sich selbst zurückfaltet und von dem endogenen Enzym *Dicer* zu der wirksamen siRNA pro-

zessiert wird. Beide Methoden haben verschiedene Vorteile. So werden synthetische siRNAs von einer Vielzahl von Firmen angeboten und stellen die schnellste und experimentell am wenigsten aufwändige Methode der RNA-Interferenz dar. Zudem sind die Transfektionsraten synthetischer siRNA denen von Haarnadelvektoren überlegen. Diese haben dagegen den Vorteil einer längeren Lebensdauer in der Zelle, wodurch ein effizienterer Knockdown möglich wird und auch Proteine erreichbar werden, die eine lange Halbwertszeit haben. Problematisch ist dagegen, dass sowohl das endogene Enzym *Dicer* als auch die entsprechenden Promotoren der Haarnadelvektoren im gewählten System aktiv sein müssen, um einen effizienten Knockdown zu gewährleisten. Aus diesen Gründen wurde eine kombinierte Strategie gewählt, in der sowohl synthetische siRNAs als auch Haarnadelvektoren (im Folgenden als siPlasmide bezeichnet) mit zwei verschiedenen Promotoren zum Einsatz kamen.

Die Wahl einer geeigneten Basenabfolge ist für einen erfolgreichen Knockdown von entscheidender Bedeutung. Die Vorauswahl der Sequenzen erfolgte mit dem Programm „siRNA Target Finder“ auf der Ambion-Homepage (www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html). Für die Auswahl der verwendeten Sequenzen war wichtig, dass die korrespondierenden Zielsequenzen in allen Splice-Varianten vorkamen und zwischen Maus und Mensch konserviert waren (siehe [Abbildungen 4.1 C](#) und [4.2 C](#)). Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass sowohl transient transfizierte humane als auch endogene murine akzessorischen Untereinheiten in kultivierten Mausneuronen wirkungsvoll herunterreguliert werden konnten. Die ausgewählten Zielsequenzen für die RNA-Interferenz sind in [Anhang B](#) aufgeführt. In den siPlasmiden kamen für jede der verwendeten Zielsequenzen der U6- und der H1-Promotor zum Einsatz.

4.1.3 RNAi-Nachweis durch FACS-Analyse

Die Effizienz des Knockdowns der akzessorischen β -Untereinheiten wurde mittels FACS-Analyse überprüft. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität der EGFP- bzw. d2EGFP-Fusionsproteine als direktes Maß für die Menge des Zielproteins verwendet. Das FACS bot den Vorteil der schnellen quantitativen Analyse einer großen Zellpopulation.

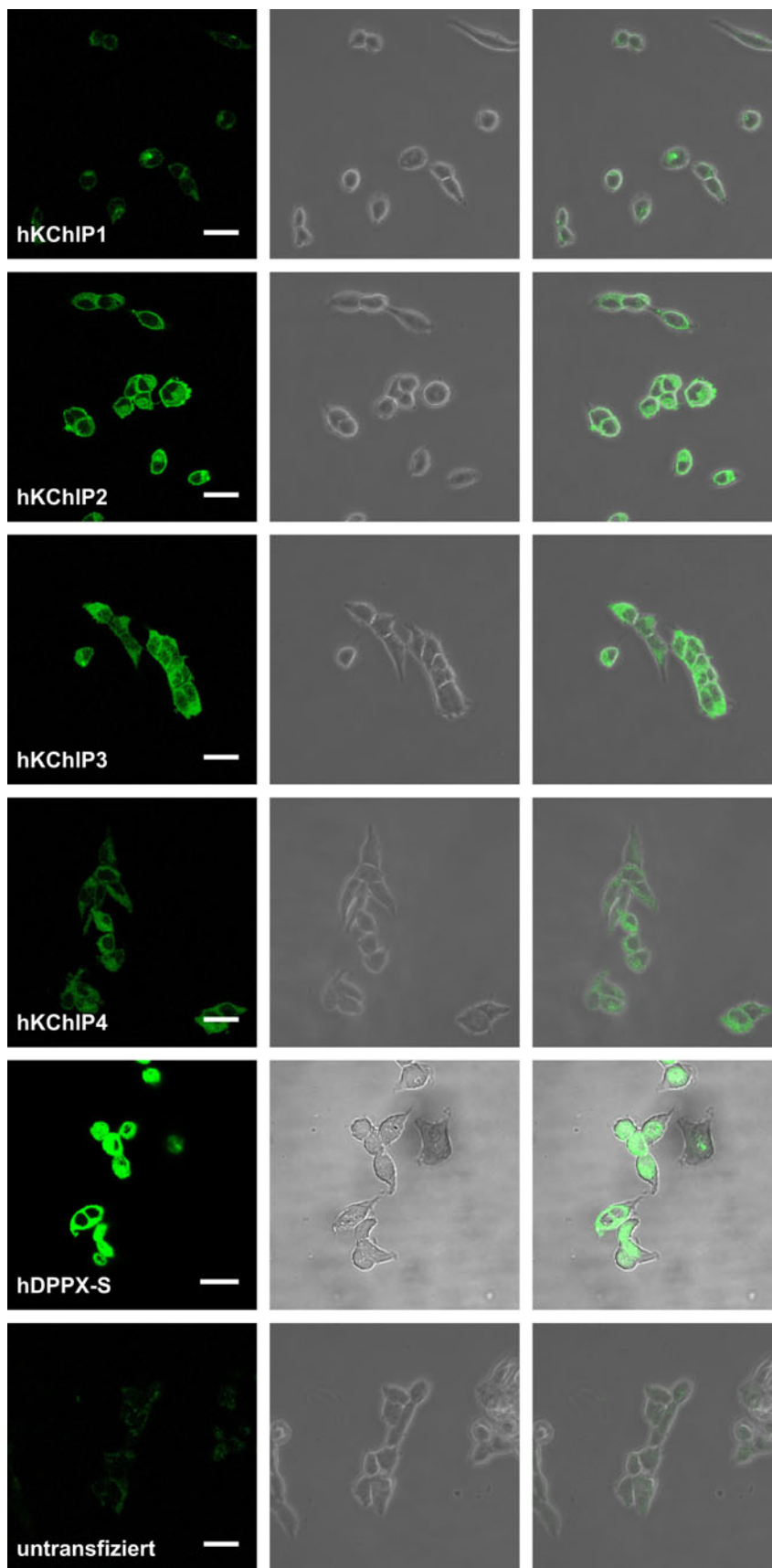


Abbildung 4.3: Expression von humanen d2EGFP-Fusionsproteinen in stabilen HEK293-Flp-In-Zelllinien.

Die stabilen Zelllinien wurden auf Deckgläschen kultiviert, fixiert und mit einem Leica TCS SP2 Konfokalmikroskop aufgenommen. Von den Zelllinien ist jeweils eine repräsentative Fluoreszenzaufnahme (linke Spalte), eine Durchlichtaufnahme (mittlere Spalte) sowie die entsprechende Überlagerung (rechte Spalte) abgebildet. In allen Fällen liegt die Fluoreszenzintensität der stabilen Linien deutlich über der von untransfizierten Elternzellen. Während KChIP1 und KChIP4 relativ schlecht exprimieren, zeigen KChIP2, KChIP3 und DPPX eine sehr starke Expression.

Größenbalken: 20 μm .

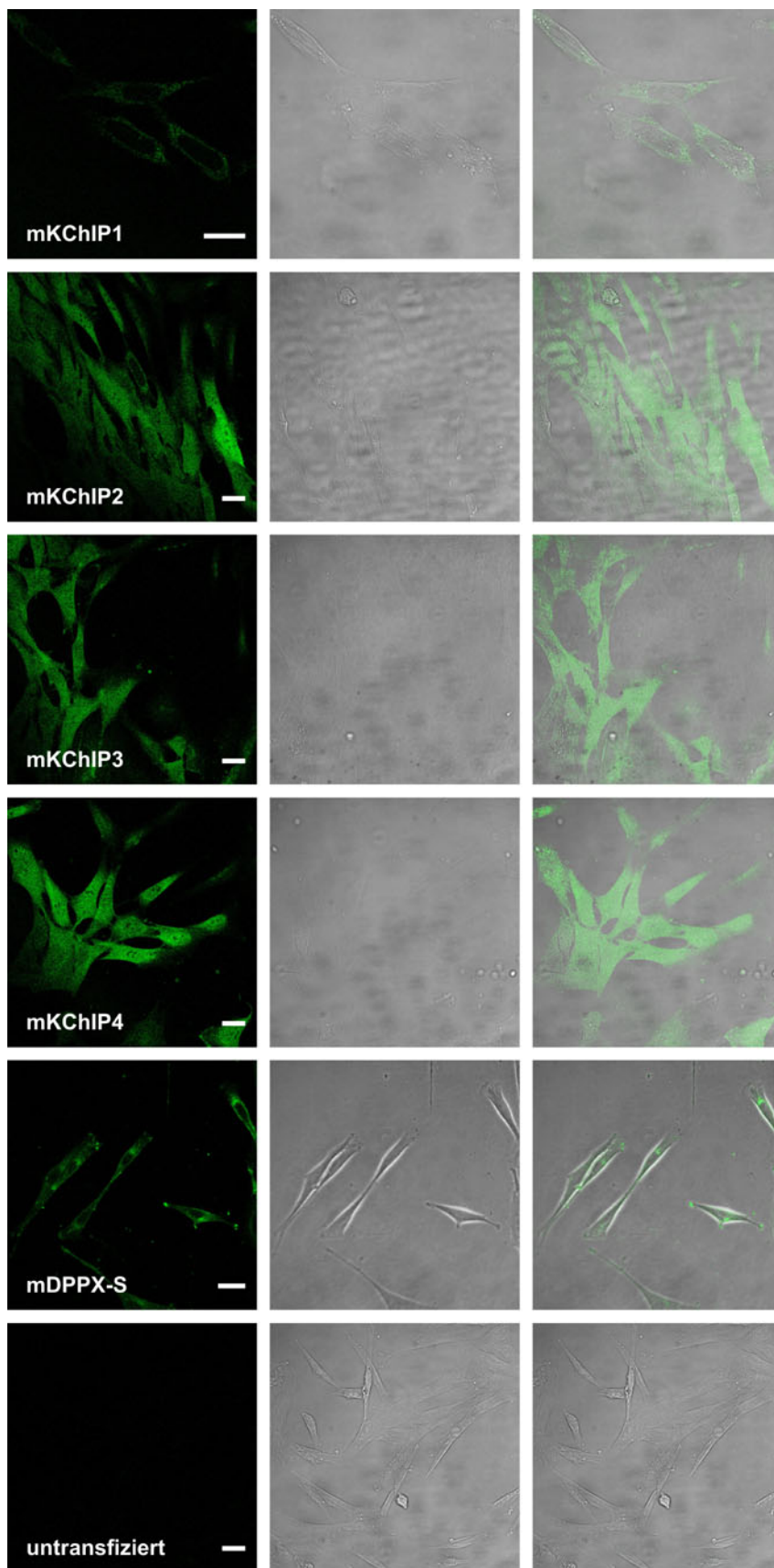


Abbildung 4.4: Expression von murinen EGFP-Fusionsproteinen in stabilen 3T3-Flp-In-Zelllinien.

Die stabilen Zelllinien wurden auf Deckgläschen kultiviert, fixiert und mit einem Leica TCS SP2 Konfokalmikroskop aufgenommen. Von den Zelllinien ist jeweils eine repräsentative Fluoreszenzaufnahme (linke Spalte), eine Durchlichtaufnahme (mittlere Spalte) sowie die entsprechende Überlagerung (rechte Spalte) abgebildet. In allen Fällen liegt die Fluoreszenzintensität der stabilen Linien deutlich über der von untransfizierten Elternzellen. Größenbalken: 20 μm .

4.1.3.1 Stabile Expression der EGFP-Fusionsproteine in Zelllinien

Bei einer transienten Transfektion ergibt sich normalerweise eine große Bandbreite unterschiedlich stark transfizierter Zellen, wobei das Spektrum von untransfizierten Zellen bis hin zu sehr stark exprimierenden Zellen reicht. Quantitative Aussagen über die Änderung der Expressionsstärke nach RNA-Interferenz in transient transfizierten Zellen sind daher nur schwer möglich. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Zelllinien erzeugt, die die unter [Abschnitt 4.1.1](#) beschriebenen Fusionsproteine stabil exprimierten. Auf diese Weise wurden fünf Zelllinien generiert, die die vier humanen KChIPs und DPPX als d2EGFP-Fusionsproteine exprimierten (siehe [Abbildung 4.3](#)). Die humanen Linien wurden im HEK293-Flp-In-Hintergrund erzeugt. Analog wurden die entsprechenden murinen EGFP-Fusionsproteine stabil in 3T3-Flp-In-Zellen exprimiert (siehe [Abbildung 4.4](#)). Alle Zelllinien zeigten eine Eigenfluoreszenz, die deutlich über der von untransfizierten Flp-In-Zellen lag. Die Zellen einer solchen Zelllinie zeigen eine homogenere Fluoreszenzintensität als transient transfizierte Zellen. Zudem ist ein ins Genom integrierter Promotor nicht so aktiv wie in einem Plasmid, wodurch die Überexpression reduziert wird und die Expression des zu untersuchenden Proteins eher der Expression eines endogenen Proteins gleicht. Für die weiteren Untersuchungen wurden die KChIP2- und die DPPX-Linie verwendet, da von beiden Proteinen starke Effekte auf den Kv4.2-Kanal beschrieben sind ([An et al., 2000](#); [Bähring et al., 2001b](#); [Nadal et al., 2003](#)). Die Fluoreszenzintensität dieser Fusionsproteine lag sowohl bei den humanen als auch bei den murinen Zelllinien deutlich über der der untransfizierten Kontrollzellen.

4.1.3.2 Knockdown von KChIP2

Für den Knockdown von KChIP2 wurden HEK293-Flp-In-Zellen, die das hKChIP2-d2EGFP-Fusionsprotein stabil exprimierten, mit einer Mischung aus siPlasmiden und einer synthetischen siRNA transfiziert. In [Abbildung 4.5 A](#) ist eine deutliche Verschiebung der entsprechenden Kurven zu niedrigeren Fluoreszenzintensitäten zu erkennen, während eine mit einem unabhängigen Kontrollplasmid transfizierte Probe nur eine sehr geringe Änderung der Fluoreszenzintensität zeigt. Die statistische Auswertung der Daten ergab, dass der durch synthetische siRNA und siPlasmide ausgelöste Knock-

down von vergleichbarer Effizienz war. In beiden Fällen verblieb aber noch etwa 40% der Proteinmenge in den Zellen.

Das generelle Problem dieses Ansatzes liegt in der Tatsache, dass keine hundertprozentige Transfektion erreicht werden kann. Der Knockdown ist somit möglicherweise noch effektiver als angegeben, da sich die in [Abbildung 4.5](#) gezeigten Kurven der mit siRNA und siPlasmiden behandelten Proben wahrscheinlich durch die Messung von zwei vermischten Zellpopulationen ergeben. Eine dieser Populationen zeigt ein Fluoreszenzmaximum im Bereich der untransfizierten Kontrollzellen. Die Größe dieser Gruppe entspricht etwa 30%. Da auch in anderen Experimenten eine Transfektionsrate von 50 bis 80% erzielt wurde, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Zellen um untransfizierte Zellen handelt. Wenn die Auswertung bezüglich dieses potentiell-

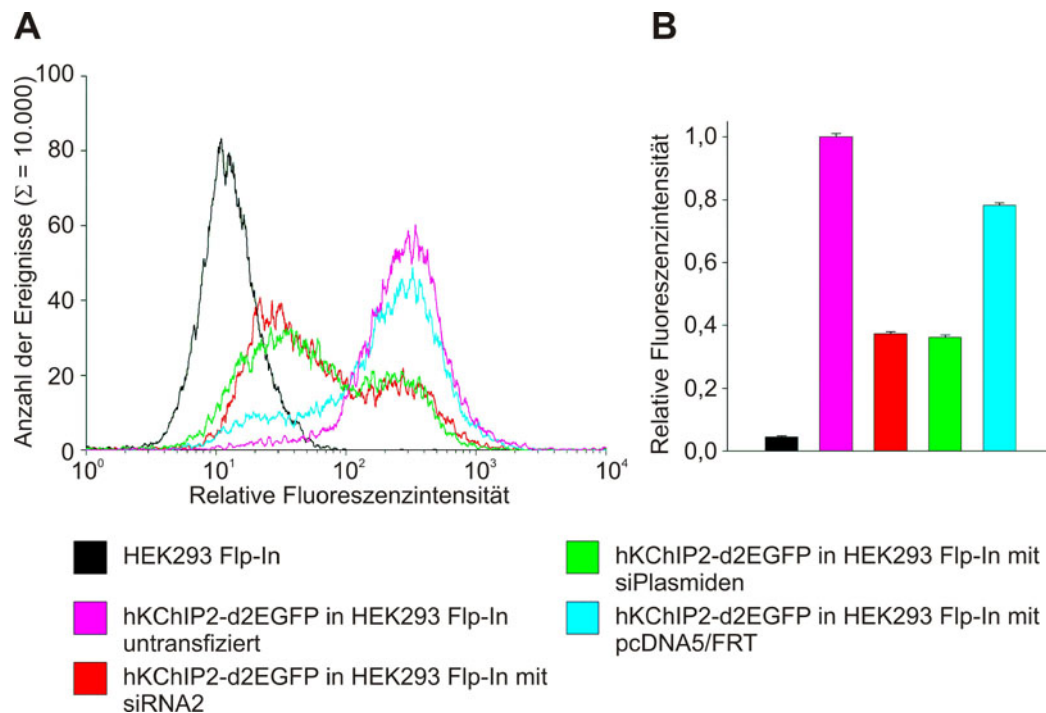


Abbildung 4.5: Untersuchung der KChIP2-RNA-Interferenz mittels FACS-Analyse.

In Zellen einer stabilen HEK293-Zelllinie, die hKChIP2-d2EGFP als Fusionsprotein exprimieren, wurde auf verschiedene Weisen RNA-Interferenz ausgelöst. Dabei wurde einerseits synthetische siRNA (rot) verwendet, andererseits ein Gemisch aus vier verschiedenen siPlasmiden (grün), die gegen zwei verschiedene Zielsequenzen gerichtet waren. Als Nachweis der Effizienz des Knockdowns wurde die Fluoreszenzintensität und damit die Menge des hKChIP2-d2EGFP-Fusionsproteins im FACS gemessen. Die Analyse der Zellen erfolgte 2 Tage nach der Transfektion. **A.** Rohdaten aus der FACS-Messung. Für jede Probe wurden insgesamt 10.000 Zellen gemessen. Die Kurven wurden für eine bessere Übersichtlichkeit geglättet. **B.** Auswertung der Daten. Für die einzelnen Proben wurden die Fluoreszenzintensitäten bestimmt und aufgetragen, die Werte repräsentieren den Mittelwert $\pm$ SEM. Dabei wurden alle Proben auf die untransfizierten hKChIP2-d2EGFP-Zellen normiert, deren mittlere Fluoreszenzintensität zuvor auf 1 gesetzt wurde.

len Fehlers korrigiert wird, ergibt sich für KChIP2 ein Knockdown von etwa 90 %. Unabhängig von der Auswertungsmethode ist in diesem Experiment kein qualitativer Unterschied zwischen den siPlasmiden und der synthetischen siRNA zu erkennen.

4.1.3.3 Knockdown von DPPX

Für die RNA-Interferenz von DPPX wurden fünf verschiedene Plasmide verglichen, die unterschiedliche siRNAs unter Kontrolle des H1-Promotors erzeugten. Eine dieser Sequenzen war gegen KChIP1 gerichtet und diente als Kontrolle. In [Abbildung 4.6 A](#) ist zu sehen, dass die Linksverschiebung der Fluoreszenzintensitäten weniger deutlich

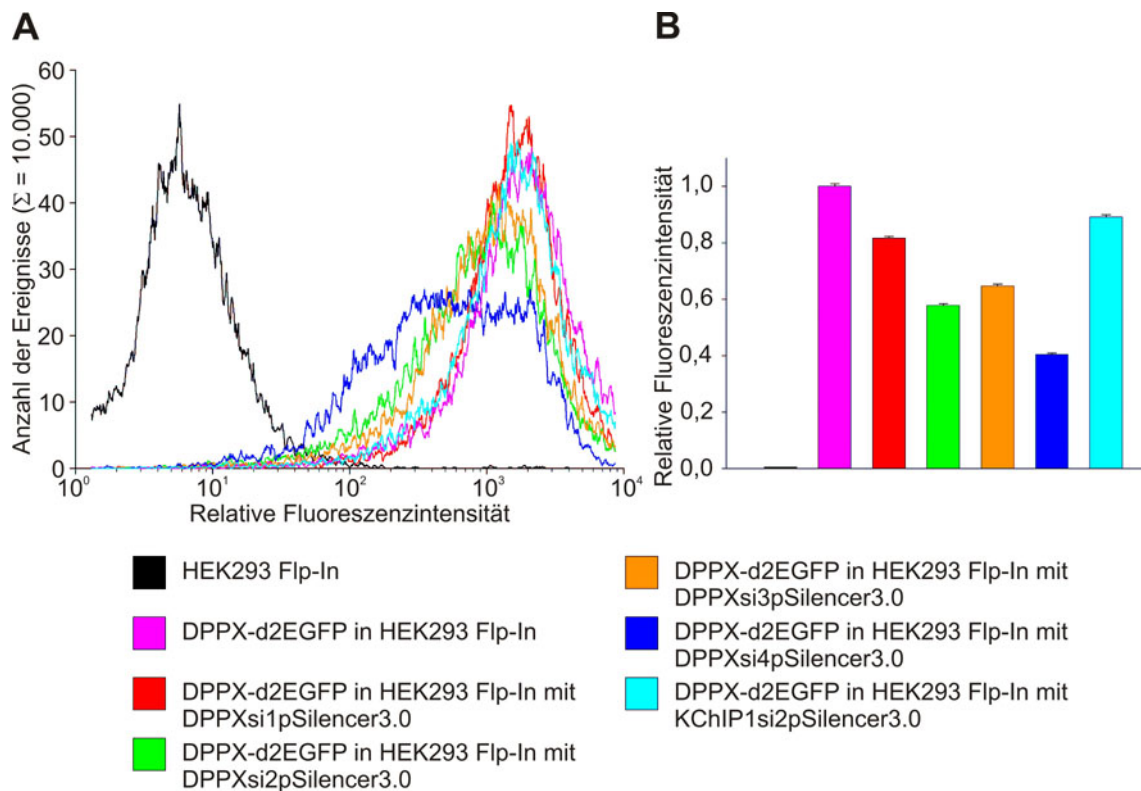


Abbildung 4.6: Untersuchung der DPPX-RNA-Interferenz mittels FACS-Analyse.

In Zellen einer stabilen HEK293-Zelllinie, die hDPPX-d2EGFP als Fusionsprotein exprimieren, wurde RNA-Interferenz ausgelöst. Es kamen vier verschiedene siPlasmide zum Einsatz. Ein gegen KChIP1 gerichtetes siPlasmid diente als Kontrolle (hellblau). Als Nachweis der Effizienz des Knockdowns wurde die Fluoreszenzintensität und damit die Menge des hDPPX-d2EGFP-Fusionsproteins im FACS gemessen. Die Zellen wurden dreimal transfiziert, an den Tagen 1, 5 und 8. Die Analyse der Zellen erfolgte 2 Tage nach der letzten Transfektion (Tag 10). **A.** Rohdaten aus der FACS-Messung. Für jede Probe wurden insgesamt 10.000 Zellen gemessen. Die Kurven wurden für eine bessere Übersichtlichkeit geglättet. **B.** Auswertung der Daten. Für die einzelnen Proben wurden die Fluoreszenzintensitäten bestimmt und aufgetragen, die Werte repräsentieren den Mittelwert $\pm$ SEM. Dabei wurden alle Proben auf die untransfizierten hDPPX-d2EGFP-Zellen normiert, deren mittlere Fluoreszenzintensität zuvor auf 1 gesetzt wurde.

ausgeprägt war als im Fall von KChIP2 (siehe [Abbildung 4.5 A](#)). Die statistische Auswertung ergab, dass eines der Konstrukte (DPPXsi4) eine Reduktion der Proteinmenge um 60% ermöglichte. Alle anderen Proben waren zwar effektiver als eine parallel getestete KChIP1-siRNA, erreichten aber nur eine Verringerung der Fluoreszenzintensität um 20 bis 40%.

4.1.4 RNAi-Nachweis durch Westernblot-Analyse

Mit Hilfe der FACS-Analyse, in der die Effizienz der RNA-Interferenz in einer existierenden Protein-Population untersucht wurde, ist es bei unvollständigem Knockdown nicht möglich, zwischen ineffizienter mRNA-Degradation und langer Lebensdauer des Zielproteins zu unterscheiden. Eine Alternative bietet die transiente Kotransfektion von Zielprotein-cDNA und siRNAs bzw. siPlasmiden. Da bei diesem Ansatz von vorn herein keine endogene Protein-Population besteht, kann von der nachgewiesenen Proteinmenge auf das Ausmaß des Abbaus der entsprechenden mRNA geschlossen werden.

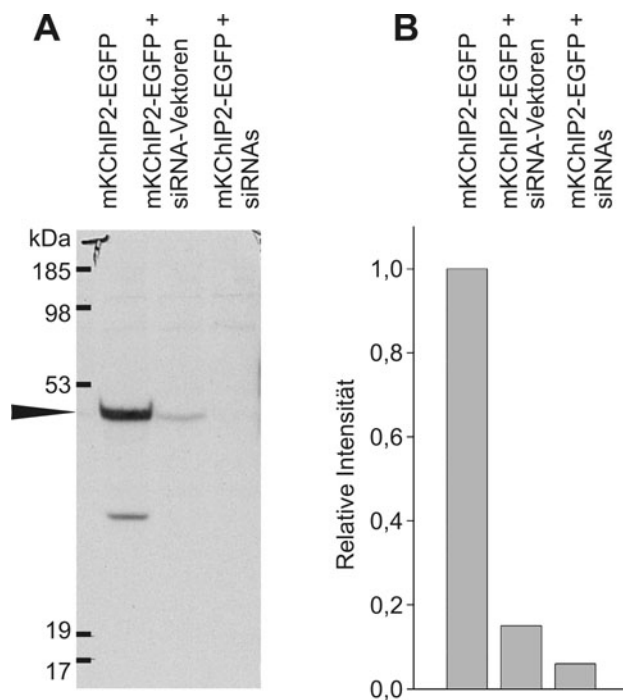


Abbildung 4.7: Nachweis des mKChIP2-Knockdowns im Westernblot.

CHO-Zellen wurden mit mKChIP2-EGFP und verschiedenen RNA-Interferenz induzierenden Agenzien kotransfiziert. Dabei wurde die Effizienz von einer Mischung aus vier siPlasmiden und drei synthetischen siRNAs verglichen. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte einen Tag nach der Transfektion. **A.** Westernblot der drei Proben. Der Nachweis der Proteine erfolgte über einem panKChIP-Antikörper. Der Pfeilkopf deutet auf die erwartete Laufhöhe des mKChIP2-EGFP-Fusionsproteins. Sowohl die siPlasmide als auch die synthetischen siRNAs waren in der Lage, eine deutliche Reduktion der Proteinexpression hervorzurufen. **B.** Quantifizierung des Blots in A mittels ImageJ. Die Intensität der ausschließlich mit mKChIP2-EGFP transfizierten Probe wurde auf 1 gesetzt. Die quantitative Auswertung ergab einen Knockdown von etwa 85% für die siPlasmide, mit synthetischen siRNAs konnte sogar ein noch stärkerer Effekt erzielt werden (etwa 96% Knockdown).

4.1.4.1 Knockdown von KChIP2

Nach der transienten Kotransfektion von mKChIP2-EGFP-cDNA und siPlasmiden bzw. synthetischen siRNAs wurde im Vergleich zur FACS-Analyse eine stärkere Reduktion der Proteinexpression beobachtet (siehe [Abbildung 4.7](#)). Dabei waren die siPlasmide den synthetischen siRNAs unterlegen, erreichten aber trotzdem einen Knockdown von etwa 85 %. Die synthetischen siRNAs reduzierten die Proteinmenge auf unter 5 %. Diese Werte zeigen, dass die KChIP2-mRNA sehr effizient abgebaut wird.

4.1.4.2 Knockdown von DPPX

Es wurden analoge Experimente zum Knockdown von DPPX durchgeführt. Dabei wurden die vier verschiedenen DPPX-Zielsequenzen in den jeweils zwei verschiedenen Vektoren eingesetzt. Die Ergebnisse spiegelten qualitativ die Resultate der FACS-Analyse wider (siehe [Abbildung 4.6](#)), quantitativ war der erzielte Knockdown aber vollständiger. So zeigten DPPXsi2 und DPPXsi4, die schon im FACS-Versuch vergleichsweise effizient waren, auch im Westernblot eine sehr starke Reduktion der DPPX-Menge, während DPPXsi1 und DPPXsi3 nur einen geringen Knockdown vermittelten (siehe [Abbildung 4.8](#)). Dabei fiel auf, dass beide verwendeten Promotoren in CHO-Zellen aktiv sind. Allerdings zeigten alle vier Zielsequenzen einen effizienteren Knockdown, wenn sie unter der Kontrolle des U6-Promotors waren. Dieses Verhalten wurde auch von anderen Gruppen *in vivo* und *in vitro* beschrieben ([An et al., 2006](#); [Makinen et al., 2006](#)). Trotz des Effekts der Promotoren zeigen die Ergebnisse, dass die Sequenz der siRNA in diesem Experiment entscheidend für die Stärke des Knockdowns ist.

4.1.5 Funktionelle Analyse der RNA-Interferenz in stabilen Zelllinien und hippokampalen Neuronen

Die vorangegangenen Ergebnisse verdeutlichen, dass mit den untersuchten siPlasmiden eine effiziente Verringerung der Menge der akzessorischen Untereinheiten möglich ist. Zudem können so auch große Proteinmengen, wie sie bei der transienten Transfektion unter Kontrolle eines starken Promotors entstehen, effektiv verringert werden. Daher wurde diese Methode auf einen funktionellen elektrophysiologischen Assay übertragen. Dabei sollte die akzessorische Untereinheit im Überschuss vorhanden und die Anzahl

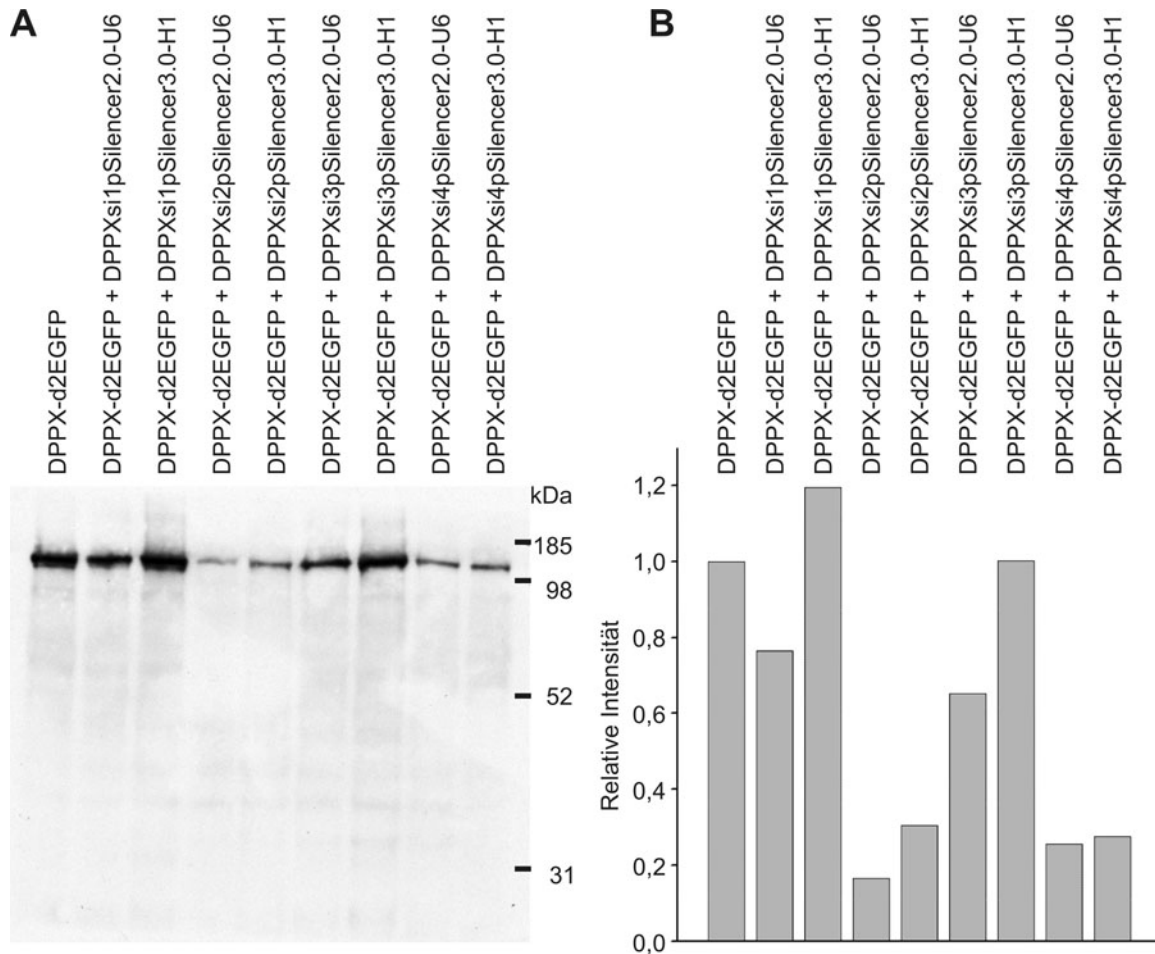


Abbildung 4.8: Nachweis des DPPX-Knockdowns im Westernblot.

CHO-Zellen wurden mit hDPPX-d2EGFP und verschiedenen siPlasmiden kotransfiziert. Dabei wurden vier Zielsequenzen unter der Kontrolle von jeweils zwei Promotoren untersucht. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte 2 Tage nach der Transfektion. **A.** Westernblot der neun Proben. Der Nachweis der Proteine erfolgte über das EGFP-Epitop. Teilweise wurde eine deutliche Reduktion der nachweisbaren DPPX-Menge erreicht. **B.** Quantifizierung des Westernblots in A mittels ImageJ. Die Intensität der ausschließlich mit hDPPX-d2EGFP transfizierten Probe wurde auf 1 gesetzt. Die quantitative Auswertung ergab einen Knockdown von bis zu 85 % für einzelne siPlasmide, andere Konstrukte zeigten keinerlei Wirkung.

der zu transfizierenden Plasmide minimal sein. Deshalb wurden Zelllinien erzeugt, in denen der Kv4.2-Kanal als fluoreszenzmarkiertes Fusionsprotein stabil exprimiert wurde. Dazu wurde, wie zuvor bei den akzessorischen Untereinheiten, EGFP bzw. d2EGFP an den C-Terminus des Kanals fusioniert (siehe [Abbildung 4.9 A](#)). Ähnliche Fusionsproteine wurden bereits verwendet, ohne dass ein Einfluss des EGFP-Epitops auf eine der untersuchten Eigenschaften des Kv4.2-Kanals beobachtet wurde ([Kim et al., 2005](#); [Lauver et al., 2006](#)). In der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zeigten die Zelllinien eine starke Fluoreszenz des über das Cytoplasma verteilten Fusionsproteins, wobei der Nukleus ausgespart war (siehe [Abbildung 4.9 B und C](#)).

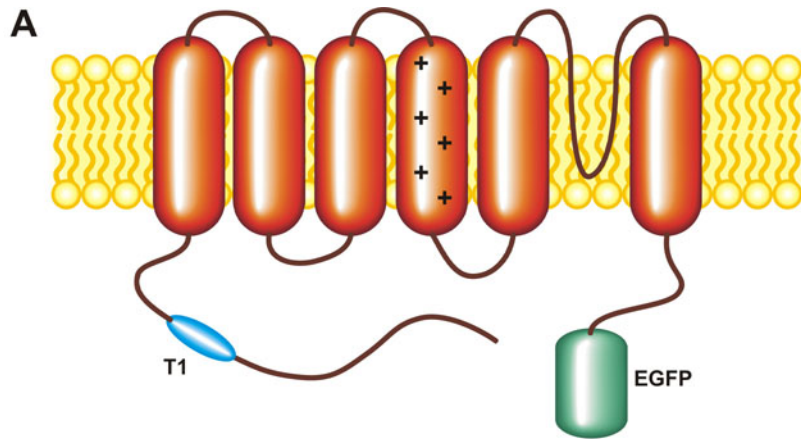
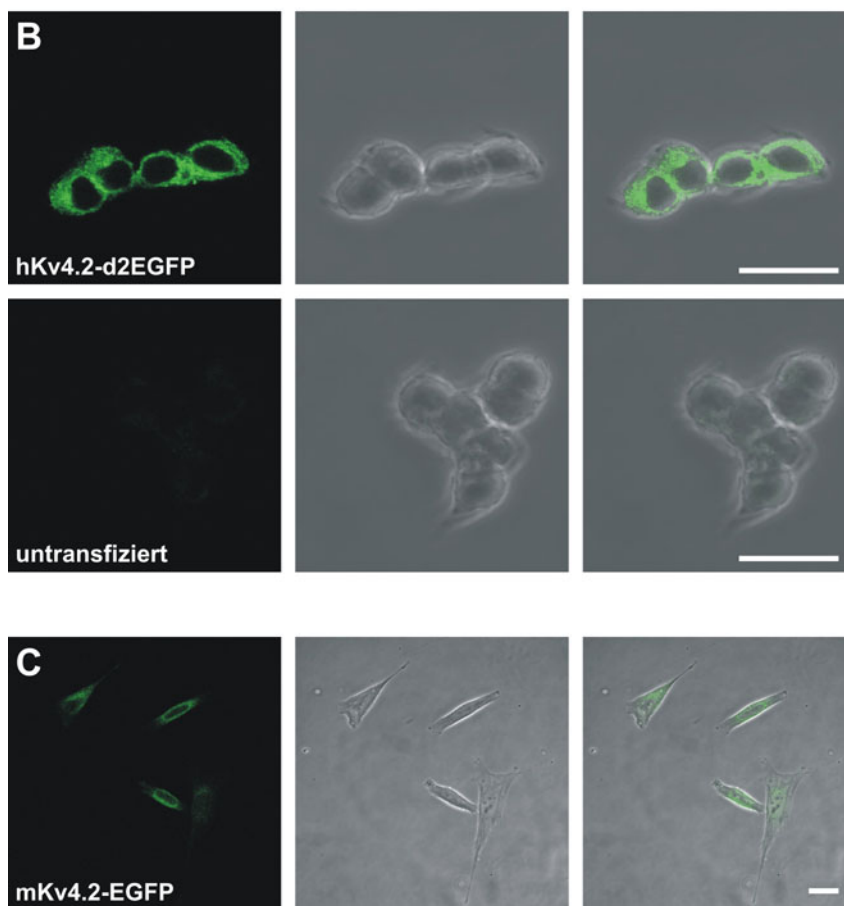


Abbildung 4.9: Erzeugung von Zelllinien, die den Kv4.2-Kanal als Fusionsprotein stabil exprimieren.

A. Schematischer Aufbau des fluoreszenzmarkierten Kv4.2-Kanals. Für eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Domänen siehe [Abb. 1.3](#). Die Fluoreszenzmarkierung wurde an den C-Terminus des Kanals fusioniert. **B.** HEK293-Flp-In-Zelllinie, die den humanen Kv4.2-Kanal als d2EGFP-Fusionsprotein exprimiert. Die linke Spalte zeigt eine repräsentative Fluoreszenzaufnahme, die mittlere Spalte eine Durchlichtaufnahme und die entsprechende Überlagerung ist in der rechten Spalte abgebildet. Als Vergleich sind untransfizierte HEK293-Flp-In-Zellen abgebildet. Das hKv4.2-d2EGFP-Fusionsprotein ist im perinukleären Raum lokalisiert. **C.** 3T3-Flp-In-Zelllinie, die den murinen Kv4.2-Kanal als EGFP-Fusionsprotein exprimiert. Die linke Spalte zeigt eine repräsentative Fluoreszenz-, die mittlere eine Durchlichtaufnahme und die entsprechende Überlagerung ist in der rechten Spalte abgebildet. Das mKv4.2-EGFP-Fusionsprotein ist ebenfalls im perinukleären Raum lokalisiert. Größenbalken: 20 μm .



Die humane Kv4.2-d2EGFP-Zelllinie wurde mit KChIP2.1, den siPlasmiden und DsRed kotransfiziert. Als sensibler Parameter für die Interaktion von Kanal und Unter-einheit diente die Erholung aus der Inaktivierung, die durch KChIP2 enorm beschleunigt wird ([An et al., 2000](#); [Bähring et al., 2001b](#)). Zudem bietet das *recovery*-Protokoll durch den ersten Testpuls den Vorteil einer internen Normierung (siehe [Abbildung](#)

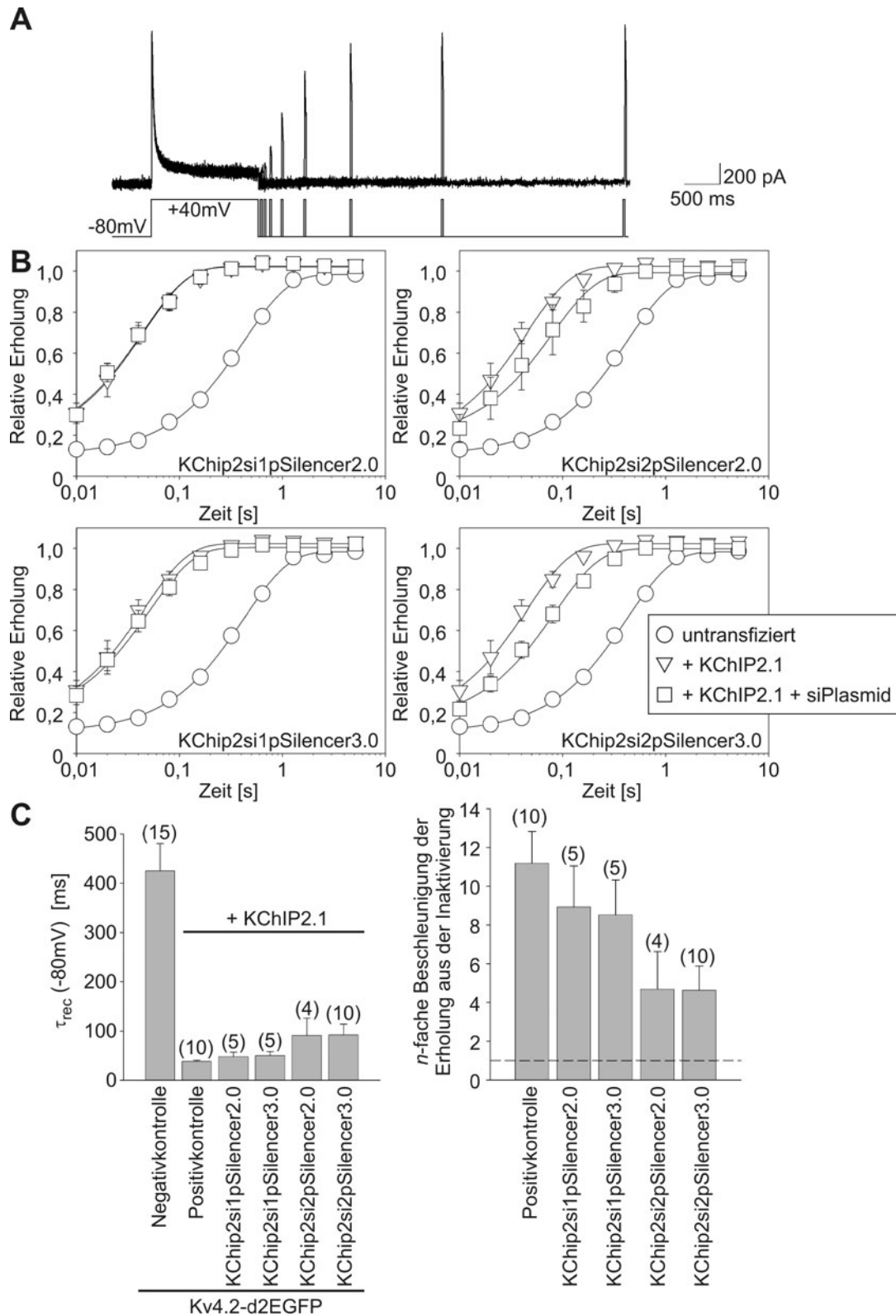


Abbildung 4.10: Elektrophysiologische Untersuchung des KChIP2-Knockdowns in einer stabilen hKv4.2-d2EGFP-Zelllinie.

Stabil hKv4.2-d2EGFP exprimierende HEK293-Zellen wurden mit KChIP2.1 und verschiedenen siPlasmiden kotransfiziert. Zur Quantifizierung des Knockdowns wurde die Erholung aus der Inaktivierung gemessen.

A. Typische Erholung des hKv4.2-d2EGFP-Kanals aus der Inaktivierung. Es ist die Überlagerung von 10 Messzyklen gezeigt. Jeder Messzyklus besteht aus einem Vorpuls, dem nach unterschiedlich langen Zeiträumen der eigentliche Testpuls folgt. Da der Kanal nach dem Vorpuls nicht sofort wieder zur Verfügung steht, sich aber allmählich erholt, wächst die Amplitude des Testpulses langsam mit der zwischen den Pulsen liegenden Zeit. Unter den Stromkurven ist eine Überlagerung der Zyklen des Pulsprotokolls abgebildet. **B.** Graphische Darstellung der Erholung aus der Inaktivierung für mit verschiedenen siPlasmiden transfizierte Zellen. Bei Anwesenheit von KChIP2.1 verschiebt sich die Erholungskurve des Kv4.2-Kanals (Kreise) nach links (Dreiecke). Die hKv4.2-d2EGFP-Zelllinie wurde mit KChIP2.1 (0,1 μg), dsRed (0,25 μg) und je einem siPlasmid kotransfiziert. Nach einem Tag wurde an diesen Zellen die Erholung aus der Inaktivierung gemessen (Quadrate). Die verschiedenen siPlasmide beeinflussten die Erholung in unterschiedlichem Maße, allerdings zeigte sich nie ein starker Knockdown-Effekt. **C.** Graphische Darstellung der Zeitkonstanten und der Effekte der Inaktivierung. Die Zeitkonstanten für mit siPlasmiden transfizierte Zellen verlangsamten sich, erreichten allerdings nicht das Niveau des hKv4.2-d2EGFP-Kanals in Abwesenheit von KChIP2.1. Die im Diagramm angegebenen N -Nummern gelten auch für Bild B. Alle Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

4.10 A). Aus [Abbildung 4.10 B](#) wird deutlich, dass die verschiedenen siPlasmide nur einen geringen Einfluss auf die Erholung aus der Inaktivierung haben. Wiederum ist ersichtlich, dass sowohl der U6- als auch der H1-Promotor aktiv waren, allerdings war KChIP2si1 wesentlich weniger effektiv als KChIP2si2 (vergleiche [Abbildung 4.8](#)). Aus der statistischen Auswertung (siehe [Abbildung 4.10 C](#)) wird deutlich, dass keines der getesteten siPlasmide im elektrophysiologischen Versuch einen großen Effekt zeigte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der unvollständige Knockdown durch die transiente Überexpression von KChIP2 hervorgerufen wurde.

Als Nächstes wurden die siPlasmide in kultivierten hippokampalen Mausneuronen getestet. Dass ein Knockdown in diesen Zellen durchgeführt werden kann, wurde bereits gezeigt ([Krichevsky und Kosik, 2002](#)). Für die Experimente wurde durch einen Testpuls auf +40 mV in den Neuronen eine Stromantwort ausgelöst. Dieser Gesamtstrom I_{gesamt} (siehe [Abbildung 4.11 A](#)) besteht aus einem *steady-state*-Strom I_{SS} und einer A-Typ-Stromkomponente I_{SA} , die nicht ohne Weiteres direkt gemessen werden kann. Die molekulare Grundlage für den I_{SA} sind Kv4-Kanäle ([Serodio et al., 1994, 1996](#)). Da die A-Typ-Kanäle bei weniger negativen Potentialen inaktivieren und nicht mehr verfügbar sind, stellt die Stromantwort der Zelle nach einem weniger negativen Vorpuls praktisch I_{SS} dar. Daher ist es möglich I_{SA} durch Subtraktion des I_{SS} vom Gesamtstrom I_{gesamt} zu erhalten. Als Parameter für die Effizienz der siPlasmide diene der Quotient aus I_{SA} und I_{SS} . Aus [Abbildung 4.11 B](#) geht hervor, dass das Verhältnis dieser beiden Ströme nach siPlasmid-Behandlung kleiner wird, was auf einen geringeren Anteil des durch Kv4 vermittelten Stroms am Gesamtstrom hindeutet. Die Bewertung

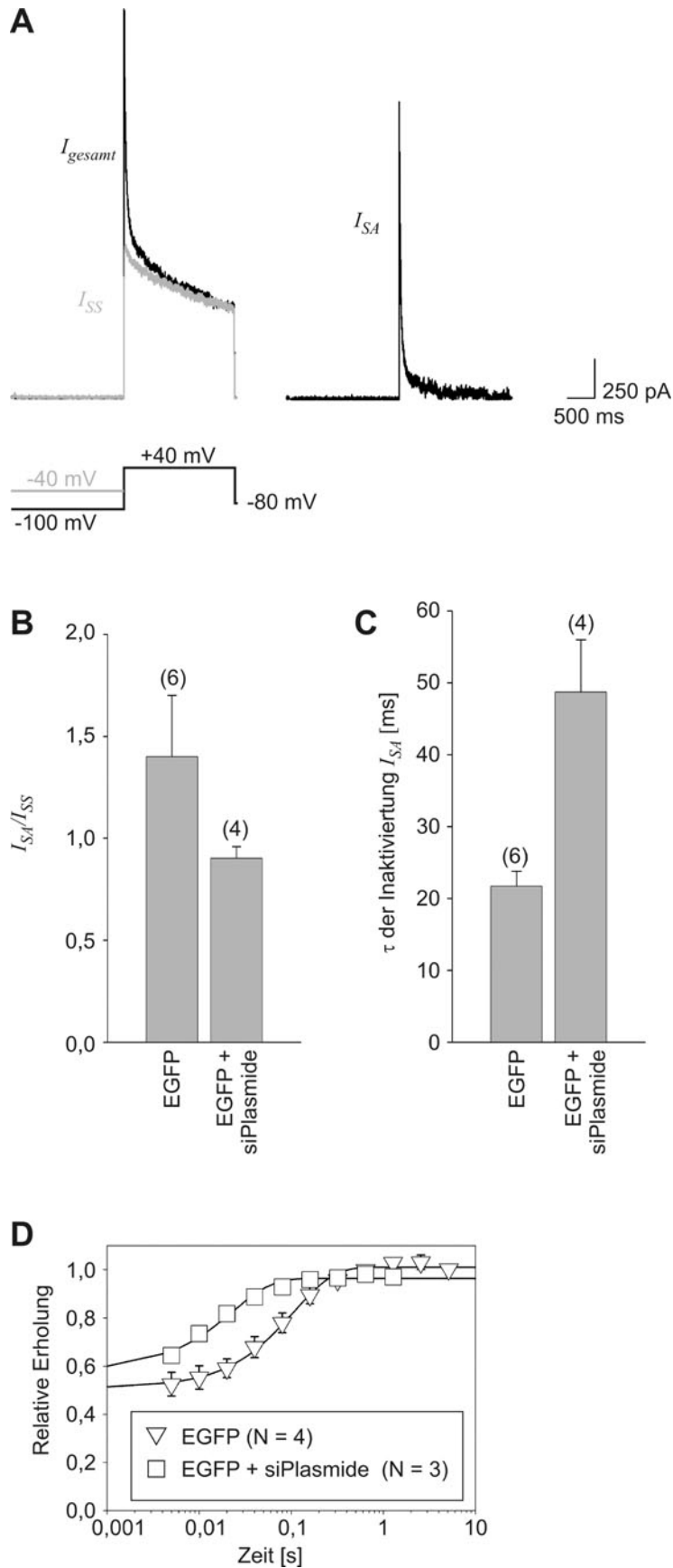


Abbildung 4.11: RNA-Interferenz in hippocampalen Neuronen.

Kultivierte hippocampale Neuronen wurden mit EGFP und einer Mischung aus gegen KChIP2 gerichteten siPlasmiden kotransfiziert. Die Messung erfolgte 1 bis 3 Tage nach der Transfektion. Alle Fehlerbalken stellen den SEM dar. **A.** Es wurde ein einfaches Testprotokoll mit stark negativem Vorpuls gemessen (schwarz). Auf diese Weise erhält man eine maximale Stromantwort. Anschließend wurde das gleiche Protokoll mit nur leicht negativem Vorpuls durchgeführt (grau). In diesem Fall sind die Kv4.2-Kanäle bereits inaktiviert und tragen nicht mehr zur Stromantwort bei. Der verbleibende Strom wird als I_{SS} und die inaktivierte Komponente als I_{SA} bezeichnet. **B.** Statistische Auswertung der elektrophysiologischen Daten aus den Neuronen. Der Quotient aus I_{SA} und I_{SS} diente als normiertes Maß für die Verringerung des A-Typ-Stroms. In den mit siPlasmiden behandelten Zellen sinkt dieses Verhältnis. **C.** Vergleich der Zeitkonstanten τ der Inaktivierung des I_{SA} . **D.** Erholung aus der Inaktivierung für Neuronen, die entweder mit EGFP oder mit EGFP und siPlasmiden transfiziert wurden.

der Knockdown-Effizienz ist in diesem System allerdings schwer möglich, da nicht entschieden werden kann, welchen Anteil an I_{SA} die Kv4.2/KChIP2-Komplexe haben. Es ist wahrscheinlich, dass neben KChIP2 weitere β -Untereinheiten in den Neuronen exprimiert werden, die durch den KChIP2-Knockdown nicht betroffen sind, aber signifikant zu I_{SA} beitragen. Der einfachste Weg, die Effizienz des KChIP2-Knockouts zu ermitteln, wäre der Vergleich der gemessenen Ströme mit dem I_{SA} von KChIP2-Knockout-Mäusen.

Ein vollkommen anderes Bild ergab die Auswertung der Zeitkonstanten τ der Inaktivierung des I_{SA} . Im heterologen Expressionssystem verlangsamt sich die Zeitkonstante nach Koexpression von KChIP2.2 (Bähring *et al.*, 2001b). Daher würde man nach Knockdown von KChIP2.2 eine schnellere Zeitkonstante erwarten. Im Gegensatz dazu zeigten die behandelten Neuronen eine deutliche Verlangsamung der Zeitkonstanten von $21,7 \pm 2,1$ ms ($N = 6$) auf $48,7 \pm 7,3$ ms ($N = 4$). Als weiterer sensibler Parameter wurde die Erholung aus der Inaktivierung untersucht. Dazu wurde das in [Abbildung 4.10 A](#) wiedergegebene Protokoll verwendet, dieses enthielt allerdings einen zusätzlichen Puls bei 5 ms. Die Erholung aus der Inaktivierung wurde nach Behandlung der Neuronen mit siPlasmiden, im Gegensatz zur Hypothese, schneller (siehe [Abbildung 4.11 C](#)). Die Vielzahl der in Neuronen exprimierten unterschiedlichen KChIP-Splice-Varianten, durch die Kv4-Kanal-vermittelte Ströme verschieden moduliert werden, könnte die beobachteten Effekte erklären (siehe [Diskussion](#)).

4.2 Modifizierte Kanaluntereinheiten mit extrazellulären Epitopen

Aus den in [Abschnitt 4.1](#) wiedergegebenen Ergebnissen geht hervor, dass mit den verwendeten Methoden durchaus ein Knockdown der akzessorischen β -Untereinheiten des Kv4.2-Kanals möglich ist. Bei der Anwendung der RNA-Interferenz in kultivierten hippokampalen Neuronen stößt man allerdings an die Grenzen des experimentellen Systems (siehe [Diskussion](#)). Diese könnten für den nativen Kv4.2-Kanal nur durch die Herstellung von Knockout-Mäusen für die einzelnen β -Untereinheiten umgangen werden. Für die systematische Untersuchung wäre allerdings die Erzeugung von Mehrfach-

Knockout-Mäusen nötig, an deren Neuronen dann die entsprechenden Versuche durchzuführen wären. Die Erzeugung solcher Mäuse wäre kosten- und zeitintensiv, zudem würde die Erzeugung der Mehrfach-Knockouts eine erhebliche logistische Herausforderung darstellen. Zusätzlich ergäbe sich beim Abschalten einer ganzen Gengruppe die Problematik von Sekundär- und Tertiäreffekten, die im Einzel-Knockout durch andere Mitglieder der selben Gengruppe kompensiert würden. Dies ist besonders bei Genen zu befürchten, deren Produkte eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen wahrnehmen wie z. B. KChIP3 (Buxbaum *et al.*, 1998; An *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002).

Eine Möglichkeit, all diese Probleme zu umgehen, ist die Verwendung von bindungsdefizienten Kanal-Punktmutanten. Auf diese Weise ist es mit relativ geringem Aufwand möglich, Kanäle zu generieren, die mit ganzen Gruppen von akzessorischen β -Untereinheiten nicht mehr interagieren können. Für die KChIPs wurden solche Punktmutanten im N-Terminus des Kv4.2-Kanals identifiziert (Callsen *et al.*, 2005). In dieser Studie wurden die N-terminalen Kv4.2-Mutanten A14K und F11K identifiziert, die sowohl in Koimmunpräzipitationen als bindungsdefizient charakterisiert wurden als auch in elektrophysiologischen Messungen keinen KChIP-Effekt zeigen. Für die folgenden Experimente wurde hauptsächlich die A14K-Mutante verwendet, auf die KChIP2 keinerlei Effekt mehr hat (Callsen *et al.*, 2005).

Ein weiterer Vorteil der Verwendung mutierter Kanäle ist die Möglichkeit, zusätzlich zur Mutation auch Markierungen einzubringen, die eine Lokalisation des Proteins erleichtern. Da es bisher keine guten kommerziellen Antikörper gibt, die den nativen Kv4.2-Kanal in der Immunfluoreszenz erkennen, wurde EGFP an den C-Terminus des Kanals fusioniert. Auf diese Weise war es möglich, die Expression und Lokalisation des Kanals ohne zusätzliche Antikörperfärbung zu verfolgen. Frühere Arbeiten zeigten bereits, dass das Einfügen eines C-terminalen EGFPs keinen Einfluss auf die Eigenschaften des Kv4.2-Kanals hat (Kim *et al.*, 2005; Lauver *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde zwischen den Transmembransegmenten S1 und S2 ein HA-Epitop in die extrazelluläre Schleife eingebracht, das die Visualisierung der Oberflächenexpression des Kv4.2-Kanals durch Färbung unpermeabilisierter Zellen ermöglicht. Einen Überblick über den prinzipiellen Aufbau der markierten α -Untereinheiten gibt [Abbildung 4.13 A](#).

4.2.1 Verhalten von Kv4.2A14K-HA in heteromultimeren Komplexen

Die bindingsdefiziente Kv4.2A14K-Mutante sollte letztlich in Neuronen exprimiert werden. Da in diesem nativen Expressionssystem eine signifikante Population endogener Kv4-Kanäle existiert, war es zunächst nötig, das Verhalten der Mutante in Gegenwart anderer Kv4- α -Untereinheiten zu untersuchen. Dazu wurde cRNA humaner Kv4.2wt-HA-, Kv4.3wt-HA- und Kv4.2A14K-HA-Kanäle in unterschiedlichen Kombinationen in *Xenopus*-Oozyten injiziert. Die Auswertung der Maximalströme mit und ohne KChIP2.2 ergab für die Wildtyp-Kanäle den erwarteten Stromanstieg in Gegenwart von KChIP2.2, während dieser bei Kv4.2A14K ausblieb (siehe [Abbildung 4.12 A und B](#)). In allen kombinierten Ansätzen zeigten die Ströme einen deutlichen An-

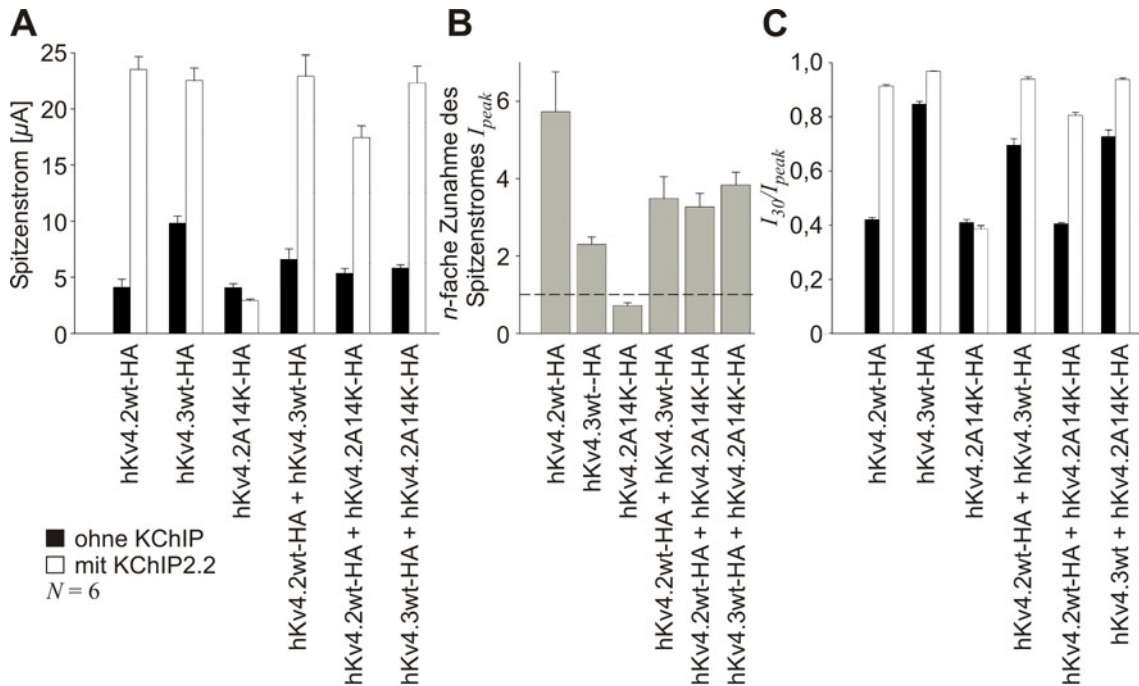


Abbildung 4.12: Untersuchung heteromultimerer Kv4-Komplexe in *Xenopus*-Oozyten.

Für diese Messungen wurden jeweils 0,5 ng Kanal-cRNA in Oozyten injiziert. Bei Expression verschiedener Kanal- α -Untereinheiten wurden die cRNAs im Verhältnis 1:1 eingesetzt. KChIP2.2 wurde in den entsprechenden Proben im fünffachen Überschuss verwendet. Die Expressiondauer betrug 48 Stunden. Die Oozyten wurden in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gemessen. **A.** Maximale Amplitude der Ströme in An- und Abwesenheit von KChIP2.2. Nur in der hKv4.2A14K-HA-Probe führte die Zugabe von KChIP2.2 nicht zu einer starken Steigerung der Stromamplitude. **B.** Graphische Darstellung der Zunahmefaktoren der maximalen Stromamplituden. Bei einem fehlenden KChIP-Effekt sind Werte um 1 (gestrichelte Linie) zu erwarten. **C.** Quotient aus dem Strom nach 30 ms (I_{30}) und maximaler Stromamplitude (I_{peak}). Da KChIP2.2 die initiale Phase der Inaktivierung verlangsamt, kann dieser Quotient als Maß für den Effekt der β -Untereinheiten auf die Kanal-Mutanten herangezogen werden.

stieg in Gegenwart von KChIP2.2. Der Quotient aus I_{30} und I_{peak} , der in Anwesenheit von KChIP2.2 deutlich ansteigt (Callsen *et al.*, 2005), ist ein weiteres Zeichen für die Interaktion von Kv4.2-Kanal und KChIP2.2. [Abbildung 4.12 C](#) zeigt diesen Quotienten für die in Oozyten gemessenen Ströme. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Quotient für den Kv4.2wt-Kanal stark anstieg, während sich für den Kv4.2A14K-Kanal keine Änderung nachweisen ließ. Bei Koexpression von Kv4.2wt- und Kv4.2A14K-cRNA zeigte sich ebenfalls ein deutlich erhöhter Wert für den I_{30}/I_{peak} -Quotienten in Anwesenheit von KChIP2.2.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte auf heteromultimeres Assembly zurückzuführen waren, wurde das Verhalten des mutierten Kanals in Säugerzellen in Gegenwart von Wildtyp-Kanälen untersucht. Aus diesem Grund wurden in CHO-Zellen Koimmunpräzipitationen zwischen KChIP2.1 und verschiedenen Kombinationen aus Kv4.2wt-HA, Kv4.3wt-HA und Kv4.2A14K-HA durchgeführt. Um zwischen Wildtyp- und mutiertem Kanal unterscheiden zu können, wurde in den gemischten Ansätzen je ein Kanalkonstrukt mit und ein Kanalkonstrukt ohne EGFP-Markierung verwendet. Da das EGFP-Protein etwa 27 kDa wiegt, lassen sich beide Kanalkonstrukte im Westernblot gut unterscheiden.

[Abbildung 4.13 B](#) zeigt den Expressionskontroll-Blot, der dazu diente, gleiche Proteinmengen in der Koimmunpräzipitation einzusetzen. Es ist zu erkennen, dass alle transfizierten Konstrukte exprimiert wurden. In [Abbildung 4.13 C](#) sind die Ergebnisse der Koimmunpräzipitation dargestellt. Starke Banden in den Bahnen 2 und 5 zeigen, dass der Kv4.2wt-Kanal unabhängig von der EGFP-Markierung an KChIP2.1 bindet, während der Kv4.2A14K-Kanal (Bahnen 3 und 6) nicht präzipitiert wird. In den Proben, die sowohl Kv4.2wt als auch Kv4.2A14K enthalten (Bahnen 1 und 4), werden jeweils beide Kanäle präzipitiert. Diese Daten sind zusammen mit der Koimmunpräzipitation in umgekehrter Richtung, die zu ähnlichen Ergebnissen führte, ein deutlicher Hinweis darauf, dass Kv4.2A14K nicht in der Lage ist, KChIP2.1 zu binden, aber mit Kv4.2wt Heteromultimere bildet. Ein analoges Verhalten ist in Gegenwart von Kv4.3wt zu beobachten, auch hier ist Kv4.2A14K in der Lage, wie Kv4.2wt Heteromultimere zu bilden (Bahnen 7 bis 9).

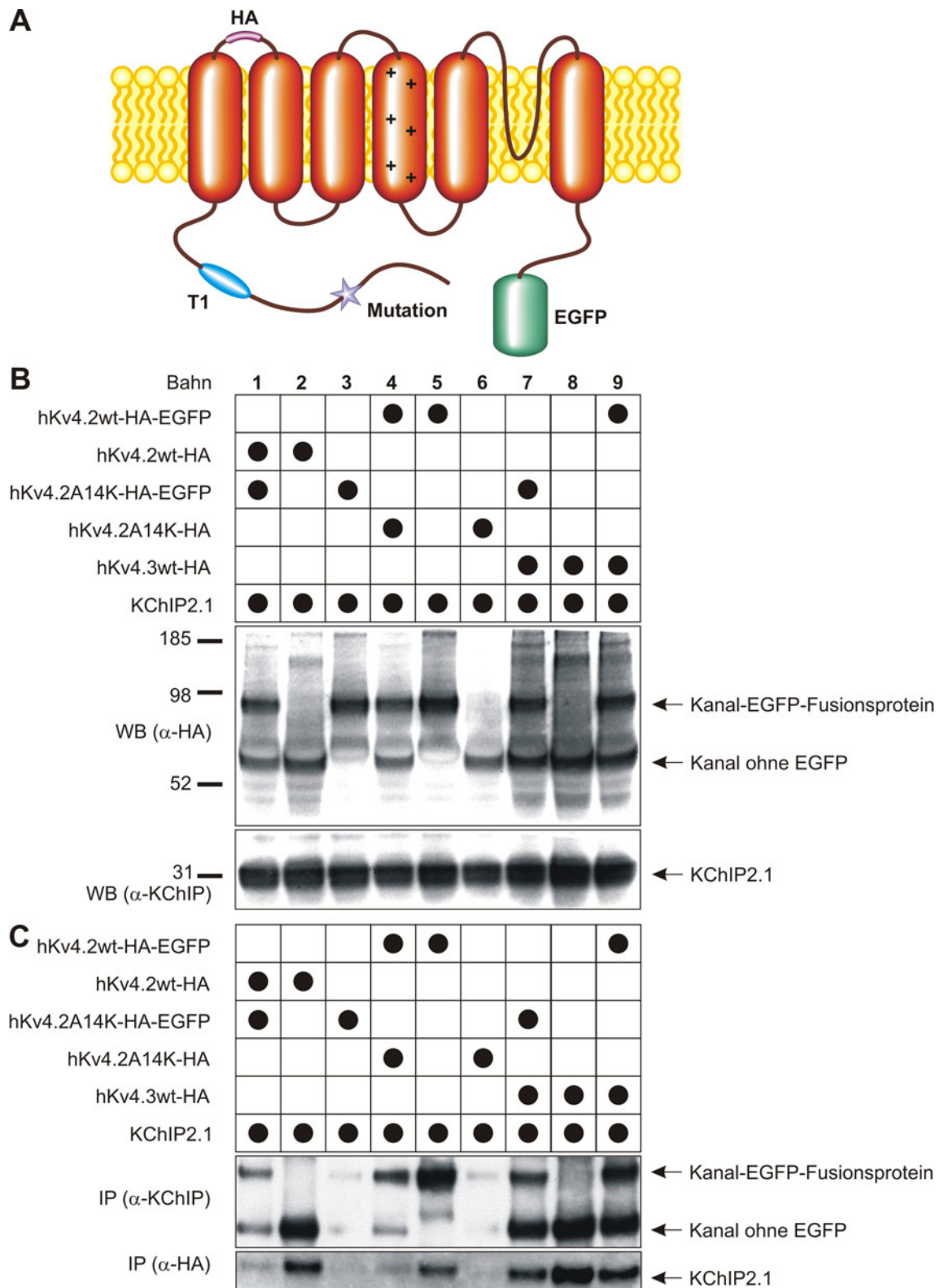


Abbildung 4.13: Koimmunpräzipitation heteromultimerer Kanal-Komplexe.

A. Schematischer Aufbau des fluoreszenzmarkierten Kv4.2-HA-Kanals. Für eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Domänen siehe [Abbildung 1.3](#). Die Fluoreszenzmarkierung wurde an den C-Terminus des Kanals fusioniert, das HA-Epitop befindet sich zwischen den Transmembransegmenten 1 und 2 und ist

von der Außenseite der Zelle zugänglich. Die Mutationen, die zur KChIP-Bindungsdefizienz führen (F11K, A14K), liegen im N-terminalen Bereich des Kanals. **B.** Expressionskontrollblot für die Koimmunpräzipitation. Es wurden Kanäle mit und ohne EGFP-Markierung in Anwesenheit von KChIP2.1 in CHO-Zellen koexprimiert. Der Kanal wurde über das HA-Signal nachgewiesen, für KChIP2.1 wurde ein panKChIP-Antikörper verwendet. Diese Westernblots wurden quantitativ ausgewertet und dienten der Angleichung der in der Koimmunpräzipitation eingesetzten Proteinmengen. **C.** Ergebnisse der Koimmunpräzipitation. Die Präzipitation erfolgte mit HA- bzw. panKChIP-Antikörpern.

Die Koimmunpräzipitationsdaten deuten darauf hin, dass weder das eingefügte extrazelluläre HA-Epitop noch die Fusion mit EGFP die Bindungseigenschaften des Kv4.2-Kanals ändern. Die Mutation A14K ist dagegen in solchen Konstrukten weiterhin ausreichend, die Interaktion mit KChIP2 vollständig zu unterbinden.

4.2.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der epitop-markierten Kv4.2-Konstrukte

Für die Charakterisierung der markierten Kanalkonstrukte war es weiterhin wichtig zu prüfen, ob diese im heterologen Säuger-Expressionssystem einen typischen A-Typ-Strom vermitteln. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob trotz der eingefügten Modifikationen eine funktionelle Interaktion mit KChIP2 und DPPX möglich war.

Wie in [Abbildung 4.14 A](#) zu sehen ist, waren die modifizierten Kanäle durchaus in der Lage, einen Wildtyp-ähnlichen A-Typ-Strom zu erzeugen. Darüber hinaus zeigte der Kv4.2wt-HA-EGFP-Kanal in Gegenwart von KChIP2.2 die typischen Merkmale der KChIP-Interaktion ([An et al., 2000](#); [Bähring et al., 2001b](#)). So wurde die Stromdichte etwa um den Faktor 25 erhöht und die initiale Phase der Inaktivierung verlangsamt (siehe [Abbildung 4.14 B](#)). Darüber hinaus zeigte der Kv4.2wt-HA-EGFP-Kanal bei Anwesenheit von DPPX die in der Literatur beschriebene schnelle initiale Inaktivierungsphase ([Nadal et al., 2003](#)) bei einer enormen Zunahme der Stromdichte (etwa um Faktor 80). Diese Daten deuten darauf hin, dass durch das Einführen der beiden Markierungen keine wichtigen Eigenschaften des Kanals zerstört wurden. Somit konnten diese Konstrukte für die geplanten Versuche verwendet werden.

4.2.3 Oberflächennachweis extrazellulär markierter Kanal-untereinheiten im heterologen Expressionssystem

In einem nächsten Experiment wurde die Zugänglichkeit des extrazellulären HA-Signals in unpermeabilisierten Zellen überprüft. Dazu wurden CHO-Zellen mit

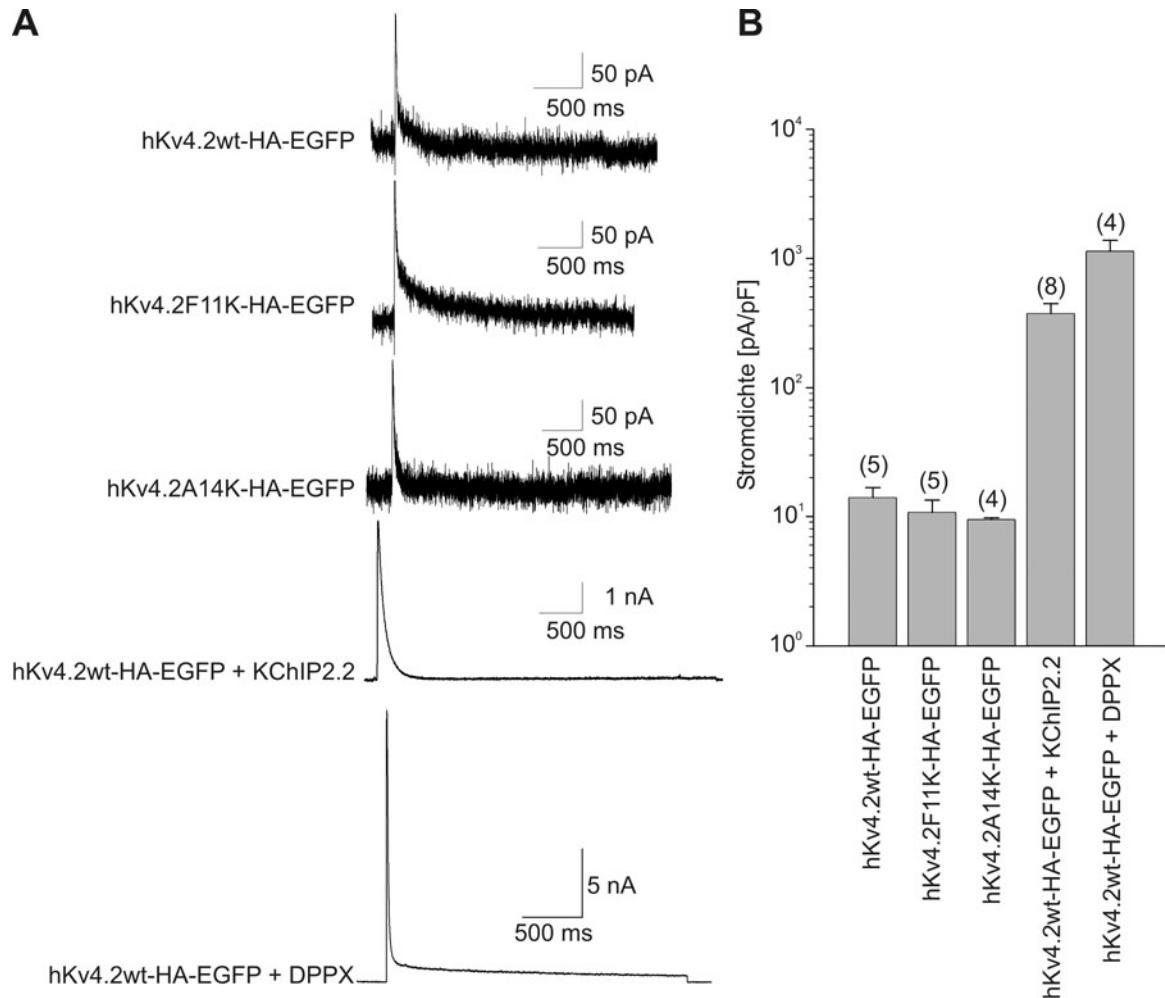


Abbildung 4.14: Nachweis der Funktionalität der HA-EGFP-Fusionsproteine.

CHO-Zellen wurden mit den Fusionsproteinen transfiziert. Die Reaktion auf einen einfachen Testpuls wurde in der Ganz-Zell-Konfiguration gemessen. **A.** Repräsentative Stromspuren des hKv4.2wt-HA-EGFP-Kanals und zweier KChIP-bindungsdefizienter Mutanten. Das Wildtyp-Konstrukt wurde zusätzlich mit KChIP2.2 bzw. DPPX koexprimiert, um einen Einfluss der eingefügten Markierungen auf die funktionelle Interaktion mit den Untereinheiten auszuschließen. **B.** Auswertung der Stromdichte-Daten für die in Bild A gezeigten Konstrukte. Die Stromdichte wurde auf einer logarithmischen Achse aufgetragen, die Fehlerbalken stellen den SEM dar.

Kv4.2wt-HA-EGFP und KChIP2 kotransfiziert. Durch die Anwesenheit von KChIP2 wird die Oberflächenexpression des Kv4.2-Kanals erhöht (Bähring *et al.*, 2001b). So behandelte unpermeabilisierte Zellen wurden mit einem HA-Antikörper gefärbt, der wegen der intakten Zellmembran nur an extrazelluläre Epitope binden konnte. Anschließend wurde ein Alexa546-markierter Sekundärantikörper appliziert. Somit zeigte die Rotfluoreszenz ausschließlich in die Zellmembran integrierte Kv4.2-Kanäle an, während die grüne Eigenfluoreszenz des Kv4.2wt-HA-EGFP-Kanals die Gesamtverteilung in der Zelle widerspiegelte.

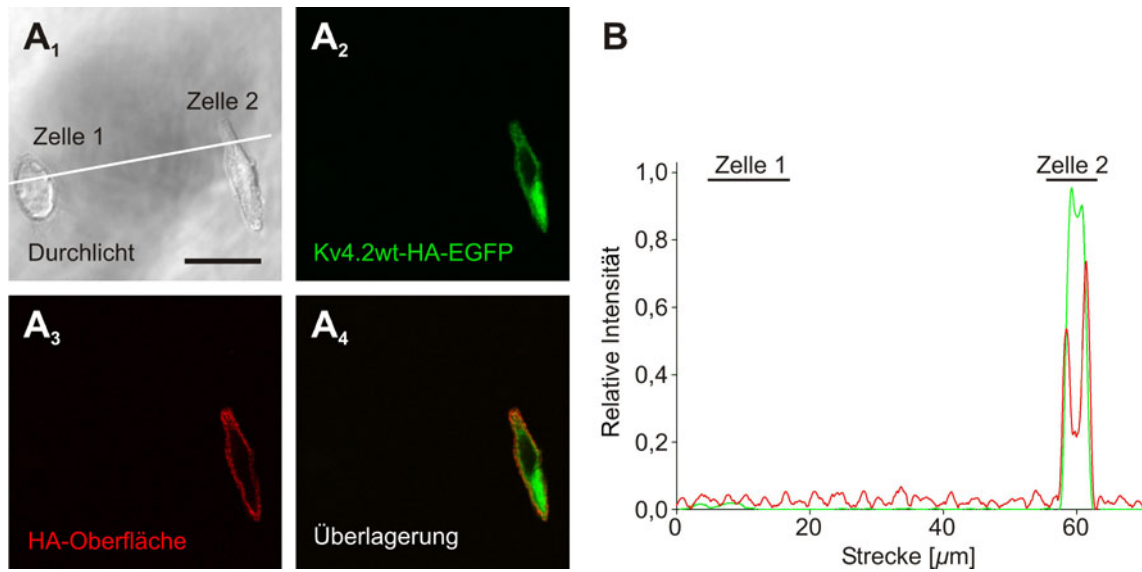


Abbildung 4.15: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Kv4.2wt-HA-EGFP in CHO-Zellen.

Um die Funktionalität der in den Kanal eingefügten Markierungen zu untersuchen, wurde dieser in Gegenwart von KChIP2 koexprimiert. **A.** Im Bildausschnitt liegen zwei CHO-Zellen (A_1). Die Eigenfluoreszenz des Kanals zeigt, dass nur eine dieser beiden Zellen transfiziert wurde (A_2). Eine anschließend durchgeführte Färbung gegen die HA-Markierung in unpermeabilisierten Zellen zeigt ein deutliches Signal in der Peripherie der transfizierten Zelle, welches in der untransfizierten Zelle fehlt (A_3). **B.** Die Fluoreszenzprofile entlang der im Durchlichtbild angegebenen Linie verdeutlichen diesen Sachverhalt. Es ist zu erkennen, dass Zelle 2 im Gegensatz zu Zelle 1 eine starke EGFP-Fluoreszenz und die aus der HA-Färbung resultierende Peripherie-Markierung aufweist.

Größenbalken: 20 μm .

In [Abbildung 4.15](#) ist eine solche Färbung dargestellt. Im Durchlicht sind zwei CHO-Zellen zu sehen. Eine dieser Zellen zeigt im Grünkanal eine deutliche EGFP-Fluoreszenz, diese Zelle ist im Gegensatz zur anderen Zelle transfiziert. Der Kv4.2A14K-HA-EGFP-Kanal ist hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat zu erkennen, darüber hinaus sind die peripheren Teile der Zelle gefärbt. Der Kern weist keinerlei Färbung auf. Die Färbung mit dem HA-Antikörper zeigt ein deutliches Signal an der Peripherie der transfizierten Zelle, während die untransfizierte Zelle nicht gefärbt ist. Diese Beobachtungen lassen sich auch im Fluoreszenzprofil wiederfinden. Hier zeigt die untransfizierte Zelle keine erhöhte Fluoreszenzintensität, während die transfizierte Zelle eine deutlich erhöhte EGFP-Fluoreszenzintensität mit peripherer HA-Färbung aufweist.

Ein vergleichbares Experiment wurde mit hDPPX-d2EGFP durchgeführt. Hier war es nicht nötig, ein zusätzliches extrazelluläres Epitop in das Protein einzuführen, da das C-terminale d2EGFP bei korrekt in die Membran integriertem hDPPX-d2EGFP in den

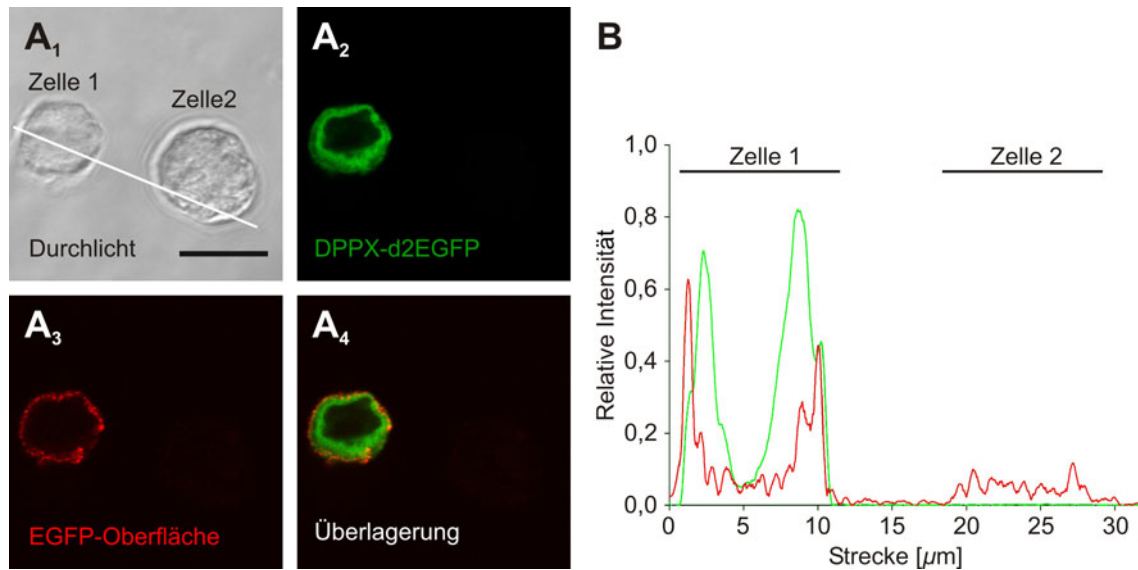


Abbildung 4.16: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von hDPPX-d2EGFP in CHO-Zellen.

Um die Funktionalität der in die Untereinheit eingefügten d2EGFP-Markierung zu untersuchen, wurde das DPPX-Konstrukt in CHO-Zellen exprimiert. **A.** Im Durchlichtbild sind zwei Zellen zu erkennen (A₁). Die Eigenfluoreszenz des hDPPX-d2EGFP-Konstrukts zeigt, dass nur eine dieser beiden Zellen transfiziert wurde (A₂). Die Untereinheit ist in der gesamten Zelle verteilt, der Kern ist dabei ausgespart. Eine anschließend durchgeführte Färbung gegen die d2EGFP-Markierung in unpermeabilisierten Zellen zeigt ein deutliches Signal in der Peripherie der transfizierten Zelle, welches in der untransfizierten Zelle fehlt (A₃). **B.** Die Fluoreszenzprofile entlang der im Durchlichtbild angegebenen Linie verdeutlichen diesen Sachverhalt. Es ist zu erkennen, dass Zelle 1 im Gegensatz zu Zelle 2 eine starke d2EGFP-Eigenfluoreszenz und die aus der Oberflächenfärbung resultierende Peripherie-Markierung aufweist. Größenbalken: 10 μm.

extrazellulären Raum ragt und somit für eine Färbung zugänglich ist. [Abbildung 4.16](#) zeigt wiederum zwei Zellen, von denen eine transfiziert ist, während die andere als Negativkontrolle dient. Die linke Zelle ist mit hDPPX-d2EGFP transfiziert und weist somit im Gegensatz zur untransfizierten Zelle die erwartete Grünfärbung im peripheren und perinukleären Bereich auf. Die durchgeführte Färbung der unpermeabilisierten Zellen ermöglichte den immunzytochemischen Nachweis ausschließlich extrazellulärer EGFP-Markierungen. Somit wurden nur korrekt in die Membran integrierte DPPX-Fusionsproteine angefärbt. Die auf diese Weise erhaltene Färbung der extrazellulären EGFP-Markierungen überlappt mit der Peripherie der transfizierten Zelle, während die als Negativkontrolle dienende untransfizierten Zelle nahezu keine Signale aufweist. Die graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität entlang der markierten Strecke verdeutlicht diese Ergebnisse. Es ist eindeutig zu erkennen, dass ausschließlich die transfizierte Zelle ein starkes EGFP-Signal mit Peripherie-Färbung des extrazellulären EGFPs zeigt.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die extrazellulären Epitope des Kv4.2-HA-EGFP-Kanals und der hDPPX-d2EGFP-Untereinheit für immunzytochemische Untersuchungen zugänglich sind und die Integration der Proteine in die Membran nicht negativ beeinflussen.

4.3 Epitopmarkierte Kanaluntereinheiten in hippocampalen Neuronen

Aus den Ergebnissen von [Abschnitt 4.2](#) geht hervor, dass sich die mit einer extrazellulären HA-Markierung versehenen Kv4.2wt-EGFP-Fusionsproteine im Hinblick auf ihre Elektrophysiologie und ihre Fähigkeit, akzessorische Untereinheiten zu binden, wie der Kv4.2wt-Kanal verhalten. Im Gegensatz dazu zeigte die Punktmutation A14K einen vollständigen Verlust der KChIP2-Interaktion, sowohl in Bindungsexperimenten als auch in elektrophysiologischen Untersuchungen. Darüber hinaus hatte diese Mutation aber keinen Einfluss auf die Kanaleigenschaften, so dass diese Mutante zur weiteren Untersuchung herangezogen werden konnte.

Kv4.2-Kanäle werden hauptsächlich im Gehirn und im Herzen exprimiert. Für die folgenden Experimente wurden kultivierte primäre hippocampale Neuronen von Maus und Ratte verwendet. Diese Neuronen sollten in Kultur mit den verschiedenen markierten Kanaluntereinheiten transfiziert werden. Dabei erfolgte der Expressions- und Lokalisationsnachweis über die Eigenfluoreszenz der EGFP-Markierung, so dass endogene Proteine nicht dargestellt wurden. Da die Färbung der extrazellulären Markierungen gegen HA bzw. EGFP erfolgte, beides Epitope, die nicht in den nativen Kanaluntereinheiten vorhanden waren, wurden auch hier ausschließlich transient transfizierte Kanaluntereinheiten nachgewiesen.

4.3.1 Subzelluläre Marker und morphologische Charakterisierung hippocampaler Neuronen in Primärkultur

Es wurden sowohl Kulturen aus neugeborenen Mäusen (P0) als auch aus embryonalen Ratten (E18) erzeugt und miteinander verglichen. Bei der Präparation der hippocam-

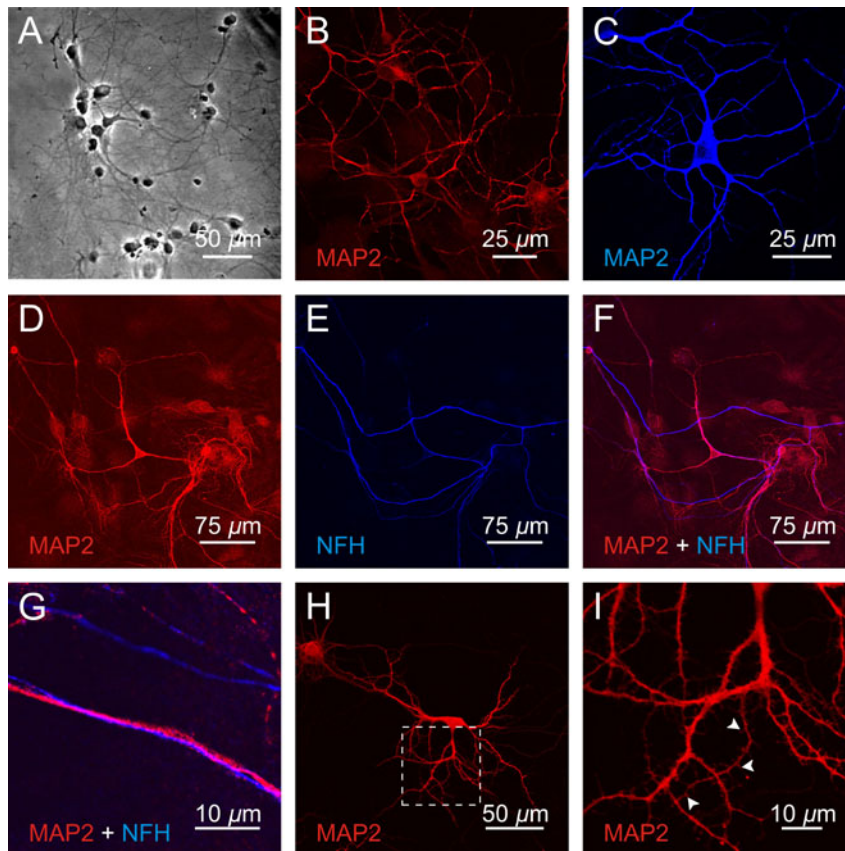


Abbildung 4.17: Mikroskopische Charakterisierung der neuronalen Primärkultur.

Kultivierte hippocampale Neuronen wurden mit Markern gegen typische neuronale Kompartimente gefärbt. **A.** Übersichtsaufnahme über eine Rattenneuronen-Kultur (E18, DIV8). **B.** Kultivierte Mauseuronen (P0, DIV8). Die Zellen wurden gegen den dendritischen Marker MAP2 gefärbt, um die Verzweigung des Dendritenbaums sichtbar zu machen. **C.** Typische hippocampale Pyramidenzellen (Maus, P0, DIV10). Neben dem pyramidenförmigen Soma sind deutlich der apikale und die beiden basalen Dendriten zu erkennen. **D.** Dendritische Färbung in einer Mauseuronen-Kultur (P0, DIV14). **E.** Färbung gegen den axonalen Marker NFH im selben Bildausschnitt wie D. **F.** Überlagerung der Bilder D und E. **G.** Oftmals erwiesen sich Strukturen, die immunzytochemisch zunächst positiv für MAP2 und NFH schienen, bei stärkerer Vergrößerung als zwei getrennte Strukturen (Maus, P0, DIV14). **H.** Rattenneuronen (E18) zeigen nach 14 Tagen in Kultur bereits einen weit entwickelten Dendritenbaum. **I.** Ausschnitt aus Bild H. Bei stärkerer Vergrößerung sind in diesem Stadium bereits *Spines* zu erkennen (Pfeilköpfe).

palen Primärkulturen wurden die Zellen einem Trypsin-Verdau unterzogen und mit einer Pasteur-Pipette trituriert. Als Folge davon waren die Neuronen zum Zeitpunkt ihrer Plattierung auf Deckgläschen kugelförmig und wiesen keinerlei neuronentypische Fortsätze wie Dendriten oder Axone auf. Für die geplanten Untersuchungen war es wichtig, reife Neuronen zu transfizieren. Um ein reifes Stadium zu erreichen, mussten diese Neuronen eine gewisse Zeit in Kultur gehalten werden. Andererseits ist die Zeit, die Neuronen in Kultur überleben, begrenzt und die ohnehin geringe Effizienz bei der Transfektion primärer Neuronen sinkt mit zunehmendem Alter dieser Zellen. Aus diesen Gründen war es für die nachfolgenden Untersuchungen essentiell, ein Zeitfenster zu bestimmen, in dem die Neuronen weit entwickelt waren, eine effiziente Transfektion aber trotzdem noch möglich war. Um die Entwicklung der Neuronen zu verfolgen, wurden endogene Proteine angefärbt. Als dendritischer Marker wurde MAP2 verwendet,

während NFH als axonaler Marker diene. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden Neuronen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit EGFP transfiziert und die Transfektionsrate bestimmt.

Abbildung 4.17 zeigt einige typische Stadien der Neuronenentwicklung *in vitro*. In Bild A ist eine Übersicht über plattierte Rattenneuronen zu sehen, die Zellen waren zu diesem Zeitpunkt 8 Tage in Kultur. Nach dieser Zeit haben kultivierte Neuronen bereits wieder einen stark verzweigten Dendritenbaum (siehe Bild B). Eine typische Pyramidenzelle zeigt Bild C. Das pyramidenförmige Soma, die beiden basalen und der apikale Dendrit sind gut zu erkennen. Dieses Neuron war zum Zeitpunkt der Färbung 10 Tage in Kultur. Das zweite wichtige neuronale Kompartiment neben den Dendriten sind die Axone. Die Bilder D bis F zeigen einen Ausschnitt einer 14 Tage alten Mauskultur, die sowohl gegen MAP2 als dendritischem Marker als auch gegen NFH als axonalem Marker gefärbt wurde. Beide Kompartimente sind deutlich zu erkennen. Bei einer solchen Kofärbung traten oft Kompartimente auf, die sowohl für MAP2 als auch für NFH positiv zu sein schienen. Bei stärkerer Vergrößerung wird allerdings deutlich, dass es sich um zwei getrennte Kompartimente handelte (siehe Bild G). Rattenneuronen in diesem Alter (DIV14) zeigen ebenfalls einen weit entwickelten Dendritenbaum (siehe Bild H). Zusätzlich dazu sind jedoch auch *Spines* zu erkennen (siehe Bild I), die bei 14 Tage alten Mausneuronen nie beobachtet wurden (vergleiche Bild G).

Die Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass kultivierte Neuronen bereits nach 7 Tagen in Kultur weit entwickelt sind. Darüber hinaus scheinen sich Rattenneuronen, die von Embryonen gewonnen wurden, schneller zu entwickeln als Neuronen von neugeborenen Mäusen. Leider konnten die Neuronen nach 14 Tagen in Kultur nur mit extrem geringer Effizienz transfiziert werden. Aus diesem Grund wurden die Transfektionen meist zwischen Tag 7 und Tag 10 vorgenommen, da die Dendritenbäume zu diesem Zeitpunkt schon weit entwickelt waren und die Transfektionseffizienz noch in einem akzeptablen Bereich lag. Während des Transfektionszeitraumes schienen Maus- und Rattenneuronen in einem ähnlichen Entwicklungsstadium zu sein, daher wurden beide Systeme verwendet.

4.3.2 Kv4.2-HA-EGFP-Lokalisation und -Oberflächennachweis

Da die KChIPs im heterologen Expressionssystem offensichtlich für den Transport des Kv4.2-Kanals zur Oberfläche wichtig sind (Bähring *et al.*, 2001b), sollte untersucht werden, ob Kv4.2-Känale, die nicht mehr in der Lage sind, KChIPs zu binden, im Vergleich zum Wildtyp-Kanal eine veränderte Lokalisation im Neuron aufweisen.

Dazu wurden kultivierte Mausneuronen mit den in Abschnitt 4.2 charakterisierten Kanalkonstrukten transfiziert (siehe Abbildung 4.18). Zur Bestimmung der Kompartimente wurde parallel eine MAP2-Färbung durchgeführt. Wie in Bild A zu sehen ist, war hKv4.2wt-HA-EGFP in der Lage, das Soma des transfizierten Neurons zu verlassen. Dabei war die Verteilung nicht gleichmäßig, sondern wies lokale Häufungen auf (Pfeilköpfe). Ein ähnliches Bild ergab die Untersuchung der KChIP-bindungsdefizienten Mutanten hKv4.2F11K-HA-EGFP (Bild B) und hKv4.2A14K-HA-EGFP (Bild C). Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Verteilungsmustern um durch passive Diffusion entstandene Artefakte handelte, wurden Neuronen mit einer transportdefizienten Kv4.2-Mutante transfiziert, der die letzten 30 Aminosäuren fehlten. Eine solche Deletion sollte die Fähigkeit des Kanals, das Soma zu verlassen, stark einschränken, da die Bindungsstelle des Kanals an den Transportfaktor Kif17 auf diesen Bereich eingeschränkt werden konnte (Chu *et al.*, 2006). Um eine vergleichbare transportdefiziente Mutante zu erhalten, wurden die letzten 30 Aminosäuren des Kv4.2-Kanals im Kv4.2wt-HA-EGFP-Konstrukt deletiert, so dass auf diese Weise Kv4.2-600Δ-HA-EGFP entstand. Dieses Konstrukt zeigte in Neuronen eine starke Expression, war aber nicht in der Lage, das Soma zu verlassen (siehe Bild D). Als Beispiel für eine Verteilung durch Diffusion wurde ein Neuron mit EGFP transfiziert (siehe Bild E). In diesem Fall war eine hohe Fluoreszenzintensität entlang der Dendriten zu erkennen, die nicht die beim transportierten Kanal beobachteten lokalen Häufungen aufwies. Diese Beobachtungen wurden im rechten Teil der Abbildung noch einmal durch typische Intensitätsprofile von Dendritenabschnitten verdeutlicht. Offensichtlich ist die KChIP-Bindung für den Transport des Kv4.2-Kanals entlang der Dendriten nicht von entscheidender Bedeutung.

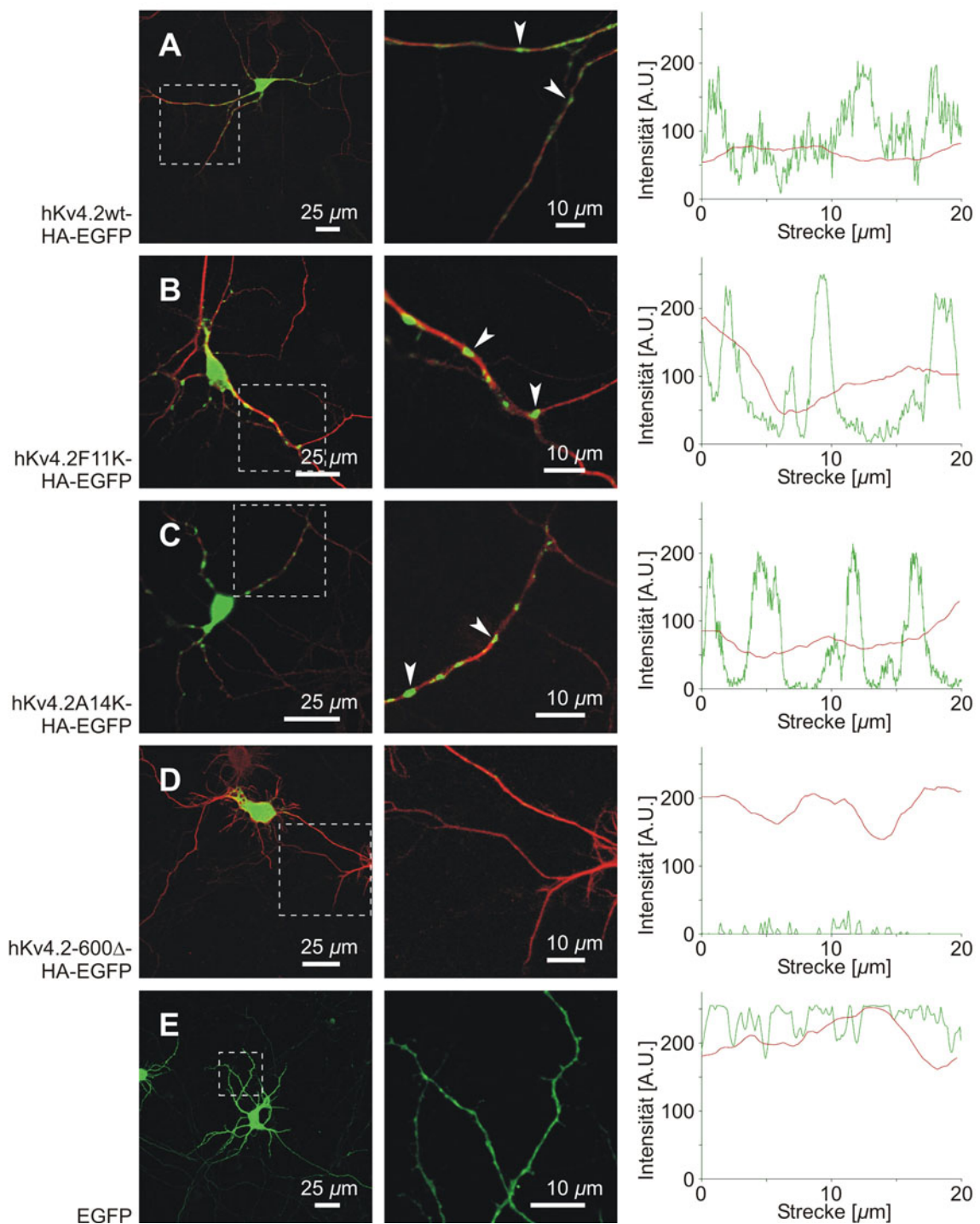


Abbildung 4.18: Lokalisation fluoreszenzmarkierter Kv4.2-Konstrukte in Neuronen.

Kultivierte hippocampale Neuronen wurden mit hKv4.2-HA-EGFP-Konstrukten transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen gegen den dendritischen Marker MAP2 gefärbt (rot). Die linke Spalte zeigt jeweils eine Übersichtsaufnahme der Zelle. Die rechte Spalte zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des durch die Boxen angedeuteten Bereichs. Rechts neben den mikroskopischen Aufnahmen ist jeweils ein Fluoreszenzprofil entlang eines repräsentativen Dendritenausschnittes zu sehen. Dabei ist die Eigenfluoreszenz des EGFPs in Grün aufgetragen, die MAP2-Fluoreszenz wurde zur besseren Übersichtlichkeit geglättet und in Rot dargestellt. **A.** Kv4.2wt-HA-EGFP zeigt eine EGFP-Fluoreszenz in den Dendriten. **B.** Auch die Eigen-

fluoreszenz der KChIP-bindungsdefizienten Mutante hKv4.2F11K-HA-EGFP zeigt eine Verteilung, die nicht nur auf das Soma beschränkt ist, sondern deutliche Anhäufungen entlang der Dendriten aufweist. **C.** Ein ähnliches Bild ergibt sich für die zweite getestete KChIP-bindungsdefiziente Mutante hKv4.2A14K-HA-EGFP. **D.** Als Negativkontrolle wurde ein Konstrukt transfiziert, das wegen einer Deletion nicht mehr in die Dendriten transportiert werden konnte. Hier ist keinerlei Färbung im Dendriten zu erkennen. **E.** Im Gegensatz dazu zeigen mit EGFP transfizierte Neuronen eine vollkommen homogene Verteilung des fluoreszierenden Proteins, da dieses im Gegensatz zu den Kanalkonstrukten nicht aktiv transportiert wird, sondern diffundiert.

Im Folgenden sollte der Einfluss von KChIP2 auf die Oberflächenexpression des Kv4.2-Kanals untersucht werden. Dazu wurden kultivierte Rattenneuronen mit hKv4.2wt-HA-EGFP und hKv4.2A14K-HA-EGFP transfiziert, zusätzlich wurden analoge Experimente durchgeführt, in denen KChIP2.1 kotransfiziert wurde. Die Lokalisation des Kanals ergab sich aus der Eigenfluoreszenz des EGFP-Fusionsproteins, die Oberflächenexpression wurde durch Färbung der extrazellulären HA-Markierung sichtbar gemacht (siehe [Abbildung 4.19](#)). Es war zu erkennen, dass die Lokalisationsprofile der Kv4.2-Kanäle lokale Häufungen aufwiesen. Zudem wurde in allen vier Proben ein Anteil des markierten Kanals an der Dendritenoberfläche nachgewiesen (Pfeilköpfe). Darüber hinaus wurden aber auch Protein-Ansammlungen beobachtet, die sich nicht an der Oberfläche befanden und daher in der HA-Färbung kein Signal gaben (Pfeile). Die Probe, in der hKv4.2wt-HA-EGFP mit KChIP2.1 kotransfiziert wurde, hob sich insofern von den anderen untersuchten Proben ab, als die EGFP-Eigenfluoreszenz und die Färbung des extrazellulären HA-Epitops nahezu vollständig überlappten.

Dieser erste Eindruck sollte im Folgenden statistisch untermauert werden. Für die Färbung wurden jeweils exakt die gleichen Bedingungen verwendet, Gleiches galt für die Aufnahmeparameter am Mikroskop. Auf diese Weise war es möglich, eine semi-quantitative Aussage über die relative Oberflächenexpression des Kanals zu machen. Dazu wurden für beide Fluoreszenzmarker die Intensitäten entlang der Dendriten vermessen und entsprechende Intensitätsprofile erstellt. (siehe [Abbildung 4.20](#)). Bereits die Überlagerung der Fluoreszenzintensitäten zeigte, dass es in allen Proben EGFP-Signale gab, denen ein korrespondierendes HA-Signal zugeordnet werden konnte (Pfeilköpfe). Darüber hinaus gab es EGFP-Signale ohne zugehöriges HA-Signal (Pfeile). Die Auswertung der Flächen unter den Kurven ergab, dass die relativen Anteile der Oberflächenexpression von hKv4.2wt-HA-EGFP und hKv4.2A14K-HA-EGFP in etwa vergleichbar waren. Diese Werte konnten durch Kotransfektion von KChIP2.1

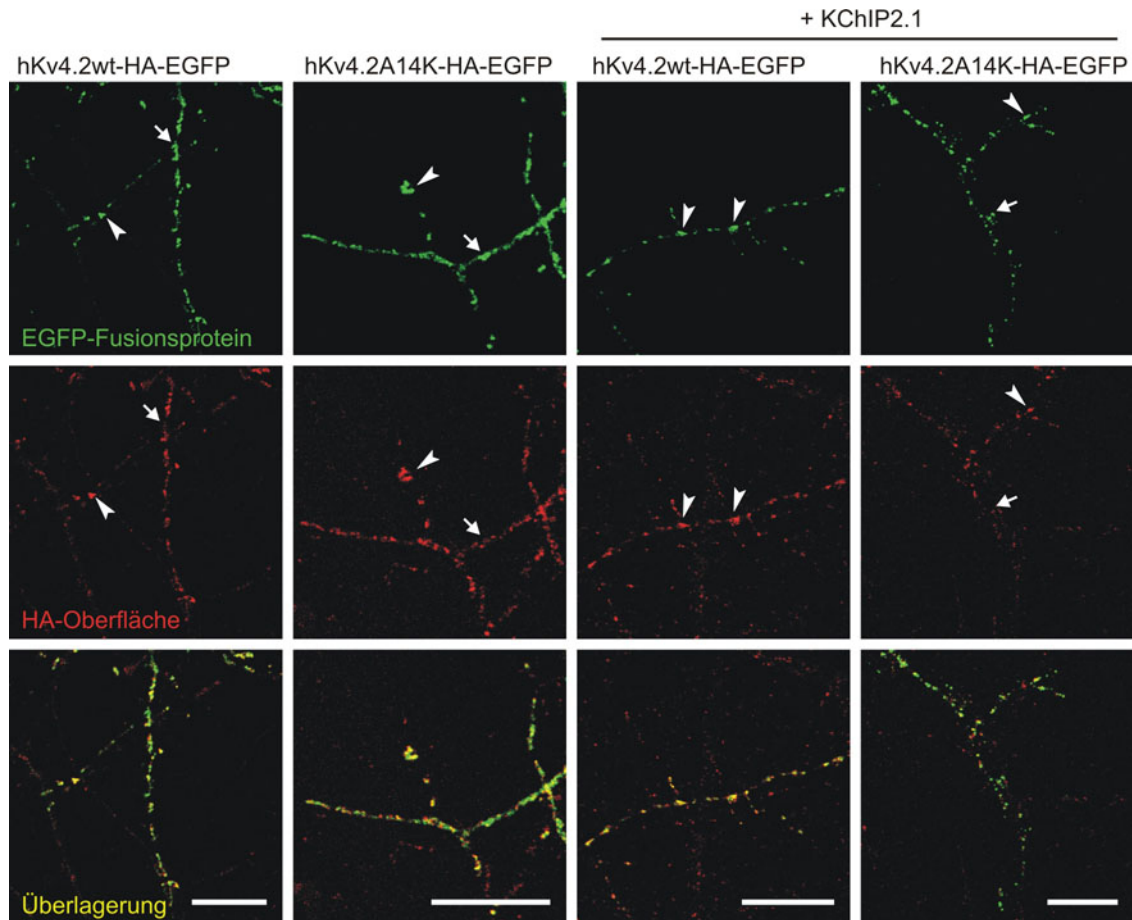
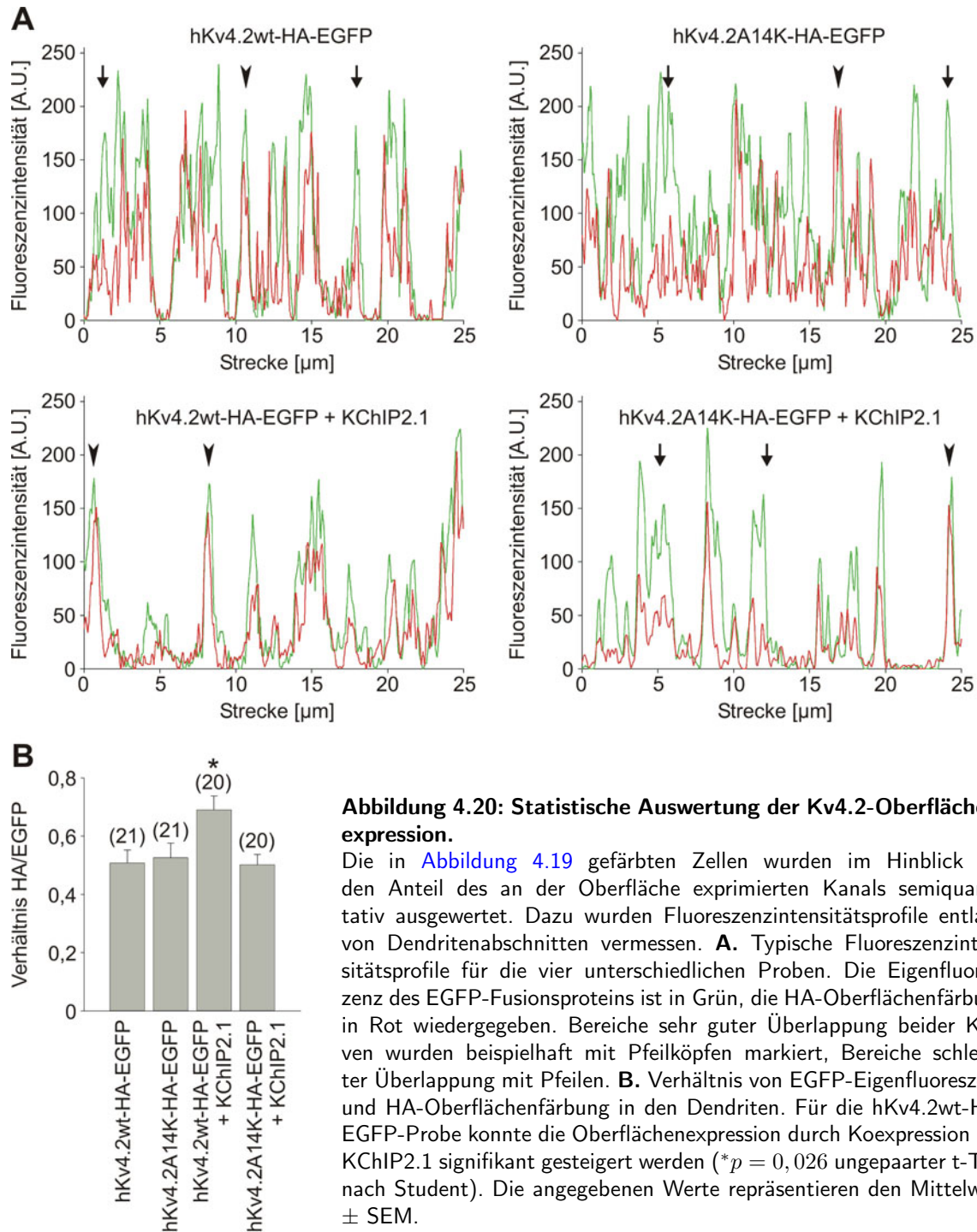


Abbildung 4.19: Oberflächenexpression fluoreszenzmarkierter Kv4.2-Konstrukte in Neuronen. Hippokampale Rattenneuronen (E18) wurden an DIV7 mit hKv4.2wt-HA-EGFP bzw. hKv4.2A14K-HA-EGFP transfiziert. Dabei wurde jeder der Kanäle mit und ohne zusätzliches KChIP2.1 zur Expression gebracht. Anschließend wurden die unpermeabilisierten Neuronen gegen das extrazelluläre HA-Epitop gefärbt und mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops analysiert. Dabei wurde die EGFP-Eigenfluoreszenz (obere Reihe) mit der HA-Oberflächenfärbung (mittlere Reihe) verglichen. Die Überlagerung ist in der unteren Reihe wiedergegeben. In den Proben wurden sowohl Kanal-Anhäufungen gefunden, denen eine Oberflächenexpression entsprach (Pfeilköpfe), als auch solche, die ohne komplementäre Oberflächenexpression waren (Pfeile). Dabei wurde in der mit KChIP2.1 kotransfizierten hKv4.2wt-HA-EGFP-Probe nahezu ausschließlich Kolo-kalisation beobachtet. Größenbalken: 15 μm .

für hKv4.2wt-HA-EGFP um beinahe 40% gesteigert werden, während das Verhältnis für die KChIP-bindungsdefiziente hKv4.2A14K-HA-EGFP-Mutante unverändert blieb (siehe [Abbildung 4.20 B](#)).

Diese Ergebnisse zeigen, dass KChIP2 in der Lage ist, die Oberflächenexpression von Kv4.2 in Neuronen zu steigern, allerdings scheint es noch weitere Faktoren zu geben, die für die Oberflächenexpression von Kv4.2 von Bedeutung sind.



4.3.3 hDPPX-d2EGFP-Lokalisation und -Oberflächennachweis

Für die akzessorische β -Untereinheit DPPX sollten analoge Experimente zur Oberflächenexpression durchgeführt werden. Bisher sind keine Mutationen beschrieben, die

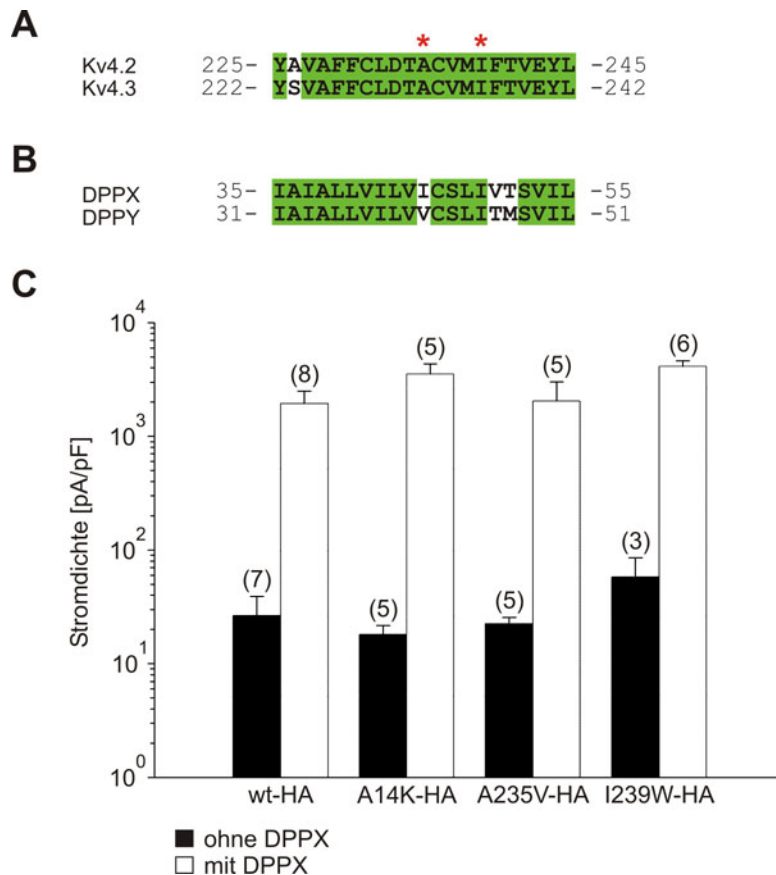


Abbildung 4.21: Charakterisierung der DPPX-Interaktionsfähigkeit.

Die für Kv4.3 publizierte Mutationen, die den Einfluss von DPPY aufheben, wurden auf Kv4.2 übertragen. **A.** Sequenzvergleich der S2-Domänen von Kv4.2 und Kv4.3. Gleiche Aminosäuren sind farblich hinterlegt. Beide Transmembrandomänen unterscheiden sich lediglich in einer Aminosäure. Die für die Kv4.3-Untereinheit publizierten und in Kv4.2 übertragenen Mutationen (A232V bzw. A235V und I236W bzw. I239W) sind durch rote Sterne markiert. **B.** Sequenzvergleich der Transmembrandomänen von DPPX und DPPY. Gleiche Aminosäuren wurden grün hinterlegt. Die Transmembrandomänen der beiden Dipeptidylaminopeptidasen unterscheiden sich nur in drei Positionen. **C.** Es wurde untersucht, ob DPPX einen Effekt auf die mutierten Kv4.2- α -Untereinheiten hat. Dazu wurden CHO-Zellen mit 0,1 μ g Kanalunterein-

heit und 1 μ g DPPX transfiziert. Die Messung der maximalen Stromantwort auf einen Testpuls auf +40 mV erfolgte nach einem Tag. Die Mittelwerte $\pm$ SEM wurden in einem semilogarithmischen Diagramm aufgetragen.

den Kv4.2-Kanal bindungsdefizient für DPPX machen. Allerdings wurden zwei Mutationen in der zweiten Transmembrandomäne von Kv4.3 publiziert, die die Bindung von DPPY an diesen Kanal verhindern (Ren *et al.*, 2005). Sowohl Kv4.2 und Kv4.3 als auch DPPX und DPPY zeigen in der Umgebung dieser Mutationen eine hohe Homologie (siehe Abbildung 4.21 A und B). Daher wurden die für Kv4.3 beschriebenen Mutationen auf die entsprechenden homologen Positionen in der Kv4.2-Kanaluntereinheit übertragen. In elektrophysiologischen Experimenten wurde überprüft, ob die erzeugten Konstrukte (Kv4.2A235V-HA und Kv4.2I239W-HA) in der Lage waren, mit DPPX zu interagieren. DPPX als akzessorische Untereinheit erhöht den durch Kv4-Kanäle vermittelten Strom drastisch (Nadal *et al.*, 2003; Radicke *et al.*, 2005). Daher wurde die maximale Stromantwort auf einen Testpuls auf +40 mV zur Auswertung herangezogen. Alle getesteten Kv4.2-Konstrukte zeigten in Gegenwart von DPPX einen starken Anstieg der Amplitude der Stromantwort (Abbildung 4.21 C). Es wurde daher

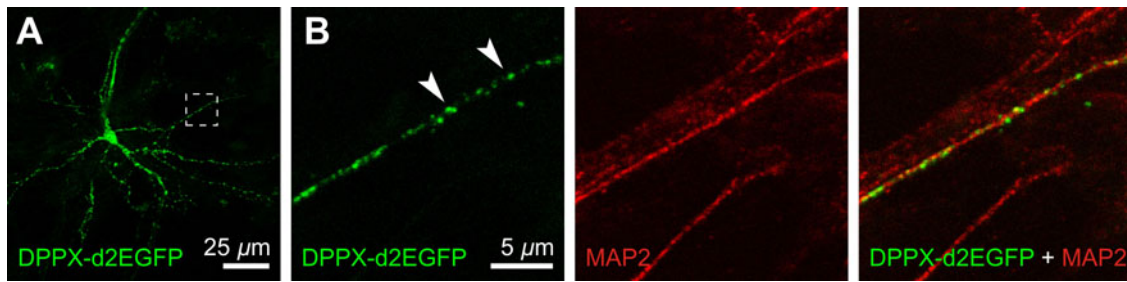


Abbildung 4.22: Lokalisation von hDPPX-d2EGFP in Neuronen. Hippokampale Rattenneuronen (E18) wurden mit hDPPX-d2EGFP transfiziert. **A.** Die Eigenfluoreszenz des hDPPX-d2EGFP-Konstruktes zeigt, dass das Fusionsprotein stark exprimiert wird und in die Dendriten gelangt. **B.** Der durch die Box in Bild A gekennzeichnete repräsentative Dendritenausschnitt bei stärkerer Vergrößerung. Es ist die Eigenfluoreszenz des hDPPX-d2EGFP, die MAP2-Färbung des dendritischen Kompartiments sowie die entsprechende Überlagerung abgebildet. Wie bei hKv4.2-HA-EGFP ist auch hier eine uneinheitliche Verteilung mit lokalen Anhäufungen zu erkennen (Pfeilköpfe).

davon ausgegangen, dass die eingefügten Mutationen nicht ausreichend sind, einen funktionellen Effekt von DPPX auf den Kv4.2-Kanal zu unterbinden. Aufgrund dieser Tatsache konnte die Quantifizierung der Oberflächenexpression analog zur KChIP-bindungsdefizienten Kv4.2A14K-Mutante nicht durchgeführt werden.

Im Gegensatz zu den KChIPs sind die Dipeptidylaminopeptidasen transmembranäre Proteine. Daher ist es möglich, die Oberflächenexpression einer solchen akzesorischen β -Untereinheit durch immunzytochemische Färbung unpermeabilisierter Zellen zu visualisieren. Für diesen experimentellen Ansatz wurde hDPPX-d2EGFP verwendet, da bereits gezeigt wurde, dass das EGFP-Epitop den Transport des Fusionsproteins in CHO-Zellen nicht stört (siehe [Abbildung 4.16](#)). Um das Verhalten des DPPX-Fusionsproteins in einem physiologischerem Umfeld zu untersuchen, wurden kultivierte hippocampale Rattenneuronen mit hDPPX-d2EGFP transfiziert (siehe [Abbildung 4.22](#)). In [Abbildung 4.22 A](#) ist eine Verteilung des hDPPX-d2EGFP-Fusionsproteins entlang der Dendriten zu erkennen. Bei stärkerer Vergrößerung sind zahlreiche diskrete Anhäufungen in den Dendriten erkennbar (siehe [Abbildung 4.22 B](#)).

Um die Bedeutung des Kv4.2-Kanals für die Oberflächenexpression der DPPX-Untereinheit zu untersuchen, wurden Neuronen mit Kv4.2 und hDPPX-d2EGFP kotransfiziert. Die Lokalisation des hDPPX-d2EGFP wurde durch die Eigenfluoreszenz des d2EGFP-Markers visualisiert, während die Oberflächenexpression durch immunzytochemischen Nachweis des extrazellulären d2EGFPs in unpermeabilisierten Neuronen erfolgte (siehe [Abbildung 4.23](#)). **Reihe A** zeigt eine starke Expression des hDPPX-

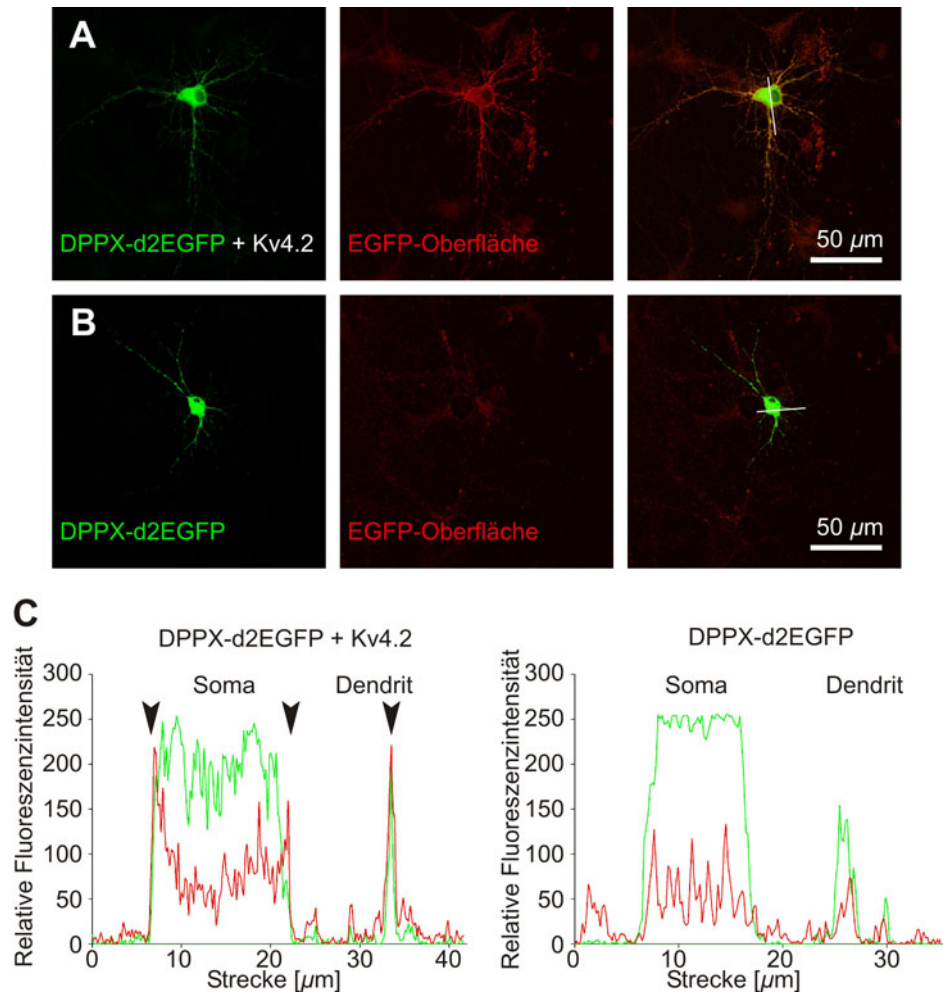


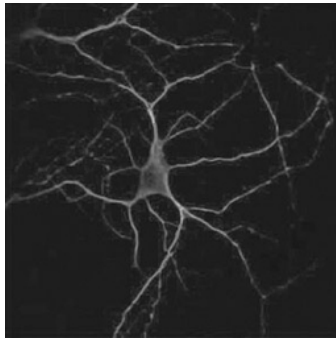
Abbildung 4.23: Oberflächenexpression von hDPPX-d2EGFP in Neuronen.

Rattenneuronen (E18) wurden mit hDPPX-d2EGFP allein oder mit hDPPX-d2EGFP und hKv4.2 transfiziert. Anschließend wurden die unpermeabilisierten Zellen gegen extrazelluläres d2EGFP gefärbt. **A.** hDPPX-d2EGFP gelangt in Gegenwart von Kv4.2 in die Dendriten. Außerdem wurde eine starke Oberflächenfärbung nachgewiesen, die auf einen effizienten Transport der Untereinheit an die Oberfläche des Neurons hinweist. **B.** In Abwesenheit von Kv4.2 war hDPPX-d2EGFP ebenfalls in der Lage, das Soma zu verlassen. Allerdings war nahezu kein d2EGFP an der Oberfläche nachzuweisen. **C.** Fluoreszenzintensitätsprofile entlang der in der rechten Spalte markierten Strecken. Beide Strecken durchschneiden das Soma und einen kleinen Dendritenast. In der mit Kv4.2 kotransfizierten Zelle sind deutliche EGFP-Oberflächensignale in der Peripherie des Somas und im Dendriten zu erkennen (Pfeilköpfe).

d2EGFP in einem mit Kv4.2 kotransfizierten Neuron. Darüber hinaus ist eine starke EGFP-Oberflächenfärbung zu erkennen, die sowohl das Soma umgibt als auch die Dendriten färbt. In [Reihe B](#) ist ein Neuron zu sehen, welches nur mit hDPPX-d2EGFP transfiziert wurde. Auch hier zeigt das hDPPX-d2EGFP eine starke Expression, die sich auf das Soma und die Dendriten erstreckt (vergleiche [Abbildung 4.22](#)). Allerdings ist nahezu keine EGFP-Oberflächenfärbung zu erkennen, die auf eine Integration des hDPPX-d2EGFP-Proteins in die Membran hindeuten würde. Um diese Tatsachen zu

verdeutlichen, wurden Fluoreszenzprofile entlang der in der rechten Spalte gekennzeichneten Strecken aufgenommen. Dabei wurde jeweils ein Querschnitt durch das Soma und einen Dendriten gelegt.

In [Abbildung 4.23 C](#) ist deutlich zu erkennen, dass in der ausschließlich mit hDPPX-d2EGFP transfizierten Zelle trotz vergleichbarer EGFP-Intensität nahezu keine extrazelluläre DPPX-Färbung auftrat. Im Gegensatz dazu zeigt das zusätzlich mit Kv4.2 transfizierte Neuron deutliche Signale in der Peripherie des Somas und im Bereich des Dendriten (Pfeilköpfe). Diese Daten zeigen, dass die DPPX-Oberflächenexpression durch die Anwesenheit von Kv4.2 in kultivierten Neuronen stark gesteigert werden kann.



5

Diskussion

5.1 Molekulare Stöchiometrie heteromultimerer Kv4-Kanal-Komplexe

Da es im Gehirn große Bereiche gibt, in denen sich die Expression von Kv4-Kanälen, DPPs und KChIPs überlagert, ist der Gedanke der Bildung ternärer Komplexe, die sowohl die Kv4-Kanäle als auch beide Typen von β -Untereinheiten enthalten, naheliegend. In elektrophysiologische Messungen zeigte sich, dass die Ströme, die nach Koexpression beider akzessorischer Untereinheiten mit Kv4-Kanälen gemessen wurden, nicht durch einfache Überlagerung von KChIP/Kv4- und DPP/Kv4-Strömen simuliert werden können. So ist beispielsweise die Erholung aus der Inaktivierung für den ternären Komplex schneller als die Erholung mit jeweils nur einer β -Untereinheit (Jerng *et al.*, 2005). Die nach Koexpression beider β -Untereinheiten erhaltenen Ströme gleichen dem neuronalen I_{SA} in einigen Parametern auf eine Weise, die mit Expression nur einer β -Untereinheit nicht erreicht werden kann. Für die Existenz ternärer Komplexe spricht auch die Tatsache, dass bereits in der ersten Beschreibung der DPPs als akzessorische β -Untereinheiten der Kv4-Kanäle KChIP und DPPX mit Kv4.2 ko-präzipitiert wurden (Nadal *et al.*, 2003). Der mögliche Aufbau eines solchen nativen Kanal-Komplexes ist in [Abbildung 5.1](#) wiedergegeben. Die Existenz ternärer Kv4-Kanal-Komplexe ermöglicht eine erhebliche Bandbreite unterschiedlicher Eigenschaften, die eine feine Abstimmung auf die jeweiligen Bedürfnisse in verschiedenen Hirnregionen ermöglichen (Jerng *et al.*, 2005). Dabei kann die Vielfalt durch die Verwendung unterschiedlicher akzessorischer Untereinheiten bzw. deren Splice-Varianten sowie durch Bildung von Heteromultimeren der α -Untereinheit noch einmal erheblich gesteigert werden.

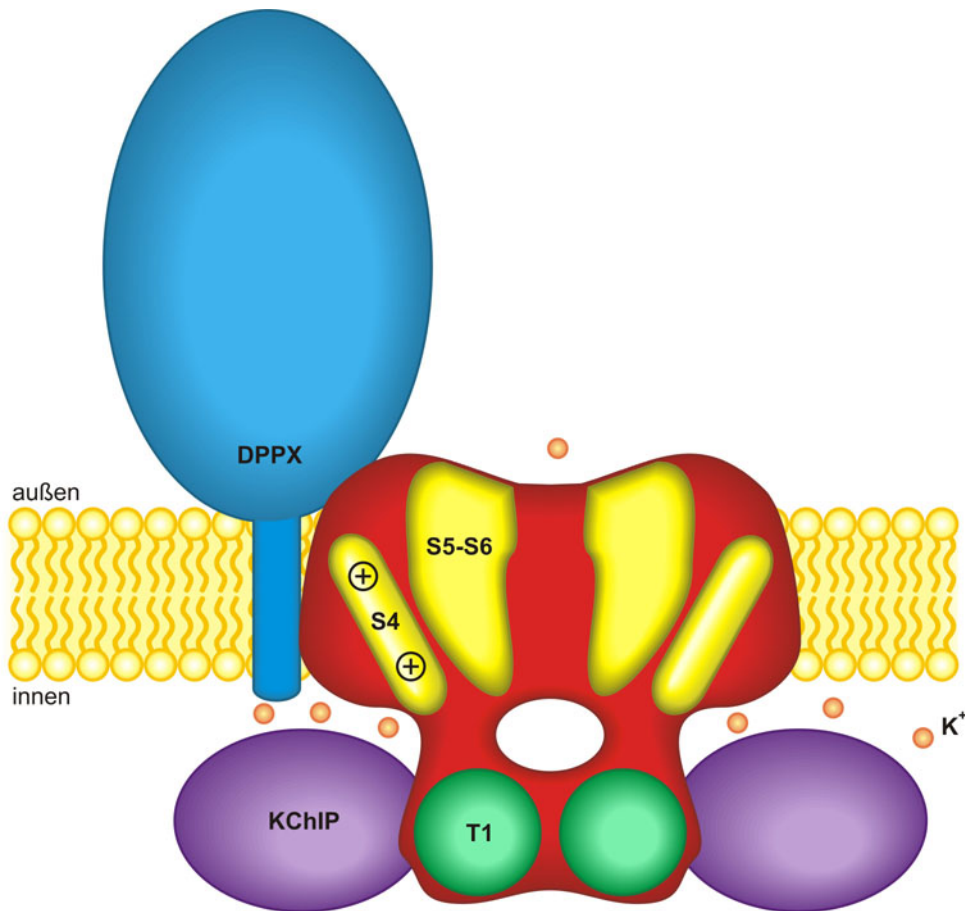


Abbildung 5.1: Möglicher Aufbau eines Kv4.2-Kanal-Komplexes (modifiziert nach [Jerng et al., 2004a](#)).

Die Kv4.2- α -Untereinheit ist in Rot dargestellt, funktionell wichtige Domänen wie die Porenregion (S5 und S6) oder der mit positiven Ladungen versehene Spannungssensor (S4) sind in Gelb wiedergegeben. Die T1-Domäne (T1), die die untergruppenspezifische Zusammenlagerung verschiedener α -Untereinheiten vermittelt, ist grün dargestellt. Kaliumionen (K^+) wurden orange gefärbt. Zwei KChIPs sind in Höhe der T1-Domänen gezeigt (violett), ein transmembranäres DPPX-Protein ist blau dargestellt. Über die Stöchiometrie des Kanal-Komplexes herrscht noch keine endgültige Klarheit, mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit kann von einem 4:4-Verhältnis für die Kv4.2- α -Untereinheit und KChIP ausgegangen werden. Die Anzahl der DPP-Untereinheiten in einem solchen Komplex konnte bisher nicht ermittelt werden.

Die genaue Stöchiometrie nativer Kv4-Kanal-Komplexe ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht geklärt. Als gesichert kann die Existenz von Heteromultimeren aus verschiedenen Kv4- α -Untereinheiten angesehen werden, die im Herzen gezeigt wurde ([Guo et al., 2002](#)). Die Bildung dieser Heteromultimere findet nur innerhalb der gleichen Unterfamilie statt und erfolgt über die T1-Domäne im N-Terminus ([Li et al., 1992](#); [Xu et al., 1995](#); [Shen und Pfaffinger, 1995](#)). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Bildung solcher Komplexe gezeigt. Die Tatsache, dass hKv4.2A14K-HA in Gegenwart von hKv4.2wt-HA kopräzipitiert wird, ist ein deutliches Zeichen für die Bildung von

heteromultimeren Kanälen aus hKv4.2A14K-HA und hKv4.2wt-HA. Auch hKv4.3wt-HA ist in der Lage, mit KChIP-bindenden und KChIP-bindungsdefizienten Kv4.2-Kanal-Untereinheiten Heteromultimere zu bilden, ein Verhalten, das von Kv-Kanälen *in vitro* seit langem bekannt ist (Christie *et al.*, 1990; Isacoff *et al.*, 1990; Ruppersberg *et al.*, 1990; Weiser *et al.*, 1994).

Dagegen ist die genaue Anzahl der akzessorischen Untereinheiten in einem nativen Kanal-Komplex nicht bekannt. Die nahe Verwandtschaft der verschiedenen KChIPs und die bisherigen Strukturdaten legen für alle KChIPs einen ähnlichen Bindungsmechanismus an die Kv4-Kanäle nahe (Kim *et al.*, 2004a; Scannevin *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004; Callsen *et al.*, 2005). Für die Interaktion von KChIPs und Kv4-Kanälen existieren zahlreiche experimentelle Befunde, die sich allerdings teilweise schwer miteinander in Einklang bringen lassen. So berichtet eine Gruppe, dass ein Fusionsprotein aus dem N-Terminus von Kv4.2 und einem Großteil von KChIP1 dimerisiert, wodurch die von anderen Gruppen beschriebene vierfach rotationssymmetrische Struktur in Frage gestellt wird (Zhou *et al.*, 2004). Andere Arbeiten gehen von dieser vierfachen Symmetrie aus, favorisieren aber eine unterschiedliche Lage von KChIP1, entweder unterhalb der T1-Domäne (Scannevin *et al.*, 2004) oder auf einer Ebene mit T1 (Pioletti *et al.*, 2006). Aufgrund von Mutationsscans, elektrophysiologischen Messungen, Koimmunpräzipitationen und Strukturdaten konnten N- und C-terminale Kanal-domänen als wichtige Interaktionsstellen identifiziert werden (An *et al.*, 2000; Bähring *et al.*, 2001b; Scannevin *et al.*, 2004; Callsen *et al.*, 2005), darüber hinaus wurden einzelne Aminosäuren in der T1-Domäne identifiziert, die für die Bindung der KChIPs an die Kv4-Kanäle von Bedeutung sind (Scannevin *et al.*, 2004; Callsen *et al.*, 2005; Pioletti *et al.*, 2006). Für KChIP2 wurde eine oktamere Struktur des Kv4/KChIP-Komplexes nachgewiesen (Kim *et al.*, 2004a,b), wobei die Position von KChIP2 ebenso wie die von KChIP1 (Pioletti *et al.*, 2006) in der Ebene der T1-Domänen bestimmt wurde (Kim *et al.*, 2004a). Auf eine oktamere Struktur deutet auch eine Studie hin, in der Kv4-Kanäle nach Mutation der T1-Domäne nicht mehr tetramersieren, in Gegenwart von KChIP3 jedoch funktionelle Kanäle bilden (Kunjilwar *et al.*, 2004).

Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die oktamere Struktur einen maximalen KChIP-Kv4-Kanal darstellt und dass native Kanal-Komplexe nicht notwendigerweise

über vier gebundene KChIPs verfügen müssen. Dafür sprechen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, die zeigen, dass sich die in HEK293-Zellen gemessenen Ströme auch nach einem effizienten Knockdown der akzessorischen KChIP2-Untereinheit nur unwesentlich von Strömen in Gegenwart von KChIP2 unterscheiden.

Auch wenn Untersuchungen nahelegen, dass der Kv4.2-KChIP-Komplex aus je vier Untereinheiten besteht (Kim *et al.*, 2004a; Pioletti *et al.*, 2006), ist es durchaus möglich, dass sich unter den im Knockdown-Experiment herrschenden Bedingungen Kv4.2-Kanal-Komplexe gebildet hatten, die weniger als vier KChIPs enthielten. Ein solcher Komplex könnte sich ähnlich verhalten wie ein Komplex mit der maximalen Anzahl KChIPs. Auf diese Weise könnte eine geringe Menge KChIP das Fehlen einer großen Anzahl akzessorischer Untereinheiten kompensieren. In einem solchen Modell wäre es möglich, dass eine Kv4.2- α -Untereinheit, die KChIP2 gebunden hat, einen KChIP-Effekt zeigen und Konformationen einnehmen könnte, die dann auch von den anderen α -Untereinheiten ohne KChIPs leichter eingenommen werden könnten. Somit wäre es in einem kooperativen Modell möglich, KChIP-Effekte auf Untereinheiten zu übertragen, die kein KChIP gebunden haben. Ähnliche Prozesse sind für die Rolle des S4-Segments in der Kv-Kanal-Aktivierung beschrieben (Smith-Maxwell *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu dem hier diskutiertem Modell konnte für andere Kaliumkanäle ein stöchiometrischer Bedarf an akzessorischen Untereinheiten gezeigt werden, da diese ein ER-Rückhaltemotiv in den Untereinheiten maskieren (Shyng und Nichols, 1997; Zerangue *et al.*, 1999)

Eine alternative Erklärung des starken KChIP-Effektes nach dem Knockdown könnte in der Verwendung des starken CMV-Promotors liegen, durch den bei transienter Überexpression eine große Menge KChIP entsteht. Daher reichen die nach dem Knockdown verbleibenden 15 % KChIP möglicherweise aus, um den vollen Effekt auf den Kv4.2-Kanal zu entfalten. Das Gen für die Kv4.2- α -Untereinheit stand bei diesem Versuch zwar auch unter der Kontrolle des CMV-Promotors, war aber in das Genom integriert, wodurch die Menge an gebildetem Protein deutlich geringer war. Es ist denkbar, dass in dieser Konstellation selbst bei einem nahezu vollständigen Knockdown ausreichend KChIP2 zur Verfügung steht, um einen starken Effekt auf die α -Untereinheit auszuüben.

Eine weitere Möglichkeit, die elektrophysiologischen Experimente in der HEK293-Zelllinie zu erklären, ist die gesteigerte Stabilität von KChIP in Gegenwart des Kv4.2-Kanals. Für die gegenseitige Beeinflussung der Expression und Lebensdauer von Kv4 und KChIPs gibt es zahlreiche Beispiele (Shibata *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006b; Menegola und Trimmer, 2006). In diesem Modell wäre es denkbar, dass Kv4.2- α -Untereinheiten, die KChIP2 gebunden haben, aufgrund ihrer höheren Stabilität in der Zellmembran akkumulieren und letztendlich den beobachteten Strom vermitteln.

Auch die elektrophysiologischen Experimente in Oozyten zeigten, dass sich heteromultimere Kanäle, die KChIP-bindungsdefiziente hKv4.2A14K-Untereinheiten enthielten, eher wie der Wildtypkanäle verhielten. Wäre die KChIP-Bindung essentiell für die funktionelle Oberflächenexpression des Kv4.2-Kanals, wäre bei Koexpression des Wildtyp-Kanals mit der KChIP-bindungsdefizienten Mutante ein dominant negativer Effekt aufgetreten, der jedoch in den durchgeführten Experimenten nicht beobachtet wurde. Daher deuten die hier vorgestellten Ergebnisse darauf hin, dass Kv4-Kanal-Komplexe nicht notwendigerweise vier KChIPs enthalten müssen, um die in der Literatur beschriebenen KChIP-Effekte zu zeigen.

Für die DPPs gibt es bisher keine Strukturdaten in Verbindung mit Kv-Kanälen. Eine Röntgenstruktur der extrazellulären Domäne zeigte überwiegend eine Dimerisierung, daneben traten aber auch Monomere auf (Strop *et al.*, 2004). Über die Stöchiometrie der DPP/Kv4-Kanal-Komplexe wurden bisher keine Daten erhoben. Aufgrund der Struktur der extrazellulären Domäne werden Komplexe mit zwei, vier oder acht DPPs je Kv4-Tetramer für möglich gehalten (Strop *et al.*, 2004). Wie bei den KChIPs ist jedoch nicht klar, ob es sich hierbei lediglich um eine Obergrenze handelt und ob auch Kanal-Komplexe mit weniger DPPs existieren und an die Zelloberfläche transportiert werden.

Neben dem möglichen Auftreten von Kanal-Komplexen, die nicht die maximal mögliche Anzahl der akzessorischen Untereinheiten enthalten, treten mit hoher Wahrscheinlichkeit auch native Kanal-Komplexe auf, die in Bezug auf ihre akzessorischen Untereinheiten Heteromultimere sind. Dafür sprechen die Expressionsprofile der akzessorischen Untereinheiten, die im Hippokampus eine Überlappung aufweisen (Wada

et al., 1992; Boland *et al.*, 2003; Pruunsild und Timmusk, 2005; Ren *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006b; Nadal *et al.*, 2006). Außerdem wurde gezeigt, dass DPPX und DPPY in der Lage sind, Heteromultimere zu bilden (Ren *et al.*, 2005). Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten weisen ebenfalls auf die Möglichkeit hin, dass sich Kv4-Kanal-Komplexe mit unterschiedlich zusammengesetzten akzessorischen Untereinheiten bilden können.

So führte die Behandlung mit siPlasmiden gegen KChIP2 in kultivierten hippocampalen Neuronen zu einer Reduktion des I_{SA} , einer Verlangsamung der Inaktivierung und einer Beschleunigung der Erholung aus der Inaktivierung. Die Verringerung des I_{SA} war zu erwarten, da in KChIP2-Knockout-Mäusen Kv4.2-vermittelte Ströme im Herzen ebenfalls sehr stark reduziert werden (Kuo *et al.*, 2001). Der Effekt des Knockdowns auf die Stromamplitude der I_{SA} -Komponente fiel allerdings gering aus. Noch erstaunlicher ist jedoch die Tatsache, dass sich mit den Zeitkonstanten der Inaktivierung und der Erholung aus der Inaktivierung zwei kinetische Parameter nicht im Einklang mit der Hypothese verhielten, wonach der Knockdown von KChIP2 die elektrophysiologischen Parameter in Richtung der Werte für die reine Kv4.2- α -Untereinheit verschieben sollte. Eine mögliche Erklärung ist eine geänderte Zusammensetzung der Kv4.2-Kanal-Komplexe, da die Menge an verfügbarem KChIP2 durch den Knockdown reduziert wurde. Es sind KChIP4-Splice-Varianten bekannt, die die Inaktivierung des Kv4.2-Kanals extrem verlangsamen (Holmqvist *et al.*, 2002) und somit die beobachtete Verlangsamung der Zeitkonstanten der Inaktivierung erklären könnten. Darüber hinaus könnte die schnellere Erholung aus der Inaktivierung auf ein geändertes Zusammenspiel von KChIPs und DPPs im ternären Komplex zurückzuführen sein (Jerng *et al.*, 2005).

Da die akzessorischen Untereinheiten KChIPs und DPPs die Kv4- α -Untereinheiten nicht ohne gegenseitigen Einfluss modulieren (Jerng *et al.*, 2005), ist es beim heutigen Kenntnisstand nicht möglich, die genaue Änderung in der Zusammensetzung der Kanal-Komplexe aus den gemessenen funktionellen Daten zu ermitteln.

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass ein effizienter Knockdown der akzessorischen β -Untereinheiten möglich ist. Gleichzeitig wird aber auch deutlich, dass ein vollständiger Knockdown nicht erreicht wurde und dass auch kleine Mengen der

akzessorischen Kanaluntereinheiten starke Effekte auf die Kv4.2- α -Untereinheiten haben können. Die hier erhobenen Daten lassen vermuten, dass der durch den Knock-down verringerte Einfluss von KChIP2 durch andere β -Untereinheiten kompensiert werden kann.

5.2 Kv4-Strukturdeterminanten der funktionellen Interaktion mit akzessorischen Untereinheiten

Die Bindung von KChIPs und Kv4-Kanälen wurde detailliert untersucht, wobei die veröffentlichten Ergebnisse die Vermutung nahelegen, dass die Bindung aller KChIPs an den Kanal auf ähnliche Weise erfolgt (Kim *et al.*, 2004a; Scannevin *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004; Callsen *et al.*, 2005). Im N-Terminus des Kv4.2-Kanals wurden einzelne Aminosäuren identifiziert, deren Mutation die KChIP-Interaktion aufhebt (Callsen *et al.*, 2005). Eine dieser Mutanten (hKv4.2A14K-HA) wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet und war, im Gegensatz zu allen anderen getesteten Konstrukten, nicht in der Lage, KChIP2 zu präzipitieren. Auch bei der Koexpression von hKv4.2A14K-HA und hKv4.2wt-HA wurden deutlich geringere Mengen an Kanal und KChIP präzipitiert als beim hKv4.2wt-HA-Kanal allein. Zudem zeigte hKv4.2A14K-HA im Gegensatz zum analogen hKv4.2wt-HA-Konstrukt in Oozyten keine Zunahme des Stroms bei Koexpression mit KChIP2. In ihrem Verhalten dem Kv4.3wt-HA-Kanal gegenüber konnten hKv4.2wt-HA und hKv4.2A14K-HA in den durchgeführten Experimenten nicht unterschieden werden. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigen, dass die Mutation A14K ausreichend ist, die KChIP2-Interaktion vollständig zu unterbinden, ohne eine der anderen untersuchten Eigenschaften der α -Untereinheit zu beeinflussen.

Über die strukturellen Determinanten der Bindung zwischen Kv4-Kanälen und DPPs ist wenig bekannt. Vor kurzem wurden zwei Punktmutationen beschrieben, die in Kv4.3-Kanälen zu einem Verlust der DPPY-Interaktion führten (Ren *et al.*, 2005). Um die Rolle von DPPX für die Oberflächenexpression des Kv4.2-Kanals zu untersuchen, wurden analoge Mutanten des Kv4.2-Kanals erzeugt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten heterologen Expressionsstudien in CHO-Zellen zeigten aller-

dings klar, dass die Mutationen, für die in Kv4.3 eine Inhibition des DPPY-Effekts beschrieben ist (Ren *et al.*, 2005), in Kv4.2 offensichtlich nicht ausreichend sind, eine funktionelle Interaktion mit DPPX zu verhindern. Aus den hier erhobenen Daten wird deutlich, dass die Bindungsdeterminanten zwischen Kv4.2 und DPPX beziehungsweise Kv4.3 und DPPY nicht ohne weiteres übertragen werden können. Daher muss ein differenzierterer Bindungsmechanismus für Kv4-Kanäle und DPPs angenommen werden. Eine Erklärung für die beobachteten Effekte gestaltet sich dennoch schwierig, da die Mutationen in einen Bereich eingebracht wurden, der zwischen den beiden Kv4-Kanälen hoch konserviert ist. Die Aminosäuren, die im Transmembransegment der beiden DPPs für die Interaktion mit den mutierten Resten in Frage kommen, stimmen ebenfalls überein. In diesem Bereich tritt lediglich ein konservativer Austausch eines Valins gegen ein Isoleucin auf, der aber wegen der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Aminosäuren keinen großen Effekt auf die Bindungseigenschaften der DPPs haben sollte. Größere Unterschiede in den Sequenzen finden sich dagegen im N-Terminus der S2-Domäne der Kv4-Kanäle und am C-Terminus des Transmembransegmentes der DPPs. Da die Transmembrandomäne der DPPs von der Zellinnenseite zur Zellaußenseite verläuft, das S2-Segment der Kv4-Kanäle aber in umgekehrter Richtung, ist eine enge Nachbarschaft dieser Aminosäuren durchaus vorstellbar. Möglicherweise stellt diese zweite Region innerhalb der Membran eine weitere Interaktionsstelle zwischen α - und β -Untereinheiten dar, die die hier beschriebenen Unterschiede im Bindungsverhalten erklären könnte. Allerdings herrscht in der Literatur keine endgültige Klarheit über die genaue Lage der zweiten Transmembrandomäne, verschiedene Quellen unterscheiden sich um bis zu neun Aminosäuren (Zhu *et al.*, 1999, www.expasy.org). In der vorliegenden Arbeit wurde die Transmembrandomäne verwendet, die von der ExPASy-Datenbank angegeben wird. Da die Lage der Transmembrandomäne in beiden Fällen aufgrund der Hydrophobizität der Aminosäuren berechnet wurde, fand die jüngere Angabe Verwendung. Da aber weder Kokristalle von DPPs und dem Kv4-Kanal noch Ergebnisse von Mutationsstudien zur Verfügung stehen, kann die Frage nach den molekularen Unterschieden im Mechanismus der Bindung zurzeit nicht beantwortet werden.

5.3 Targeting, Transport und funktionelle Oberflächenexpression von Kv-Kanälen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle einer direkten funktionellen Interaktion mit akzessorischen β -Untereinheiten für die subzelluläre Lokalisation und die funktionelle Oberflächenexpression von Kv4.2- α -Untereinheiten in hippocampalen Neuronen untersucht.

Neben dem im heterologen Expressionssystem beschriebenen Effekt auf die funktionelle Oberflächenexpression, der durch die akzessorischen Untereinheiten vermittelt wird (Bähring *et al.*, 2001b; Nadal *et al.*, 2003; Jerng *et al.*, 2004a), sind auch Signalsequenzen in der α -Untereinheit selbst bekannt, die die subzelluläre Lokalisation beeinflussen. So wurde ein Dileucin-Motiv, welches im C-Terminus lokalisiert ist, als Sortiersignal für den Transport der Kv4.2-Kanäle in die Dendriten identifiziert (Rivera *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu wird die axonale Lokalisation von Kv1-Kanälen durch die Interaktion mit Kv β über die T1-Domäne gesteuert (Gu *et al.*, 2003). Der Transport von Kv4.2 selbst wird durch das Kinesin Kif17 vermittelt (Chu *et al.*, 2006). Die Bindestelle für dieses Transportprotein wurde auf die 30 letzten Aminosäuren eingegrenzt. Es gelang aber weder, die genaue Bindungsstelle noch das postulierte Adapterprotein zu identifizieren (Chu *et al.*, 2006). Darüber hinaus interagiert Kv4.2 über seinen C-Terminus mit dem Aktin-bindenden Protein Filamin (Petrecca *et al.*, 2000). Filamin fungiert möglicherweise als Gerüstprotein, welches Kv4.2 in der postsynaptischen Membran verankert (Petrecca *et al.*, 2000). Am äußersten Ende des C-Terminus der Kv4-Kanäle befindet sich eine Bindestelle für PSD-95, welches ebenfalls als Gerüstprotein dient und einen Einfluss auf die Lokalisation des Kanals hat (Wong *et al.*, 2002). Die Interaktion mit Proteinen des Cytoskeletts verankert den Kv4.2-Kanal, allerdings kann seine Aktivität auch in diesem Zustand durch eine Vielzahl von Proteinkinasen beeinflusst werden (Baldwin *et al.*, 1991; Hoffman und Johnston, 1998; Adams *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2002; Varga *et al.*, 2004).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete inhomogene Verteilung der fluoreszenzmarkierten Kv4.2-Kanäle entlang der Dendriten wurde sowohl für den endogenen Kv4-Kanal (Alonso und Widmer, 1997) als auch für transfizierte Kanalkonstrukte beschrie-

ben (Kim *et al.*, 2005; Chu *et al.*, 2006; Lauver *et al.*, 2006). Darüber hinaus konnte kein Einfluss der akzessorischen KChIP-Untereinheit auf die Fähigkeit der Kv4.2- α -Untereinheit, das Soma zu verlassen, gezeigt werden. So konnten in dieser Arbeit zwei getestete KChIP-bindungsdefiziente Mutanten ebenfalls in den Dendriten nachgewiesen werden. Die oben erwähnte inhomogene Verteilung entlang der Dendriten deutet auf einen aktiven Transport der Kv4.2- α -Untereinheiten hin. In EGFP-transfizierten Kontrollneuronen wurde eine gleichmäßige Färbung der Dendriten beobachtet, die auf eine Verteilung durch Diffusion schließen lässt. Für einen Transport der Kv4.2- α -Untereinheiten spricht weiterhin die Tatsache, dass ein Konstrukt, in dem die Bindestelle für das Transportprotein Kif17 deletiert worden war (Chu *et al.*, 2006), nicht in den Dendriten nachgewiesen werden konnte.

Die Bedeutung der KChIPs für die funktionelle Oberflächenexpression, die zu der dramatischen Zunahme in der Stromamplitude führt, ist in heterologen Expressionssystemen beschrieben (Bähring *et al.*, 2001b; Takimoto *et al.*, 2002; O’Callaghan *et al.*, 2003), für Neuronen wurde sie aber noch nicht gezeigt. Darüber hinaus ist die Regulation der Oberflächenexpression durch akzessorische Untereinheiten auch von anderen Kaliumkanälen wie dem Kir6-Kanal oder hSlo bekannt (Zerangue *et al.*, 1999; Toro *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Kv4.2- α -Untereinheiten in kultivierten hippocampalen Neuronen in der Lage sind, die Dendritenoberfläche zu erreichen. Das gilt auch für das hKv4.2A14K-HA-EGFP-Konstrukt. Im Gegensatz zu dieser KChIP2-bindungsdefizienten Mutante konnte die Oberflächenexpression des Wildtyp-Konstruktes durch Koexpression mit KChIP2 um etwa 40 % gesteigert werden. Diese Daten zeigen deutlich, dass KChIP2 eine Rolle bei der Oberflächenexpression der Kv4.2- α -Untereinheit spielt. Auf der anderen Seite wird aber klar, dass auch in Abwesenheit von KChIP2 ein Transport von α -Untereinheiten an die neuronale Zelloberfläche erfolgt. Dafür gibt es mehrere mögliche Erklärungen.

Zum einen könnte die Kv4.2A14K-HA-EGFP- α -Untereinheit, für die ein Verlust der KChIP2-Interaktion gezeigt wurde, in der Lage sein, mit anderen KChIPs zu interagieren. In der untersuchten Mutante wurde lediglich eine Aminosäure mutiert, daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine KChIP2-bindungsdefiziente Mutante entsteht, die in der Lage ist, einzelne andere KChIPs zu binden. Da das Verhalten der

A14K-Mutante gegenüber weiteren KChIPs nicht untersucht wurde, kann keine Aussage über die Übertragbarkeit der KChIP2-Bindungsdefizienz getroffen werden. Wegen der schon erwähnten großen Ähnlichkeit zwischen den KChIPs ist die Möglichkeit einer restriktiven KChIP-Bindungsdefizienz allerdings recht unwahrscheinlich, da anzunehmen ist, dass die Bindung an den Kanal für unterschiedliche KChIPs auf ähnliche Weise erfolgt (Kim *et al.*, 2004a; Scannevin *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004; Callsen *et al.*, 2005).

Eine zweite Möglichkeit zur Klärung der basalen Oberflächenexpression ist die Bildung von Heteromultimeren aus der mutierten Kv4.2A14K-HA-EGFP-Untereinheit und endogenen Kv4- α -Untereinheiten. Untersuchungen haben gezeigt, dass Kv4.2- α -Untereinheiten in kultivierten hippokampalen Neuronen bereits an DIV6 nachgewiesen werden können (Maletic-Savatic *et al.*, 1995). Da die in dieser Arbeit verwendeten Mausneuronen (P0) und Rattenneuronen (E18) zwischen Tag 7 und 10 transfiziert wurden, können sich heteromultimere Kanäle mit endogenen Kv4- α -Untereinheiten gebildet haben, die DPPs und, zumindest teilweise, KChIPs binden können. Da das Verhalten von Kv4-Tetrameren, die weniger als vier KChIPs gebunden haben, bisher nicht untersucht wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Kanäle an die Zelloberfläche transportiert werden, sobald ein KChIP an eine im Kv4-Tetramer enthaltene Wildtyp- α -Untereinheit bindet. Dieses Modell würde allerdings einen quantitativen Unterschied zwischen Kv4.2A14K-HA-EGFP- und Kv4.2wt-HA-EGFP-transfizierten Neuronen vorhersagen, wenn große Mengen KChIP2 vorhanden wären. In diesem Fall sollten die Kv4.2wt-HA-EGFP-Untereinheiten effektiver an die Zelloberfläche transportiert werden, da sie keine endogenen „Helferproteine“ benötigen. Ein solches Verhalten wurde in der vorliegenden Arbeit nach der zusätzlichen heterologen Expression von KChIP2 beobachtet, nicht aber während der basalen Expression. Allerdings zeigen die hier vorgestellten KChIP2-Koexpressionsdaten, dass KChIP2 ein limitierender Faktor für die Oberflächenexpression ist, daher kann nicht unbedingt erwartet werden, dass der postulierte Unterschied bereits bei der basalen Oberflächenexpression auftritt. Trotzdem scheint dieses Modell wegen der massiven Überexpression der Kv4.2A14K-HA-EGFP-Untereinheit als Erklärung für die basale Oberflächenexpression in Neuronen relativ ungeeignet.

Die wahrscheinlichste Möglichkeit, die basale Oberflächenexpression zu erklären, sind weitere akzessorische β -Untereinheiten, die andere Bindungsstellen an den Kv4.2- α -Untereinheiten haben. Hier könnten wiederum die DPPs eine Rolle spielen, von denen bekannt ist, dass sie die Oberflächenexpression der Kv4.2- α -Untereinheit steigern können (Nadal *et al.*, 2003; Jerng *et al.*, 2004b; Chen *et al.*, 2006a). Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass die verwendeten KChIP2-bindungsdefizienten Mutanten in der Lage sind, mit DPPX zu interagieren, ist durchaus ein Modell denkbar, in dem die transfizierten α -Untereinheiten nach Bindung von DPPs an die Oberfläche transportiert werden. Mit diesem Modell ist der beobachtete effizientere Membrantransport KChIP-bindender α -Untereinheiten bei zusätzlicher KChIP2-Überexpression vereinbar.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass der Mechanismus der KChIP-vermittelten Erhöhung der funktionellen Oberflächenexpression auch in Neuronen existiert. Allerdings müssen in diesen Zellen weitere Faktoren vorhanden sein, die den Transport des Kv4.2-Kanals zur Oberfläche fördern können. Weiterhin zeigen die durchgeführten Experimente, dass transient transfizierte Kv4.2-Kanäle bereits an DIV8 in den Dendriten nachgewiesen werden können. Zu diesem Zeitpunkt beginnt in kultivierten hippocampalen Neuronen der Transport des endogenen Kv4.2-Kanals in die Dendriten, der bis dahin ausschließlich in intrazellulären Kompartimenten nachweisbar ist (Maletic-Savatic *et al.*, 1995).

In heterologen Expressionssystemen fördern DPPs den Transport der Kv4.2- α -Untereinheit zur Zelloberfläche (Nadal *et al.*, 2003; Jerng *et al.*, 2004b; Chen *et al.*, 2006a). Für eine effiziente Regulation der Oberflächenexpression sollten nur vollständig assemblierte Kanal-Komplexe an die Zelloberfläche gelangen können. Das würde einerseits bedeuten, dass Kv4.2- α -Untereinheiten nicht ohne akzessorische β -Untereinheiten zur Membran gelangen würden, andererseits sollten auch akzessorische Untereinheiten nicht ohne α -Untereinheit an die Zelloberfläche gelangen. Genau dieses Verhalten wurde in der vorliegenden Arbeit in kultivierten hippocampalen Neuronen beobachtet. So zeigten Neuronen, die ausschließlich mit DPPX-d2EGFP transfiziert worden waren, zwar eine deutliche Expression des Fusionsproteins, eine Oberflächenexpression im Soma und den Dendriten trat allerdings erst nach Koexpression von Kv4.2 auf. Diese

Daten legen nahe, dass die Assemblierung nativer Kv4.2-Kanal-Komplexe im Golgi-Apparat abläuft und dass nur vollständige Kanal-Komplexe an die Zelloberfläche gelangen können. Ein analoger Einfluss von KChIP1 wurde bereits beschrieben (Hasdemir *et al.*, 2005). Die Expression von DPPX-d2EGFP in kultivierten hippocampalen Neuronen ergab eine inhomogene, an die Kv4.2-HA-EGFP-Kanäle erinnernde Verteilung. Diese Daten lassen vermuten, dass Kv4.2-Kanäle und DPPs gemeinsam in die Dendriten transportiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die akzessorische Untereinheit DPPX nur im Komplex mit der Kv4.2- α -Untereinheit zur neuronalen Zelloberfläche transportiert wird. Darüber hinaus konnten die in immortalisierten Zelllinien beschriebenen Effekte der akzessorischen β -Untereinheiten auf den Kv4.2-Kanal hier erstmals auch auf kultivierte hippocampale Neuronen übertragen werden. Dabei wurde deutlich, dass die akzessorischen KChIP-Untereinheiten nicht essentiell für die Expression der Kv4.2- α -Untereinheit, den Transport in die Dendriten oder die Oberflächenexpression sind. Allerdings ist KChIP2 in der Lage, die Oberflächenexpression der Kv4.2wt- α -Untereinheit, nicht aber die einer KChIP2-bindungsdefizienten Mutante signifikant zu steigern. Die hier erhobenen Daten deuten darauf hin, dass ein funktioneller Kv4.2-Kanal-Komplex nicht notwendigerweise die maximal mögliche Anzahl akzessorischer Untereinheiten enthalten muss.



- Abramoff, M., Magelhaes, P. und Ram, S. (2004): Image Processing with ImageJ, *Biophotonics International* **11** (7), S. 36–42.
- Adams, J. P., Anderson, A. E., Varga, A. W., Dineley, K. T., Cook, R. G., Pfaffinger, P. J. und Sweatt, J. D. (2000): The A-type potassium channel Kv4.2 is a substrate for the mitogen-activated protein kinase ERK, *J Neurochem* **75** (6), S. 2277–87.
- Allen, M., Heinzmann, A., Noguchi, E., Abecasis, G., Broxholme, J., Ponting, C. P., Bhattacharyya, S., Tinsley, J., Zhang, Y., Holt, R., Jones, E. Y., Lench, N., Carey, A., Jones, H., Dickens, N. J., Dimon, C., Nicholls, R., Baker, C., Xue, L., Townsend, E., Kabesch, M., Weiland, S. K., Carr, D., von Mutius, E., Adcock, I. M., Barnes, P. J., Lathrop, G. M., Edwards, M., Moffatt, M. F. und Cookson, W. O. (2003): Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14, *Nat Genet* **35** (3), S. 258–63.
- Alonso, G. und Widmer, H. (1997): Clustering of Kv4.2 potassium channels in postsynaptic membrane of rat supraoptic neurons: an ultrastructural study, *Neuroscience* **77** (3), S. 617–21.
- An, D. S., Qin, F. X., Auyeung, V. C., Mao, S. H., Kung, S. K., Baltimore, D. und Chen, I. S. (2006): Optimization and functional effects of stable short hairpin RNA expression in primary human lymphocytes via lentiviral vectors, *Mol Ther* **14** (4), S. 494–504.
- An, W. F., Bowlby, M. R., Betty, M., Cao, J., Ling, H. P., Mendoza, G., Hinson, J. W., Mattsson, K. I., Strassle, B. W., Trimmer, J. S. und Rhodes, K. J. (2000): Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors, *Nature* **403** (6769), S. 553–6.

- Anderson, A. E., Adams, J. P., Qian, Y., Cook, R. G., Pfaffinger, P. J. und Sweatt, J. D. (2000): Kv4.2 phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, *J Biol Chem* **275** (8), S. 5337–46.
- Arenz, C. und Schepers, U. (2003): RNA interference: from an ancient mechanism to a state of the art therapeutic application?, *Naturwissenschaften* **90** (8), S. 345–59.
- Bähring, R., Boland, L. M., Varghese, A., Gebauer, M. und Pongs, O. (2001a): Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels, *J Physiol* **535** (Pt 1), S. 65–81.
- Bähring, R., Dannenberg, J., Peters, H. C., Leicher, T., Pongs, O. und 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** (26), S. 23888–94.
- Baldwin, T. J., Tsaur, M. L., Lopez, G. A., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (1991): Characterization of a mammalian cDNA for an inactivating voltage-sensitive K⁺ channel, *Neuron* **7** (3), S. 471–83.
- Barry, D. M., Xu, H., Schuessler, R. B. und Nerbonne, J. M. (1998): Functional knock-out of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4 alpha subunit, *Circ Res* **83** (5), S. 560–7.
- Berkenhout, J. (1769): *Outlines of the Natural History of Great Britain and Ireland: Containing a systematic arrangement and concise description of all the Animals, Vegetables, and Fossiles which have hitherto been discovered in these Kingdoms*, 3 Vols. in one, P. Elmsly, London.
- Bezanilla, F. (2002): Voltage sensor movements, *J Gen Physiol* **120** (4), S. 465–73.
- Blaustein, R. O. und Miller, C. (2004): Ion channels: shake, rattle or roll?, *Nature* **427** (6974), S. 499–500.
- Boland, L. M., Jiang, M., Lee, S. Y., Fahrenkrug, S. C., Harnett, M. T. und O’Grady, S. M. (2003): Functional properties of a brain-specific NH2-terminally spliced modulator of Kv4 channels, *Am J Physiol Cell Physiol* **285** (1), S. C161–70.
- Burgoyne, R. D. und Weiss, J. L. (2001): The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins, *Biochem J* **353** (Pt 1), S. 1–12.
- Buxbaum, J. D., Choi, E. K., Luo, Y., Lilliehook, C., Crowley, A. C., Merriam, D. E. und Wasco, W. (1998): Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with

- the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment, *Nat Med* **4** (10), S. 1177–81.
- Cai, X., Liang, C. W., Muralidharan, S., Kao, J. P., Tang, C. M. und Thompson, S. M. (2004): Unique roles of SK and Kv4.2 potassium channels in dendritic integration, *Neuron* **44** (2), S. 351–64.
- Callsen, B., Isbrandt, D., Sauter, K., Hartmann, L. S., Pongs, O. und Bähring, R. (2005): Contribution of N- and C-terminal Kv4.2 channel domains to KChIP interaction [corrected], *J Physiol* **568** (Pt 2), S. 397–412.
- Carrion, A. M., Mellstrom, B. und Naranjo, J. R. (1998): Protein kinase A-dependent derepression of the human prodynorphin gene via differential binding to an intragenic silencer element, *Mol Cell Biol* **18** (12), S. 6921–9.
- Carrion, A. M., Link, W. A., Ledo, F., Mellstrom, B. und Naranjo, J. R. (1999): DREAM is a Ca^{2+} -regulated transcriptional repressor, *Nature* **398** (6722), S. 80–4.
- Chabala, L. D., Bakry, N. und Covarrubias, M. (1993): Low molecular weight poly(A)⁺ mRNA species encode factors that modulate gating of a non-Shaker A-type K⁺ channel, *J Gen Physiol* **102** (4), S. 713–28.
- Chen, T., Ajami, K., McCaughan, G. W., Gai, W. P., Gorrell, M. D. und Abbott, C. A. (2006a): Molecular characterization of a novel dipeptidyl peptidase like 2-short form (DPL2-s) that is highly expressed in the brain and lacks dipeptidyl peptidase activity, *Biochim Biophys Acta* **1764** (1), S. 33–43.
- Chen, X., Yuan, L. L., Zhao, C., Birnbaum, S. G., Frick, A., Jung, W. E., Schwarz, T. L., Sweatt, J. D. und Johnston, D. (2006b): 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** (47), S. 12143–51.
- Cheng, H. Y., Pitcher, G. M., Laviolette, S. R., Whishaw, I. Q., Tong, K. I., Kockeritz, L. K., Wada, T., Joza, N. A., Crackower, M., Goncalves, J., Sarosi, I., Woodgett, J. R., Oliveira-dos Santos, A. J., Ikura, M., van der Kooy, D., Salter, M. W. und Penninger, J. M. (2002): DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation, *Cell* **108** (1), S. 31–43.
- Christie, M. J., North, R. A., Osborne, P. B., Douglass, J. und Adelman, J. P. (1990): Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits, *Neuron* **4** (3), S. 405–11.

- Chu, P. J., Rivera, J. F. und Arnold, D. B. (2006): A role for Kif17 in transport of Kv4.2, *J Biol Chem* **281** (1), S. 365–73.
- Coetzee, W. A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M. S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz de Miera, E. und Rudy, B. (1999): Molecular diversity of K⁺ channels, *Ann N Y Acad Sci* **868**, S. 233–85.
- Decher, N., Barth, A. S., Gonzalez, T., Steinmeyer, K. und Sanguinetti, M. C. (2004): Novel KChIP2 isoforms increase functional diversity of transient outward potassium currents, *J Physiol* **557** (Pt 3), S. 761–72.
- Dixon, J. E. und McKinnon, D. (1994): Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats, *Circ Res* **75** (2), S. 252–60.
- Dixon, J. E., Shi, W., Wang, H. S., McDonald, C., Yu, H., Wymore, R. S., Cohen, I. S. und McKinnon, D. (1996): Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current, *Circ Res* **79** (4), S. 659–68.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. und MacKinnon, R. (1998): The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity, *Science* **280** (5360), S. 69–77.
- Durell, S. R., Hao, Y. und Guy, H. R. (1998): Structural models of the transmembrane region of voltage-gated and other K⁺ channels in open, closed, and inactivated conformations, *J Struct Biol* **121** (2), S. 263–84.
- Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D. und Sharp, P. A. (2003): Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression, *Nat Rev Mol Cell Biol* **4** (6), S. 457–67.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. und Tuschl, T. (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature* **411** (6836), S. 494–8.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. und Mello, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* **391** (6669), S. 806–11.
- Goldstein, S. A., Wang, K. W., Ilan, N. und Pausch, M. H. (1998): Sequence and function of the two P domain potassium channels: implications of an emerging superfamily, *J Mol Med* **76** (1), S. 13–20.

- Gu, C., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (2003): A conserved domain in axonal targeting of Kv1 (Shaker) voltage-gated potassium channels, *Science* **301** (5633), S. 646–9.
- Guo, W., Li, H., London, B. und Nerbonne, J. M. (2000): Functional consequences of elimination of $I_{to,f}$ and $I_{to,s}$: early afterdepolarizations, atrioventricular block, and ventricular arrhythmias in mice lacking Kv1.4 and expressing a dominant-negative Kv4 alpha subunit, *Circ Res* **87** (1), S. 73–9.
- Guo, W., Li, H., Aimond, F., Johns, D. C., Rhodes, K. J., Trimmer, J. S. und Nerbonne, J. M. (2002): Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K^+ currents, *Circ Res* **90** (5), S. 586–93.
- Guo, W., Jung, W. E., Marionneau, C., Aimond, F., Xu, H., Yamada, K. A., Schwarz, T. L., Demolombe, S. und Nerbonne, J. M. (2005): Targeted deletion of Kv4.2 eliminates $I_{to,f}$ and results in electrical and molecular remodeling, with no evidence of ventricular hypertrophy or myocardial dysfunction, *Circ Res* **97** (12), S. 1342–50.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stühmer, W. und Wang, X. (2005): International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels, *Pharmacol Rev* **57** (4), S. 473–508.
- Hall, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT., *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, S. 95–8.
- Hannon, G. J. (2002): RNA interference, *Nature* **418** (6894), S. 244–51.
- Hasdemir, B., Fitzgerald, D. J., Prior, I. A., Tepikin, A. V. und Burgoyne, R. D. (2005): Traffic of Kv4 K^+ channels mediated by KChIP1 is via a novel post-ER vesicular pathway, *J Cell Biol* **171** (3), S. 459–69.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. und MacKinnon, R. (1994): Mutations in the K^+ channel signature sequence, *Biophys J* **66** (4), S. 1061–7.
- Ho, K., Nichols, C. G., Lederer, W. J., Lytton, J., Vassilev, P. M., Kanazirska, M. V. und Hebert, S. C. (1993): Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel, *Nature* **362** (6415), S. 31–8.
- Hoffman, D. A., Magee, J. C., Colbert, C. M. und Johnston, D. (1997): K^+ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons, *Nature* **387** (6636), S. 869–75.

- Hoffman, D. A. und Johnston, D. (1998): Downregulation of transient K^+ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC, *J Neurosci* **18** (10), S. 3521–8.
- Holmqvist, M. H., Cao, J., Hernandez-Pineda, R., Jacobson, M. D., Carroll, K. I., Sung, M. A., Betty, M., Ge, P., Gilbride, K. J., Brown, M. E., Jurman, M. E., Lawson, D., Silos-Santiago, I., Xie, Y., Covarrubias, M., Rhodes, K. J., Distefano, P. S. und An, W. F. (2002): Elimination of fast inactivation in Kv4 A-type potassium channels by an auxiliary subunit domain, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (2), S. 1035–40.
- Hough, R. B., Lengeling, A., Bedian, V., Lo, C. und Bucan, M. (1998): Rump white inversion in the mouse disrupts dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6 and causes dysregulation of Kit expression, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (23), S. 13800–5.
- Hu, H. J., Carrasquillo, Y., Karim, F., Jung, W. E., Nerbonne, J. M., Schwarz, T. L. und Gereau, R. W. t. (2006): The Kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity, *Neuron* **50** (1), S. 89–100.
- Isacoff, E. Y., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (1990): Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes, *Nature* **345** (6275), S. 530–4.
- Isomoto, S., Kondo, C. und Kurachi, Y. (1997): Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function, *Jpn J Physiol* **47** (1), S. 11–39.
- Jerng, H. H., Shahidullah, M. und Covarrubias, M. (1999): Inactivation gating of Kv4 potassium channels: molecular interactions involving the inner vestibule of the pore, *J Gen Physiol* **113** (5), S. 641–60.
- Jerng, H. H., Pfaffinger, P. J. und Covarrubias, M. (2004a): Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels, *Mol Cell Neurosci* **27** (4), S. 343–69.
- Jerng, H. H., Qian, Y. und Pfaffinger, P. J. (2004b): Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10), *Biophys J* **87** (4), S. 2380–96.
- Jerng, H. H., Kunjilwar, K. und Pfaffinger, P. J. (2005): Multiprotein assembly of Kv4.2, KCHIP3 and DPP10 produces ternary channel complexes with ISA-like properties, *J Physiol* **568** (Pt 3), S. 767–88.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A. und MacKinnon, R. (2003): The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K^+ channel, *Nature* **423** (6935),

- S. 42–8.
- Jo, D. G., Lee, J. Y., Hong, Y. M., Song, S., Mook-Jung, I., Koh, J. Y. und Jung, Y. K. (2004): Induction of pro-apoptotic calsenilin/DREAM/KChIP3 in Alzheimer's disease and cultured neurons after amyloid- β exposure, *J Neurochem* **88** (3), S. 604–11.
- Kamb, A., Tseng-Crank, J. und Tanouye, M. A. (1988): Multiple products of the *Drosophila Shaker* gene may contribute to potassium channel diversity, *Neuron* **1** (5), S. 421–30.
- Kim, J., Wei, D. S. und Hoffman, D. A. (2005): Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones, *J Physiol* **569** (Pt 1), S. 41–57.
- Kim, L. A., Furst, J., Butler, M. H., Xu, S., Grigorieff, N. und Goldstein, S. A. (2004a): I_{to} channels are octomeric complexes with four subunits of each Kv4.2 and K⁺ channel-interacting protein 2, *J Biol Chem* **279** (7), S. 5549–54.
- Kim, L. A., Furst, J., Gutierrez, D., Butler, M. H., Xu, S., Goldstein, S. A. und Grigorieff, N. (2004b): Three-dimensional structure of I_{to} ; Kv4.2-KChIP2 ion channels by electron microscopy at 21 Å resolution, *Neuron* **41** (4), S. 513–9.
- Kin, Y., Misumi, Y. und Ikehara, Y. (2001): Biosynthesis and characterization of the brain-specific membrane protein DPPX, a dipeptidyl peptidase IV-related protein, *J Biochem (Tokyo)* **129** (2), S. 289–95.
- Kobertz, W. R., Williams, C. und Miller, C. (2000): Hanging gondola structure of the T1 domain in a voltage-gated K⁺ channel, *Biochemistry* **39** (34), S. 10347–52.
- Krichevsky, A. M. und Kosik, K. S. (2002): RNAi functions in cultured mammalian neurons, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (18), S. 11926–9.
- Kubo, Y., Baldwin, T. J., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (1993): Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel, *Nature* **362** (6416), S. 127–33.
- Kunjilwar, K., Strang, C., DeRubeis, D. und Pfaffinger, P. J. (2004): KChIP3 rescues the functional expression of Shal channel tetramerization mutants, *J Biol Chem* **279** (52), S. 54542–51.
- Kuo, H. C., Cheng, C. F., Clark, R. B., Lin, J. J., Lin, J. L., Hoshijima, M., Nguyen-Tran, V. T., Gu, Y., Ikeda, Y., Chu, P. H., Ross, J., Giles, W. R. und Chien, K. R.

- (2001): A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I_{to} and confers susceptibility to ventricular tachycardia, *Cell* **107** (6), S. 801–13.
- Lauver, A., Yuan, L. L., Jeromin, A., Nadin, B. M., Rodriguez, J. J., Davies, H. A., Stewart, M. G., Wu, G. Y. und Pfaffinger, P. J. (2006): Manipulating Kv4.2 identifies a specific component of hippocampal pyramidal neuron A-current that depends upon Kv4.2 expression, *J Neurochem* **99** (4), S. 1207–23.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. und Barhanin, J. (1996a): A pH-sensitive yeast outward rectifier K^+ channel with two pore domains and novel gating properties, *J Biol Chem* **271** (8), S. 4183–7.
- Lesage, F., Reyes, R., Fink, M., Duprat, F., Guillemare, E. und Lazdunski, M. (1996b): Dimerization of TWIK-1 K^+ channel subunits via a disulfide bridge, *Embo J* **15** (23), S. 6400–7.
- Lesage, F. und Lazdunski, M. (2000): Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels, *Am J Physiol Renal Physiol* **279** (5), S. F793–801.
- Li, M., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (1992): Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the *Shaker* potassium channel, *Science* **257** (5074), S. 1225–30.
- Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C. C. und Kain, S. R. (1998): Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter, *J Biol Chem* **273** (52), S. 34970–5.
- Lilliehook, C., Chan, S., Choi, E. K., Zaidi, N. F., Wasco, W., Mattson, M. P. und Buxbaum, J. D. (2002): Calsenilin enhances apoptosis by altering endoplasmic reticulum calcium signaling, *Mol Cell Neurosci* **19** (4), S. 552–9.
- Lilliehook, C., Bozdagi, O., Yao, J., Gomez-Ramirez, M., Zaidi, N. F., Wasco, W., Gandy, S., Santucci, A. C., Haroutunian, V., Huntley, G. W. und Buxbaum, J. D. (2003): Altered $A\beta$ formation and long-term potentiation in a calsenilin knock-out, *J Neurosci* **23** (27), S. 9097–106.
- Linné, C. v. (1758): *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*, Editio decima, reformata, Impensis Direct. Laurentii Salvii, Holmiae.
- Lu, Z., Klem, A. M. und Ramu, Y. (2001): Ion conduction pore is conserved among

- potassium channels, *Nature* **413** (6858), S. 809–13.
- Makinen, P. I., Koponen, J. K., Karkkainen, A. M., Malm, T. M., Pulkkinen, K. H., Koistinaho, J., Turunen, M. P. und Yla-Herttuala, S. (2006): Stable RNA interference: comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain, *J Gene Med* **8** (4), S. 433–41.
- Maletic-Savatic, M., Lenn, N. J. und Trimmer, J. S. (1995): Differential spatiotemporal expression of K⁺ channel polypeptides in rat hippocampal neurons developing *in situ* and *in vitro*, *J Neurosci* **15** (5 Pt 2), S. 3840–51.
- Mellstrom, B. und Naranjo, J. R. (2001): Ca²⁺-dependent transcriptional repression and derepression: DREAM, a direct effector, *Semin Cell Dev Biol* **12** (1), S. 59–63.
- Menegola, M. und Trimmer, J. S. (2006): Unanticipated region- and cell-specific downregulation of individual KChIP auxiliary subunit isoforms in Kv4.2 knock-out mouse brain, *J Neurosci* **26** (47), S. 12137–42.
- Morohashi, Y., Hatano, N., Ohya, S., Takikawa, R., Watabiki, T., Takasugi, N., Imaizumi, Y., Tomita, T. und Iwatsubo, T. (2002): Molecular cloning and characterization of CALP/KChIP4, a novel EF-hand protein interacting with presenilin 2 and voltage-gated potassium channel subunit Kv4, *J Biol Chem* **277** (17), S. 14965–75.
- Nadal, M. S., Amarillo, Y., Vega-Saenz de Miera, E. und Rudy, B. (2001): Evidence for the presence of a novel Kv4-mediated A-type K⁺ channel-modifying factor, *J Physiol* **537** (Pt 3), S. 801–9.
- Nadal, M. S., Ozaita, A., Amarillo, Y., Vega-Saenz de Miera, E., Ma, Y., Mo, W., Goldberg, E. M., Misumi, Y., Ikehara, Y., Neubert, T. A. und Rudy, B. (2003): The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels, *Neuron* **37** (3), S. 449–61.
- Nadal, M. S., Amarillo, Y., Vega-Saenz de Miera, E. und Rudy, B. (2006): Differential characterization of three alternative spliced isoforms of DPPX, *Brain Res* **1094** (1), S. 1–12.
- Nakamura, T. Y., Pountney, D. J., Ozaita, A., Nandi, S., Ueda, S., Rudy, B. und Coetzee, W. A. (2001): A role for frequenin, a Ca²⁺-binding protein, as a regulator of Kv4 K⁺-currents, *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (22), S. 12808–13.
- Napoli, C., Lemieux, C. und Jorgensen, R. (1990): Introduction of a chimeric Chalcone Synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes

- in trans*, *Plant Cell* **2** (4), S. 279–289.
- Neher, E. und Sakmann, B. (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres, *Nature* **260** (5554), S. 799–802.
- Numberger, M. und Draguhn, A. (1996): *Patch-Clamp-Technik*, Labor im Focus, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- O’Callaghan, D. W., Hasdemir, B., Leighton, M. und Burgoyne, R. D. (2003): Residues within the myristoylation motif determine intracellular targeting of the neuronal Ca^{2+} sensor protein KChIP1 to post-ER transport vesicles and traffic of Kv4 K^{+} channels, *J Cell Sci* **116** (Pt 23), S. 4833–45.
- Osawa, M., Tong, K. I., Lilliehook, C., Wasco, W., Buxbaum, J. D., Cheng, H. Y., Penninger, J. M., Ikura, M. und Ames, J. B. (2001): Calcium-regulated DNA binding and oligomerization of the neuronal calcium-sensing protein, calsenilin/DREAM/KChIP3, *J Biol Chem* **276** (44), S. 41005–13.
- Patel, A. J. und Lazdunski, M. (2004): The 2P-domain K^{+} channels: role in apoptosis and tumorigenesis, *Pflügers Arch* **448** (3), S. 261–73.
- Petrecce, K., Miller, D. M. und Shrier, A. (2000): Localization and enhanced current density of the Kv4.2 potassium channel by interaction with the actin-binding protein filamin, *J Neurosci* **20** (23), S. 8736–44.
- Pioletti, M., Findeisen, F., Hura, G. L. und Minor, D. L., J. (2006): Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer, *Nat Struct Mol Biol* **13** (11), S. 987–95.
- Pongs, O., Kecskemethy, N., Müller, R., Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H. H., Canal, I., Llamazares, S. und Ferrus, A. (1988): *Shaker* encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*, *Embo J* **7** (4), S. 1087–96.
- Pruunsild, P. und Timmusk, T. (2005): Structure, alternative splicing, and expression of the human and mouse KCNIP gene family, *Genomics* **86** (5), S. 581–93.
- Qi, S. Y., Riviere, P. J., Trojnar, J., Junien, J. L. und Akinsanya, K. O. (2003): Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases, *Biochem J* **373** (Pt 1), S. 179–89.
- Radicke, S., Cotella, D., Graf, E. M., Ravens, U. und Wettwer, E. (2005): Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative β -subunit

- of human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3, *J Physiol* **565** (Pt 3), S. 751–6.
- Ren, X., Hayashi, Y., Yoshimura, N. und Takimoto, K. (2005): Transmembrane interaction mediates complex formation between peptidase homologues and Kv4 channels, *Mol Cell Neurosci* **29** (2), S. 320–32.
- Rivera, J. F., Ahmad, S., Quick, M. W., Liman, E. R. und Arnold, D. B. (2003): An evolutionarily conserved dileucine motif in *Shal* K⁺ channels mediates dendritic targeting, *Nat Neurosci* **6** (3), S. 243–50.
- Rosati, B., Pan, Z., Lypen, S., Wang, H. S., Cohen, I., Dixon, J. E. und McKinnon, D. (2001): Regulation of KChIP2 potassium channel β subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle, *J Physiol* **533** (Pt 1), S. 119–25.
- Ruiz-Gomez, A., Mellstrom, B., Tornero, D., Morato, E., Savignac, M., Holguin, H., Aurrekoetxea, K., Gonzalez, P., Gonzalez-Garcia, C., Cena, V., Mayor, F., J. und Naranjo, J. R. (2007): G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of downstream regulatory element antagonist modulator regulates membrane trafficking of Kv4.2 potassium channel, *J Biol Chem* **282** (2), S. 1205–15.
- Ruppersberg, J. P., Schröter, K. H., Sakmann, B., Stocker, M., Sewing, S. und Pongs, O. (1990): Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins, *Nature* **345** (6275), S. 535–7.
- Scannevin, R. H., Wang, K., Jow, F., Megules, J., Kopsco, D. C., Edris, W., Carroll, K. C., Lu, Q., Xu, W., Xu, Z., Katz, A. H., Olland, S., Lin, L., Taylor, M., Stahl, M., Malakian, K., Somers, W., Mosyak, L., Bowlby, M. R., Chanda, P. und Rhodes, K. J. (2004): Two N-terminal domains of Kv4 K⁺ channels regulate binding to and modulation by KChIP1, *Neuron* **41** (4), S. 587–98.
- Serodio, P., Kentros, C. und Rudy, B. (1994): Identification of molecular components of A-type channels activating at subthreshold potentials, *J Neurophysiol* **72** (4), S. 1516–29.
- Serodio, P., Vega-Saenz de Miera, E. und Rudy, B. (1996): Cloning of a novel component of A-type K⁺ channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain, *J Neurophysiol* **75** (5), S. 2174–9.
- Shen, N. V. und Pfaffinger, P. J. (1995): Molecular recognition and assembly sequences

- involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K^+ channel subunit proteins, *Neuron* **14** (3), S. 625–33.
- Sheng, M., Tsaur, M. L., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (1992): Subcellular segregation of two A-type K^+ channel proteins in rat central neurons, *Neuron* **9** (2), S. 271–84.
- Shibata, R., Nakahira, K., Shibasaki, K., Wakazono, Y., Imoto, K. und Ikenaka, K. (2000): A-type K^+ current mediated by the Kv4 channel regulates the generation of action potential in developing cerebellar granule cells, *J Neurosci* **20** (11), S. 4145–55.
- Shibata, R., Misonou, H., Campomanes, C. R., Anderson, A. E., Schrader, L. A., Doliveira, L. C., Carroll, K. I., Sweatt, J. D., Rhodes, K. J. und Trimmer, J. S. (2003): A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels, *J Biol Chem* **278** (38), S. 36445–54.
- Shyng, S. und Nichols, C. G. (1997): Octameric stoichiometry of the K_{ATP} channel complex, *J Gen Physiol* **110** (6), S. 655–64.
- Sigworth, F. J. (1994): Voltage gating of ion channels, *Q Rev Biophys* **27** (1), S. 1–40.
- Smith, D. R., Doucette-Stamm, L. A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Reeve, J. N. und et al. (1997): Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH : functional analysis and comparative genomics, *J Bacteriol* **179** (22), S. 7135–55.
- Smith-Maxwell, C. J., Ledwell, J. L. und Aldrich, R. W. (1998): Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation, *J Gen Physiol* **111** (3), S. 399–420.
- Sokolova, O., Kolmakova-Partensky, L. und Grigorieff, N. (2001): Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution, *Structure* **9** (3), S. 215–20.
- Strop, P., Bankovich, A. J., Hansen, K. C., Garcia, K. C. und Brunger, A. T. (2004): Structure of a human A-type potassium channel interacting protein DPPX, a member of the dipeptidyl aminopeptidase family, *J Mol Biol* **343** (4), S. 1055–65.
- Stühmer, W. (1992): Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes, *Methods*

- Enzymol* **207**, S. 319–39.
- Takimoto, K., Yang, E. K. und Conforti, L. (2002): Palmitoylation of KChIP splicing variants is required for efficient cell surface expression of Kv4.3 channels, *J Biol Chem* **277** (30), S. 26904–11.
- Takimoto, K., Hayashi, Y., Ren, X. und Yoshimura, N. (2006): Species and tissue differences in the expression of DPPY splicing variants, *Biochem Biophys Res Commun* **348** (3), S. 1094–100.
- Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (1987): Sequence of a probable potassium channel component encoded at *Shaker* locus of *Drosophila*, *Science* **237** (4816), S. 770–5.
- Tombola, F., Pathak, M. M. und Isacoff, E. Y. (2005): How far will you go to sense voltage?, *Neuron* **48** (5), S. 719–25.
- Toro, B., Cox, N., Wilson, R. J., Garrido-Sanabria, E., Stefani, E., Toro, L. und Zarei, M. M. (2006): KCNMB1 regulates surface expression of a voltage and Ca^{2+} -activated K^+ channel via endocytic trafficking signals, *Neuroscience* **142** (3), S. 661–9.
- Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. und Sharp, P. A. (1999): Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*, *Genes Dev* **13** (24), S. 3191–7.
- Van Hoorick, D., Raes, A., Keyzers, W., Mayeur, E. und Snyders, D. J. (2003): Differential modulation of Kv4 kinetics by KChIP1 splice variants, *Mol Cell Neurosci* **24** (2), S. 357–66.
- Varga, A. W., Yuan, L. L., Anderson, A. E., Schrader, L. A., Wu, G. Y., Gatchel, J. R., Johnston, D. und Sweatt, J. D. (2004): Calcium-calmodulin-dependent kinase II modulates Kv4.2 channel expression and upregulates neuronal A-type potassium currents, *J Neurosci* **24** (14), S. 3643–54.
- Wada, K., Yokotani, N., Hunter, C., Doi, K., Wenthold, R. J. und Shimasaki, S. (1992): Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family, *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (1), S. 197–201.
- Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R., Chandy, K. G., Grissmer, S. und Wulff, H. (2005): International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels, *Pharmacol Rev* **57** (4),

S. 463–72.

- Weiser, M., Vega-Saenz de Miera, E., Kentros, C., Moreno, H., Franzen, L., Hillman, D., Baker, H. und Rudy, B. (1994): Differential expression of *Shaw*-related K⁺ channels in the rat central nervous system, *J Neurosci* **14** (3 Pt 1), S. 949–72.
- Wickenden, A. D., Lee, P., Sah, R., Huang, Q., Fishman, G. I. und Backx, P. H. (1999): Targeted expression of a dominant-negative Kv4.2 K⁺ channel subunit in the mouse heart, *Circ Res* **85** (11), S. 1067–76.
- Wong, W., Newell, E. W., Jugloff, D. G., Jones, O. T. und Schlichter, L. C. (2002): Cell surface targeting and clustering interactions between heterologously expressed PSD-95 and the *Shal* voltage-gated potassium channel, Kv4.2, *J Biol Chem* **277** (23), S. 20423–30.
- Xu, J., Yu, W., Jan, Y. N., Jan, L. Y. und Li, M. (1995): Assembly of voltage-gated potassium channels. Conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the α -subunits, *J Biol Chem* **270** (42), S. 24761–8.
- Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. A. und Catterall, W. A. (2005): Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily, *Pharmacol Rev* **57** (4), S. 387–95.
- Yuan, L. L., Adams, J. P., Swank, M., Sweatt, J. D. und Johnston, D. (2002): Protein kinase modulation of dendritic K⁺ channels in hippocampus involves a mitogen-activated protein kinase pathway, *J Neurosci* **22** (12), S. 4860–8.
- Yuste, R. (1997): Potassium channels. Dendritic shock absorbers, *Nature* **387** (6636), S. 851, 853.
- Zagha, E., Ozaita, A., Chang, S. Y., Nadal, M. S., Lin, U., Saganich, M. J., McCormack, T., Akinsanya, K. O., Qi, S. Y. und Rudy, B. (2005): Dipeptidyl peptidase 10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels, *J Biol Chem* .
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. und Bartel, D. P. (2000): RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals, *Cell* **101** (1), S. 25–33.
- Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (1999): A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K_{ATP} channels, *Neuron* **22** (3), S. 537–48.
- Zhang, Y., MacLean, J. N., An, W. F., Lanning, C. C. und Harris-Warrick, R. M.

- (2003): KChIP1 and frequenin modify *Shal*-evoked potassium currents in pyloric neurons in the lobster stomatogastric ganglion, *J Neurophysiol* **89** (4), S. 1902–9.
- Zhou, W., Qian, Y., Kunjilwar, K., Pfaffinger, P. J. und Choe, S. (2004): Structural insights into the functional interaction of KChIP1 with *Shal*-type K⁺ channels, *Neuron* **41** (4), S. 573–86.
- Zhu, X. R., Wulf, A., Schwarz, M., Isbrandt, D. und Pongs, O. (1999): Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K⁺ current, *Receptors Channels* **6** (5), S. 387–400.

ANHANG



Auf die Erläuterungen von Standardeinheiten (min, g) und gebräuchlichen Vorsätzen bei Einheiten (m, μ) wurde verzichtet.

AraC	Cytosinarabinosid
AS	Aminosäure(n)
asRNA	<i>Antisense</i> -RNA
BK	<i>large conductance voltage- and calcium-activated K⁺-channel</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserum-Albumin)
CALP	<i>calsenilin-like protein</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i> (immortalisierte Zelllinie, gewonnen aus den Eierstöcken des Chinesischen Hamsters (<i>Cricetulus griseus</i>))
CMV	Cytomegalovirus
COS-1	Nierenzelllinie der Grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
d2EGFP	destabilisiertes EGFP
DIV...	<i>days in-vitro</i> (Tage in Kultur)
DMP	Dimethylpimelimidat
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
DPP	Dipeptidylaminopeptidase
DPPX	DPP6
DREAM	<i>downstream-regulatory-element antagonist modulator</i>
E...	embryonaler Tag (Tage nach der Begattung)
eag	<i>ether á go-go</i>
EF	Calcium-bindendes Motiv, benannt nach Helices im Parvalbumin-Protein

EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (verbessertes grün fluoreszierendes Protein)
ELK	<i>ether á go-go like K⁺-channel</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (fluoreszenzgestützte Zell-Sortierung)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
GRK	<i>G protein-coupled receptor kinase</i>
HA	Hämagglutinin
HBS	HEPES- <i>buffered saline</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCN	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i> (immortalisierte Zelllinie, gewonnen aus einer menschlichen embryonalen Niere)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonat
hERG	<i>human ether-á-go-go-related gene</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
KChIP	<i>K⁺-channel-interacting protein</i> (Kaliumkanal-interagierendes Protein)
KCNIP	<i>K⁺-channel-interacting protein</i> (Kaliumkanal-interagierendes Protein, offizieller Genname)
KCNQ	<i>KQT-like subfamily of voltage-gated potassium channels</i> (Unterfamilie Q der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle, Kv7-Kanäle, offizieller Genname)
KcsA	<i>Streptomyces-lividans-K⁺-Kanal</i>
Kir	<i>inward rectifying K⁺ channel</i> (Kalium-Einwärtsgleichrichter-Kanal)
Kv	<i>voltage-gated K⁺-channel</i> (spannungsgesteuerter Kaliumkanal)
LB	<i>Luria broth</i>
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MODC	murine Ornithindecaboxylase
MthK	<i>Methanobacterium-thermoautotrophicum-K⁺-Kanal</i>
NA	numerische Apertur
NCS	Neuronaler Calciumsensor
NEC	Neuronen-Extrazellulärlösung
NFH	<i>neurofilament heavy chain</i> (schwere Kette des Neurofilament)
NIC	Neuronen-Intrazellulärlösung

OEC	Oozyten-Extrazellulärlösung
OPA	Operationsverstärker
P...	postnataler Tag (Tage nach der Geburt)
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEST	Signalsequenz, die Proteine für den Abbau in den Proteasomen markiert und reich an den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T)
PS	Penicilin-Streptomycin
PSD	<i>Post-Synaptic Density</i>
PSG	Penicillin-Streptomycin-Glutamin
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure, RNS)
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
siPlasmid	Haarnadelvektor
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
slo	<i>slowpoke calcium-dependent</i>
TEA	Triethanolamin
tiff	<i>tagged image file format</i>
TM	Transmembransegment
TOK	<i>two pore domains outward-rectifying K⁺ channel</i>
TREK	<i>TWIK-related potassium channel</i> (TWIK-verwandter Kaliumkanal)
Tris	Tris(-Hydroxymethyl)-Aminomethan
TTX	Tetrodotoxin (Gift aus dem Kugelfisch (<i>Fugu</i> sp.), blockiert spannungs-aktivierte Natriumkanäle)
TWIK	<i>Tandem of Pore loop domains in a Weak Inward rectifying K⁺ channel</i>
wt	Wildtyp



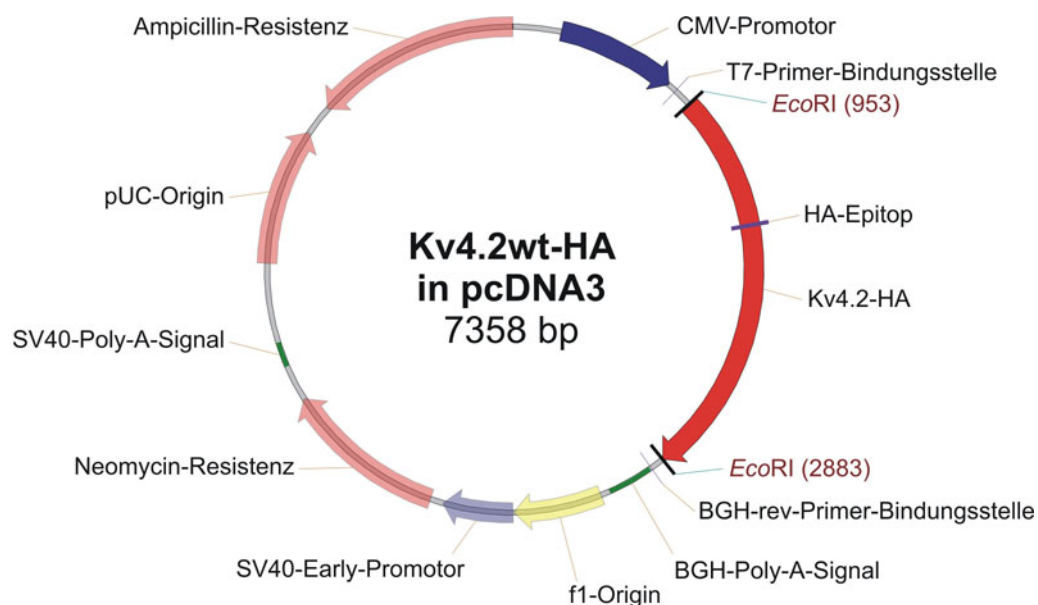
Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten siPlasmide bzw. synthetischen siRNAs waren gegen die unten aufgeführten Sequenzen gerichtet.

KChIP2si1	AAGTCCATCTATGACATGATG	(siPlasmid)
KChIP2si2	ATGTCCCAGCGGAATTGTCAA	(siPlasmid)
DPPXsi1	AAGATCTCTTCAGTGAAGACT	(siPlasmid)
DPPXsi2	CTCTCCAATAACAGACTTCAA	(siPlasmid)
DPPXsi3	CTGGCTCCACAGACAGAATGA	(siPlasmid)
DPPXsi4	CTGGCTGTATGAAGAGGAGAT	(siPlasmid)
siRNA1	GAGGATGAGTTTGAAGTATCC	(synthetische siRNA)
siRNA2	GAGGAATTCATTGAGTCTTGT	(synthetische siRNA)
siRNA3	CAGGAACAAACCAAGTTCACA	(synthetische siRNA)

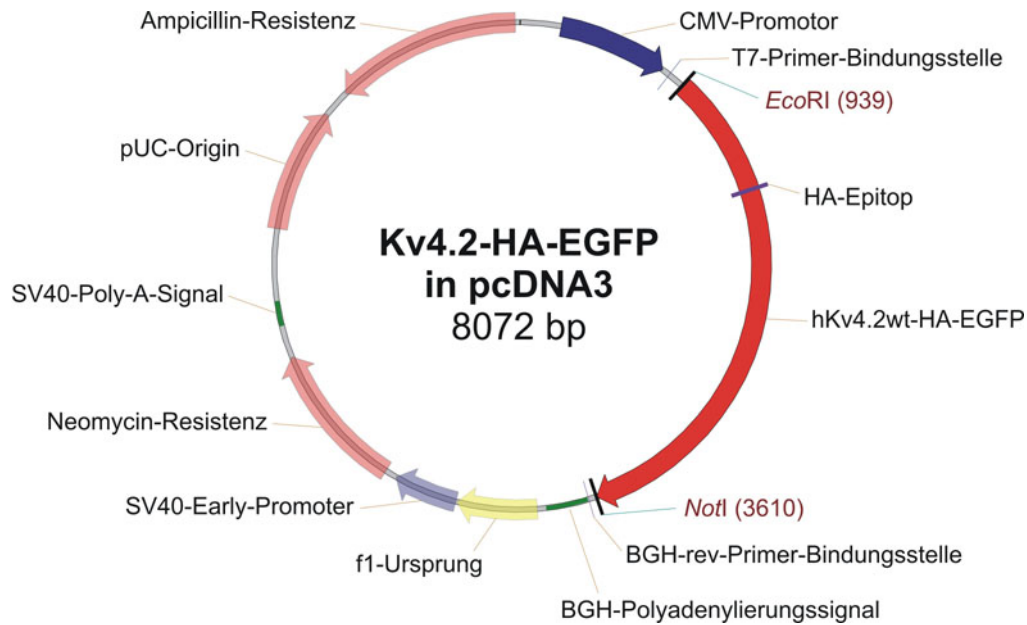
C

Plasmid-Karten

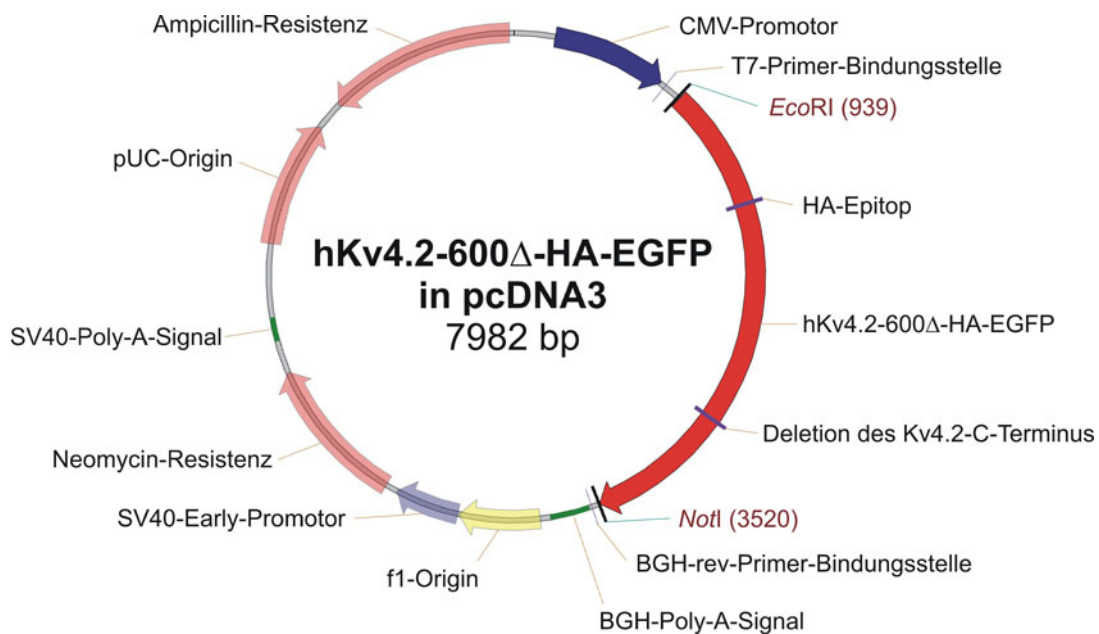
In den Plasmid-Karten wurden die Abschnitte, die für die Expression des Zielproteins nicht von unmittelbarer Bedeutung sind, zur besseren Übersicht halbtransparent dargestellt.



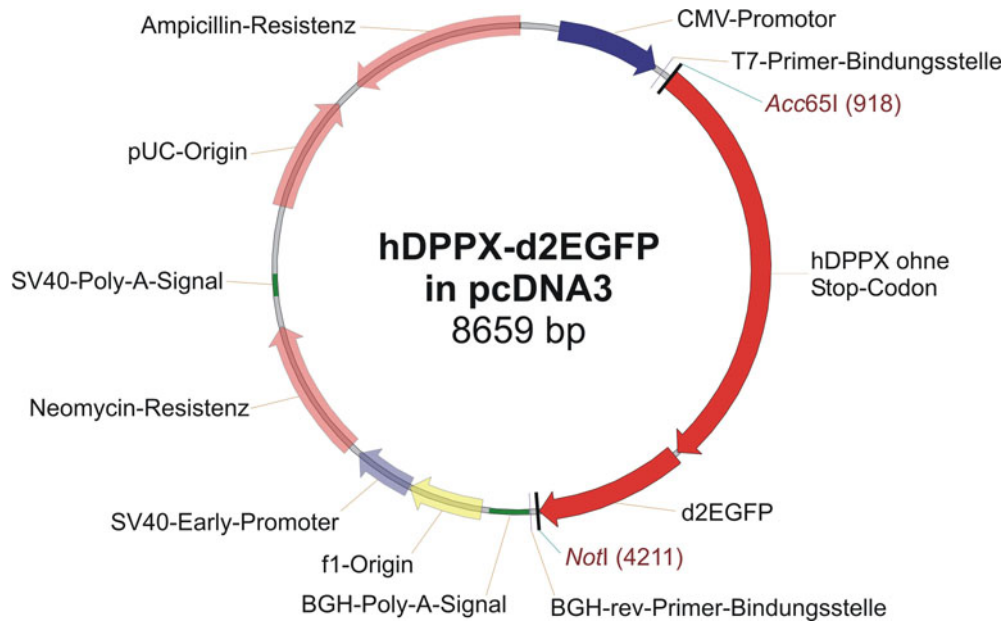
Kv4.2wt-HA in pcDNA3. Der humane Kv4.2-Kanal enthält in der ersten extrazellulären Schleife ein HA-Epitop. Das Konstrukt wurde in den pcDNA3-Vektor inkloniert, der eine Expression in Säugerzellen ermöglicht.



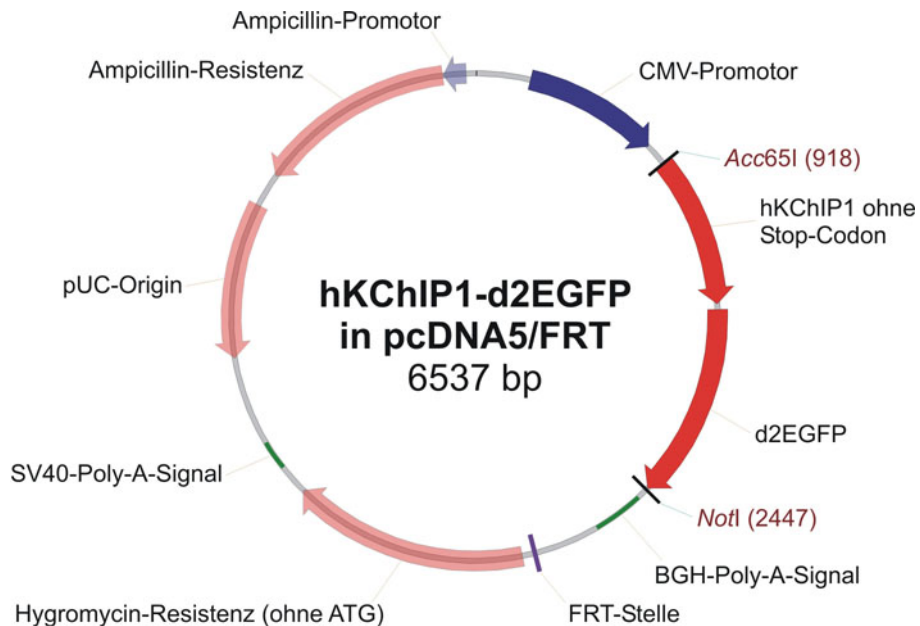
Kv4.2-HA-EGFP in pcDNA3. An den C-Terminus des humanen Kv4.2-HA-Kanals wurde der Fluoreszenzmarker EGFP fusioniert. Durch Punktmutationen im N-Terminus entstanden die in dieser Arbeit verwendeten KChIP2-bindungsdefizienten Mutanten hKv4.2F11K-HA-EGFP und hKv4.2A14K-HA-EGFP.



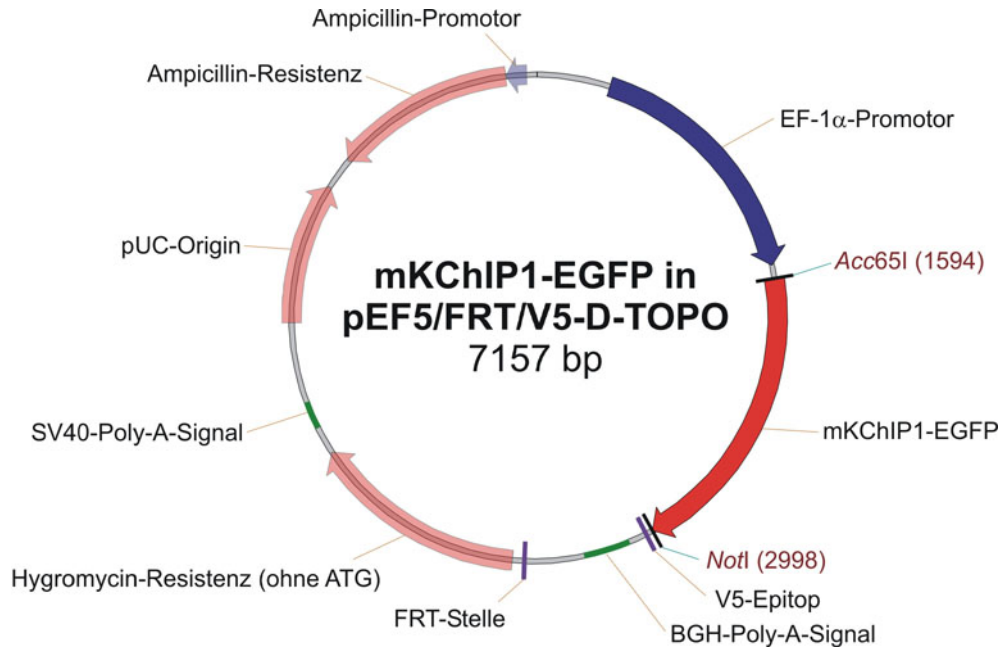
hKv4.2-600Δ-HA-EGFP in pcDNA3. Durch Deletion der C-terminalen 30 Aminosäuren entstand dieses Konstrukt, dem die Bindungsstelle des Kinesins Kif17 fehlt.



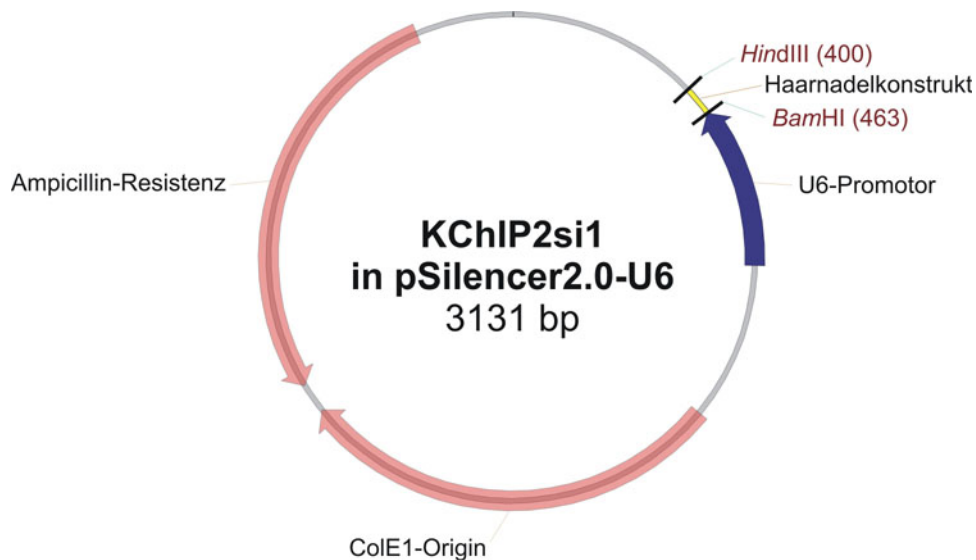
hDPPX-d2EGFP in pcDNA3. Dieses Plasmid diente zur Expression der akzessorischen DPPX-Untereinheit, an deren C-Terminus eine destabilisierte EGFP-Variante fusioniert wurde.



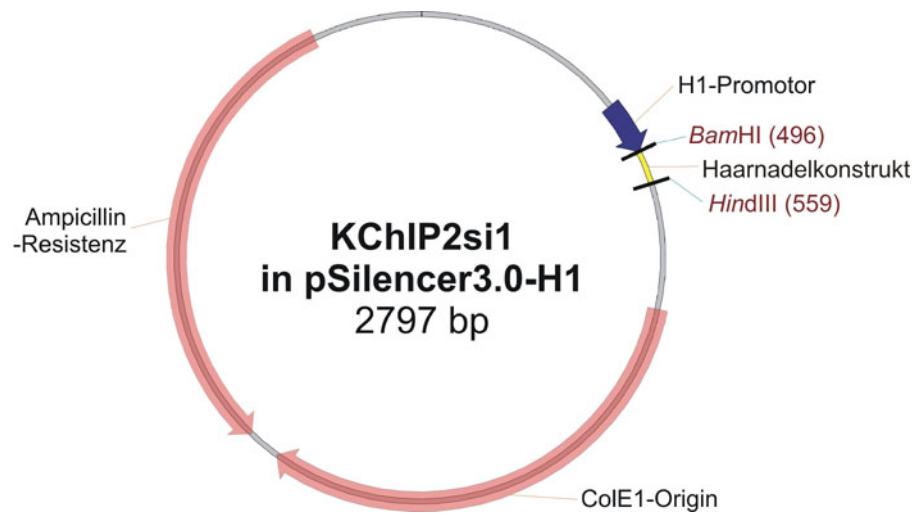
hKChIP1-d2EGFP in pcDNA5/FRT. Für die Erzeugung stabiler HEK293-Zelllinien wurden Fusionsproteine aus Kanaluntereinheit und einer destabilisierten EGFP-Variante in den pcDNA5/FRT-Vektor kloniert. Dieser Vektor ermöglicht die Selektion stabil transfizierter Zellen durch unterschiedliche Resistenzen. Analoge Vektoren wurden für weitere Kanaluntereinheiten hergestellt.



mKChIP1-EGFP in pEF5/FRT/V5-D-TOPO. Für die Erzeugung stabiler 3T3-Zelllinien wurden Fusionsproteine aus Kanaluntereinheit und EGFP in den pEF5/FRT/V5-D-TOPO-Vektor kloniert. Dieser Vektor ermöglicht die Selektion stabil transfizierter Zellen durch unterschiedliche Resistenzen. In diesem Vektor steht das Fusionsprotein unter Kontrolle des EF-1 α -Promotors, da der CMV-Promotor in 3T3-Zellen mit der Zeit deaktiviert wird. Analoge Vektoren wurden für weitere Kanaluntereinheiten hergestellt.



KChIP2si1 in pSilencer2.0-U6. Dieser Vektor diente zur Produktion eines Haarnadelkonstruktes, aus dem eine siRNA gegen KChIP2 gebildet wurde. Dabei stand das Haarnadelkonstrukt unter Kontrolle des U6-Promotors.



KChIP2si1 in pSilencer3.0-H1. Dieser Vektor diente zur Produktion eines Haarnadelkonstruktes, aus dem eine siRNA gegen KChIP2 gebildet wurde. Dabei stand das Haarnadelkonstrukt unter Kontrolle des H1-Promotors.



Hier wird die Zusammensetzung der im [Kapitel Methoden](#) erwähnten Puffer und Lösungen in alphabetischer Reihenfolge wiedergegeben.

BSA-Lösung	2% in PBS
Diethylpyrocarbonat-behandeltes Wasser	DEPC, 0,1% (v/v)
ECL-Lösung	50 μ M Luminol, 41 μ M p-Cumarsäure, 0,3‰ H_2O_2 , 100 mM Tris-HCl, pH 8,5
EDTA	0,5‰ (w/v), pH 7,4
Extrazellulärlösung	135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, 10 mM Sacharose, pH 7,4 mit NaOH
Gentamycin-Lösung	7,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM Na-Pyruvat, 5 mM HEPES, 50 μ g/ml Gentamycin, pH 7,5 mit NaOH
HBS (2 $\times$)	280 mM NaCl, 10mM KCl, 1,5 mM Na_2HPO_4 , 12 mM Dextrose, 50 mM HEPES, pH 7,05, steril filtriert, Aliquots bei -20°C gelagert
Intrazellulärlösung	125 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, 10 mM Sacharose, 2 mM Glutathion, 2 mM K_2 -ATP, pH 7,2 mit KOH
KCM (5 $\times$)	0,5 M KCl, 0,15 M CaCl_2 , 0,25 M MgCl_2
Lysispuffer	150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 2 mM EDTA, pH 7,4 mit NaOH, 0,5% Triton X-100, 10 μ l/ml Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma, Taufkirchen), 4°C
NEC	160 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM Glukose, Phenolrot 0,01 g/l, pH 7,3 mit NaOH, steril filtriert, Zugabe von 500 nM TTX direkt vor Gebrauch

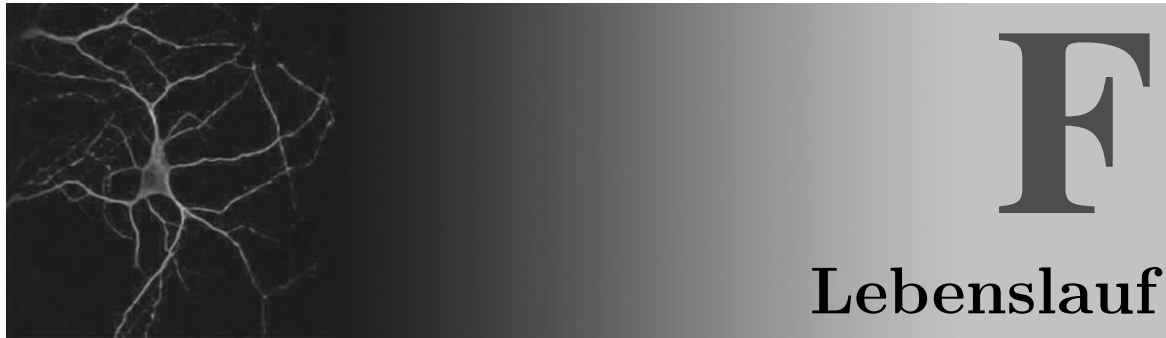
Neurobasalmedium	2 % B27-Supplement, 0,5 mM L-Glutamin, 25 μ M Glutamat
NIC	140 mM K-MeSO ₃ , 5 mM KCl, 0,5 mM CaCl ₂ , 0,5 mM MgCl ₂ , 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,2 mit KOH, Zugabe von 2 mM Mg-ATP direkt vor Gebrauch
OEC	79,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 5 mM HEPES, pH 7,5 mit NaOH
Oozyten-Ringer-Lösung (Ca ²⁺ -frei)	82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 55 mM HEPES, pH 7,5 mit NaOH
PBS	150 mM NaCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄
PBST	Zusatz von 0,5 % (v/v) Tween zu PBS
Plattierungsmedium	MEM, 0,6 % Glukose, 10 % Pferdeserum
TAE-Puffer	0,05 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
Triton X-100	0,25 % in PBS
TSS-Puffer	73 % LB-Medium, 10 % PEG3350, 5 % DMSO, 20 mM MgSO ₄ , pH 6,5, sterilfiltriert



Hartmann, L. S., Callsen, B., Pongs, O., Bähring, R. (2006): Role of accessory subunits in somatodendritic Kv4.2 channel expression. *Posterpräsentation beim jährlichen Treffen der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in München.*

Hartmann, L. S., Pongs, O., Bähring, R. (2005): Interaction of Kv4.2 A-type channels with accessory subunits. *Posterpräsentation beim jährlichen Treffen der Society of Neuroscience in Washington, D. C.*

Callsen, B., Isbrandt, D., Sauter, K., Hartmann, L. S., Pongs, O. und Bähring, R. (2005): Contribution of N- and C-terminal Kv4.2 channel domains to KChIP interaction [corrected], *J Physiol* **568** (Pt 2), S. 397–412.



Persönliche Daten

Name	L. Sven Hartmann
Geburtsdatum	9. September 1977
Geburtsort	Frankfurt (Oder)

Studium

seit November 2003	Promotion im Institut für neurale Signalverarbeitung am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH)
Oktober 1998 bis Oktober 2003	Universität Hamburg Biochemie/Molekularbiologie Abschluss: Diplom mit Gesamtnote „sehr gut“ Thema der Diplomarbeit: Induzierbare Expression von <i>Anti-sense</i> -RNA zur Untersuchung der Regulation und des Exports eukaryotischer ribosomaler Untereinheiten

Stipendien

Februar 2001 bis September 2003	Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes e. V.
November 2000 bis Februar 2007	Stipendiat von e-fellows.net

Schulische Ausbildung

bis Juni 1997	Carl-Friedrich-Gauß-Gymnasium mit mathematisch-naturwissenschaftlich-technischer Richtung, Frankfurt (Oder) Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,0)
---------------	---