

Aus dem Institut für Neurale Signalverarbeitung des Zentrums für Molekulare
Neurobiologie Hamburg des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. Olaf Pongs

**Elektrophysiologische, proteinbiochemische und
immunzytochemische Charakterisierung
C-terminaler HERG (*LQT2*) Mutationen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Chi-un Choe

aus Bochum

Hamburg 2008

Choe et al., C-terminal HERG (*LQT2*) mutations disrupt I_{Kr} channel regulation through 14-3-3epsilon. *Human Molecular Genetics*, 2006 Oct 1;15(19):2888-902.

Angenommen vom Fachbereich der Medizin
Der Universität Hamburg am 23.4.2008

Veröffentlichung mit Genehmigung des
Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. O. Pongs

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. J. R. Schwarz

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. A. Gal

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese/Fragestellung	1
2	Einleitung	2
2.1	Das Herzaktionspotential	3
2.2	Das LQT-Syndrom und HERG	6
2.2.1	Das angeborene LQT-Syndrom	6
2.2.2	Die biophysikalischen Eigenschaften des HERG	9
2.3	Sympathoadrenerge Stimulation ist kritisch für die Auslösung kardialer Attacken bei LQT-Syndrom	11
2.3.1	Physiologie der sympathoadrenergen Regulation des Herzens	11
2.3.2	Sympathoadrenerge Stimulation als Auslöser kardialer Attacken bei LQT-Syndrom	13
2.4	Fallvorstellungen	15
2.4.1	Familie mit der LQT2-Mutation R1014fsX38	17
2.4.2	Familie mit der LQT2-Mutation V1038fsX20	19
2.4.3	Familie mit der LQT2-Mutation R744X	19
2.4.4	Familie mit der LQT2-Mutation S818L	20
2.4.5	Familie mit der LQT2-Mutation G965X	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Molekularbiologische Methoden	22
3.1.1	Lösungen und Vektoren	22
3.1.1.1	Lösungen	22
3.1.1.2	Vektoren	24
3.1.2	Enzymatische Modifikation von DNA	25
3.1.2.1	Restriktionsverdau von DNA	25
3.1.2.2	Auffüllreaktion nicht-kompatibler, überhängender 5'-Enden	25
3.1.2.3	Phosphorylierung von DNA-Fragmenten	25
3.1.2.4	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	26
3.1.2.5	Ligation von DNA-Fragmenten	26
3.1.3	Auftrennung und Aufreinigung von DNA	26
3.1.3.1	Agarosegelelektrophorese von DNA	26
3.1.3.2	Aufreinigung von DNA	26
3.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
3.1.4.1	Standard-PCR	27
3.1.4.2	In-vitro Mutagenese	28
3.1.5	Konzentrationsbestimmung von DNA	29
3.1.6	Transformation kompetenter Bakterien	29
3.1.7	Präparation von DNA	30

3.1.7.1	Präparation von Plasmid-DNA aus 2ml-Kulturen (Miniprep)	30
3.1.7.2	Präparation von Plasmid-DNA aus 50ml-Kulturen (Midiprep)	30
3.1.8	Sequenzierung von DNA	31
3.2	Zellbiologische Methoden	32
3.2.1	Zellkulturmedien	32
3.2.2	Kultivierung von CHO- und COS7-Zellen	33
3.2.3	Transfektion von CHO- und COS7-Zellen	34
3.3	Immunzytochemische Methoden	35
3.3.1	Lösungen und Antikörper	35
3.3.2	Präparation der Zellen	36
3.3.3	Mikroskopische Analyse	36
3.4	Proteinbiochemische Methoden	37
3.4.1	<i>Western Blot</i> -Analyse	37
3.4.1.1	Lösungen und Antikörper	37
3.4.1.2	Durchführung der <i>Western Blot</i> -Analyse	39
3.4.2	Immunpräzipitation	40
3.4.2.1	Lösungen und Antikörper	40
3.4.2.2	Durchführung der Immunpräzipitation	41
3.5	Elektrophysiologische Methoden	42
3.5.1	Lösungen	42
3.5.1.1	Extrazelluläre Lösungen	42
3.5.1.2	Intrazelluläre Lösungen	42
3.5.2	Der Messtand	43
3.5.2.1	Isolierung des Messtandes	43
3.5.2.2	Mikroskop	43
3.5.2.3	Perfusion	43
3.5.2.4	Patchpipetten und Elektroden	43
3.5.3	Die Datenerfassung	45
3.5.3.1	Verstärker	45
3.5.3.2	Kapazitäten	46
3.5.3.3	Serienwiderstand	47
3.5.3.4	Digitalisierung und Filter	47
3.5.4	Durchführung der Patch-Clamp Experimente	48
3.5.4.1	Giga-Seal und <i>Whole-Cell</i> -Konfiguration	48
3.5.4.2	Protokolle	48
3.5.5	Auswertung	50
3.5.5.1	Elektrophysiologische Grundlagen	50
3.5.5.1.1	Das Gleichgewichtspotential und die Nernst-Gleichung	50
3.5.5.1.2	Die Leitfähigkeits-Spannungs- Beziehung und Boltzman-Funktion	51
3.5.5.1.3	Zeitkonstanten	52
3.5.5.2	Auswertung	53
3.5.5.2.1	Computergestützte Analyse- programme	53
3.6	Computergestützte Simulation	54
3.6.1	Kanalkinetiken	54
3.6.2	β -adrenerges Stimulationsmodell	55

3.6.3 Simulation von Herzaktionspotentialen	56
---	----

4 Ergebnisse 57

4.1 Klonierung der HERG Mutanten S818L, G965X, R744X, R1014fsX38 und V1038fsX20 sowie deren Fusion mit einem Hämagglutin-Epitop	57
4.1.1 Anhängen von Hämagglutinin an den HERGwt	58
4.1.2 Elektrophysiologische Untersuchung des HA-Epitop markierten HERGwt	66
4.1.3 Anhängen des Hämagglutinin-Epitops an die HERG-Mutanten	67
4.2 Biophysikalische Charakterisierung	69
4.2.1 Aktivierung	69
4.2.2 Inaktivierung und Deaktivierung	72
4.2.3 Ladungstransfer	75
4.3 Bestimmung der Proteinexpression und -reifung	79
4.4 Immunzytochemische und elektrophysiologische Analyse der HERG-Mutanten R744X und S818L	81
4.4.1 Immunzytochemische Analyse der HERG-Mutanten R744X und S818L	81
4.4.2 Koexpression des HERGwt mit den HERG-Mutanten R744X und S818L	84
4.5 Proteinstabilität der Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20	86
4.6 Molekulare und funktionelle Interaktion der Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 mit 14-3-3 ϵ	88
4.6.1 Molekulare Interaktion der HERG-Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 mit 14-3-3 ϵ	88
4.6.2 Funktionelle Modulation der HERG-Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 durch 14-3-3 ϵ	90
4.6.3 Funktionelle Modulation der mit HERGwt koexprimierten HERG-Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 durch 14-3-3 ϵ	94
4.7 Computergestützte Simulation einer ventrikulären Kardiomyozyte	100

5 Diskussion 105

5.1 Die transportdefizienten Mutationen R744X und S818L	105
5.1.1 Mechanismus der Retention im ER	107
5.1.2 Mechanismus der Retention im Golgi-Apparat	108
5.1.3 Temperatursensitivität transportdefizienter Mutationen	109
5.1.4 Haplo-Gendosis-Effekt transportdefizienter	

HERG-Mutanten	110
5.2 Die HERG-Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20	112
5.2.1 Regulation von HERG durch Proteinkinase A	112
5.2.2 Struktur, Funktion und Regulation von 14-3-3	114
5.2.3 Funktionelle Interaktion von 14-3-3 ϵ mit HERG	115
5.2.4 Physiologische Relevanz der Interaktion von 14-3-3 ϵ mit HERG	116
5.2.5 Pathophysiologischer Mechanismus der Interaktion von 14-3-3 ϵ mit HERG	123
5.2.6 Der HERG/14-3-3 ϵ Komplex – Grundlage für einen makromolekularen Signalkomplex?	125
6 Zusammenfassung	127
7 Literaturverzeichnis	128
8 Anhang	145
8.1 Abkürzungsverzeichnis	145
8.2 Klonkarten	147
8.3 Danksagung	154
8.4 Lebenslauf	155
8.5 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	156
8.6 Erklärung	158

1 Arbeitshypothese/Fragestellung

Zielsetzung war es, durch elektrophysiologische und zellbiologische Untersuchungen die molekularen Grundlagen der Pathophysiologie der fünf Mutationen, die in den fünf nicht verwandten Familien im KCNH2 Gen gefunden worden waren, zu klären.

1) Zu Beginn sollte mit Hilfe der Patch-Clamp Technik untersucht werden, ob sich die fünf identifizierten LQT2-Mutationen biophysikalisch vom Wildtyp unterscheiden.

2) Für viele C-terminale HERG-Mutanten wurde eine fehlende Detektion von Strömen in Zellen beschrieben. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für die einige der hier beschriebenen C-terminalen Mutanten angenommen. Proteinbiochemische und immunzytochemische Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob sich der intrazelluläre Transport oder die Proteinreifung der LQT2-Mutationen vom Wildtyp unterscheidet.

3) Die beschriebenen Mutationsträger erlitten ihre kardialen Ereignisse meist nach Auslösung sympathischer Stimulation (emotionaler Stress, Erschrecken, körperlicher Belastung, Weckerklingeln), wofür ein Zusammenhang bisher nicht beschrieben ist. Da eine PKA-abhängige Aktivierung des HERG durch 14-3-3 ϵ beschrieben wurde (Kagan *et al.*, 2002), nahmen wir eine gestörte Modulation von HERG durch 14-3-3 ϵ an. Mit Hilfe elektrophysiologischer und proteinbiochemischer Untersuchungen sollte die molekulare und funktionelle Interaktion von HERG und 14-3-3 ϵ analysiert werden. Abschließend sollte durch Computersimulationen geklärt werden, ob die experimentell erhobenen Daten den klinischen Zustand der Patienten erklären können.

2 Einleitung

Die Herzfrequenz eines Erwachsenen beträgt etwa 70 Herzschläge pro Minute. Voraussetzung für diese etwa sekundliche Kontraktion ist eine synchronisierte Erregung der Herzmuskelzellen. Diese eine Vielzahl unterschiedlicher Ionenkanäle, welche eine kontrollierte Entstehung, Ausbreitung und Beendigung der Erregung gewährleisten. Pathologische Veränderungen in der Aktivität dieser Ionenkanäle führen zu einem Verlust der synchronisierten Erregungsausbreitung, d.h. einer Herzarrhythmie.

Besonders ausgeprägt ist der Zusammenhang zwischen Ionenkanaldefekt und klinischem Bild im Fall des Long-QT-Syndroms (LQT-Syndrom), das auf Defekte in Natrium, bzw. Kaliumkanälen zurückgeführt werden konnte, die eine verzögerte Beendigung des Aktionspotentials bewirken. Die auf zellulärer Ebene entstehende verlängerte Erregung der Herzmuskelzelle macht sich in der Summe im Elektrokardiogramm (EKG) als eine verlängerte gemessene QT-Zeit bemerkbar. Die QT-Zeit wird nach Bazett an die Herzfrequenz angepasst, indem man aus gemessener QT-Zeit und RR-Zeit die frequenzkorrigierte QT_c -Zeit berechnet:

$$QT_c = \frac{\overline{QT} (ms)}{\sqrt{RR (sec)}}$$

Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch ventrikuläre Tachyarrhythmien und Kammerflimmern, welche zu Synkopen und plötzlichen Herztod führen können (Jervell & Lange-Nielsen, 1957; Romano, 1963; Ward, 1964; Schwartz *et al.*, 1975; Moss *et al.*, 1991). Kennzeichnend ist eine schnelle, polymorphe, ventrikuläre Tachyarrhythmie, welche als Torsade de Pointes (TdP) bezeichnet wird (Abbildung 2.1). Besonders häufig kommt es zu diesen kardialen Ereignissen nach sympathoadrenerger Stimulation während körperlicher Belastung oder durch emotionale Erregung (Schwartz *et al.*, 2001). Obwohl die pathophysiologischen Grundlagen dieser Krankheit bereits gut erforscht sind, sind die molekularen Mechanismen, bzw. Signalkaskaden, die der Auslösung von Arrhythmien durch sympathische Stimulation zugrunde liegen, bisher nicht verstanden.

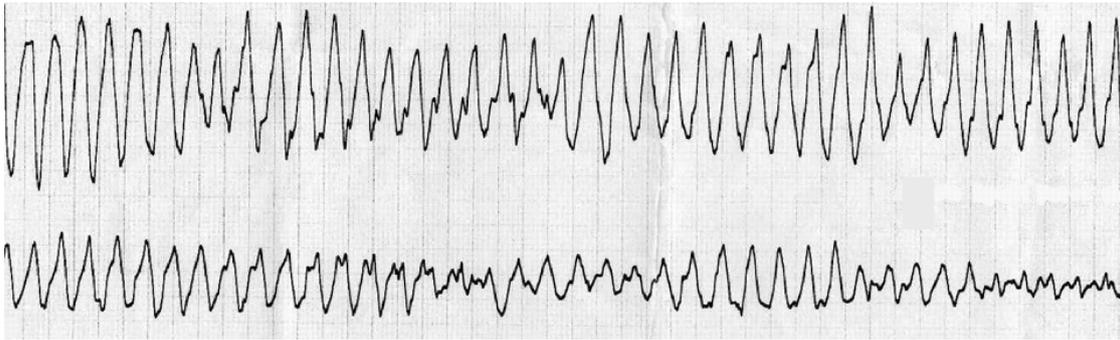


Abbildung 2.1

Beim LQT-Syndrom kann man im EKG ein pathognomisches, paroxysmales Kammerflattern beobachten, welches als Torsade de Pointes oder auch als Spitzenumkehrtanzen-Kammerflattern bezeichnet wird. Die Bezeichnung ist darauf zurückzuführen, dass die Kammerkomplexe mit abwechselnder Ausschlagrichtung um die Grundlinie tanzen. Das EKG wurde mit einer Geschwindigkeit von 25 mm pro Sekunde aufgezeichnet. (modifiziert nach Booker *et al.*, 2003)

2.1 Das Herzaktionspotential

Das EKG ermöglicht die Darstellung der Erregungsausbreitung im Herzen durch oberflächliche Ableitung der Summenaktionspotentiale aller Herzmuskelzellen. Diesen Vektoren der Summenaktionspotentiale, welche durch unterschiedliche Wellen und Komplexe im EKG abgebildet werden, liegen die zellulären Aktionspotentiale in Kardiomyozyten zugrunde.

Besonders charakteristisch für das ventrikuläre Herzaktionspotential sind eine sehr schnelle Depolarisation und eine langsame Repolarisation, wodurch ein mehrere hundert Millisekunden dauerndes Herzaktionspotential entsteht. Üblicherweise wird das Herzaktionspotential in fünf Phasen eingeteilt, die mit Aktivitäten unterschiedlicher Ionenkanäle korreliert werden können (Abbildung 1.2). Während der Phase 0 kommt es zur schlagartigen Depolarisation der Zelle im wesentlichen hervorgerufen durch Aktivierung spannungsabhängiger $\text{Na}_v1.5$ Natriumkanäle. Anschließend findet durch einen transienten Kaliumauswärtsstrom (*transient outward current*) eine teilweise Repolarisation statt (Phase 1). Die Phase 2 ist durch ein Plateau im Herzaktionspotential

charakterisiert, welches vor allem durch ein Gleichgewicht zwischen einem Kalziumeinstrom $I_{Ca(L)}$ durch L-Typ Kalziumkanäle und einem Kaliumauswärtsstrom I_K getragen wird. In der Phase 3 kommt es zur fast vollständigen Repolarisation und Beendigung des Aktionspotentials. Die letzte Phase 4 ist durch einen auswärts gerichteten Kaliumstrom I_{Kir} dominiert, welcher für die finale, vollständige Zurückführung auf die Ruhespannung verantwortlich ist (Abbildung 2.2).

An der Beendigung der Plateauphase in Phase 3 zeigen sich im wesentlichen die Aktivitäten zweier spannungsabhängiger Kaliumkanäle verantwortlich, die einen langsam aktivierenden Strom I_{Ks} (*slow*) und eine schnell aktivierende Komponente I_{Kr} (*rapid*) vermitteln (Abbildung 2.2). Die Aktivität dieser Kanäle ist besonders kritisch für die Regulation der Erregungsausbreitung und -eindämmung, da sich Kardiomyozyten in Phase 3 in einer relativen Refraktärphase befinden und somit relativ leicht wieder erregbar sind. Deshalb ist das Risiko für das Auftreten von Kammerflimmern während dieser Zeitspanne am größten, weshalb sie auch als vulnerable Phase bezeichnet wird. Die T-Welle im EKG entspricht der Repolarisation des Herzaktionspotentials und verläuft somit synchron mit der vulnerablen Phase. I_{Kr} und I_{Ks} sind maßgebend für die Länge des Herzaktionspotentials. Die Reduktion einer Komponente der beiden I_K führt bereits zu einer deutlichen Verlängerung der Aktionspotentialdauer. Diagnostisch ist dies durch eine verlängerte QT-Zeit im EKG erkennbar, die das klinische Bild des LQT-Syndrom kennzeichnet (Abbildung 2.2, gestrichelte Linien).

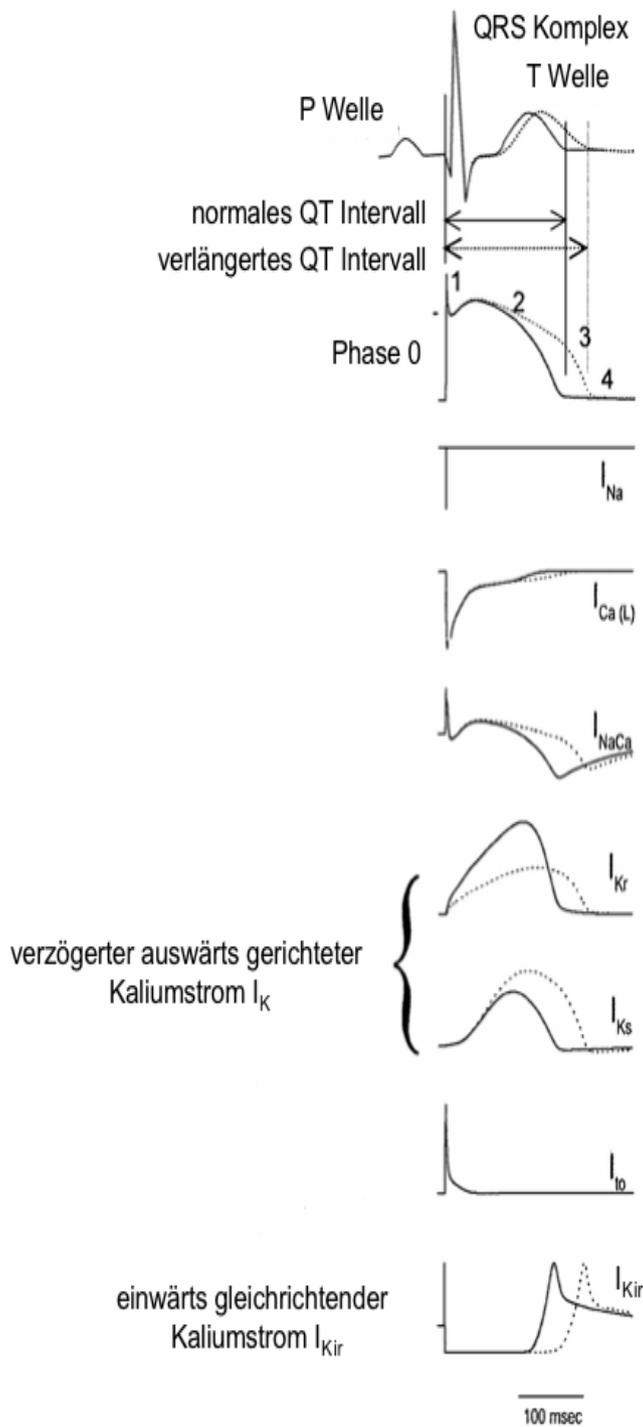


Abbildung 2.2

Der Zusammenhang von Elektrokardiogramm (oberstes Feld), ventrikulärem Herzaktionspotential (zweitoberstes Feld) und unterschiedlichen Ionenströmen (untere Felder) ist graphisch und chronologisch synchron dargestellt. Die durchgezogenen Linien der Ionenströme kennzeichnen die normale Ausgangslage, wohingegen die gestrichelten Linien der einzelnen Ionenströme das Resultat einer 50%igen Reduktion von I_{Kr} darstellt. (modifiziert nach Roden *et al.*, 2002)

2.2 Das LQT-Syndrom und der HERG Ionenkanal

2.2.1 Das angeborene LQT-Syndrom

Bisher konnten sechs Genorte, welche sich auf den Chromosomen 3 (LQT 3), 4 (LQT 4), 7 (LQT 2), 11 (LQT 1 und LQT 6) und 21 (LQT 5) befinden mit einer vererbaren Form des LQT-Syndroms korreliert werden (Wang *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1994; Schott *et al.*, 1995; Chevillard *et al.*, 1991; Abbott *et al.*, 1999). Vier dieser Gene (KCNQ1, KCNH2, KCNE1 und KCNE2) kodieren für Untereinheiten von spannungsabhängigen Kaliumkanälen, die für I_{Ks} (Kv 7.1 und minK), bzw. für I_{Kr} (HERG und MiRP1) verantwortlich sind (Splawski *et al.*, 1997; Tyson *et al.*, 1997; Abbott *et al.*, 1999). Mutationen in diesen Untereinheiten führen zu einer Reduktion in der Aktivität der entsprechenden Kaliumkanäle in *in vitro* Expressionssystemen. Der Zusammenhang zwischen mutationsbedingter I_K -Verminderung und pathophysiologischer Ausprägung des LQT-Syndroms lässt sich in Computersimulationen von Herzaktionspotentialen verdeutlichen. Wird der schnelle, repolarisierende Kaliumstrom I_{Kr} um 50% reduziert, beobachtet man eine Verlängerung des Herzaktionspotential, womit eine verlängerte QT-Zeit einhergeht (gestrichelte Linien in Abbildung 1.2). LQT-Mutationen werden meist autosomal dominant vererbt. Ein autosomal-rezessiver Vererbungsmodus, der zusätzlich mit einer angeborenen Taubheit verbunden ist, wird als Jervell-Lange-Nielsen (JLN) Krankheit bezeichnet (Jervell & Lange-Nielsen, 1957).

Eine abnormal verlängerte Depolarisation kann zu einer Verlängerung des Herzaktionspotential und somit zur Ausprägung des LQT-Syndroms führen. Genetische Veränderungen im Gen für $Na_v1.5$, dem depolarisierenden Natriumstrom konnten mit LQT3 assoziiert werden (Wang *et al.*, 1995; Tabelle 1). Hier wird diskutiert, dass LQTS-Mutationen eine verminderte Inaktivierung von $Na_v1.5$ Kanälen hervorrufen und dadurch zu einer Verlängerung des Herzaktionspotential führen (Bennett *et al.*, 1995; Dumaine *et al.*, 1996). Alternativ wird diskutiert, dass die Mutationen zu einem Leckstrom durch die Steuerungspore (*gating pore*) führen und dieses LQT

verursacht (Stanislav *et al.*, 2007). Der Vererbungsmodus von LQT3 scheint autosomal-dominant zu sein.

Erst kürzlich konnten Mutationen im Ankyrin-B Protein mit LQT4 assoziiert werden (Mohler *et al.*, 2003). Bei Ankyrin-B handelt es sich nicht wie in den anderen Fällen um Ionenkanaluntereinheiten, sondern um ein Membranprotein, welches unterschiedlichen Ionen transportern und Rezeptoren als Adapter und Anker dient (Mohler *et al.*, 2002). Mutationen in Ankyrin-B können zu einer fehlenden Bildung und fehlerhaften Koordination dieser Transportkomplexe führen und somit zu Extrasystolen und Herzarrhythmien prädisponieren. Auch LQT4 hat einen autosomal-dominanten Vererbungsmodus.

Syndrom	Gen (Genort)	häufigster Vererbungsmodus	häufigste Pathophysiologie
LQT1*	Kv7.1 / KCNQ1 (11p15.5)	autosomal-dominant	↓ I _{Ks}
LQT2*	HERG / KCNH2 (7p35-36)	autosomal-dominant	↓ I _{Kr}
LQT3*	SCN5A (3p24-27)	autosomal-dominant	↑ Plateau I _{Na}
LQT4*	Ankyrin-B (4q25-27)	autosomal-dominant	↑ [Ca ²⁺] _i
LQT5*	MinK / KCNE2 (21p22.1-2)	autosomal-dominant	↓ I _{Ks}
LQT6*	MiRP1 / KCNE1 (11p15.5)	autosomal-dominant	↓ I _{Kr}
JLN1**	Kv7.1 / KCNQ1 (11p15.5)	autosomal-rezessiv	↓↓ I _{Ks}
JLN2**	MinK / KCNE2 (21p22.1-2)	autosomal-rezessiv	↓↓ I _{Ks}

Tabelle 1

Zusammenstellung des Romano-Ward Syndroms (LQT1 – 6, markiert mit *) und des Jervell-Lange-Nielsen Syndroms (JLN1 – 2, markiert mit **) mit den verantwortlichen Genen, den entsprechenden Genlokalisationen und Erbgängen sowie der daraus resultierenden funktionellen Veränderungen. Im Gegensatz zum Romano-Ward-Syndrom, welcher autosomal-dominant vererbt wird, ist das autosomal-rezessiv vererbte Jervell-Lange-Nielsen Syndrom mit angeborener Taubheit assoziiert.

(modifiziert nach Roden *et al.*, 2002 mit Angaben aus Wang *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1994; Schott *et al.*, 1995; Chevillard *et al.*, 1991; Abbott *et al.*, 1999)

2.2.2 Die biophysikalischen Eigenschaften des HERG

Dem LQT2-Syndrom liegen Mutationen im KCNH2 Gen zugrunde, das die α -Untereinheit des HERG Kaliumkanals kodiert. HERG Kanäle vermitteln den repolarisierenden Strom I_{Kr} (Curran *et al.*, 1995; Sanguinetti *et al.*, 1995; Trudeau *et al.*, 1995). HERG gehört zur **ether à go-go** (eag)-Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Luiman *et al.*). Vier Untereinheiten bilden einen tetrameren I_{Kr} -Kanal. Jede Untereinheit enthält sechs Transmembranhelices (S1 bis S6). Der Teil von S5 bis S6 bildet die Pore und den Selektivitätsfilter des Kanals aus. Bei fast allen Kaliumkanälen findet sich im Selektivitätsfilter die Aminosäuresequenz TXGYGD. Die S4 Transmembranhelix enthält zahlreiche, regelmäßig angeordnete positiv geladene Aminosäuren, die einen essentiellen Teil des Spannungssensors darstellen (Lory *et al.*, 2005 a und b)).

Spannungsabhängige Kaliumkanäle können in drei unterschiedlichen Zuständen vorliegen. Im einfachsten Fall gilt:



Die unterschiedlichen Reaktionen lassen sich mit Hilfe eines allosterischen Gatingmodell beschreiben, in dem sowohl die geschlossenen Zustände C (*closed*) als auch der offene Zustand O (*open*) mit den inaktivierten Zuständen I (*inactivated*) verknüpft sind.

Viele spannungsabhängige Kaliumkanäle haben schnelle Aktivierungszeitkonstanten und relativ langsame Inaktivierungszeitkonstanten, so dass die spannungsabhängigen Kaliumkanäle auf Depolarisation mit großen Auswärtsströmen antworten (Hille, 2001). Die biophysikalischen Eigenschaften von HERG Kanälen unterscheiden sich allerdings davon deutlich. HERG Kanäle weisen nach Depolarisation eine schnellere Inaktivierung als Aktivierung auf, so dass aufgrund der sehr schnellen Inaktivierung der aktivierten Kanäle bei positiven Membranpotentialen nur

sehr kleine Gesamtströme registriert werden können. Die Erholung aus der Inaktivierung ist bei negativen Membranpotentialen sehr schnell und die Deaktivierung sehr langsam. Dadurch ist es möglich große HERG-Ströme als instantane Auswärtsströme zu messen (Smith *et al.*, 1997; Miller, 1997).

Die biophysikalischen Eigenschaften können gut erklären, warum eine Dysfunktion von HERG Kanälen, zu einer Prädisposition von Herzarrhythmien führt. Während der Phase 1 kommt es durch Depolarisation zur raschen Aktivierung und Inaktivierung der HERG Kanäle. In Phase 3 kommt es dann zu einer Erholung der HERG Kanäle aus der Inaktivierung. Wenn es in dieser Phase zu einer vorzeitigen Erregung (z.B. Extrasystole) kommt, dann können HERG Kanäle in dieser Phase mit Produktion sehr großer Auswärtsströme ein vorzeitiges Aktionspotentialfeuern verhindern. Ist die Funktion der HERG-Kanäle vermindert oder nicht vorhanden, dann kann es zu einer vorzeitigen und der Ausbreitung einer unkontrollierten Erregung kommen.

2.3 Sympathoadenerge Stimulation ist kritisch für die Auslösung von Arrhythmien beim LQT-Syndrom

2.3.1 Physiologie der sympathoadrenergen Regulation des Herzens

Kontraktilität (Inotropie), Herzfrequenz (Chronotropie), Überleitungsgeschwindigkeit im Atrioventrikularknoten (Dromotropie) und Relaxation (Lusitropie) des Herzens wird von Gegenspielern des autonomen Nervensystems reguliert – dem Sympathikus und dem Parasympathikus. Die sympathische Regulation am Herzen erfolgt vorwiegend über spezifische β_1 -adrenerge Rezeptoren (β -AR), welche durch die Ausschüttung der sympathischen Überträgerstoffe Adrenalin und Noradrenalin stimuliert werden. Die extrazelluläre Bindung von Noradrenalin führt zur Aktivierung von stimulierenden G-Proteinen (G_s), welche an intrazellulären Domänen des Rezeptors gebunden vorliegen. Die heterotrimeren G-Proteine bestehen aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit. $G\alpha$ dissoziieren bei Aktivierung ab und aktivieren die membrangebundene Adenylatzyklase (AC) zu aktivieren. Dies führt zur Erhöhung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), einem sekundären Botenstoff, der Proteinkinase A (PKA) stimuliert. In Kardiomyozyten phosphoryliert PKA unterschiedlichste Proteine – den L-Typ Kalziumkanal (Zhao *et al.*, 1994; Gerhardstein *et al.*, 1999), Phospholamban (Simmerman *et al.*, 1998), Troponin I (Sulakhe *et al.*, 1995), Ryanodinrezeptor (Marx *et al.*, 2000) und Myosin-Bindendes-Protein C (Kunst *et al.*, 2000) (Abbildung 2.3). Die Phosphorylierung dieser Proteine bewirkt in ventrikulären Myozyten eine erhöhte Freisetzung von Kalzium (positiv inotrop), aber auch eine beschleunigte Beseitigung von Kalzium nach Kontraktion (positiv lusitrop).

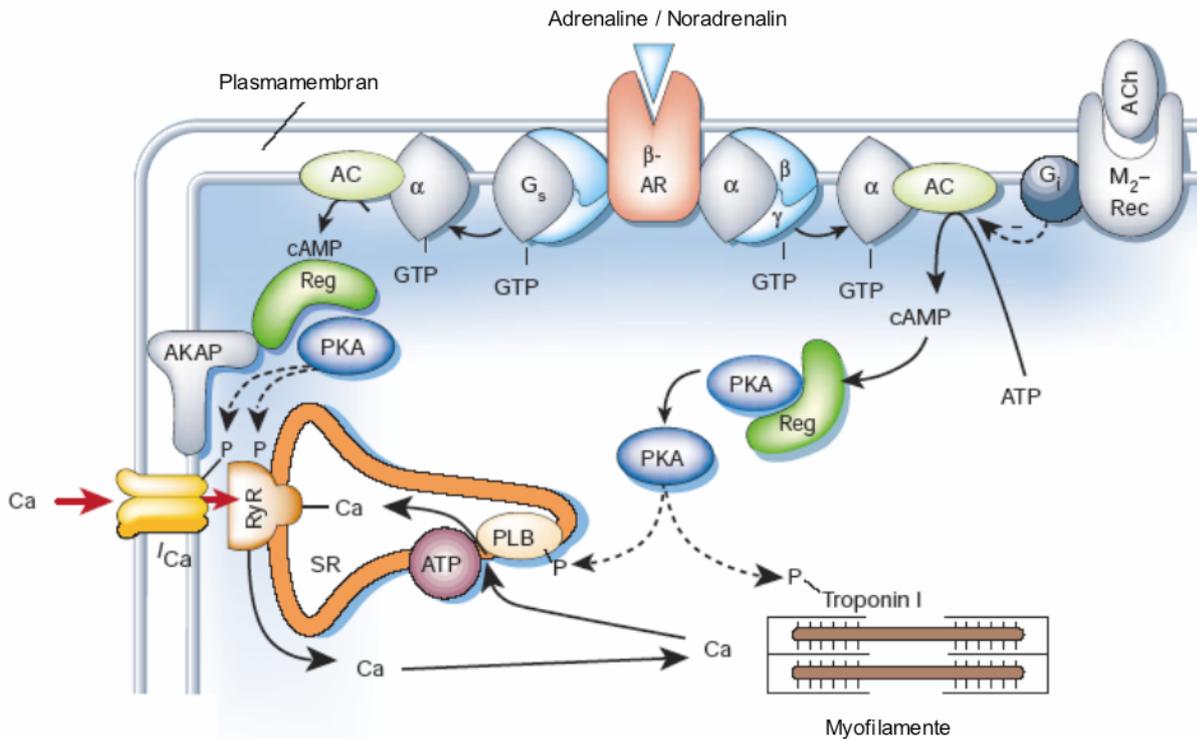


Abbildung 2.3

Die sympathoadrenerge Stimulation wird durch die Transmitter Adrenalin oder Noradrenalin vermittelt, welche den β -adrenergen Rezeptor (β -AR) aktivieren. Intrazellulär bewirkt die Rezeptoraktivierung die Bindung von Guanosin triphosphat (GTP) an das stimulierende, heterotrimere G-Protein (G_s), welches dadurch aktiviert wird und in die α -Untereinheit, sowie einen $\beta\gamma$ -Komplex zerfällt. Die freigesetzte α -Untereinheit stimuliert die Adenylatzyklase (AC), welche aus Adenosin triphosphat (ATP) zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) produziert. Durch Regulatorproteine (Reg) kommt es dann zu einer Aktivierung der membrangebundenen und zytosolischen Proteinkinase A (PKA). Die durch ein A-Kinase-Ankerprotein (AKAP) an die Membran gebundene PKA phosphoryliert den L-Typ Kalziumkanal, der für den spannungsabhängigen Kalziumstrom I_{Ca} verantwortlich ist, und den Ryanodinrezeptor (RyR). Dies führt zu einem erhöhten Einstrom von Kalzium (Ca) durch den L-Typ Kalziumkanal sowie zu einer verstärkten Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Die zytosolische PKA phosphoryliert Troponin I und Phospholamban (PLB). Phosphoryliertes Phospholamban führt zur Inhibition des hemmenden Einflusses auf die Ca^{2+} -ATPase, welche für den Rücktransport des zytosolischen Kalziums verantwortlich ist. Phosphoryliertes Troponin I setzt schneller Kalzium aus den Myofilamenten frei und bewirkt so eine beschleunigte Relaxation nach Kontraktion. (modifiziert nach Bers *et al.*, 2002)

Der positiv inotrope Effekt wird durch eine Stimulierung der L-Typ Kalziumkanäle erreicht, was zu einer Erhöhung des Kalziumeinstroms I_{Ca} führt (Reuter, 1967; Reuter & Scholz, 1977). Es kommt jedoch nicht nur zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels durch extrazelluläres Kalzium, sondern auch durch verstärkte Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) durch den phosphorylierten Ryanodinrezeptor (RyR).

Die Vermittlung des positiv lusitropen Effektes erfolgt durch eine beschleunigte Absenkung des Kalziumspiegels. Diese wird durch Dissoziation phosphorylierten Phospholamban (PLB) von der Kalziumpumpe (Ca^{2+} -ATPase) des ER bewirkt. Dies ermöglicht eine schnellere Absenkung des zytosolischen Kalziums und eine raschere Relaxation des Muskels.

2.3.2 Sympathoadrenerge Stimulation als Auslöser kardialer Attacken bei LQT-Syndrom

Sympathoadrenerge Stimulation führt zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration durch erhöhten Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum und aus dem ER. Damit verbunden ist eine Verkürzung des Aktionspotentials und ein beschleunigter Herzrhythmus. Bei Patienten mit LQT-Syndrom kann man jedoch eine Verkürzung des Aktionspotentials nicht beobachten. Es kommt es durch die sympathoadrenerge Stimulation zu frühzeitigen Nachdepolarisationen, welche als Substrat für Torsade de Pointes Tachyarrhythmien dienen und in der Folge zum plötzlichen Herztod führen können (Noda *et al.*, 2002).

Es scheinen sich jedoch einige Unterschiede zwischen den verschiedenen Genen, welche für das LQT-Syndrom verantwortlich sind, herauszukristallisieren. Bei LQT1 Patienten löst überwiegend körperliche Anstrengung – also eine langandauernde, sympathische Stimulation – kardiale Ereignisse aus, wohingegen bei LQT2 Patienten emotionaler Stress und Erschrecken, insbesondere durch akustische Stimuli – also plötzliche,

kurzandauernde, sympathische Stimulation – als Auslöser für Herzattacken dominieren (Schwartz *et al.*, 2001; Abbildung 2.4). Im Gegensatz zu Patienten mit Mutationen in Komponenten des repolarisierenden Kaliumstroms kommt es bei LQT3 Patienten mit Fehlfunktionen des spannungsabhängigen Natriumkanals vor allem während des Schlafes, bzw. körperlicher Ruhe zur Auslösung kardialer Arrhythmien (Schwartz *et al.*, 2001).

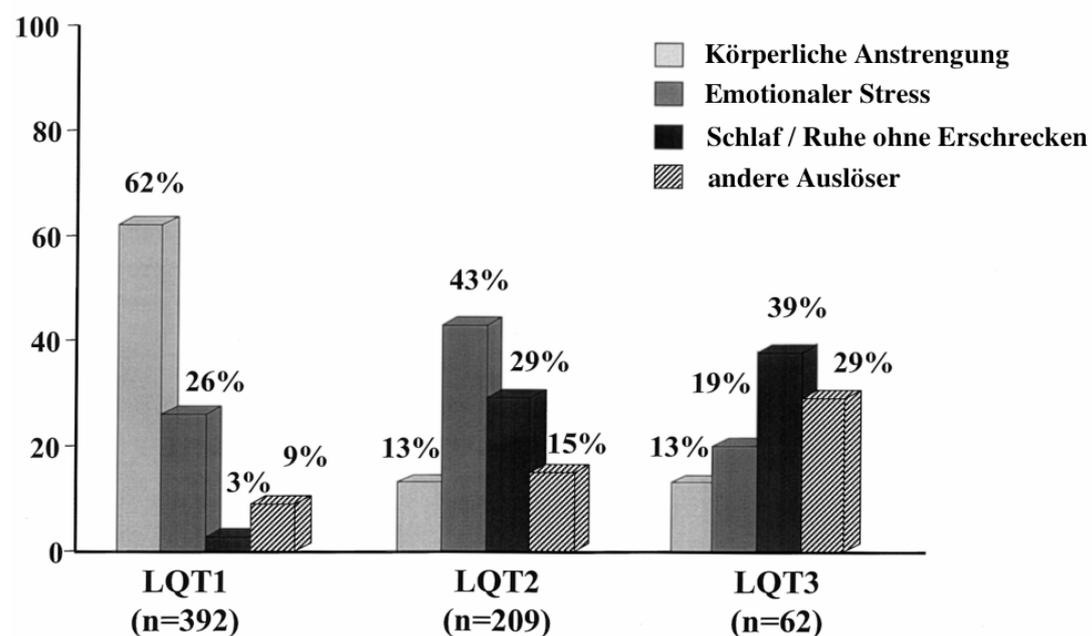


Abbildung 2.4

Als Auslöser für kardiale Ereignisse bei LQT1, LQT2 und LQT3 Patienten wurden körperliche Anstrengung, emotionaler Stress (Erschrecken, Angst, Wut, plötzlicher Lärm), Schlaf sowie sonstige Auslöser unterschieden. (modifiziert nach Schwartz *et al.*, 2001)

2.4 Fallvorstellungen

In Deutschland, Italien und Frankreich wurden in den Arbeitsgruppen von Dr. Eric Schulze-Bahr, Dr. Silvia Priori und Dr. Pascale Guicheney fünf nicht verwandte Familien mit einem vererbbaeren LQT2-Syndrom identifiziert. Mitglieder dieser Familien wiesen Mutationen im C-Terminus des KCNH2 Gens auf. Eine Beteiligung anderer Gene KV 7.1, HERG, SCN5A, MiRP und minK (also *LQT1-3* und *LQT5-6*) konnte durch teilweise Sequenzierung der Gene und/oder Segregationsanalyse ausgeschlossen werden. Eine Sequenzierung oder Segregationsanalyse des Ankyrin-B Gens, welches für LQT4 verantwortlich ist, wurde ausgeschlossen, da der seltene und sehr spezifische Phänotyp mit Verlängerung der QT-Zeit, Sinusbradykardie und Vorhofflimmern bei allen Patienten nicht zu finden war. Die vollständige Sequenzierung des *LQT2*-Gens bei den Angehörigen der Familien, brachte familienspezifische Mutationen zutage – G2893T (führt auf Ebene der Aminosäuresequenz zu G965X), 3036-3048del (R1014fsX38), 3107-3111dup (V1038fsX20), C2230T (R744X) und C2453T (S818A). Vier der Mutationen (G965X, R1014fsX38, V1038fsX20 und R744X) führen zu einer Verkürzung des Proteins. Eine Mutation (S818L) enthielt eine Missensemutation (Abbildung 2.5). Bei der Überprüfung einer größeren Stichprobe konnten diese Mutationen in der Normalbevölkerung nicht gefunden werden.

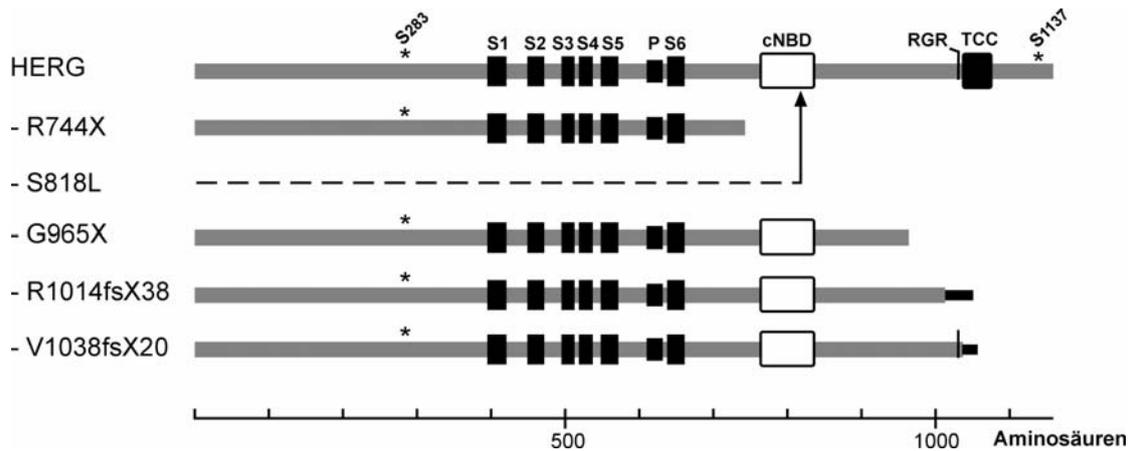


Abbildung 2.5

Die schematische Darstellung der Primärstruktur der unterschiedlichen HERG Mutanten und des HERG-Wildtyps (HERG) verdeutlicht die Verkürzungen des HERG-Proteins durch Mutationen R744X, G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20, sowie den Ort des Aminosäureaustausches in der Mutante S818L. Die sechs Transmembran-Domänen (S1-S6), die Porenschleife (P), die zyklische Nukleotid-Bindedomäne (cNBD), das C-terminale ER-Retentionssignal (RGR), die für die Tetramerisierung möglicherweise wichtige *Coiled Coil* Struktur (TCC), sowie die N-terminale und C-terminale PKA-Phosphorylierungsstellen (S283, S1137) sind entsprechend markiert und dargestellt. Graue Balken markieren Primärstrukturen, welche denen des HERG-Wildtyps gleichen, wohingegen durch Leserahmenverschiebungen veränderte Sequenzen durch einen dünneren, schwarzen Balken symbolisiert werden. Die gestrichelte Linie und der Pfeil markieren den Aminosäureaustausch der S818L Mutante.

2.4.1 Familie mit der LQT2-Mutation R1014fsX38

In einer großen deutschen Familie (n=36 verwandter Personen in fünf Generationen) konnte eine LQT2-Mutation mit Deletion der Nukleotide 3036-3038 in zwölf Individuen identifiziert werden. Die Mutation führt zu einer Verschiebung des Leserahmens ab der 1014. Aminosäure mit einer 38 Aminosäure langen Missense-Sequenz und kann nach internationaler Vereinbarung als R1014fsX38 beschrieben werden (Abbildung 2.5). Eine klinische Ausprägung des LQT2-Syndroms konnte in neun Trägern der Mutation gefunden werden. Im EKG war das auffälligste Merkmal der Mutationsträger R1014fsX38 eine eingekerbte oder zweiphasische T-Welle. Weitere drei Individuen waren asymptomatisch.

Die Indexpatientin ist eine 31-jährige Frau, die seit ihrem 16. Lebensjahr unter Synkopen, die durch Stress ausgelöst wurden und anfangs als „epileptische Anfälle“ fehldiagnostiziert wurden, litt. Mit 25 Jahren hatte sie einen Herzstillstand aufgrund eines Kammerflimmerns, das erfolgreich behandelt wurde. Eine verlängerte QT_c-Zeit (500 ms) und die Identifizierung der Mutation im LQT2-Gen führte zur Diagnose des LQT2-Syndroms.

Während der Familienanamnese stellte man fest, dass eine Tante einen Herzstillstand erlitten hatte. Weitere Familienmitglieder waren von Synkopen betroffen (n=11). Jedoch nur in neun dieser klinisch symptomatischen Fälle konnte eine Mutation in KCNH2 nachgewiesen werden. Bei zwei Individuen mit Synkopen fand sich keine Mutation im KCNH2-Gen. Die Synkopen wurden höchstwahrscheinlich durch eine orthostatische Dysregulation verursacht. Eine retrospektive Analyse aller Familienangehörigen wies die KCNH2-Mutation in zwölf Mitgliedern nach, wobei in allen Fällen die Mutation heterozygot vorlag. Eine verlängerte QT_c-Zeit (> 440 ms) und ausgeprägte Symptome des LQT-Syndroms wurde bei neun Familienmitgliedern beobachtet (Abbildung 2.6).

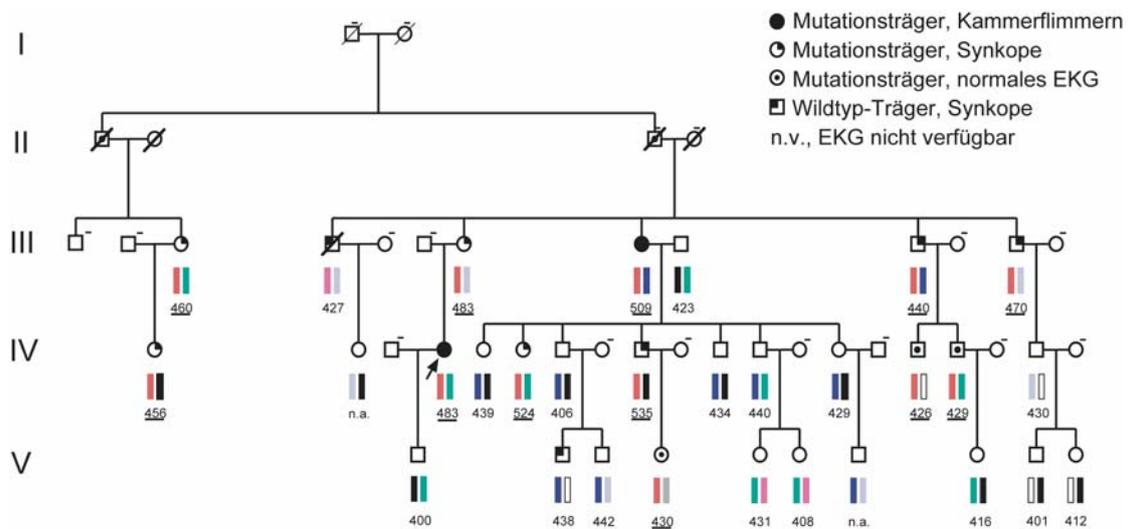


Abbildung 2.6

Der Stammbaum einer deutschen Familie (n=36, Generation I – V) mit einer LQT2-Mutation im C-Terminus von HERG (R1014fsX38) ist dargestellt. Rote Balken markieren heterozygote Träger der Mutation, während alle anderen Farben keinen Zusammenhang zur Mutation aufweisen. Männer sind mit Vierecken und Frauen mit Kreisen gekennzeichnet. Die Zahlen geben die korrigierte QT-Zeit (QT_c der EKG Ableitung II) in ms an und sind in Fällen von Mutationsträgern unterstrichen. In neun Familienmitgliedern mit verlängerter QT_c-Zeit (>440ms) wurde die mit der Krankheit assoziierte Mutation gefunden. Im Gegensatz zu den Personen mit QT_c-Zeiten im Schwellenbereich (430-440ms), litten die Betroffenen an Synkopen. In drei Personen mit normaler QT_c-Zeit wurde retrospektiv die Mutation im LQT2-Gen gefunden (VI-16: 426ms, IV-17: 429ms, V-4: 430ms). Die Mutation konnte zwar in 12 Individuen gefunden werden, aber nur neun Träger waren symptomatisch, d.h. die Penetranz war unvollständig (75%).

2.4.2 Familie mit der LQT2-Mutation V1038fsX20

Die LQT2-Mutation mit Duplikation der Nukleotide 3107-3111 (resultierend in V1038fsX20) konnte in vier von sieben Familienmitgliedern nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden weitere vier Verwandte mit dem LQT-Syndrom diagnostiziert, standen aber nicht für eine genetische Analyse zur Verfügung.

Der Proband – ein 25-jähriger Mann – hatte im Alter von 23 Jahren eine Synkope während körperlicher Belastung. Das Oberflächen-EKG zeigte eine T-Welle, die in der Ableitung V4 eine Kerbe aufwies oder in den Ableitungen V2-V3 zweiphasisch erschien. Die korrigierte QT_c-Zeit betrug 503ms in der Ableitung II. Der 52-jährige Vater des Probanden wies im EKG eine QT_c-Zeit von 480ms auf, war jedoch asymptomatisch.

2.4.3 Familie mit der LQT2-Mutation R744X

Die Punktmutation C2230T führt zu einem verkürzten HERG-Protein (R744X). Die Mutation konnte in einem 20-jährigen Mann nachgewiesen werden mit einer Vorgeschichte von bereits drei synkopalen Episoden, die mit akutem emotionalem Stress assoziiert waren. Die letzte Synkope hatte er im Alter von 13 Jahren trotz Therapie mit β -Blockern (Metoprolol 1mg/kg/Tag). Keine weiteren Familienangehörigen litten unter Synkopen, bzw. waren an plötzlichem Herztod gestorben. Bei seiner letzten Untersuchung im November 2001 berichtete der Proband von keinen weiteren Synkopen. Das QT_c-Intervall betrug 490ms (Ableitung II) mit einer eingekerbten T-Welle in den Ableitungen V2-V4. Weiterhin konnte die Mutation R744X auch in dem 44 Jahre alten Vater des Probanden identifiziert werden, der eine QT_c-Zeit von 465ms aufwies, aber asymptomatisch war.

2.4.4 Familie mit der LQT2-Mutation S818L

Eine 27-jährige Frau hatte im Alter von 25 Jahren ihre erste Synkope mit dokumentierter Torsade de Pointes Tachyarrhythmie und wurde im Anschluss an den Vorfall mit Nadolol und einem Herzschrittmacher behandelt. Die genetische Analyse der Familie ergab, dass es sich um eine *de novo* Mutation handelte. Die Mutation wurde jedoch an ihre 2-jährige Tochter weitergegeben, welche ein QT_c-Intervall von 472ms aufwies.

Die Beschreibung der nur unvollständig charakterisierten Punktmutation S818L und die erste Präsentation der klinischen Daten wurde bereits in früheren Arbeiten veröffentlicht (Berthet *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2000).

2.4.5 Familie mit der LQT2-Mutation G965X

Eine 28-jährige Frau, welche unter Synkopen litt, wies die Punktmutation G2893T (Aminosäuresequenz G965X) auf. Ihre erste dokumentierte Synkope trat im Alter von 25 Jahren auf. Im Anschluss hatte sie weitere synkopale Episoden, welche zumeist durch akustische Stimuli (Wecker, Telefonklingeln) ausgelöst wurden. Im Alter von 27 Jahren hatte sie eine im Laufe der neurologischen Untersuchung dokumentierte polymorphe ventrikuläre Tachyarrhythmie. Im Folgenden wies das EKG eine verlängerte QT-Zeit (498ms) auf, worauf die Diagnose des LQT-Syndroms gestellt wurde. Durch die anschließende Behandlung mit Nadolol (1 mg/kg/Tag) konnten weitere Episoden seit drei Jahren verhindert werden. Keine weiteren Familienangehörigen litten unter Synkopen oder waren an plötzlichem Herzstillstand verstorben. Die genetische Analyse zeigte, dass die Mutation vom asymptotischen Vater weitergegeben worden war. Weitere Familienangehörige standen für eine genetische Analyse nicht zur Verfügung.

3 Material und Methoden

Falls nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien von den Firmen Baker, Difco, Fluka, GibcoBRL, Macherey-Nagel, Merck, Riedel-de-Haen, Roth, Serva und Sigma-Aldrich in Reinstqualität bezogen.

Enzyme, Molekulargewichtstandards und Nukleosidtriphosphate wurden von den Firmen Boehringer Mannheim, Clontech, Invitrogen, New England Biolabs, Novagen, MBI Fermentas, Pharmacia Biotech, Promega, Qiagen, Stratagene und USB erworben.

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech erworben.

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Lösungen und Vektoren

3.1.1.1 Lösungen

AP-Puffer	50	mM	Tris-HCl, pH 8,5
	100	mM	EDTA
Ampicillin-Lösung	0.1	g/ml	Ampicillin in H ₂ O
DNA-Probenpuffer (5x)	20	% (w/v)	Ficoll
	100	mM	EDTA
	0,025	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,025	% (w/v)	Xylenyanol
dNTP-Stammlösung	20	mM	pro dATP, dCTP, dGTP und dTTP
Ethidiumbromid-Lösung	10	mg/ml	Ethidiumbromid
LB-Medium	10	g/l	Bacto-Trypton, pH 7,4
	10	g/l	NaCl
	5	g/l	Hefeextrakt
LB/Amp-Medium	100	mg/l	Ampicillin in LB-Medium
LB/Amp-Platten	20	g/l	Agar in LB-Medium
	100	mg/l	Ampicillin
LB/Amp/Kana-Medium	20	g/l	Agar in LB-Medium
	100	mg/l	Ampicillin

	25	mg/l	Kanamycin
Ligationspuffer (10x)	200	mM	Tris-HCl, pH 7,9
	100	mM	MgCl ₂
	100	mM	Dithiothreitol (DTT)
	6	mM	ATP
Lyse-Puffer	10	mM	Tris-HCl, pH 7,9
	140	mM	NaCl
	1	%	Triton X-100
taq-Polymerase-Puffer (5x)	100	mM	TrisHCl pH 8.4
	250	mM	KCl
	1.3	mM	MgCl
PCR-Puffer (10x)	200	mM	Tris-HCl, pH 8,8
	20	mM	MgSO ₄
	100	mM	KCl
	100	mM	(NH ₄)SO ₄
	1	% (v/v)	Triton X-100
	1	mg/ml	BSA, Nuklease-frei
T4-Polymerase-Puffer (5x)	165	mM	Tris-Acetat, pH 7,9
	330	mM	Natriumacetat
	50	mM	Magnesiumacetat
	0,5	mg/ml	BSA
	2,5	mM	DTT
TAE-Puffer	40	mM	Tris-Acetat, pH 8.0
	2	mM	EDTA
TB-Puffer	3	g/l	PIPES
	15	mM	CaCl ₂
	250	M	KCl

	10,88 g/l	MgCl ₂ , steril filtriert
TE (10x)	0,1 M	Tris-HCl, pH 7,5
	10 mM	EDTA

3.1.1.2 Vektoren

pcDNA3.1	Expressionsvektor für heterologe Expression in Gewebekulturzellen (Invitrogen, Karlsruhe)
pTre-Tight	Expressionsvektor für heterologe Expression in Gewebekulturzellen (Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA)
pTet-Off	Expressionsvektor mit Regulatoreinheit zur Doxyzyklin-kontrollierten Suppression der cDNA Transkription (Gossen und Bujard, 1992)
pBud-CE4.1	bicistronischer Expressionsvektor für heterologe Expression in Gewebekulturzellen (Invitrogen, Karlsruhe)

3.1.2 Enzymatische Modifikation von DNA

3.1.2.1 Restriktionsverdau von DNA

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die gewünschte Menge an DNA wurde mit der erforderlichen Menge an Restriktionsenzym für etwa 2 Stunden unter für das Enzym optimalen Bedingungen (Puffer, Temperatur) inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde entweder durch Hitzeinaktivierung (75 °C, 10 min) oder durch Zugabe von DNA-Probenpuffer mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung gestoppt.

Wurde gleichzeitig mit mehreren Enzymen verdaut, dann wurden die dafür veränderten Enzymmengen und Reaktionsbedingungen nach Herstellerangaben verwendet. Bei sequentieller Verdauung wurde zwischen den Restriktionen der DNA-haltige Restriktionsansatz auf einem Mikrodialysefilter pipettiert und für etwa 20-30 Minuten gegen H₂O dialysiert.

3.1.2.2 Auffüllreaktion nicht-kompatibler, überhängender 5'-Enden

(Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Auffüllung von überhängenden, nicht-kompatiblen 5'-Enden von DNA-Fragmenten wurden diese 20 min bei 11 °C mit dNTPs in T4-Polymerase-Puffer inkubiert. Pro µg aufzufüllender DNA wurde 1 U T4-DNA-Polymerase eingesetzt.

3.1.2.3 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

(Sambrook *et al.*, 1989)

Für die Phosphorylierung wurden die DNA-Fragmente für 30 min bei 37 °C in T4-PNK-Puffer mit der T4-Polynukleotidkinase inkubiert. Es wurden dabei pro 50 pmol 5'-Enden 1 U der T4-Polynukleotidkinase eingesetzt.

3.1.2.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die Dephosphorylierung der DNA wurde mit alkalischer Phosphatase in AP-Puffer 1h bei 37 °C inkubiert. Pro pmol der 5'-Enden DNA wurde 1 U der alkalischen Phosphatase eingesetzt.

3.1.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

(Sambrook *et al.*, 1989)

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die Vektor-DNA mit einem dreifachen molaren Überschuß an Fragment-DNA in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl in Ligationspuffer mit 1 µl T4-DNA-Ligase bei Raumtemperatur für etwa 2 h inkubiert.

3.1.3 Auftrennung und Aufreinigung von DNA

3.1.3.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten (Ansätze mit DNA-Probenpuffer versetzt) erfolgte je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente in horizontalen Agarosegelen (1-2 % (w/v) in TAE-Puffer) unter Verwendung von GNA-100 Elektrophoresekammern (Pharmacia Biotech). Als Laufpuffer diente TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid als Nachweisreagenz. Die angelegte Spannung variierte zwischen 70 und 100 V, die Trenndauer betrug 30-90 min.

3.1.3.2 Aufreinigung der DNA

Unter UV-Licht wurde das DNA-haltige Gelstück ausgeschnitten und mit dem GFX Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufbereitet.

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988)

3.1.4.1 Standard PCR

Für die Vervielfältigung von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μ l in folgendem Ansatz durchgeführt:

Plasmid-DNA (Matrize)	10-50	ng
Oligonukleotid 1	50	μ g
Oligonukleotid 2	50	μ g
dNTPs	0.2	mM
PCR-Puffer (10x)	5	μ l
TurboPfu-Polymerase	1.25	U
MgSO ₄	1.5	mM

Es wurde ein TriBlock (Biometra, Göttingen) mit folgendem Programm verwendet:

Denaturierung	95 °C	5 min	
<hr/>			
Denaturierung	95 °C	30 s	
Hybridisierung	57 °C	30 s	30 Zyklen
Synthese	72 °C	60 s	
<hr/>			
Synthese	72 °C	5 min	
<hr/>			
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	

Das PCR-Produkt wurde durch Gelelektrophorese und Sequenzierung analysiert.

3.1.4.2 In vitro-Mutagenese

Das Anhängen einer DNA-Sequenz an ein Konstrukt wurde mit Hilfe der in vitro-Mutagenese erreicht. Dafür wurde eine PCR mit zwei Oligonukleotiden durchgeführt, wobei eines komplementär zu einer N-terminalen Sequenz von HERG (etwa 350 bp stromaufwärts) war und das andere Oligonukleotid nicht nur die zu inserierende Sequenz enthielt, sondern auch komplementär zum N-Terminus des Konstruktes war. Durch die PCR entstand ein neues Oligonukleotid, in welchem die gewünschte Sequenz mit dem N-Terminus des Konstruktes fusioniert vorlag. Die entsprechende PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung	95 °C	1 min	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	1 min	
Hybridisierung	60 °C	1 min	26 Zyklen
Synthese	72 °C	1 min	
Synthese	72 °C	10 min	1 Zyklus
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	

Nach gelelektrophoretischer Analyse konnte das PCR-Produkt, welches eine Fusion der gewünschten Sequenz mit dem N-Terminus des Konstruktes darstellte, durch passende Restriktionsschnittstellen an den N-Terminus des Konstruktes angeheftet werden.

3.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die Ausbeute und Reinheit präparierter DNA wurde durch photometrische Messung bei 260 nm bestimmt. Dazu wurden die Lösungen verdünnt und gegen H₂O als Leerwert gemessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht 1 OD₂₆₀ (optische Dichte bei 260 nm) einer Konzentration von 50 µg/ml. Das Verhältnis der Extinktionen E_{260}/E_{280} diente dabei der Güteabschätzung der Präparation.

3.1.6 Transformation kompetenter Bakterien

(Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Transformation wurden 100 µl einer Suspension kompetenter Bakterien des *E.coli*-Stammes *XL1-Blue* mit Plasmid-DNA (20-50 ng) oder einem Ligationsansatz 20min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock (90 s, 42 °C) und Abkühlen auf Eis (5 min) wurden die Bakterienzellen auf LB/Amp-Platten, bzw. auf LB/Amp/Kana-Platten ausplattiert und anschließend über Nacht bei 37 °C kultiviert.

3.1.7 Präparation von DNA

3.1.7.1 Präparation von Plasmid-DNA aus 2ml-Kulturen (Miniprep)

(Birnboim und Doly, 1979)

Für die Vermehrung des plasmidtragenden Bakterienstammes wurde eine Einzelkolonie in 2 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37 °C im Warmluftschüttler bei 180 Upm inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des GFX Mikro Plasmid Kits (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Gemäß Protokoll wurde die Flüssigzellkultur pelletiert (3000 x g, RT, 2 min) und das Bakteriensediment in 300 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Lösung II wurde vorsichtig durchmischt und 3 min bei RT inkubiert, bis die Lyse der Bakterien durch Klarwerden der Lösung angezeigt wurde. Anschließend wurden 600 µl Lösung III zugegeben und auf dem Vortex durchmischt. Im Anschluss wurde 5 min bei RT zentrifugiert (15000 x g), die wässrige Phase wurde abgenommen und auf vorbereitete GFX Säulen pipettiert. Nach Inkubation für 1min bei RT wurden die Säulen samt Überstand zentrifugiert (15000 x g, RT, 30 s). Der Durchfluss wurde verworfen, 400 µl Waschpuffer wurden auf die Säule gegeben und anschließend zentrifugiert (15000 x g, RT, 60 s). Die GFX Säulen wurden in frische Reaktionsgefäße gegeben und anschließend nach 1 min Inkubation bei RT in 20 µl TE-Puffer aufgenommen (15000 x g, RT, 1 min).

3.1.7.2 Präparation von Plasmid-DNA aus 50ml-Kulturen (Midiprep)

(Macherey-Nagel1 Nucleobond AX *handbook*, 1997)

Die Präparation wurde mit dem Nucleobond AX Kit (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Gemäß Protokoll wurden 50 ml LB/Amp-Medium mit einer Einzelkolonie plasmidtragender kompetenter Zellen von einer LB/Amp-Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Warmluftschüttler bei 180 Upm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde zentrifugiert (8000 x g, 4 °C, 10 min) und

das Pellet in 4 ml Puffer S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer S2 wurde vorsichtig durch 6-8maliges Invertieren gemischt und die Suspension für 5min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde mit 4 ml Puffer S3 versetzt, vorsichtig durchmischt und 5 min auf Eis stengelassen. Die ausgefällten Proteine wurden anschließend pelletiert ($11000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, mind. 25 min) und der die Plasmide enthaltende Überstand über Filterpapier auf eine zuvor mit 2 ml Puffer N2 äquilibrierte Säule Nucleobond AX 100 gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 4ml Puffer N3 gewaschen und danach die an die Säule gebundenen Plasmide mit 5 ml Puffer N5 eluiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 3.6 ml Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation ($15000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min) wurde das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeute an DNA wurde photometrisch bestimmt und die Konzentration zu $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Die Qualität der präparierten DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese verifiziert.

3.1.8 Sequenzierung von DNA

(Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Kits und des ABI 377 DNA Sequenziergeräts (Applied Biosystems). Die Probenaufbereitung und die Beschickung des Geräts wurde von den Mitarbeitern der Servicegruppe "Sequenzierung" am ZMNH durchgeführt.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkulturmedien

CHO-Nährmedium (Gibco, Karlsruhe)	MEM Alpha Medium (mit Nukleotiden, L-Glutamin) supplementiert mit 10 % (v/v) fötales Kälberserum 50 U/ml Penicillin/Streptomycin 4 mM L-Glutamin
COS7-Nährmedium (Gibco, Karlsruhe)	Dulbeccos MEM/MNT Mix F12 (mit Pyridoxin) supplementiert mit 10 % (v/v) fötales Kälberserum 50 U/ml Penicillin/Streptomycin 4 mM L-Glutamin
OPTI-MEM I (Gibco, Karlsruhe)	Serumreduziertes Medium, flüssig (supplementiert mit L-Glutamin, HEPES, Na ₂ CO ₃ , Natriumpyruvat, Hypoxanthin, Thymidin, Spurenelementen, Wachstumsfaktoren, Phenolrot)
PBS (Gibco, Karlsruhe)	Dulbeccos PBS, flüssig (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Na ₂ CO ₃)
Trypsin (Gibco, Karlsruhe)	0.25 % Trypsin in 1 mM EDTA, flüssig

3.2.2 Kultivierung von CHO- und COS7-Zellen

(Lindl und Bauer, 1989)

Die CHO-Zellen wurden in supplementierten CHO Medium unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 95 % O₂, 90 % relative Luftfeuchtigkeit) in 50 ml Zellkulturflaschen kultiviert. Nach jeweils 3-4 Tagen wurden bei Konfluenz des Zellrasens die Zellen nach Abnahme des Mediums und zweimaligem Waschen in PBS mit Trypsin inkubiert bis eine Ablösung und Abrundung der Zellen zu beobachten war (etwa 2-4 min). Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von frischem CHO-Nährmedium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen durch Trituration vom Zellkulturgefäß gelöst und vereinzelt. In eine Zellkulturflasche mit 20ml Medium wurde 1 ml der triturierten Zellsuspension für die Weiterkultivierung gegeben. Nach Zählung der Zellen der verbleibenden Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer wurden die CHO-Zellen zu einer Dichte von 10⁵ Zellen/ml Medium in Gegenwart von CHO-Medium in Kulturschalen (Ø 35 mm) ausgesät und bis zur weiteren Verwendung unter Standardbedingungen kultiviert.

Die COS7-Zellen wurden auf die gleiche Weise in supplementierten COS7-Medium kultiviert.

3.2.3 Transfektion von CHO- und COS7-Zellen

(Hawley-Nelson *et al.*, 1993)

Die in Kulturschalen (\varnothing 35 mm) ausgesäten Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 50-80 % (etwa 18-24 h) unter Standardbedingungen kultiviert. Für jede Transfektion wurden etwa 2 μ g DNA in 100 μ l OPTI-MEM (Gibco, Karlsruhe) verdünnt. Für jeden DNA-Ansatz wurden 3.5 μ l Lipofectamin (Gibco, Karlsruhe) in 100 μ l OPTI-MEM gegeben. Diese Lipofectamin-Ansätze wurden zu den DNA-Ansätzen gegeben und vorsichtig gemischt. Die so gemischten Ansätze wurden dann bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach Inkubation wurde jedem DNA-Lipofectamin Gemisch 0.8 ml OPTI-MEM zugesetzt und nach Mischen auf die zuvor mit OPTI-MEM gewaschenen Zellen gegeben. Nach Inkubation unter Standardbedingungen für 4-6 h wurde der Transfektionsansatz wieder abgenommen und gegen 2 ml Nährmedium ausgetauscht. Bis zur Verwendung der Zellen für elektrophysiologische oder fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde unter Standardbedingungen oder unter modifizierten Standardbedingungen (20 °C, 5 % CO₂, 95 % O₂, 90 % relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert.

3.3 Immunzytochemische Methoden

3.3.1 Lösungen und Antikörper

Sämtliche Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Fixierlösung (in ddH ₂ O)	2 % Formaldehyd in Wasser
Phosphate Buffer Saline (PBS) (Gibco, Karlsruhe)	Dulbeccos PBS, flüssig (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Na ₂ CO ₃)
Permeabilisierungslösung (in PBS)	0,3 % Triton X-100
Blockierungslösung (in PBS)	5 % Rinderserumalbumin 3 % Pferdeserum
Maus anti-CD4 Antikörper (in PBS mit 3 % Pferdeserum) (Zymed, San Francisco, USA)	1:200 verdünnt in PBS
Kaninchen anti-HA Antikörper (in PBS mit 3 % Pferdeserum) (Eurogentec, Liege, Belgien)	1:200 verdünnt in PBS
anti-Kaninchen AlexaFluor546 Antikörper (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)	1:2000 verdünnt in PBS
anti-Maus AlexaFluor488 Antikörper (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)	1:2000 verdünnt in PBS

3.3.2 Präparation der Zellen

COS-7 Zellen wurden auf sterilen Glassplättchen in 35 mm Schälchen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Schälchen ausplattiert. Etwa 24 h nach Transfektion wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen wurden in 2 % Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden sie dreimal für 5 min bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen und für 10 min bei Raumtemperatur mit Permeabilisierungslösung inkubiert. Daraufhin wurde für mindestens 1 h bei Raumtemperatur mit Blocklösung inkubiert, bevor die Verdünnungen von anti-CD4 und anti-HA Antikörper auf die Zellen gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttelinkubator inkubiert wurde. Dann wurde die Antikörperlösung abgenommen und zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit den Verdünnungen der anti- Kaninchen AlexaFluor546 und anti-Maus AlexaFluor488 Antikörper auf dem Schüttelinkubator inkubiert.

Nachdem im Anschluss dreimal für 5 min mit PBS gewaschen wurde, fixierte man die Glasplättchen mit Hilfe von 10 μ l Permafluor (Thermo Electron Cooperation) auf Objektträger.

3.3.3 Mikroskopische Analyse

Die präparierten Zellen wurden anschließend mit Hilfe des Laser-Konfokalen-Mikroskops Leica NTSC im sequentiellen Scanmodus untersucht (Leica, Bensheim, Deutschland).

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 *Western Blot*-Analyse

3.4.1.1 Lösungen und Antikörper

Antikörperlösung	1 % Milchpulver in PBS 0.05 % Tween-20
Blockpuffer	5 % Milchpulver in PBS 0.05 % Tween-20
Blotpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 10 % Methanol 0.01 % SDS
Detektionslösung I	2.5 mM 3-Aminophthalhydrazid 0.4 mM p-Kumarsäure in DMSO 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5)
Detektionslösung II	0,02 % H ₂ O ₂ 0,1 M Tris-HCl (pH 8.5)
Phosphatpuffer <i>Phosphate Buffer Saline</i> (PBS) (Gibco, Karlsruhe)	Dulbeccos PBS, flüssig (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Na ₂ CO ₃)
Lyse-Puffer	50 mM HEPES (pH 7.4) 150 mM NaCl 0.5 % Triton X-100 2.5 µl Proteinase-Inhibitor (Sigma)

Waschlösung	0.05 % Tween-20 in PBS
Protran Nitrocellulose Membran (Schleicher und Schüll, Dassel)	
NuPage™ 8-12%ige Auftrennungsgel (Invitrogen)	
anti-HA Ratte Antikörper (3F10, Roche)	1:500 verdünnt in Antikörperlösung
anti-EGFP Maus Antikörper (Roche)	1:500 verdünnt in Antikörperlösung
anti-14-3-3 ϵ Hase Antikörper (Upstate, Waltham, MA, USA)	1:500 verdünnt in Antikörperlösung
anti-HERG Hase Antikörper (Santa Cruz)	1:500 verdünnt in Antikörperlösung
Peroxidase-gekoppelte Ziege anti-Ratte IgG (H + L) (Dianova, Hamburg)	1:5000 verdünnt in Antikörperlösung
Peroxidase-gekoppelte Ziege anti-Maus IgG (H + L) (Dianova, Hamburg)	1:10000 verdünnt in Antikörperlösung
Peroxidase-gekoppelte anti-Hase IgG (H + L) (Vector, Burlingame, CA, USA)	1:5000 verdünnt in Antikörperlösung

3.4.1.2 Durchführung der *Western Blot*-Analyse

(Towbin *et al.*, 1997; Ausubel, 1996)

CHO-Zellen wurden 24 h nach Transfektion zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, für 1.5 h in 250 μ l Lyse-Puffer und anschließend für 10 min mit 10000 g zentrifugiert. Der Überstand (etwa 5 – 15 μ l) wurde unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE unter Verwendung von 8-12 % NuPage™ Gelen aufgetrennt. Daraufhin wurden die Proteine auf Protran Nitrocellulose Membrane übertragen und für 1 h mit Blockpuffer geblockt.

Anschließend wurden die geblockten Membrane für 1 h bei Raumtemperatur mit anti-HA, anti-EGFP oder anti-14-3-3 ϵ Antikörpern inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit Waschlösung wurden die Membrane mit den entsprechenden sekundären Antikörpern inkubiert – also mit Peroxidase-gekoppelten Ziege anti-Ratte IgG, mit Peroxidase-gekoppelten Ziege anti-Maus IgG und mit Peroxidase-gekoppelten anti-Hase IgG.

Die Antikörperreaktion wurde durch die bei der Substratumsetzung durch die Peroxidase entstehende Chemolumineszenz nachgewiesen. Die Membran wurde 1 min bei RT mit Detektionsreagenz inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und restliche Flüssigkeit durch kurzes Pressen zwischen Filterpapieren beseitigt. Anschließend wurde nach luftblasenfreiem Bedecken mit Klarsichtfolie die Membran einem Röntgenfilm exponiert.

3.4.2 Immunpräzipitation

3.4.2.1 Lösungen und Antikörper

IP-Beschichtungspuffer 10 mM Tris-HCl (pH 7.9)
 140 mM NaCl
 1 % Triton X-100
 1 % Rinderhämoglobin

IP-Reaktionspuffer 10 mM Tris-HCl (pH 7.9)
 140 mM NaCl
 1 % Triton X-100
 0,1% Rinderhämoglobin

IP-Waschpuffer 10 mM Tris-HCl (pH 7.9)
 2 M NaCl
 1 % Triton X-100
 0,1 % Rinderhämoglobin

NuPage™ Probenpuffer
(Invitrogen)

anti-flag Epitop Maus Antikörper 1:500 verdünnt in Antikörperlösung
(Rockland, Gilbertsville, PA, USA)

anti-14-3-3 ϵ Hase Antikörper 1:500 verdünnt in Antikörperlösung
(Upstate, Dundee, UK)

Weiterhin wurden die Lösungen und Antikörper verwendet, welche für die *Western Blot*-Analyse benutzt wurden.

3.4.2.2 Durchführung der Immunpräzipitation

(Anderson und Blobel, 1979; Ausubel, 1996)

Vor Durchführung der Koimmunpräzipitation wurde mit Hilfe der Western Blot-Analyse die Menge an 14-3-3 oder EGFP bestimmt um die Expression der HERG Proteine zu normalisieren.

Für die Immunpräzipitation wurden 80 -100 μ l Lysat von transfizierten CHO-Zellen mit 10 μ l anti-14-3-3 Antikörper oder 5 μ l anti-flag Epitop versetzt und anschließend mit Lysepuffer auf ein Gesamtvolumen von 110 μ l aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C unter kontinuierlicher Rotation. Am nächsten Tag wurden die Lysate für 20 h mit equilibrierten Protein G-Kugeln (DynaI, Hamburg) inkubiert. Die Antigen/Antikörper Komplexe wurden gemäß Protokoll des Herstellers präzipitiert. Die Präzipitate wurden zweimal gewaschen mit Lysepuffer gewaschen und anschließend für 10 min bei 70 °C in reduzierendem NuPage™ Probenpuffer inkubiert.

Die Auftrennung mit Hilfe der SDS- Polyacrylamidelektrophorese, der elektrophoretische Transfer auf Nitrocellulosemembran und die Markierung mit anti-HA Antikörpern und die Immunodetektion der Antikörper durch Chemilumineszenz erfolgte durch *Western Blot*-Analyse (siehe „Durchführung der *Western Blot*-Analyse“ in Abschnitt 2.4.1.2).

3.5 Elektrophysiologische Methoden

3.5.1 Lösungen

3.5.1.1 Extrazelluläre Lösungen

Ringerlösung	135	mM	NaCl
	5	mM	KCl
	2	mM	CaCl ₂
	10	mM	Glukose
	20	mM	Sukrose
	5	mM	HEPES
	pH 7.4 mit		NaOH

Modifizierte Ringerlösung	150	mM	NaCl
	1.8	mM	CaCl ₂
	4	mM	KCl
	1	mM	MgCl ₂
	5	mM	Glukose
	10	mM	HEPES
	pH 7.4 mit		NaOH

3.5.1.2 Intrazelluläre Lösungen

Intrazellulärlösung I	140	mM	KCl
	2	mM	MgCl ₂
	10	mM	EGTA
	10	mM	HEPES
	pH 7.3 mit		KOH

Intrazellulärlösung II	126	mM	KCl
	4	mM	Mg-ATP
	2	mM	Mg ₂ SO ₄
	5	mM	EGTA
	0.5	mM	CaCl ₂
	25	mM	HEPES
	pH 7.2 mit		KOH

3.5.2 Der Messtand

3.5.2.1 Isolierung des Messtandes

Für die Messungen wurden die Kulturschalen auf einem beweglichen Objektisch eines Mikroskops fixiert, welcher auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut war, um Erschütterungen während der Messung zu vermeiden. Weiterhin war der Messtand von einem geerdeten Metallkäfig umgeben, der als Faradaykäfig fungierte.

3.5.2.2 Mikroskop

Zur optischen Kontrolle des experimentellen Ablaufs und zur Identifizierung transfizierter Zellen diente ein invertiertes Mikroskop (Axiovert, Zeiss), welches eine bis zu 400fache Gesamtvergrößerung ermöglichte. Zur besseren Kontrastierung wurde ein Phasenkontrast benutzt. Durch die Verwendung einer UV-Lichtquelle (HBO-UV-Halogenlampe, Zeiss) konnten eGFP-exprimierende Zellen identifiziert werden. Dies diente als Nachweis für die erfolgreiche Plasmidaufnahme und Proteinexpression der zu untersuchenden Zellen.

3.5.2.3 Perfusion

Die extrazelluläre Badlösung wurde durch ein schwerkraftgetriebenes Perfusionssystem und eine durch Druckluft betriebene Absaugvorrichtung kontinuierlich ausgetauscht.

3.5.2.4 Patchpipetten und Elektroden

Die Patchpipetten wurden aus dünnwandigem Borosilikatglas hergestellt (TW150F-4, World Precision Instruments). Die Glasröhrchen wurden in drei Schritten mit Hilfe eines horizontalen Elektrodenziehgeräts (DMZ-Puller, Zeitz Instrumente) hergestellt, wobei der letzte Schritt maßgeblich den

Öffnungsdurchmesser bestimmt. Der Durchmesser der Spitzenöffnung betrug etwa $1\ \mu\text{m}$ und hatte in den verwendeten Standardlösungen einen Widerstand von 1.5 bis $3\ \text{M}\Omega$.

Die Pipetten wurden direkt am Vorverstärker befestigt und konnten durch einen motorisierten Mikromanipulator (Patchman, Eppendorf) gesteuert werden. Bei der Elektrode handelte es sich um einen mit AgCl überzogenen Silberdraht, welche in die Intrazellulärlösung der Pipette eintauchte. Die Chlorierung wurde durch ein Reaktion mit Natriumhypochlorid durchgeführt. Als extrazelluläre Badelektrode wurde ein Silberdraht mit einem AgCl-Pellet verwendet.

3.5.3 Die Datenerfassung

3.5.3.1 Verstärker

Für die Datenerfassung wurde ein EPC9 Patch-Clamp-Verstärker (HEKA, Lambrecht) verwendet. Dieser Verstärker besteht aus einem Vorverstärker und einem Hauptverstärker, wobei die gemessenen Signale vom Vorverstärker an den Hauptverstärker weitergegeben werden. Die Hauptelemente des Vorverstärkers sind der Operationsverstärker (OA) und dem Rückkopplungswiderstand (R_f).

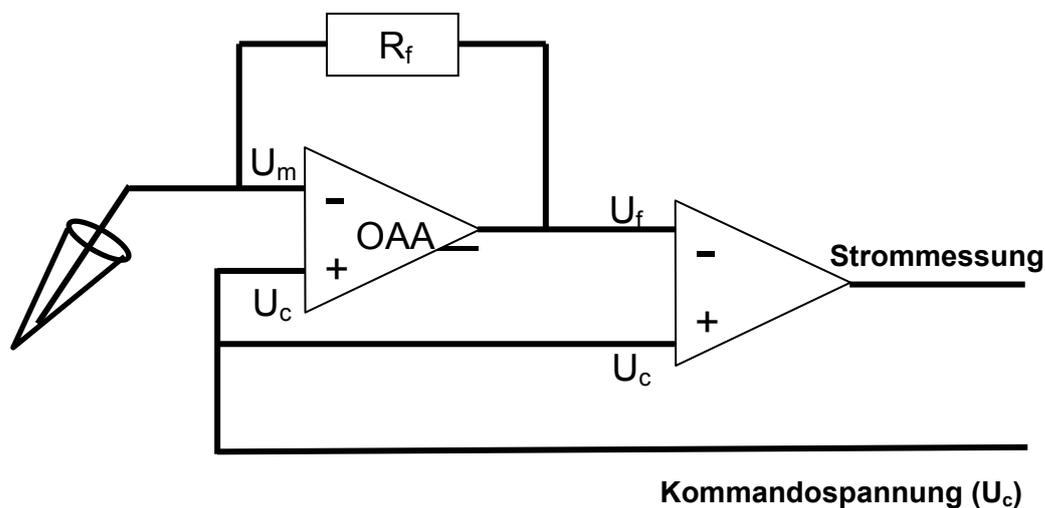


Abbildung 2.1

Die Hauptelemente des Vorverstärkers sind der Operationsverstärker (OA) und der Rückkopplungswiderstand (R_f). An den Eingängen des OA liegen jeweils die Membranspannung (U_m) von der Ableitelektrode sowie die Kommandospannung (U_c) an. An dem Ausgang des OA wird die Differenz von Membranspannung und Kommandospannung ($U_m - U_c$) als Ausgleichsspannung U_f generiert und erzeugt über den Rückkopplungswiderstand R_f einen Ausgleichstrom, bis die Membranspannung der Kommandospannung entspricht. Die Differenz von Ausgleichsspannung U_f und Kommandospannung U_c entspricht der Leitfähigkeitsänderung der Zellmembran. Die Messung des Stromes, der durch die Spannungsdifferenz ($U_c - U_f$) erzeugt wird, wird gemessen und auf einem entsprechenden Ausgabegerät dargestellt.

Der Operationsverstärker hat zwei Eingänge, wobei an einem Eingang die Spannung der Ableitelektrode, welche dem Membranpotential (U_m) der Zelle entspricht, anliegt und am zweiten Eingang das gewünschte Kommandopotential (U_c) eingespeist wird. Die Differenz zwischen diesen Potentialen U_m und U_c wird am Ausgang des Verstärkers als Ausgleichsspannung U_f generiert und führt über den Rückkopplungswiderstand R_f zu einem Ausgleichsstrom. Dieser Ausgleichsstrom führt zu einer Angleichung des Membranpotentials an das Kommandopotential, bis beide sich gleichen (also $U_m = U_c$). Außerdem wird die benötigte Spannung U_f mit der Kommandospannung U_c verglichen. Diese Spannungsdifferenz erzeugt einen Strom, der der Leitfähigkeitsänderung in der Zellmembran entspricht. Dieser Strom wird einem passenden Ausgabegerät zugeführt und dargestellt.

3.5.3.2 Kapazitäten

Physikalisch ist die Kapazität definiert als das Verhältnis von Ladung (in Coulomb) zu Spannung (in Volt). Die kapazitiven Eigenschaften der Pipette C_p und der Zellmembran C_m sind relevant für die Messungen im Voltage-Clamp. Eine Kompensation dieser Kapazitäten ist notwendig, da sonst eine Änderung des Kommandopotenzials nicht sofort zu einer Änderung des Membranpotentials führen würde, sondern zunächst zu einer Umladung der Kapazitäten. Weiterhin würde man zusätzlich zu einem schnell ansteigenden Strom, der der Ladung der Kapazität entspricht, noch einen exponentiell abfallenden Strom sehen, der mit der Entladung der Kapazität korrespondiert. Man kann eine schnelle Komponente C_{fast} mit Zeitkonstante um 0,5 bis 8 μs und eine langsame Komponente C_{slow} mit Zeitkonstanten über 5 μs unterscheiden, wobei die schnelle Komponente C_{fast} im wesentlichen durch die kapazitiven Eigenschaften der Pipette C_p und die langsame Komponente C_{slow} hauptsächlich durch die Kapazität der Zellmembran C_m entsteht. Deshalb erfolgt bei Messungen im Voltage-Clamp eine Kompensation der Pipettenkapazität (C_p) und der Membrankapazität (C_m) mit den entsprechenden Funktionen des Patch-Clamp Verstärkers (C_{fast} , bzw. C_{slow}).

Da die langsame Kapazität C_{slow} der Kapazität der Zellmembran entspricht und die spezifische Kapazität biologischer Membranen mit $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ziemlich konstant ist, kann C_{slow} deshalb direkt als Maß für die Größe der geklemmten Zelle dienen, aber nur bei annähernd runden und nicht gekoppelten Zellen.

3.5.3.3 Serienwiderstand

Der Serienwiderstand R_s entspricht dem Widerstand zwischen der Zellmembran und dem Verstärker und ist meist mehr als doppelt so groß wie der Pipettenwiderstand in der Badlösung, R_{pip} . Eine Umladung der Zellmembran findet über den Serienwiderstand R_s statt und kann somit bei großen Werten zu einer Diskrepanz zwischen Kommandopotential und tatsächlich über der Membran anliegenden Potential führen. Diese Verzerrung ist dabei proportional zum Serienwiderstand R_s und zur injizierten Spannung. Weiterhin kann es durch große Serienwiderstände zu Verzögerungen der Umladungsvorgänge kommen und damit zur Verzerrung von schnellen Kanalkinetiken. Dieser Fehler ist wiederum abhängig von der Kapazität der Zellmembran C_{slow} und dem Serienwiderstand R_s . Um diesen Fehler klein zu halten, wurde der Spannungsverlust über den Serienwiderstand R_s elektronisch mit einer entsprechenden Funktion des Patch-Clamp-Verstärkers kompensiert. Alle Messungen in dieser Arbeit wurden mit Zugangswiderständen von 2 bis 6 $\text{M}\Omega$ durchgeführt und bis zu 85 % kompensiert.

3.5.3.4 Digitalisierung und Filter

Die gemessenen analogen Stromsignale wurden durch einen 3-poligen Bessel-Filter gefiltert. Die Grenzfrequenz des ersten Filters lag bei 10 kHz, die der folgenden zwei Filter bei 2.3 – 5 kHz. Dann wurden die Daten mit einer Aufnahmefrequenz von 1.7-5 kHz digitalisiert und auf der Festplatte des Computers gespeichert.

3.5.4 Durchführung der Patch-Clamp-Experimente

3.5.4.1 Giga-Seal und *Whole-Cell*-Konfiguration

Das Grundprinzip der *Whole-Cell*-Patch-Clamp-Technik ist die Ausbildung eines sehr dichten Kontaktes (*Seal*) zwischen der Zellmembran und der Mündung der Pipette. Diese Abdichtung wird so dicht, dass Widerstände im $G\Omega$ -Bereich erreicht werden. Nachdem durch vorsichtiges Saugen und Anlegen einer negativen Spannung von -50 mV ein stabiles, dichtes *Gigaseal* erreicht wurde, fand eine Kompensation der kapazitiven Eigenschaften der Pipette durch die C_{fast} Funktion des Verstärkers statt. Anschließend wurde durch Anlegen eines leichten Unterdrucks im Inneren der Pipette das Membranstück unter der Pipettenöffnung durchbrochen, wodurch die Lösung in der Pipette mit dem Zytoplasma des Intrazellulärraums miteinander in Kontakt stehen. Nach kurzer Zeit in dieser *Whole-Cell*-Konfiguration entspricht die Zusammensetzung der intrazellulären Elektrolyte den Konzentrationen der Intrazellulärlösung in der Pipette. Anschließend erfolgte die Kompensation der kapazitiven Eigenschaften der Zellmembran durch die C_{slow} Funktion des Verstärkers. Die spezifische Kapazität biologischer Membranen wird auf $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ geschätzt und kann deshalb direkt als Maß für die Größe der geklemmten Zelle dienen. Der Zugangswiderstand R_s soll dabei so niedrig wie möglich sein, damit das tatsächlich erreichte Membranpotential möglichst schnell und genau der angelegten Spannung entspricht.

3.5.4.2 Protokolle

Sämtliche kinetischen Charakterisierung ohne Koexpression von 14-3-3 ϵ wurden bei Raumtemperatur unter Verwendung von Ringerlösung und Intrazellulärlösung I durchgeführt, wobei die CHO-Zellen auf Haltepotentiale von -80 mV geklemmt wurden. Für die Messung der Strom-Spannungs- und Leitfähigkeits-Spannungs-Kennlinie ohne 14-3-3 ϵ wurden die Zellen in 10 mV-Schritten für 30 s auf Potentiale von -70 bis $+30$ mV depolarisiert, bevor für

500ms auf -40 mV gesprungen wurde (IV_{30s} -Protokoll).

Um die Aktivierungszeitkonstanten für Spannungen von -20 mV, 0 mV und $+20$ mV zu erhalten, wurden die Zellen für die Dauer von 20 ms, 40 ms, 60 ms, 100 ms, 180 ms, 340 ms, 660 ms, 1260 ms und 2500 ms auf die entsprechenden Spannungen geklemmt und dann auf -40 mV hyperpolarisiert (*act*-Protokoll).

Für die Analyse der Deaktivierung wurden die Zellen für 1 s auf Potentiale von $+60$ mV depolarisiert und wurden anschließend für 4 s auf Potentiale von $+50$ bis -100 mV geklemmt (*deact*-Protokoll).

Um die Inaktivierung zu messen wurden die Zellen für 1 s auf $+30$ mV depolarisiert, dann für 10 ms auf -80 mV geklemmt, um dann die Ströme bei Potentialen von $+40$ bis -120 mV für 1 s zu messen (*inact*-Protokoll).

Außerdem wurde ein Protokoll mit rampenartig abfallenden Spannungen verwendet, welches ein Herzaktionspotential imitieren sollte. Nachdem auf ein Potential von $+60$ mV gesprungen wurde, reduzierte man die Spannung innerhalb von 1 s kontinuierlich bis auf -80 mV (*ramp*-Protokoll).

Für sämtliche Messungen mit Koexpression von $14-3-3\epsilon$ wurde die modifizierte Ringer Lösung und die Intrazellulärlösung II verwendet, wobei die CHO-Zellen wieder bei Raumtemperatur auf Haltepotentiale von -80 mV geklemmt wurden. Für die Analyse der Strom-Spannungs- und Leitfähigkeits-Spannungs-Kennlinie der mit $14-3-3\epsilon$ koexprimierten HERG-Konstrukte wurden kürzere, physiologischere Protokolle verwendet. In 10 mV-Schritten wurde für jeweils $3,5$ s die Zelle auf Potentiale von -60 bis $+50$ mV depolarisiert, anschließend wurde für 500 ms auf ein konstantes Potential von -40 mV gesprungen, um die Tail-Ströme zu messen ($IV_{3,5s}$ Protokoll).

3.5.5 Auswertung

3.5.5.1 Elektrophysiologische Grundlagen

3.5.5.1.1 Das Gleichgewichtspotential und die Nernst-Gleichung

Bei der Verteilung von geladenen Teilchen gibt es zwei treibende Kräfte, welche ein Gleichgewicht anstreben - nämlich die Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten und der Drift, dem das elektrische Feld zugrunde liegt. Sind die geladenen Teilchen durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt, welche nur für diese Teilchen durchlässig ist, dann streben die Teilchen durch Diffusion einen Ausgleich des Konzentrationsgradienten an. Durch die Umverteilung der geladenen Teilchen kommt es aber zu einem Ungleichgewicht der Ladungen und somit zum Aufbau eines elektrischen Gradienten. Diese Gleichgewichtsbeziehung von Diffusion und Drift geladener Teilchen, die durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt sind, wird durch die Nernst Gleichung beschrieben, welche das Gleichgewichtspotential E_{ion} als eine Funktion des Konzentrationsverhältnisses und der Valenz beschreibt.

$$E_{ion} = E_{int} - E_{ext} = \frac{RT}{zF} \ln\left(\frac{C_{ext}}{C_{int}}\right)$$

Außer dem Verhältnis von extrazellulärer Konzentration C_{ext} zu intrazellulärer Konzentration C_{int} und der Valenz z beinhaltet die Nernst-Gleichung die Temperatur T (in Kelvin), die Gaskonstante R und Faradaysche Konstante F . Die Nernst-Gleichung findet somit Verwendung bei der Berechnung von Gleichgewichtspotentialen für Ionen, welche durch eine semipermeable Membran getrennt, ungleich auf zwei Kompartemente verteilt sind.

3.5.5.1.2 Die Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung und die Boltzmann-Funktion

Die Leitfähigkeit g ist definiert als Änderung des Stroms I pro Änderung des Potentials E ($g = \Delta I / \Delta E$). Die Änderung der Spannung entspricht der Differenz von Stimulusspannung E_m und Gleichgewichtspotential für das selektive Ion E_{ion} , wobei die Stimulusspannung durch das Protokoll vorgegeben wird und das Gleichgewichtspotential sich aus den bekannten extra- und intrazellulären Konzentrationen des selektiven Ions mit Hilfe der Nernst-Gleichung berechnen lässt. Die Änderung der Leitfähigkeit entspricht bei gleich bleibender Triebkraft ($E_m - E_{ion} = \text{konstant}$) der Änderung des Stroms.

$$G = \frac{I}{E_m - E_{ion}}$$

Nachdem man die Zelle auf unterschiedliche Testpotentiale depolarisiert hat, wird immer auf dasselbe Potential geklemmt, bei welchem die Triebkraft unabhängig vom vorausgehenden Testpotential gleich ist. Die instantanen Ströme nach Klemmen auf die *tail*-spannung reagieren auf die Änderung der Spannung erst mit einer gewissen Verzögerung und unterliegen in den ersten Momenten lediglich der vorher angelegten Testpotentiale. Da aber die Triebkraft der *tail*-spannung für alle konstant ist, kann von der spannungsabhängigen Änderung der Stromamplituden in guter Näherung die spannungsabhängige Änderung der Leitfähigkeiten abgeleitet werden. Bei Annahme dieser Abschätzung entsprechen die auf die maximalen Stromamplituden normalisierten Stromamplituden (I/I_{max}) direkt den entsprechend normalisierten Leitfähigkeiten (G/G_{max}).

Fehler! Textmarke nicht definiert.Fehler! Textmarke nicht definiert.

$$\frac{G}{G_{max}} = \frac{I / E_m - E_{ion}}{I_{max} / E_m - E_{ion}} = \frac{I}{I_{max}}$$

Trägt man diese normalisierten Leitfähigkeiten (G/G_{max}) gegen die entsprechenden Testpotentiale auf, dann erhält man einen Graphen, der die

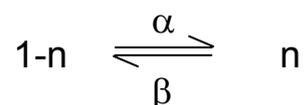
Spannungsabhängigkeit der Aktivierung beschreibt. Diese Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung kann durch eine sigmoidale Boltzmann-Funktion beschrieben werden. Die Boltzmann-Funktion beschreibt die Wahrscheinlichkeit zweier möglicher Zustände eines Systems in Abhängigkeit vom Energieniveau. Bezüglich eines Ionenkanals ist das Verhältnis von offenen (P_o) zu geschlossenen (P_c) Kanälen von Bedeutung. Damit die Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung durch eine Boltzmann-Funktion beschrieben werden kann, dürfen nur zwei Zustände vorhanden sein, d.h. es muss näherungsweise $P_o + P_c = 1$ gelten. Dann kann nämlich die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung beschrieben werden durch:

$$\frac{G}{G_{\max}} = \frac{1}{1 + \exp [(V_{1/2} - V_m) / k]}$$

Die normalisierte Leitfähigkeit kann also als Funktion von $V_{1/2}$ (Spannung der halbmaximalen Öffnungswahrscheinlichkeit) und Steigungsfaktors k beschrieben werden.

3.5.5.1.3 Zeitkonstanten

Der Anstieg der Leitfähigkeit bei Depolarisation hat einen sigmoidalen Zeitverlauf, wohingegen der Abfall der Leitfähigkeit bei Repolarisation einen exponentiellen Verlauf aufweist. Nimmt man an, dass der Zusammenhang zwischen der Wahrscheinlichkeit für den offenen (n) und geschlossenen Zustand ($1-n$) einer Funktion erster Ordnung folgt, dann gilt:



Der Übergang vom offenen zum geschlossenen Zustand erfolgt gemäß den spannungsabhängigen Zeitkonstanten α und β .

Aus diesen Annahmen folgt:

$$dn / dt = (1-n) \alpha - n \beta$$

Definiert man $1 / \alpha + \beta$ als spannungsabhängige Zeitkonstante τ , die *steady-state*-Amplitude als A_0 und die relative Amplitude als A , dann ergibt sich:

$$Y(t) = A_0 + A \exp(-t / \tau)$$

Für die Analyse ist es jedoch manchmal notwendig, den kinetischen Prozess durch zwei Zeitkonstanten τ_{fast} und τ_{slow} zu beschreiben, wobei folgende Funktion an die Stromspuren angeglichen werden kann:

$$I(t) = A_0 + A_{\text{fast}} \exp(-t / \tau_{\text{fast}}) + A_{\text{slow}} \exp(-t / \tau_{\text{slow}})$$

3.5.5.2 Auswertung

3.5.5.2.1 Computergestützte Analyseprogramme

Für die Datenaufnahme wurde ein Apple Macintosh G3 benutzt. Das Programm *Pulse+Pulsefit* wurde für die Datenerfassung und auch für die Auswertung der Stromkurven verwendet. Für die Analyse der biophysikalischen Eigenschaften und die graphische Darstellung der Stromspuren, kinetischen Parameter und Beziehungen wurde das Programm IGOR Pro 4.0 (WaveMetrics, Inc.) verwendet. Unter Verwendung von Microsoft Excel wurde das Signifikanzniveau mit dem Student t-test mit zwei Endflächen und für ungepaarte Stichproben mit ungleicher Varianz ermittelt (Microsoft Corporation). Alle Ergebnisse werden als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

3.6 Computergestützte Simulationen

3.6.1 Kanalkinetiken

Das HERG-Kanalmodell basiert auf einem bereits veröffentlichten Markov-Modell, welches an die experimentell erhaltenen HERG-Daten angepasst wurde (Clancy & Rudy, 2001). Durch empirische ermittelte Funktionen, welche den experimentellen Daten der nicht-phosphorylierten und phosphorylierten HERG-Kanalkinetiken angeglichen wurden, wurden die Zeitkonstanten ermittelt.

Zeitkonstanten des nicht-phosphorylierten HERG Kanals

$$C1 \rightarrow O \text{ oder } C1 \rightarrow I \quad \alpha\alpha = 65.5 \times 10^{-3} \exp(5.547 \times 10^{-2} \times (V - 68))$$

$$C2 \rightarrow C1 \quad \alpha_{in} = 2.172$$

$$C3 \rightarrow C2 \quad \alpha = 55.5 \times 10^{-3} \exp(5.547 \times 10^{-2}(V - 68))$$

$$C2 \rightarrow C3 \quad \beta = 2.357 \times 10^{-3} \exp(-0.6588 \times 10^{-2}V)$$

$$C1 \rightarrow C2 \quad \beta_{in} = 1.077$$

$$O \rightarrow C1 \quad \beta\beta = 2.9357 \times 10^{-3} \exp(-0.02158V)$$

$$I \rightarrow O \quad \alpha_i = 0.439 \exp(-0.02352(V + 25)) \times 4.5/[K^+]_{out}$$

$$O \rightarrow I \quad \beta_i = 3.656 \exp(0.003942V)[4.5/[K^+]_{out}]^{0.3}$$

$$I \rightarrow C1 \quad \mu = \alpha_i \cdot \beta\beta \cdot \alpha\alpha / (\alpha\alpha \cdot \beta_i)$$

Zeitkonstanten des phosphorylierten HERG Kanal

$$C1 \rightarrow O \text{ oder } C1 \rightarrow I \quad \alpha\alpha = 65.5 \times 10^{-3} \exp(5.547 \times 10^{-2} \times (V - 53))$$

$$C3 \rightarrow C2 \quad \alpha = 55.5 \times 10^{-3} \exp(5.547 \times 10^{-2}(V - 53))$$

3.6.2 β -adrenerges Stimulationsmodell

Um die Auswirkungen der PKA-abhängigen HERG-Kanalregulation zu untersuchen, wurde ein Modell einer β -adrenerg stimulierten Kardiomyozyte verwendet, welches auf bereits veröffentlichten Modellen basiert (Terrenoire *et al.*, 2005; Saucerman *et al.*, 2003). Weiterhin wurden die enzymatischen HERG Modifikationen durch PKA und Proteinphosphatase 1 (PP1) in das Modell eingebaut – unter der Annahme ähnlicher Kinetiken wie für I_{CaL} und Phospholamban in der Arbeit von Saucerman *et al.* (Saucerman *et al.*, 2003) und von I_{Ks} in der Arbeit von Terrenoire *et al.* (Terrenoire *et al.*, 2005).

In dieser Simulation wurde die Signalverarbeitung durch die HERG-Regulation mit Hilfe eines kombinierten Vorgehens vervollständigt. Einfache Differentialfunktionen wurden mit Hilfe des *Rosenbrock stiff solver* und algebraischer Gleichungen mit Hilfe von *Newton-Raphson non-linear solver* gelöst. Dies erhöhte die Stabilität und Genauigkeit der Gleichung und ermöglichte somit die Verwendung unterschiedlicher β -Agonisten Konzentrationen (und somit unterschiedlicher Zeitkonstanten). Maximale Rezeptorstimulation wurde bei den verwendeten Simulationen angenommen.

I_{HERG} Regulationsmodell

$$I_{HERG,PHOSPH} = \frac{k_{cat,PKA-I_{HERG}} \cdot [PKAC] \cdot I_{HERG,np}}{k_{m,PKA-I_{HERG}} + I_{HERG,np}}$$

$$I_{HERG,DEPHOSPH} = \frac{k_{cat,PP1-I_{HERG}} \cdot [PP1] \cdot I_{HERG,p}}{k_{m,PP1-I_{HERG,p}} + I_{HERG,p}}$$

$$\frac{dI_{HERG,np}}{dt} = I_{HERG,DEPHOSPH} - I_{HERG,PHOSPH}$$

$$\frac{dI_{HERG,p}}{dt} = I_{HERG,PHOSPH} - I_{HERG,DEPHOSPH}$$

$$Frac_{I_{HERG,p}} = \frac{I_{HERG,p}}{I_{HERG,p} + I_{HERG,np}}$$

mit

$$k_{cat,PKA-I_{HERG}} = 54 \times 10^{-3} \text{ ms}^{-1}, k_{m,PKA-I_{HERG}} = 21 \mu\text{M}$$

$$k_{cat,PP1-I_{HERG}} = 8.52 \times 10^{-3} \text{ ms}^{-1} \text{ und } k_{m,PP1-I_{HERG,p}} = 7 \mu\text{M}$$

3.6.3 Simulation von Herzaktionspotentialen

Es wurde ein Luo-Rudy-Modell einer ventrikulären Kardiomyozyte eines Meerschweinchens zur Simulation von Herzaktionspotentialen verwendet (Luo und Rudy, 1994). Modifikationen von I_{CaL} , I_{CaT} und I_{Ks} wurden entsprechend Terrenoire *et al.* vorgenommen (Terrenoire *et al.*, 2005). Das I_{Kr} Modell basiert auf den in dieser Arbeit experimentell erhobenen Daten. Den hier beschriebenen HERG-Mutationen fehlt die PKA-abhängige Interaktion mit 14-3-3 ϵ , so dass diese auch nach β -adrenerger Stimulation als „nicht-phosphorylierte“ Kanäle simuliert wurden. Die Phosphorylierung der L-Typ Kalziumkanäle und des I_{Ks} wurden als intakt angenommen. Das Modell nimmt eine „Ausgangsphosphorylierung“ der Proteine an, welche bereits vor β -adrenerger Stimulation vorliegt. Folgende Ausgangsphosphorylierung wurde für die verschiedenen Proteine angenommen: Fraktion der L-Typ Kalziumkanal β -Untereinheiten, welche in phosphoryliertem Zustand vorliegen = 0.20, Fraktion der L-Typ Kalziumkanal α -Untereinheiten, welche in phosphoryliertem Zustand vorliegen = 0.23, Fraktion der I_{Kr} Kanäle, welche in phosphoryliertem Zustand vorliegen = 0.13, Fraktion der I_{Ks} Kanäle, welche in phosphoryliertem Zustand vorliegen = 0.13. Nach β -adrenerger Stimulation wurden folgender Anteil an phosphorylierten Proteinen angenommen: Fraktion der L-Typ Kalziumkanal β -Untereinheiten, welche in phosphoryliertem Zustand vorliegen = 0.57, Fraktion der L-Typ Kalziumkanal α -Untereinheiten, welche in phosphoryliertem Zustand vorliegen = 0.53, Fraktion der I_{Kr} Kanäle, welche in phosphoryliertem Zustand vorliegen = 0.61, Fraktion der I_{Ks} Kanäle, welche in phosphoryliertem Zustand vorliegen = 0.61.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung der HERG Mutanten S818L, G965X, R744X, R1014fsX38 und V1038fsX20 sowie deren Fusion mit einem Hämagglutinin-Epitop

Die Konstruktion der HERG Mutationen S818L, G965X, R744X, R1014fsX38 und V1038fsX20 erfolgte mittels PCR-basierter Quickchange[®] Mutagenese (Stratagene). Für die elektrophysiologische Charakterisierung der jeweiligen Konstrukte wurde die cDNA des HERG Wildtyp (HERGwt) und der Mutanten in die eukaryotischen Expressionsvektoren pcDNA3.1 (Invitrogen) kloniert. Zur Durchführung der Co-Expressionsexperimente wurde die Mutanten HERG cDNA in den ersten Polylinker des Expressionsvektors pBud-4.1 (Invitrogen) (unter Kontrolle des CMV-Promotors) und die HERGwt cDNA in den zweiten Polylinker (unter Kontrolle des EF-1 α -Promotors) eingefügt. Für die Untersuchung der Stabilität der jeweiligen Kanaluntereinheiten wurde die cDNA der HERG Mutanten und des HERGwt in den pTre-Tight (Clontech) kloniert und mit pTet-Off ko-transfiziert (Gossen & Bujard, 1992). Klonkarten der verwendeten Konstrukte sind im Anhang aufgeführt.

Damit ein immunzytochemischer und proteinbiochemischer Nachweis des HERGwt und der unterschiedlichen Mutanten leichter möglich war, wurde an den HERGwt und die Mutanten ein Hämagglutinin-Epitop (HA-Epitop) an den N-Terminus angehängt. Aufgrund der Spezifität dieser HA-Sequenz kann dieses Epitop durch spezifische Antikörper erkannt werden und ermöglicht den eindeutigen Nachweis des HA-Epitop aufweisenden Fusionsproteins (Abbildung 4.1).

NH₂ – Tyr – Pro – Tyr – Asp – Val – Pro – Asp – Tyr – Ala – Ser – COOH

Abbildung 4.1

Die Aminosäure-Sequenz des verwendeten Hämagglutinin-Epitops besteht aus 10 Aminosäuren.

4.1.1 Anhängen von Hämagglutinin an den HERGwt

Die HA-Sequenz wurde durch eine Overlap-PCR an den HERGwt angehängt. Bei dieser Form der gezielten Mutagenese verwendet man anstelle eines perfekt korrespondierenden Oligonukleotids DNA-Sequenzen, welche nur zum Teil mit der Matrize überlappen. Da die Oligonukleotide in die neu synthetisierten Konstrukte eingebaut werden, erhält man nun Fusionen aus der Matrize mit dem verwendeten Oligonukleotid. In unserem Fall diente der HERGwt als Matrize. Aufgrund seiner sehr langen Sequenz und der Limitierung der PCR Fragmente auf Größen von etwa 1000 bp wurde nicht die gesamte Sequenz repliziert, sondern nur ein Fragment des HERGwt.

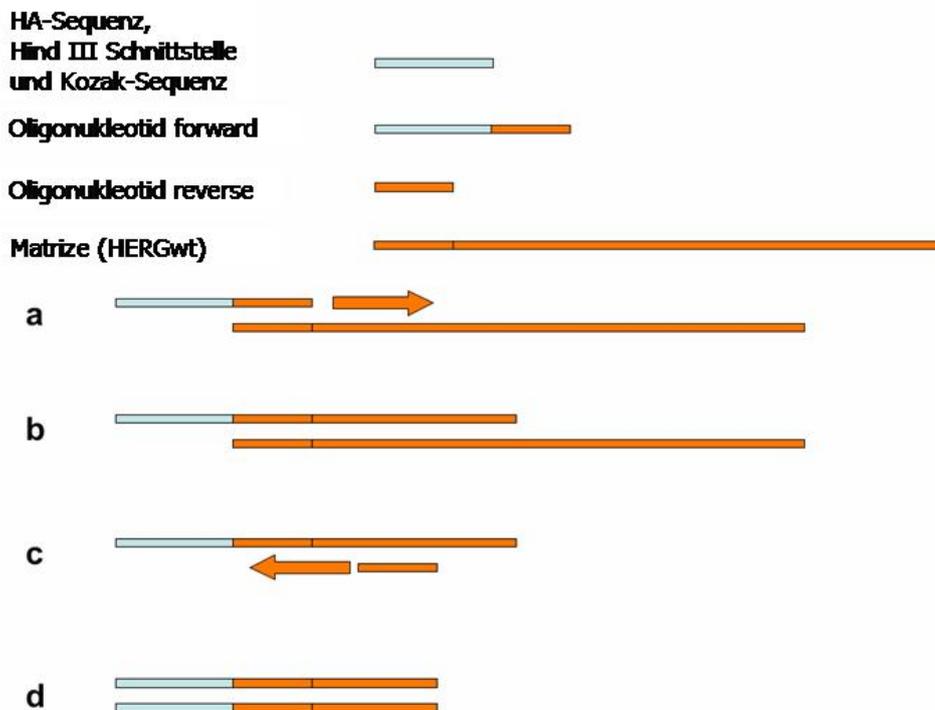


Abbildung 4.2

Es wurde ein Oligonukleotid verwendet, welches nur zum Teil mit der Matrize überlappte (oranger Bereich) und im nicht überlappenden Bereich (hellblauer Bereich) die anzuhängende HA-Sequenz, Hind III Schnittstelle und Kozac-Sequenz enthielt. **a)** Dieses nur teilweise überlappende Oligonukleotid legt sich während der PCR der Matrize an und wird entsprechend der Vorlage verlängert. **b)** Man erhält einen Einzelstrang, in welchem die gewünschte Sequenz mit einem Teil der Matrizensequenz fusioniert vorliegt. **c)** Das entgegengesetzte Oligonukleotid legt

sich nun an die Fusionssequenz an und bildet den entsprechenden komplementären Strang. **d)** Man erhält einen DNA Doppelstrang, welcher die HA-Sequenz, die Hind III Schnittstelle und die Kozak-Sequenz angehängt an ein Fragment des HERGwt kodiert. Die Fragmentgröße wurde durch die verwendeten Primer festgelegt und betrug etwa 700bp. (modifiziert nach Biochemie und Pathobiochemie von Löffler und Petrides)

Die Fragmentgröße wurde durch die Wahl des reversen Oligonukleotids bestimmt, welches in meinem Fall die Bildung eines etwa 700 bp großen Fragmentes ermöglichte (Abbildung 4.2). Es wurde ein Oligonukleotid verwendet, welches die gewünschte HA-Sequenz enthielt und mit den ersten Nukleotiden des HERGwt überlappte. Für die Gewährleistung einer hohen Translationseffizienz im heterologen Expressionssystem wurde ein Fragment einer Konsensussequenz für den Translationsstartpunkt (Kozak-Sequenz) verwendet (Kozak, 1986). Außerdem wurde eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Hind III in das Oligonukleotid eingebaut, so dass ein passendes Schneiden und Einfügen des Konstruktes möglich war. Mit Hilfe der Overlap-PCR und durch Verwendung eines Oligonukleotids, welches die Hind III Schnittstelle, die Kozak-Sequenz und die HA-Sequenz enthält, wurden diese Sequenzen an ein Fragment des HERGwt angehängt.

```
CCC AAGCTT CCACCAATGTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTCC CCGGTGCGGAGGGGCCACGTCGC
```

Abbildung 4.3

Es wurde ein Oligonukleotid für die Overlap-PCR verwendet, welches Sequenzen für eine **Hind III Schnittstelle**, eine **Kozak-Sequenz**, die gewünschte **HA-Sequenz** und die ersten 23 Nukleotide des **HERGwt** aufweist. Weiterhin wurden willkürlich drei Nukleotide (CCC) vor die Sequenz der Hind III Schnittstelle angehängt, um die Erkennung der Schnittstellen durch das Restriktionsenzym zu ermöglichen.

Man erhielt ein Fragment des HERGwt, welches mit den gewünschten HA-Sequenzen fusioniert vorlag und eine Größe von etwa 700bp hatte (Abbildung 4.3). Die Overlap-PCR wurde mit Hilfe der DNA-Polymerase *Turbo Pfu*[®] (Stratagene) durchgeführt, welches sich durch eine sehr gute Korrekturlesefunktion auszeichnet. Anschließend wurde das PCR-Produkt gelelektrophoretisch aufgetrennt, dann mit dem *GFX Gel Band Purification Kit* (Amersham Pharmacia Biotech) aufgereinigt und mit Hilfe des *ZeroBlunt*[®]*TOPO*[®]*PCR Cloning Kit* (Invitrogen) in den *ZeroBlunt*[®]*TOPO*[®] Vektor eingefügt (Abbildung 4.4).

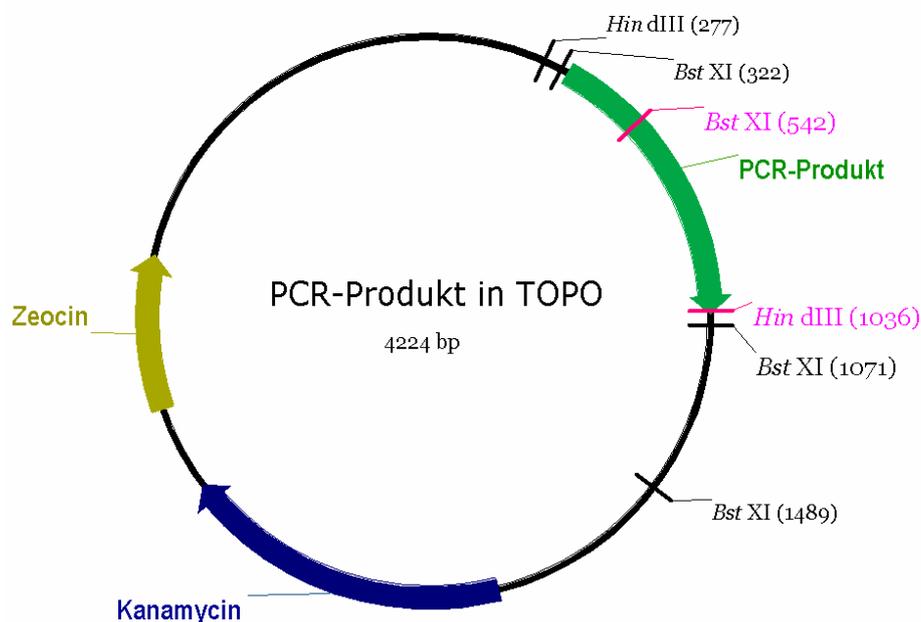


Abbildung 4.4

Das **PCR-Produkt** (bestehend aus der Hind III Schnittstelle, dem HA-Epitop und den ersten 677 Nukleotiden des HERGwt) wurde mit Hilfe des *ZeroBlunt*[®]*TOPO*[®]*PCR Cloning Kit* (Invitrogen) in den *ZeroBlunt*[®]*TOPO*[®] Vektor eingefügt. Außerdem besitzt der *ZeroBlunt*[®]*TOPO*[®] Vektor Resistenzgene für **Kanamycin** und **Zeocin**. Sämtliche Hind III und BstXI Schnittstellen im PCR-Produkt (jeweils eine), sowie im Vektor (drei, bzw. eine) sind entsprechend markiert. Die **Bst XI** und **Hind III** Schnittstelle, welche für das Umklonieren in den HERGwt-pcDNA3 Vektor benutzt wurden, sind entsprechend gekennzeichnet.

Der Einbau des PCR-Produktes erfolgte mit Hilfe von stumpfendigen Schnittstellen (*blunt ends*), so dass das PCR-Produkt potentiell auf zwei Weisen in den Vektor eingebaut werden konnte. Mit Hilfe eines Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen Hind III und Bst XI konnte anhand der Größe der Fragmente der korrekte Einbau des PCR-Produktes nachgewiesen werden. Bei einem korrekten Einbau des PCR-Produktes wie in Abbildung 4.4 erhält man bei einem Verdau mit Hind III zwei Fragmente der Größe 3469bp und 755bp und bei einem Verdau mit Bst XI vier Fragmente der Größe 3057bp, 534bp, 418bp und 220bp (Abbildung 4.4 und 4.5). Diese Fragmentgrößen waren nach entsprechendem Verdau mit Hind III und Bst XI sichtbar (Abbildung 4.5) und belegen den Einbau des PCR-Produktes in einer Konfiguration wie sie in Abbildung 4.4 gezeigt wird.

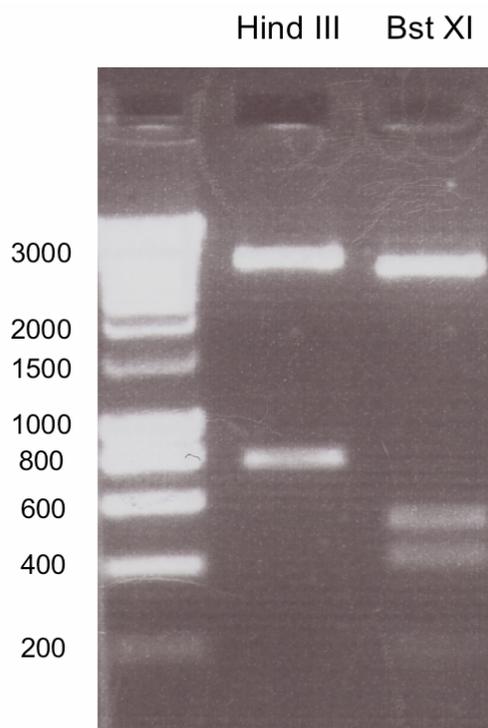


Abbildung 4.5

Die gelelektrophoretische Auftrennung des das PCR-Produkt enthaltenden *ZeroBlunt[®]TOPO[®]* Vektors nach Verdau mit Hind III (zweite Spalte) oder Bst XI (dritte Spalte). Es sind Fragmentgrößen zu sehen, wie sie bei einem korrekten Einbau des PCR-Produktes wie in Abbildung 3.7 zu erwarten wären. Die Werte der Fragmentgrößen (Smartladder, Eurogentec) sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

Das PCR-Produkt und auch das pcDNA3.1-HERGwt Konstrukt weisen jeweils eine Hind III Schnittstelle kurz vor dem Beginn der Konstruktsequenz und eine Bst XI Schnittstelle im Konstrukt auf. Mit Hilfe dieser Schnittstellen ist es nun möglich den N-terminalen Teil des HERGwt aus dem pcDNA3.1-HERGwt Konstrukt herauszuschneiden und durch das entsprechend geschnittene PCR-Produkt zu ersetzen (Abbildung 4.6).

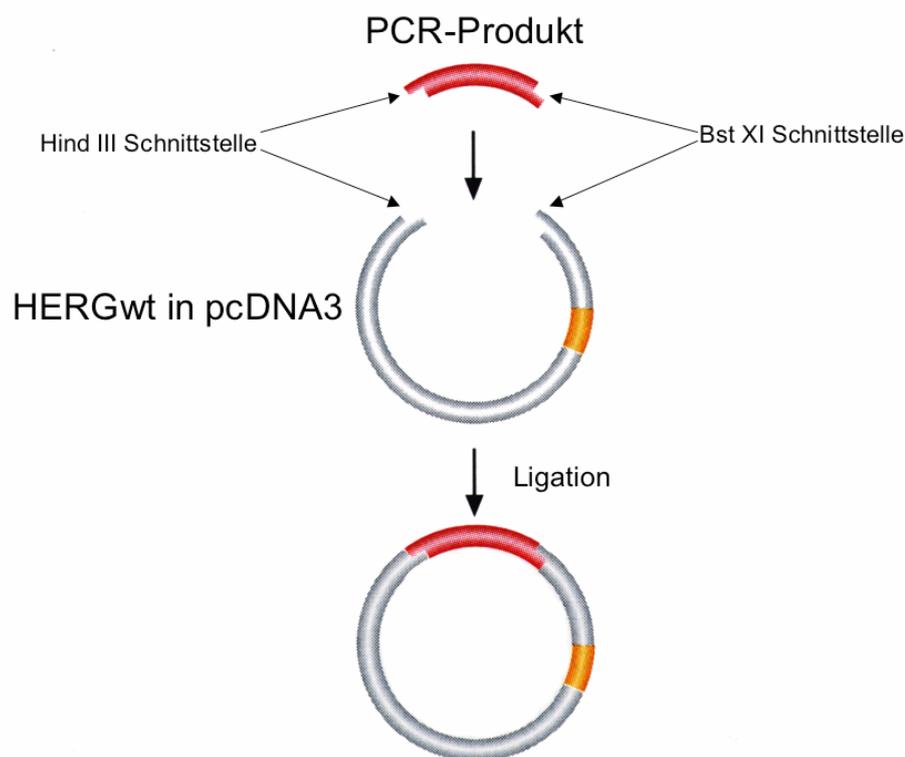


Abbildung 4.6

Das PCR-Produkt (rot) und der HERGwt-pcDNA3 Vektor (grau) wurden mit Hind III und Bst XI verdaut. Mit Hilfe dieser Schnittstellen ist es möglich den N-Terminus des HERGwt auszuschneiden und durch das PCR-Produkt (bestehend aus der HA-Sequenz und dem N-Terminus von HERGwt) zu ersetzen. Im Gegensatz zum Einbau des PCR-Produktes in den *ZeroBlunt[®]TOPO[®]* Vektor mit Hilfe von stumpfendigen Schnittstellen, ist in diesem Fall durch die Verwendung von überhängenden Schnittstellen (*sticky ends*) der Einbau des Fragmentes in korrekter Richtung und Orientierung möglich. Der pcDNA3 Vektor enthält eine Ampicillin Resistenz (gelb). (modifiziert nach einer Abbildung in „Biochemie und Pathobiochemie“ von Löffler und Petrides)

Der pcDNA3 Vektor weist in seinem Polylinker-Bereich zwei Bst XI Schnittstellen auf, welche von BamHI und NotI Schnittstellen flankiert werden und somit mit Hilfe dieser beiden Enzyme ausgeschnitten wurden. Der so modifizierte HERGwt-pcDNA3 Vektor besitzt somit nur die Bst XI Schnittstelle in der HERGwt-cDNA. Außerdem findet sich nur eine Hind III Schnittstelle. Folglich ergibt der Verdau des pcDNA3.1-HERGwt lediglich zwei Fragmente der Größe 473bp und 8429bp (Abbildung 4.7).

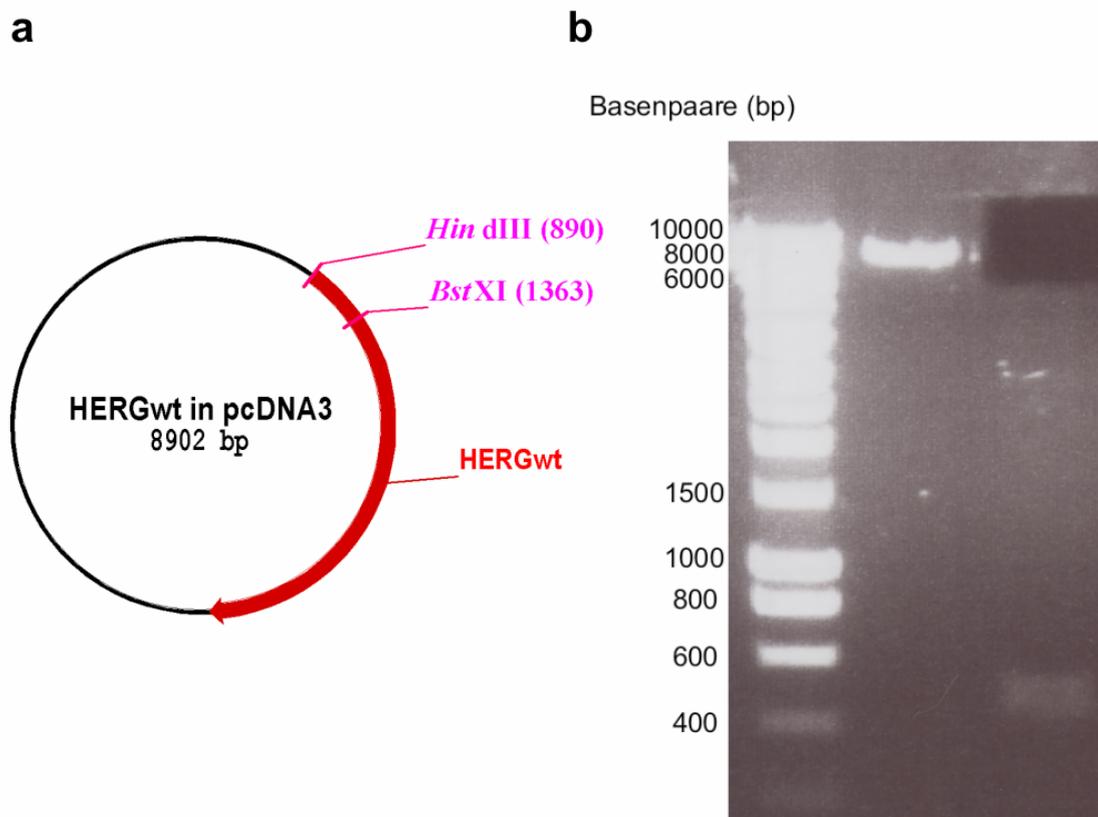


Abbildung 4.7

a Der HERGwt im pcDNA3 Vektor weist jeweils eine **Bst XI** Schnittstelle in der **HERGwt-cDNA** und eine **Hind III** Schnittstelle kurz vor Beginn der **HERGwt-cDNA** auf. Die in pink dargestellten Hind III und BstXI Schnittstellen korrespondieren zu den entsprechenden Schnittstellen im PCR-TOPO Vektor in Abbildung 3.7. **b** Beim Verdau mit diesen Enzymen entstehen somit zwei Fragmente der Größe 473bp und 8429bp. Das doppelt geschnittene Vektorfragment der Größe 8429 wurde ausgeschnitten und aufgereinigt (schwarzes Feld in der dritten Spalte).

Der Verdau des PCR-Produktes mit Hind III und Bst XI ergibt sechs Fragmente der Größe 35bp, 45bp, 220bp, 418bp, 494bp und 3012bp (Abbildung 4.8). Lediglich die Fragmente der Größe 220bp, 418bp, 494bp und 3012bp sind gelelektrophoretisch sichtbar. Das Fragment, welches durch eine Hind III (542.Base) und Bst XI (1036.Base) Schnittstelle flankiert wird und die HA-Sequenz, sowie einen Teil des HERGwt enthält, hat eine Größe von 494bp (pink untermalte Schnittstellen in Abbildung 4.11). Ein Fragment dieser Größe wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Verdaus ausgeschnitten und aufgereinigt (Abbildung 4.8)

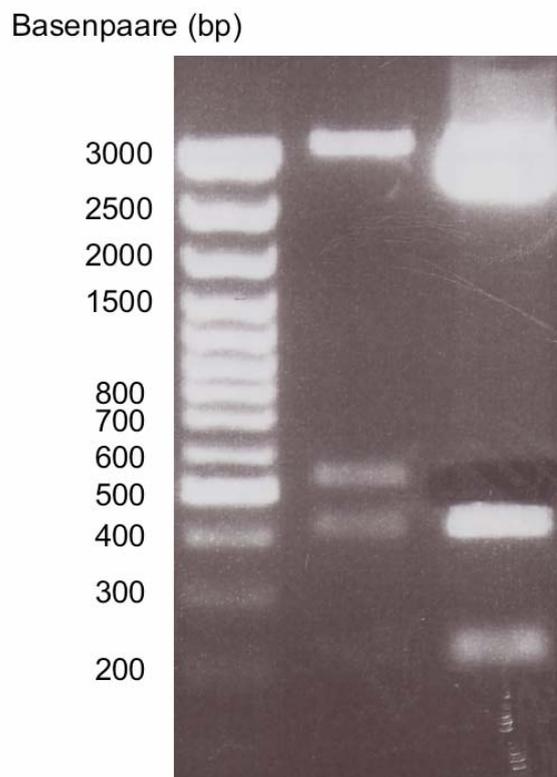


Abbildung 4.8

Die erste Spalte zeigt eine DNA Leiter zur Fragmentgrößenbestimmung in Basenpaaren (bp) und die zweite Spalte enthält das mit Bst XI verdaute PCR-Produkt. Die dritte Spalte enthielt das PCR-Produkt, welches mit Hind III und Bst XI verdaut wurde. Man kann die Fragmente der Größe 220bp, 418bp, 494bp und 3012bp erkennen. Das Fragment der Größe 494bp wurde ausgeschnitten (schwarzes Feld in Spalte 3).

Das doppelt verdauete Fragment des PCR-Produktes der Größe 494bp und der entsprechend geschnittene HERGwt-pcDNA3 Vektor der Größe 8429bp wurden durch Ligation aneinander gefügt. Man erhielt einen pcDNA3 Vektor, der die cDNA des HERGwt mit einer N-terminalen HA-Sequenz (Abbildung 4.9). Die Richtigkeit des HERGwt-HA-pcDNA3 Vektor wurde durch Kontrollverdau und durch Sequenzierung verifiziert.

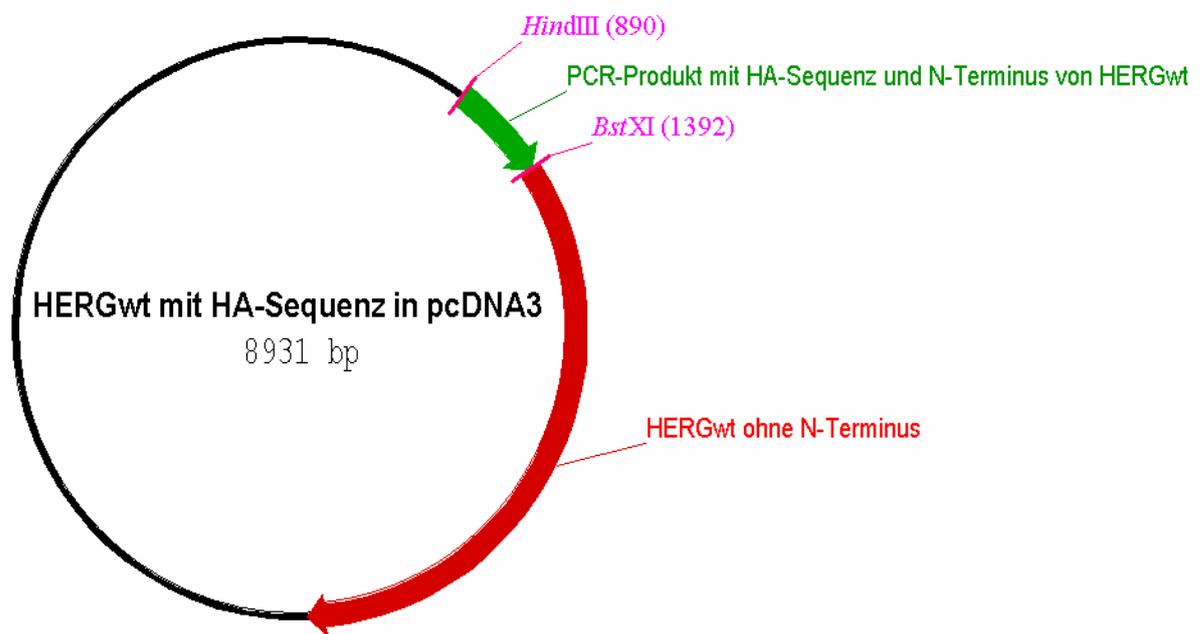


Abbildung 4.9

Der pcDNA3 Vektor enthält den **HERGwt**, sowie die angehängte HA-Sequenz am Terminus der cDNA des **HERGwt**. Das **PCR-Produkt mit der HA-Sequenz am N-Terminus des HERGwt** wurde zwischen der **Hind III** und **Bst XI** Schnittstelle eingefügt. Der HERGwt-HA-pcDNA3 Vektor hat eine Größe von 8931bp.

4.1.2 Elektrophysiologische Untersuchung des HA-Epitop markierten HERGwt

Nachdem der HERGwt mit dem HA-Epitop markiert worden war, erfolgte eine elektrophysiologische Charakterisierung des HA-markierten HERGwt. Nach Expression des HA-markierten HERGwt in CHO-Zellen konnten mit dem IV_{30s} -Protokoll (Depolarisation für 30s auf Testpotentiale von -70 bis $+30$ mV, dann 500ms auf eine Spannung von -40 mV) HERG-Ströme nachgewiesen werden (Abbildung 4.10; $n=2$). Deutlich sichtbar ist eine beschleunigte Deaktivierung der Tail-Ströme.

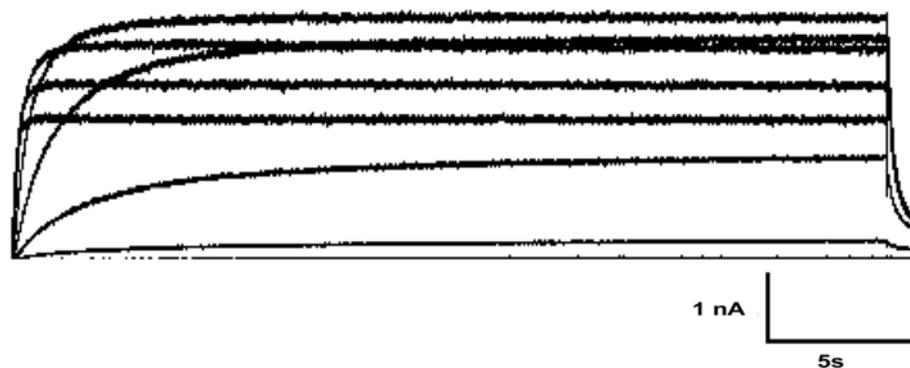


Abbildung 4.10

Der N-terminal mit einem HA-Epitop markierte HERGwt zeigt Strom-Spannungskurven, die denen des HERGwt ähneln.

4.1.3 Anhängen des Hämagglutinin-Epitops an die HERG-Mutanten

Da sich die HA-Sequenz am N-Terminus des HERGwt befand und sämtliche von uns untersuchten Mutationen sich am C-Terminus befanden, war es möglich, nach Verdau mit XhoI die Mutanten C-Termini in den entsprechend verdauten HERGwt-HA-pcDNA3 Vektor einzubauen. Sämtliche C-terminalen HERG-Mutanten konnten so N-terminal mit einer HA-Sequenz versehen werden.

Nach dem Verdau der HERG-Mutanten mit XhoI wurde das kleinere Fragment (*Insert*), welches dem C-Terminus entsprach, ausgeschnitten. Diese Fragmente hatten unterschiedliche Größen. Für die Mutanten R1014fsX38, V1038fsX20, G965X, R744X und S818L betragen die ausgeschnittenen Fragmentgrößen 1425bp, 1442bp, 856bp, 193bp und 1438bp, welche nach Isolierung und Aufreinigung gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die Anzahl, der Schattierungsgrad der Banden und die Größe der Fragmente gab Aufschluß über Reinheit, Konzentration und Erfolg des enzymatischen Verdaus (Abbildung 4.11).

Durch Ligation wurden die entsprechenden C-terminalen Fragmente der HERG-Mutanten in den mit XhoI verdauten HERGwt-HA-pcDNA3 eingebaut. So gelang eine Fusion sämtlicher HERG-Mutanten mit dem N-terminalen HA-Epitop.

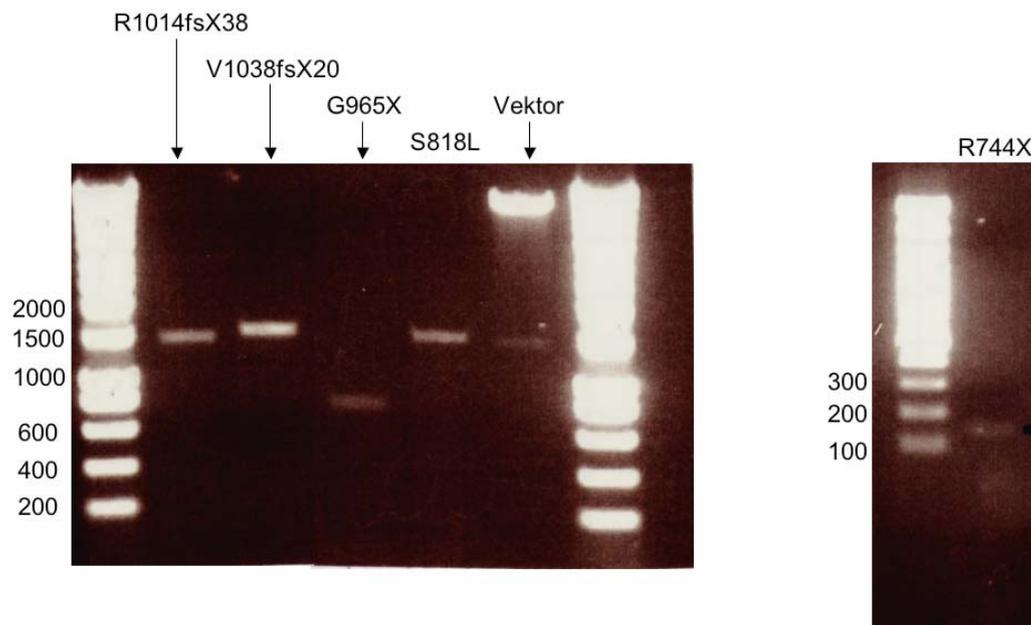


Abbildung 4.11

Die C-terminalen HERG-Mutanten wurden mit dem Restriktionsenzym XhoI verdaut und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die unterschiedlichen C-Termini der Mutanten und der HERGwt-HA-pcDNA3 Vektor mit dem N-Terminus des HERGwt wurden isoliert und aufgereinigt. Die nochmalige Gelelektrophorese der aufgereinigten Fragmente ergab saubere und solitäre Banden für alle Ansätze außer dem Vektor, wo zwei Banden sichtbar waren. Für die Mutanten R1014fsX38, V1038fsX20, G965X, R744X beziehungsweise S818L waren Fragmentgrößen von 1425bp, 1442bp, 856bp, 193bp, beziehungsweise 1438bp erkennbar.

4.2 Biophysikalische Charakterisierung

CHO-Zellen wurden mit HERGwt oder Mutanten DNA zusammen mit einem EGFP enthaltenden pcDNA3 Vektor transfiziert. Das EGFP diente zur leichteren Identifizierung transfizierter Zellen. Zur Charakterisierung wurden die von HERG-Kanälen vermittelten Ströme in der *Whole-Cell-Patch-Clamp* Konfiguration gemessen.

4.2.1 Aktivierung

Für die Analyse der exprimierten HERG-Ströme wurden die Zellen für 30 s ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV auf Testpotentiale von -70 bis +30 mV depolarisiert, bevor für 500 ms auf eine Spannung von -40 mV gesprungen wurde (IV_{30s} -Protokoll). Die Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 exprimierten HERG-Ströme mit Stromamplituden und -kinetiken ähnlich wie HERGwt (Abbildung 4.12 a, d-f). Die Mutanten R744X und S818A hingegen exprimierten keine funktionellen Kanäle. Nach mehreren unabhängigen Transfektionen konnte kein Strom nachgewiesen werden (insgesamt $n=11$, bzw. $n=12$; Abbildung 4.12 b-c). In Übereinstimmung mit der Literatur vermittelten HERG-Kanäle schnell aktivierende und schnell inaktivierende Ströme (Smith et al., 1996). Aktivierung und Inaktivierung erreichten nach 30 s ein Gleichgewicht. Entsprechend änderten sich die gemessenen Stromamplituden nach 30 s nicht mehr. Die nach 30 s gemessenen Stromamplituden wurden auf die Kapazität der Zellmembran (C_{slow}) normalisiert. Da die Kapazität der Zellmembran ein Maß für die Größe der Zelle ist, erhielt man durch diese Normalisierung Stromdichten, die unabhängig von der Zellgröße waren (gemessen in pA/pF). Das Auftragen der normalisierten Stromamplituden gegen das entsprechende Testpotential ergab Stromdichte-Spannungs-Beziehung, die für HERGwt und Mutanten-Kanäle G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 einen ähnlichen Verlauf hatten.

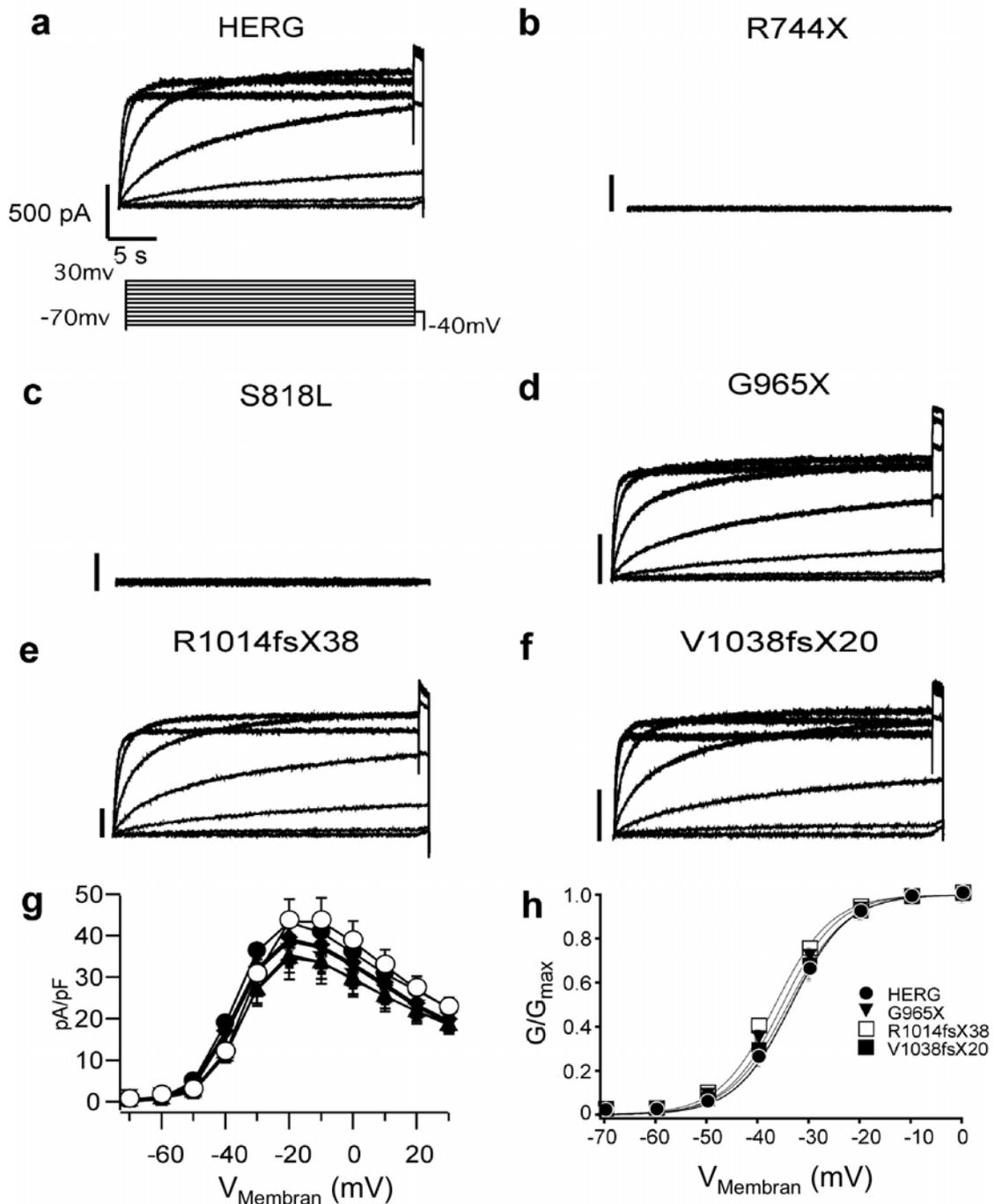


Abbildung 4.12

a) Repräsentative Stromspuren gemessen an mit HERG Wildtyp cDNA transfizierten CHO-Zellen. **b-f)** Repräsentative Stromspuren für die HERG Mutanten R744X, S818L, G965X, R1014fsX38 oder V1038fsX20. **g)** Stromdichte-Spannungskennlinien für HERG (●), G965X (▼), R1014fsX38 (□) und V1038fsX20 (■). **h)** Normalisierte Stromamplituden der Tail-Ströme aufgetragen gegen das entsprechende Testpotential. Durchgezogene Linien entsprechen angenäherten Boltzmann-Funktionen.

Die Kennlinie der Stromdichte-Spannungs-Beziehung war durch einen glockenförmigen Verlauf mit einem Maximum bei -20 mV charakterisiert (Abbildung 4.12 g). Nach den 30 sekundigen depolarisierenden Testpotentialen wurden die Zellen auf eine Spannung von -40 mV geklemmt. Dies führte zu einer schnellen Reaktivierung inaktivierter Kanäle und dementsprechend zu großen Stromamplituden. Das Verhältnis von normalisierten Stromamplituden und entsprechendem Testpotential ergab eine Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung, die sich gut mit einer Boltzmannfunktion beschreiben ließ. Dabei lassen sich $V_{1/2}$ als Spannung der halbmaximalen Öffnungswahrscheinlichkeit und k als Steigungsfaktor der Boltzmann-Funktion interpretieren. In Übereinstimmung mit der Literatur wurde für HERGwt ($n=13$) ein $V_{1/2}$ -Wert von -33.4 ± 1.0 mV und ein Steigungsfaktor von 5.48 ± 0.2 mV erhalten. Für die Mutanten G965X ($n=13$), R1014fsX38 ($n=17$) und V1038fsX20 ($n=13$) ergaben sich $V_{1/2}$ -Werte von -35.3 ± 1.5 mV, -36.5 ± 1.2 mV, beziehungsweise -36.5 ± 1.2 mV und für die Steigungsfaktoren Werte von 5.4 ± 0.3 mV, 5.5 ± 0.3 mV, beziehungsweise 5.7 ± 0.3 mV. Diese Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp (Abbildung 4.12 h und Tabelle 2).

Für die Analyse der Aktivierungszeitkonstanten τ_{act} für Spannungen von -20 mV, 0 mV und +20 mV wurden CHO-Zellen für die Dauer von 20 ms, 40 ms, 60 ms, 100 ms, 180 ms, 340 ms, 660 ms, 1260 ms und 2500 ms auf die entsprechenden Spannungen geklemmt und dann auf -40 mV hyperpolarisiert (τ_{act} -Protokoll). Eine Zunahme der Amplituden der Tail-Ströme bei Hyperpolarisation konnte mit länger andauernden Depolarisationen beobachtet werden (Abbildung 4.13 a). Die gemessenen Tail-Stromamplituden wurden gegen die Stimulusdauer aufgetragen. Der Zeitverlauf konnte mit einer einfach exponentiellen Funktion beschrieben werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Aktivierungszeitkonstanten spannungsabhängig waren und für positivere Spannungen kleiner wurden (Abbildung 4.13 b). Für τ_{act} bei +20 mV von HERGwt, G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 erhielt man Werte von 278 ± 28 ms, 213 ± 18 ms, 266 ± 25 ms, beziehungsweise 177 ± 11 ms ($n=9$, $n=8$, $n=7$, bzw. $n=7$). Die Werte für τ_{act} unterscheiden sich bei -20 mV, 0 mV und +20 mV für alle Mutanten nicht

signifikant vom Wildtyp – bis auf den Wert für τ_{act} bei +20 mV für die Mutante V1038fsX20 (Tabelle 2).

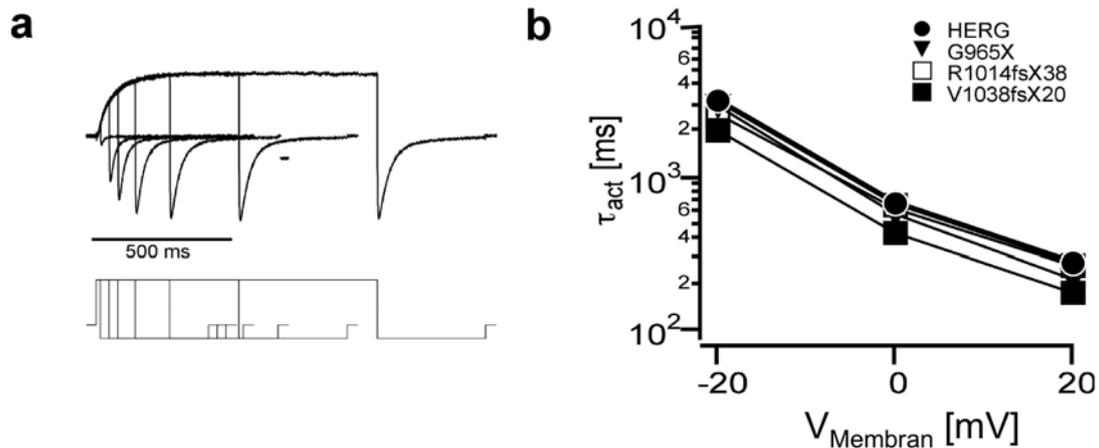


Abbildung 4.13

a) Das Protokoll zur Messung der Aktivierungskonstanten τ_{act} zeigt immer länger werdende Depolarisationen auf eine konstante Spannung (-20 mV, 0 mV und +20 mV). Die Messung zeigte für längere Depolarisationen eine Zunahme der Amplituden der Tail-Einwärtsströme. **b)** Die Aktivierungszeitkonstanten wurden durch Angleichung der Amplituden an eine einfach exponentielle Funktion für Potentiale von -20 mV, 0 mV und +20 mV berechnet. Die Verbindungslinie ist ohne theoretische Bedeutung.

4.2.2 Inaktivierung und Deaktivierung

Für die Untersuchung der Inaktivierung des HERG-Kanals in CHO-Zellen erfolgte für 1 s eine Depolarisation auf eine Spannung von +30 mV, dann wurde für 10 ms auf -80 mV geklemmt, um anschließend die Ströme bei Potentialen von +40 bis -120 mV für 1 s zu messen (τ_{inact} -Protokoll, Abbildung 4.14 a). Die zeitliche Abnahme der Stromamplitude wurde durch eine einfach exponentielle Funktion beschrieben. Die daraus erhaltenen Werte für τ_{inact} wurden gegen das entsprechende Testpotential aufgetragen (Abbildung 4.14 b). Für positivere Testpotentiale erhielt man kleinere Werte für τ_{inact} und somit eine schnellere Inaktivierung.

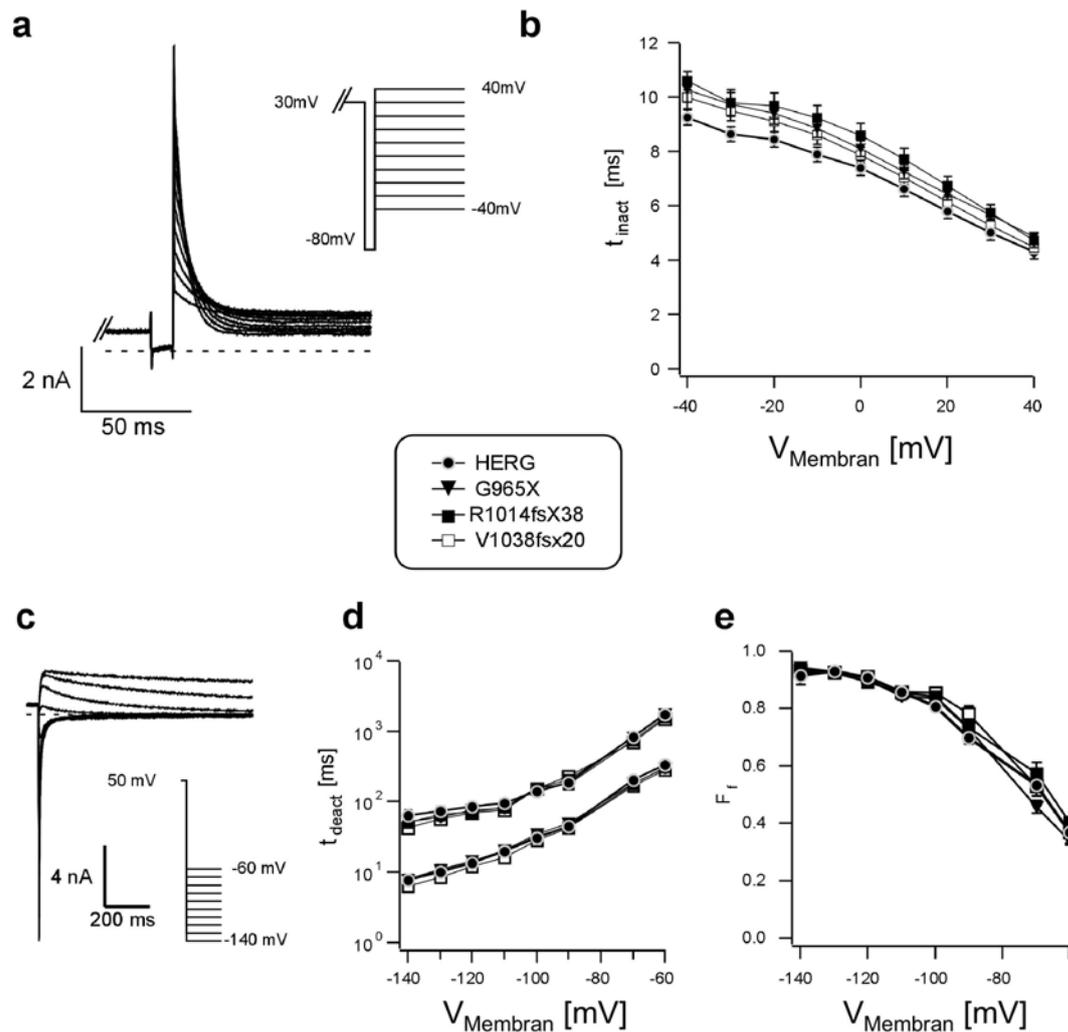


Abbildung 4.14

a) Repräsentative Stromspuren gemessen an mit HERGwt cDNA transfizierten CHO-Zellen. Rechts daneben ist das entsprechende Messprotokoll abgebildet. **b)** Spannungsabhängigkeit der erhaltenen τ_{inact} -Werte aufgetragen gegen das entsprechende Testpotential. **c)** Repräsentative Tail-Stromspuren gemessen an mit HERGwt cDNA transfizierten CHO-Zellen. **d)** Spannungsabhängigkeit der schnellen und der langsamen Deaktivierungszeitkonstante $\tau_{\text{deact,fast}}$ und $\tau_{\text{deact,slow}}$ aufgetragen gegen das entsprechende Testpotential. **e)** Das Verhältnis der Deaktivierungszeitkonstanten F_f ($\tau_{\text{deact,fast}}/\tau_{\text{deact,slow}}$) aufgetragen gegen das jeweilige Testpotential.

Die Verbindungslinien der Inaktivierungs- und Deaktivierungszeitkonstanten sind ohne theoretische Bedeutung.

Die τ_{inact} -Werte für HERGwt, G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 waren 5.0 ± 0.3 ms, 5.7 ± 0.1 ms, 5.7 ± 0.3 ms beziehungsweise 5.3 ± 0.2 ms ($n=8$, $n=9$, $n=12$, bzw. $n=9$). Nur die τ_{inact} -Werte für die Mutante R1014fsX38 unterschieden sich vom Wildtyp ($p < 0.01$, Tabelle 2).

Für die Analyse der Deaktivierung wurden die transfizierten CHO-Zellen für 1 s auf Potentiale von +60mV depolarisiert und anschließend für 4 s auf Potentiale von +50 bis -100mV geklemmt (τ_{deact} -Protokoll, Abbildung 4.14 c). Der Abfall der Stromamplitude nach Hyperpolarisation wurde am besten mit einer biexponentiellen Funktion mit einer langsamen und schnellen Deaktivierungszeitkonstanten $\tau_{\text{deact,fast}}$ und $\tau_{\text{deact,slow}}$ beschrieben. Für die schnelle Deaktivierung des Wildtyps, der Mutanten G965X, R1014fsX38, beziehungsweise V1038fsX20 bei einem Testpotential von -120mV erhielt man Zeitkonstanten von 13 ± 1 ms, 14 ± 2 ms, 14 ± 1 ms, beziehungsweise 12 ± 1 ms ($n=8$, $n=10$, $n=10$, beziehungsweise $n=9$). Die $\tau_{\text{deact,slow}}$ -Werte betragen 84 ± 10 ms, 75 ± 9 ms, 82 ± 8 ms, beziehungsweise 70 ± 8 ms für den Wildtyp, G965X, R1014fsX38, beziehungsweise V1038fsX20 ($n=8$, $n=10$, $n=10$, bzw. $n=9$). Alle erhaltenen Werte wurden gegen das jeweilige Testpotential aufgetragen (Abbildung 4.14 d). Dies zeigte, dass bei positiveren Potentialen die Deaktivierung beschleunigt wurde. Aus dem Verhältnis aus der langsamen und schnellen Zeitkonstante erhielt man Werte, welche mit positiver werdenden Spannung abnahmen (Abbildung 4.14 e).

4.2.3 Ladungstransfer

Ladungstransfer bezeichnet die elektrische Ladung, die innerhalb einer bestimmten Zeit die Membran einer Zelle passiert und wird entsprechend der physikalischen Einheit in Coloumb (C) angegeben. Um den Ladungstransfer während eines Herzaktionspotentials zu simulieren, wurde ein Protokoll mit rampenartig abfallender Spannung verwendet (Hancox et al., 1998). Das Integral unter der Stromkurve entspricht dem elektrischen Ladungstransfer. Das Verhältnis aus Ladungstransfer und Membrankapazität einer Zelle (C_{slow} in F) entspricht dem Ladungstransfer normalisiert auf die Zelloberfläche (gemessen in C/F).

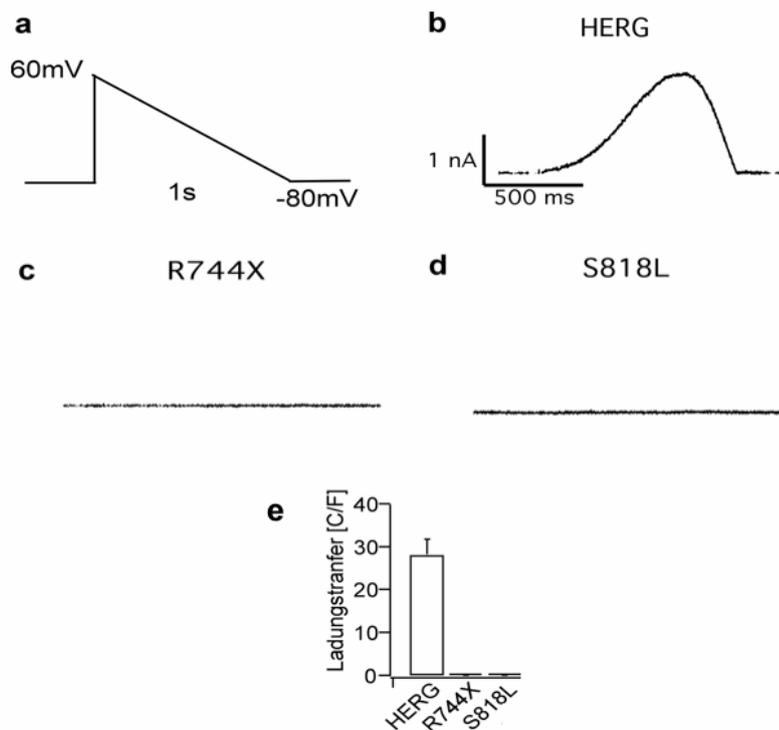


Abbildung 4.15

a) Das *ramp*-Protokoll simuliert ein Herzaktionspotential mit einem schnellen Anstieg auf +60 mV gefolgt von einem kontinuierlichen Abfall der Spannung von +60 mV auf -80 mV (Hancox et al., 1998). **b)** Repräsentative Stromspur gemessen an mit HERGwt cDNA transfizierten CHO-Zellen. **c-e)** An Zellen, die mit den Mutanten R744X und S818L transfiziert worden waren konnte kein HERG-spezifischer Strom gemessen werden.

Nachdem auf ein Potential von +60 mV gesprungen wurde, reduzierte man die Spannung innerhalb von 1 s kontinuierlich bis auf -80 mV (*ramp*-Protokoll, Abbildung 4.15 a). Wie bereits berichtet, produzierten nur die Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 Ströme, während bei den Zellen, die mit den Mutanten R744X und S818L transfiziert wurden, keine Ströme nachweisbar waren (Abbildung 4.15 c-d und 4.16 b-d). Die normalisierten durchschnittlichen Stromkurven der Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 unterschieden sich in ihrer Form nicht von der des Wildtyps (Abbildung 4.16 a-d). Der normalisierte Ladungstransfer für die Mutanten R1014fsX38 und V1038fsX20 unterschieden sich nicht von der Wildtyps. Die Mutante G965X hingegen wies einen um etwa 40% erniedrigten Ladungstransfer auf ($p < 0.05$, Abbildung 4.16 e).

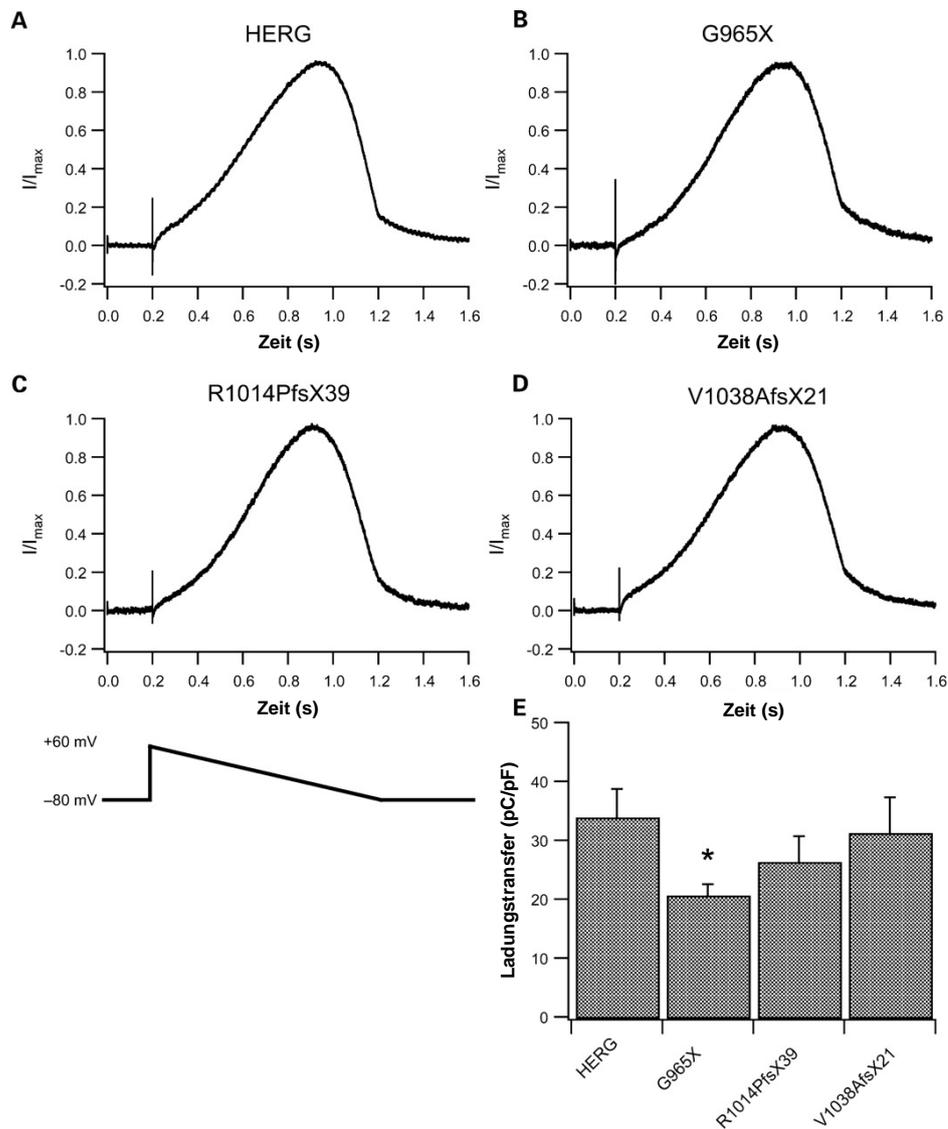


Abbildung 4.16

a) Gemittelte, auf die Membrankapazität normalisierte Stromspur von CHO-Zellen, die mit dem HERGwt transfiziert wurden. **b-d)** Die Zellen, die mit den Mutanten G965X (n=8), R1014fsX38 (n=9) und V1038fsX20 (n=9) transfiziert wurden, produzierten Stromkurven, die der des Wildtyps in Form ähnelten. **e)** Der durchschnittliche Ladungstransfer des HERGwt und der Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 ist dargestellt und zeigt eine etwa 40% Reduktion für die Mutanten G965X im Vergleich mit dem Wildtyp (* entspricht $p < 0.05$).

	HERG	G965X	R1014fsX38	V1038fsX20
$V_{1/2}$ [mV]	-33.4 ± 1.0	-35.3 ± 1.5	-36.5 ± 1.2	-34.0 ± 0.9
Steigungsfaktor [mV]	5.48 ± 0.2	5.4 ± 0.3	5.5 ± 0.3	5.7 ± 0.3
Aktivierung τ_{act} bei +20mV [mV]	278 ± 28	213 ± 18	266 ± 25	$177 \pm 11^{++}$
Deaktivierung τ_{fast} bei -120mV [mV]	13 ± 1	14 ± 2	14 ± 1	12 ± 1
τ_{slow} bei -120mV [mV]	84 ± 10	75 ± 9	82 ± 8	70 ± 8
Inaktivierung τ_{inact} bei +30mV [mV]	5.0 ± 0.3	5.7 ± 0.1	$5.7 \pm 0.3^{++}$	5.3 ± 0.2
n	6-21	6-14	6-11	5-18

Tabelle 2

Der Wert der halbmaximalen Aktivierung und der Steigungsfaktor für die spannungsabhängige Aktivierung, sowie ausgewählte Zeitkonstanten für die Aktivierung, für die Deaktivierung und die Inaktivierung sind für den HERGwt und die HERG-Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 aufgelistet. Das statistische Signifikanzniveau ++ für den Vergleich von HERGwt mit den Mutanten entsprach einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.01$.

4.3 Bestimmung der Proteinexpression und -reifung

Die biophysikalische Charakterisierung der zwei HERG-Mutanten R1014PfsX39 und V1038AfsX21 zeigten in Hinsicht auf Aktivierung, Inaktivierung, Deaktivierung und Stromdichte keinen Unterschied zum Wildtyp auf, wohingegen sich die HERG-Mutante G965X zwar hinsichtlich der Aktivierung, Inaktivierung und Deaktivierung nicht vom Wildtyp unterscheidet, aber eine deutliche Reduktion der Stromdichte aufwies. Um die Proteinexpression und -reifung der unterschiedlichen HERG-Mutanten mit der des Wildtyps zu vergleichen, wurden die HA-markierten Untereinheiten mit Hilfe der *Western Blot* Technik analysiert.

Bei der proteinbiochemischen Auftrennung des HERGwt traten mindestens drei deutliche immunreaktive Banden in Übereinstimmung mit der Literatur auf (Ficker et al., 2000a; Ficker et al., 2000b; Zhou et al., 1998). Man erkennt eine Bande bei 130kDa, welche dem unreifen, unvollständig glykosylierten HERGwt entspricht, sowie zwei weitere deutliche Banden mit Größen über 185kDa, welche reifen und glykosylierten Untereinheiten entsprechen. Sämtliche HERG-Mutanten – außer HERG-R744X – zeigten ähnliche Schemata bei der Auftrennung, obwohl sie unterschiedlich weit wanderten (Abbildung 4.17). Dies ist durch C-terminale Verkürzungen auf die unterschiedliche Größe der Mutanten zurückzuführen. HERG-R744X schien nur in einer niedermolekularen Form vorzuliegen, da nur eine Bande bei 80kDa sichtbar war. Die Untereinheiten von HERG-R744X scheinen deshalb nur in einer nicht glykosylierten Form vorzuliegen und somit nicht den Golgi-Apparat zu erreichen. Die Signalintensität der HERG-Mutanten war vergleichbar mit der des Wildtyps außer für HERG-R744X für die eine deutlich geringere Signalintensität registriert wurde. Für HERG-G965X war sogar eine leicht erhöhte Signalintensität sichtbar. Als Kontrolle wurden CHO-Zellen verwendet, welche nur mit dem leeren pcDNA3 Vektor transfiziert wurden. Man konnte in der Kontrolle eine unspezifische Bande bei 100kDa beobachten, welche auch in allen anderen Proben zu sehen war. Die Proben wurden auf das Proteinniveau des koexprimierten EGFP normalisiert.

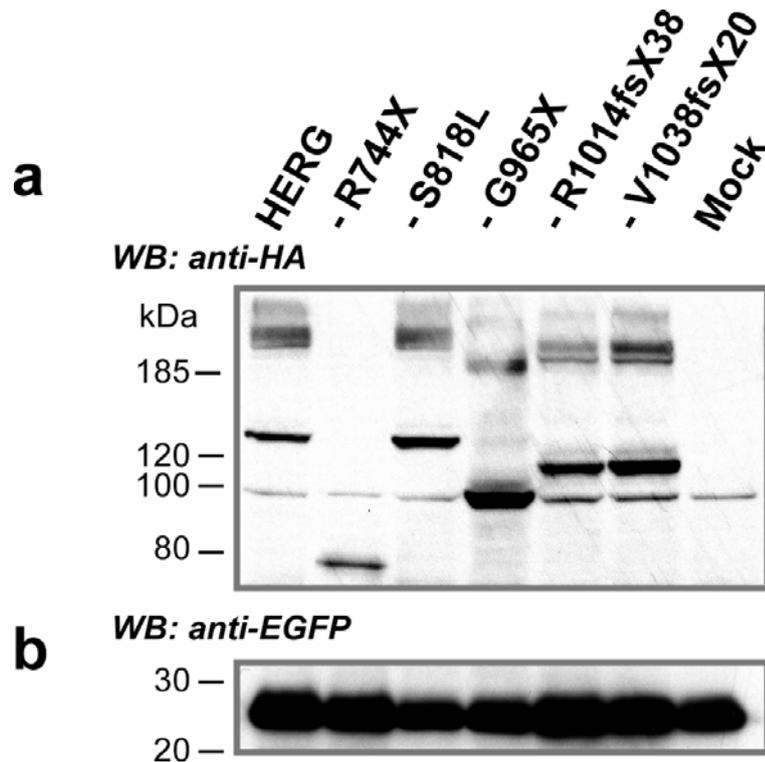


Abbildung 4.17

a) Western Blot Analyse von HA-Epitop markiertem HERGwt und Mutanten, welche in CHO-Zellen transient exprimiert wurden. Für den HERGwt konnten drei immunreaktive Banden beobachtet werden, welche einer unreifen, nur teilweise glykosylierten Form bei 130 kDa und zwei reifen, vollständig glykosylierten Formen über 185kDa entsprechen. Ein ähnliches Bandenmuster wie beim Wildtyp konnte auch bei den Mutanten beobachtet werden. Die Fragmente der Mutanten liefen jedoch unterschiedlich weit. Dies kann auf die verschiedenen molekularen Größen der C-terminal verkürzten Mutanten zurückgeführt werden. CHO-Zellen, die mit dem leeren pcDNA3-Vektor transfiziert wurden, dienten als Kontrolle und erzeugten eine unspezifische Bande bei 100 kDa, welche in allen Proben sichtbar war.

b) Kofransfiziertes EGFP wurde benutzt um die Transfektionseffizienz zu überprüfen und die Menge der Lysate zu normalisieren. Die Größe der Fragmente ist am linken Rand der Abbildung in kDa angegeben.

4.4 Immunzytochemische und elektrophysiologische Analyse der HERG-Mutanten R744X und S818L

4.4.1 Immunzytochemische Analyse der HERG-Mutanten R744X und S818L

Das Ausbleiben eines auswärts gerichteten Kaliumstroms bei den HERG-Mutanten R744X und S818L legt grundsätzlich zwei Möglichkeiten nahe. Die erste Möglichkeit ist, dass die Kanaluntereinheiten nicht in die Zellmembran eingebaut werden, was einen Defekt während der Proteinfaltung, bzw. -transportes hindeutet (Paulussen *et al.*, 2002; Kupersmidt *et al.*, 2002; Furutani *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2000). Die andere Möglichkeit ist, dass die Kanalproteine transportiert und auch in die Membran eingebaut werden, aber keine funktionellen Kanäle ausbilden (Chen *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2001).

Eine Differenzierung dieser beiden grundsätzlichen Mechanismen kann mit Hilfe immunzytochemischer Methoden geschehen. Durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen das zu untersuchende Protein kann dessen genaue Lokalisation und sein spezifisches Verteilungsmuster erkannt werden. Die Konstruktion der HA-Epitop markierten HERG-Mutanten ermöglichte uns den Nachweis der exprimierten Fusionsproteine in COS7-Zellen anhand des HA-Epitops.

Nach der Expression der HERG-Mutanten wurden die HA-Epitop markierten Kanaluntereinheiten mit fluoreszierenden Antikörpern nachgewiesen. Im Gegensatz zum HERGwt, der insbesondere eine gleichmäßige Verteilung über die gesamte Plasmamembran zeigte (Abbildung 4.17 a und b; links), konnte man für HERG-R744X (Abbildung 4.17 c und d; links) und HERG-S818L (Abbildung 4.17 e und f; links) lediglich ein perinukleäres Signal beobachten – und keines an der Plasmamembran. Um die subzelluläre Verteilung der HERG-Mutanten exakter lokalisieren zu können, wurde ein CD4-Rezeptor mit einer C-terminalen AAXX-Fusionssequenz koexprimiert (Zerangue *et al.*, 2001). Der CD4-Rezeptor wird unabhängig vom HERG transportiert und hat seine Hauptlokalisierung an der Plasmamembran (Abbildung 4.17 a, c und e; Mitte). Die Verteilung des HERGwt stimmte sehr

gut mit der Lokalisation des CD4-Rezeptors überein, so dass der Hauptexpressionsort des HERGwt eindeutig der Plasmamembran zugeordnet werden konnte (Abbildung 4.17 a; rechts). Die Mutanten HERG-R744X und S818L, welche hauptsächlich perinukleär lokalisiert werden konnten, zeigten keine Überlappungszonen mit der Verteilung des CD4-Rezeptors an der Plasmamembran (Abbildung 4.17 c und e; rechts). Dies weist darauf hin, dass die Mutanten HERG-R744X und S818L nicht auf der Plasmamembran exprimiert werden.

Für die genaue Zuordnung der intrazellulären Akkumulation von HERG-R744X und S818L wurde ein modifizierter CD4-Rezeptor mit einer C-terminalen KKXX-Fusionssequenz, welche ein ER-Retentionssignal kodiert, koexprimiert (Zerangue *et al.*, 2001). Bei Expression dieses im ER-retinierten CD4_{ER}-Rezeptor konnte man ein deutliches perinukleäres Fluoreszenzsignal erkennen (Abbildung 4.18 b, d und f; Mitte). Wurde der HERGwt koexprimiert, konnte lediglich eine gemeinsame Lokalisation des HERGwt mit dem CD4_{ER}-Rezeptor in perinukleären Bereichen beobachtet werden (Abbildung 4.18 b; rechts). Die Koexpression der HERG-R744X Mutante mit dem CD4_{ER}-Rezeptor zeigte einen fast kompletten Überlappungsbereich der HERG-Mutante mit dem CD4_{ER}-Rezeptor (Abbildung 4.18 d; rechts). Dies – in Übereinstimmung mit den Daten der Proteinexpression und -reifung – weist auf eine fast komplette Retention von HERG-R744X im ER hin. Im Gegensatz zu HERG-R744X waren bei HERG-S818L – in Übereinstimmung mit dem proteinbiochemischen Nachweis glykosylierter Untereinheiten – außer der fast kompletten Überlappung im perinukleären Bereich einige zusätzliche, peripherere Lokalisationen von HERG-S818L zu finden (Abbildung 4.18 f; rechts). Dies deutet auf ein möglicherweise defektes Transportsignal hin.

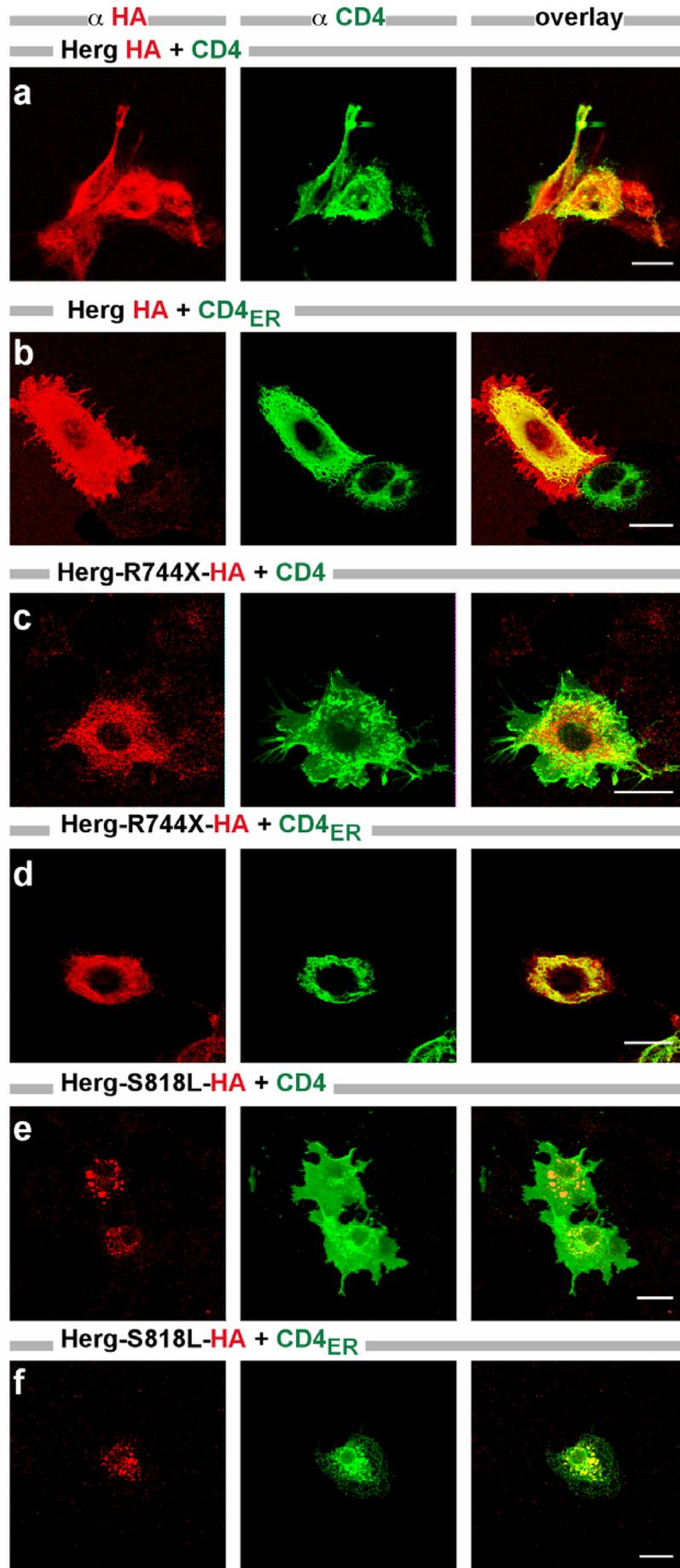


Abbildung 3.18

a) HERGwt und der CD4-Rezeptor konnten beide in intrazellulären Regionen und an der Plasmamembran detektiert werden. **b)** Der CD4_{ER}-Rezeptor, welcher im ER retiniert wird, zeigte nur Überlappungen mit dem HERGwt im perinukleären Bereich. **(c – d)** HERG-R744X und **(e – f)** HERG-S818L konnten im Gegensatz zum CD4-Rezeptor nicht an der Plasmamembran nachgewiesen werden. Die HERG-Mutanten zeigten jedoch eine fast komplette Kolo-kalisation mit dem Signal des CD4_{ER}-Rezeptors.

4.4.2 Koexpression des HERGwt mit den HERG-Mutanten R744X und S818L

Eine Reduktion der Stromdichte von HERGwt durch die Koexpression mit im ER retinierten HERG-Mutanten wurde bereits von verschiedenen Gruppen beschrieben (Kagan *et al.*, 2000; Paulussen *et al.*, 2002; Sanguinetti *et al.*, 1996; Zou *et al.*, 1998). Um herauszufinden, ob auch in unserem Fall die gemeinsame Expression der HERG-Mutanten R744X und S818L mit dem HERGwt zu einer Beeinträchtigung der Expression oder der Funktion von HERGwt-Strömen führt, wurde HERGwt mit HERG-R744X, bzw. HERG-S818L zusammen transfiziert. Es wurde das IV_{30s}-Protokoll verwendet und bei der Analyse wurden die maximalen Stromdichten miteinander und mit HERGwt verglichen. Für den HERGwt ergab sich eine Stromdichte von 23.1 ± 3.5 pA/pF (n=10). Dieser Wert unterschied sich kaum von den Stromdichten, die man erhielt, wenn man HERGwt mit HERG-R744X oder HERG-S818L zusammen transfizierte – nämlich 23.9 ± 3.0 pA/pF, bzw. 23.8 ± 2.1 pA/pF (n=16, bzw. n=14). Die zusätzliche Expression der HERG-Mutanten führte also weder zu einer verstärkten noch reduzierten Stromdichte. Vergleicht man aber diese Stromdichten mit denen aus Messungen von CHO-Zellen, die mit einer doppelten Konzentration an HERGwt transfiziert worden waren, dann erreichte man einen Wert von 36.7 ± 2.9 pA/pF (n=14). Dieser Unterschied war statistisch hochsignifikant (Abbildung 4.19 a). Weiterhin wurde eine mögliche Veränderung der spannungsabhängigen Aktivierung durch Koexpression der HERG-Mutanten mit dem HERGwt untersucht. Man konnte

jedoch keinen Unterschied in der spannungsabhängigen Aktivierung beobachten, wenn man den HERGwt mit den Koexpressionen verglich (Abbildung 4.19 b).

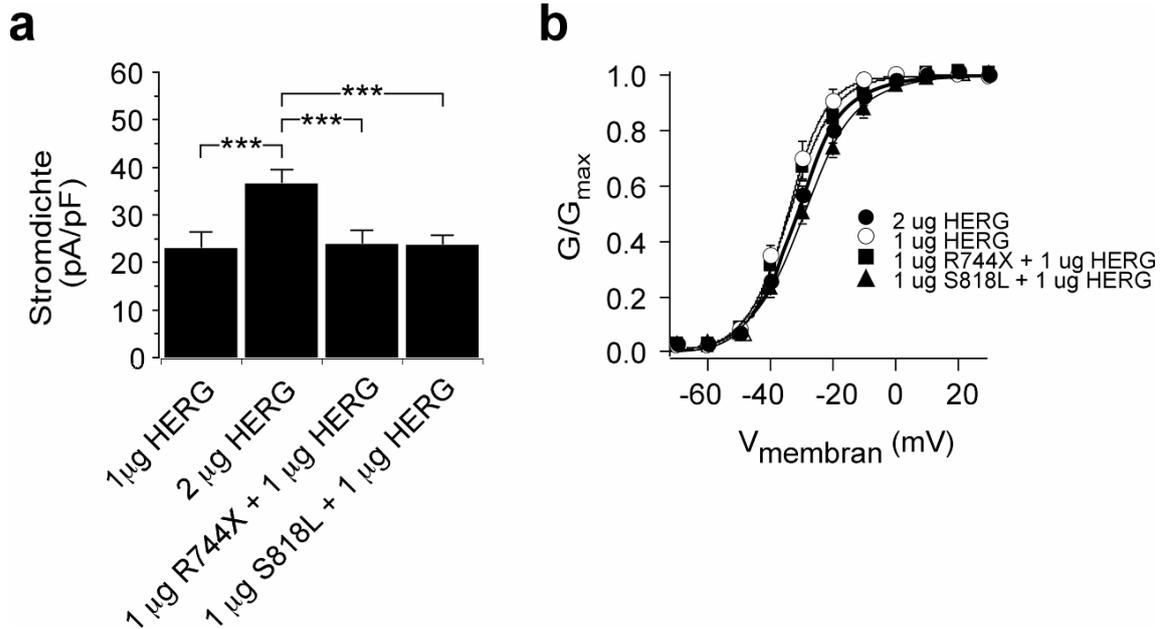


Abbildung 4.19

a) Bei der Expression von 1 µg HERGwt und Koexpression von 1 µg HERGwt mit 1 µg HERG-R744X oder HERG-S818L waren ähnliche Stromdichten zu beobachten. Diese waren deutlich kleiner als die Stromdichten, die für CHO-Zellen gemessen wurden, welche mit 2 µg HERGwt transfiziert wurden. **b)** Beim Vergleich der spannungsabhängigen Aktivierung des HERGwt mit den koexprimierten Untereinheiten konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. (***) entspricht $p < 0.001$)

4.5 Proteinstabilität der Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20

Um die Proteinstabilität von HERG und der HERG Mutanten zu untersuchen, verwendeten wir ein Tet-Off System, um die Transkription der transfizierten cDNA zu bestimmten Zeitpunkten durch die Zugabe von Doxzyklin zum Kulturmedium zu supprimieren (Gossen und Bujard, 1992). Die Expressionsniveaus wurden auf die kotransfizierte EGFP Menge normalisiert, welche unabhängig vom Tet-Off System exprimiert wurde. Für den Vergleich wurden zwei Zeitpunkte ausgesucht: 24h nach Transfektion zur Bestimmung der anfänglichen Proteinmenge (0h) und 16h nach Zugabe von Doxzyklin zum Kulturmedium (16h) (Abbildung 4.19). HERGwt und HERG-G965X wiesen nach 16h ähnliche Proteinmengen auf. HERG-R1014PfsX39 und HERG-1038fsX20 zeigten nach 16h einen deutlich stärkeren Abfall. Dies deutet auf eine verminderte Proteinstabilität der Mutantenproteine hin (Abbildung 4.20). Hingegen konnte kein Unterschied der Proteinstabilität der HERG-Mutanten verglichen mit dem HERGwt festgestellt werden, wenn die HERG Mutanten mit HERGwt koexprimiert wurden. Dies deutet daraufhin, dass aus Wildtyp und Mutante bestehende heteromere Kanalkomplexe deutlich stabiler waren als entsprechende Mutante homomultimere Komplexe.

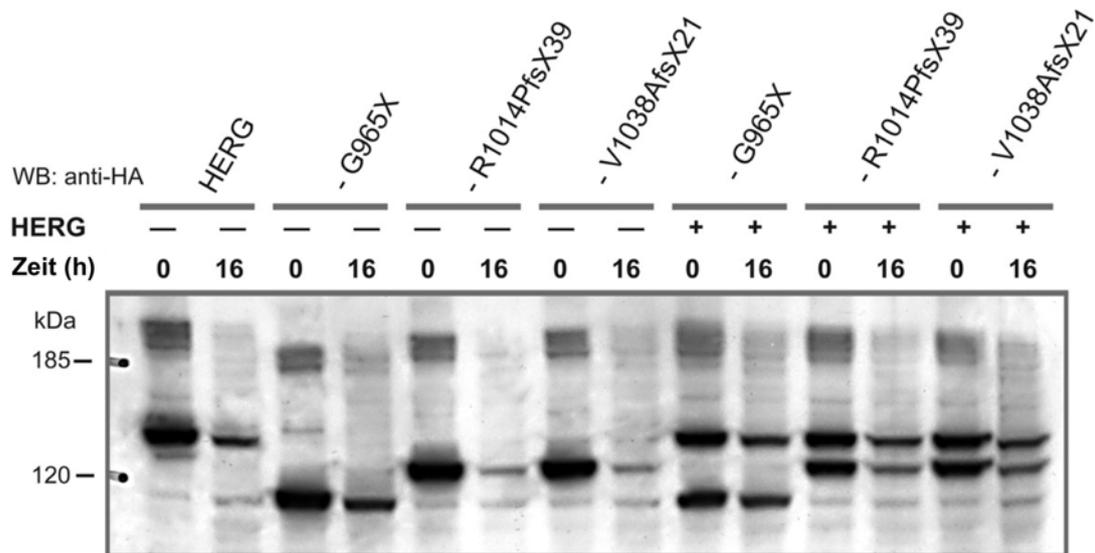


Abbildung 4.20

Western Blot Analyse zur Bestimmung der Proteinstabilität der homo- und heteromeren HERG Kanalkomplexe nach Expression in CHO-Zellen unter Verwendung eines Tet-Off Systems (Gossen und Bujard, 1992). Die Zellextrakte wurden entweder 24h nach Transfektion (Zeit 0h) oder nach einer 16 stündigen Suppression der cDNA Expression durch Zugabe von Doxyzyklin zum Kulturmedium vorbereitet und aufgetragen. Die Lysate wurden auf die Proteinmenge von EGFP normalisiert. Am linken Rand finden sich Größenangaben in kDa.

4.6 Molekulare und funktionelle Interaktion der Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 mit dem Protein 14-3-3 ϵ

Die Bindung von 14-3-3 ϵ an den PKA-phosphorylierten HERG führt zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu negativeren Potentialen (von ungefähr 10mV). Für die molekulare Interaktion von 14-3-3 ϵ mit HERG muss dieser an zwei spezifischen Serinen (S283 und S1137) durch PKA phosphoryliert vorliegen. Da bei den hier untersuchten HERG-Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 die C-terminale PKA-Phosphorylierungsstelle (S1137) aufgrund von Verkürzungen nicht vorhanden war, konnte ein Ausbleiben der Modulation durch 14-3-3 ϵ angenommen werden.

4.6.1 Molekulare Interaktion der HERG-Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 mit 14-3-3 ϵ

Zunächst wurde die Interaktion der HERG-Mutanten mit dem Protein 14-3-3 ϵ untersucht. Dafür wurden die HA-Epitop markierten HERG-Untereinheiten zusammen mit 14-3-3 ϵ transient in CHO-Zellen koexprimiert. Die erfolgreiche Expression der Proteine wurde in entsprechenden Westernblots mittels anti-14-3-3 ϵ und anti-HA Antikörper nachgewiesen. Eine Komplexbildung zwischen beiden Proteinen wurde durch Koimmunopräzipitation nachgewiesen (Abbildung 4.21). Sämtliche Proteinmengen wurden auf das 14-3-3 ϵ Signal in Westernblots normalisiert.

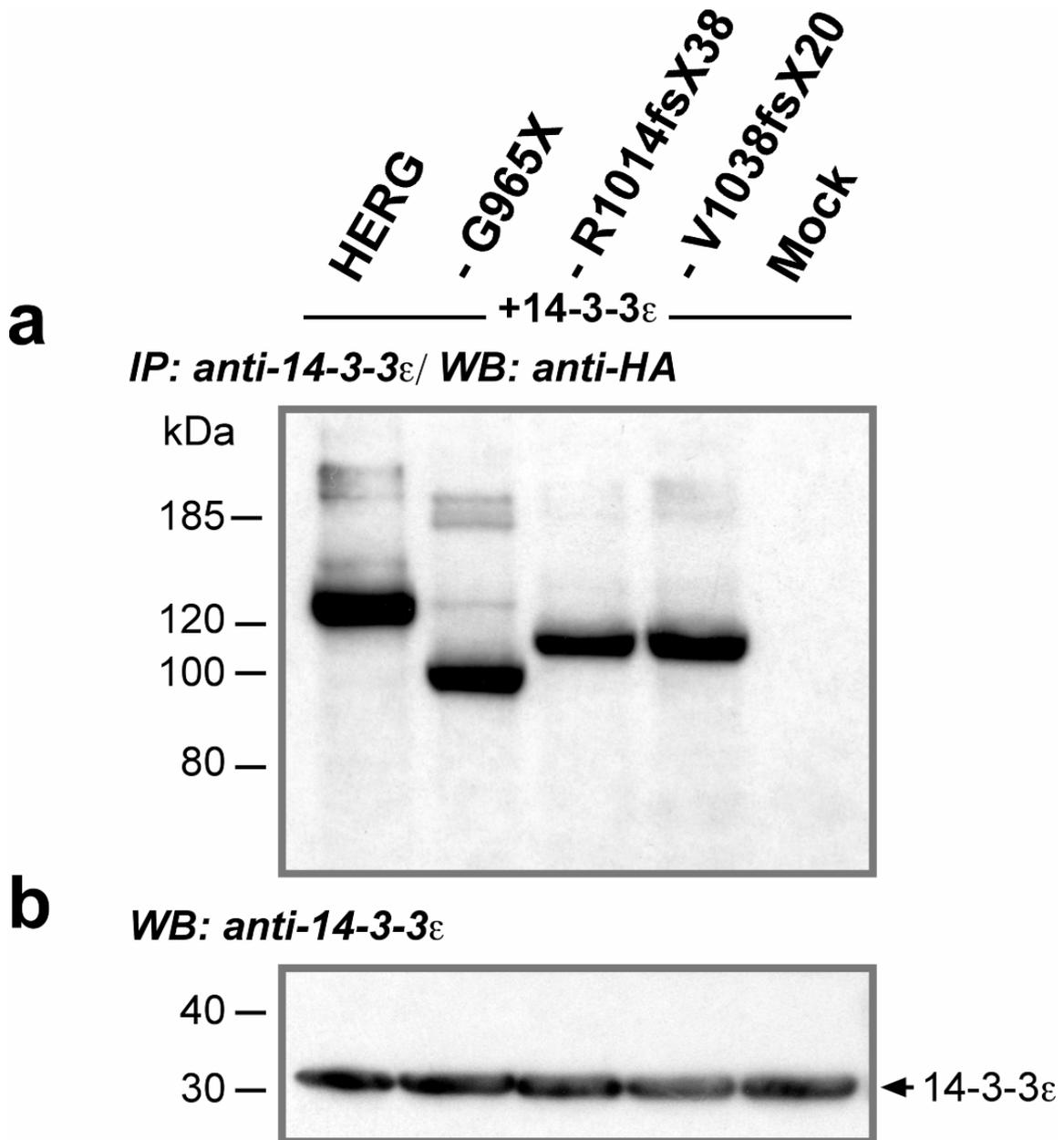


Abbildung 4.21

a) Der HA-Epitop markierte HERGwt und die HERG-Mutanten wurden mit 14-3-3 ϵ in CHO-Zellen koexprimiert und anschließend mit anti-14-3-3 ϵ Antikörpern immunopräzipitiert. Anschließend wurde die HERG-Untereinheiten mit Hilfe von anti-HA Antikörpern detektiert. Man kann deutlich erkennen, dass sämtliche HERG-Untereinheiten mit 14-3-3 ϵ interagierten, da in allen Proben eine deutliche Bande durch anti-HA Antikörper detektiert werden konnte. Mit Mock ist die Negativ-Kontrolle markiert, welche auch keine detektierbare Bande aufzeigt. **b)** Die Menge der Proteine wurde immer auf das Proteinniveau von 14-3-3 ϵ normalisiert. Am linken Rand sind die Größenangaben in kDa angegeben.

4.6.2 Funktionelle Modulation der HERG-Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 durch 14-3-3 ϵ

Um den Einfluss von 14-3-3 ϵ auf die biophysikalischen Eigenschaften der HERG-Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 zu untersuchen, wurden die HERG-Untereinheiten zusammen mit 14-3-3 ϵ transient in CHO-Zellen exprimiert. Indem ein bicistronischer Expressionsvektor verwendet wurde, in welchem EGFP und 14-3-3 ϵ gekoppelt vorlagen, konnte die Expression von 14-3-3 ϵ durch die nachweisbare Präsenz von EGFP kontrolliert werden. Für die elektrophysiologische Untersuchung klemmte ich die CHO-Zellen auf ein Haltepotential von -80 mV. Nachdem die Zellen für 3,5 s auf Testpotentiale zwischen -60 und +50 mV depolarisiert wurden, klemmte ich die Zellen auf ein konstantes Potential von -40 mV, um die Tail-Ströme zu messen (IV_{3,5s}-Protokoll).

Mit dem IV_{3,5s}-Protokoll erhielt ich -6.3 ± 0.6 mV als Wert der halbmaximalen Aktivierung für den HERGwt (n=12). Dieser Wert war vergleichbar mit den Spannungen, bei welchen die Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 ihre halbmaximale Aktivierung erreichten, und zwar -4.0 ± 1.0 mV, -7.6 ± 0.7 mV, beziehungsweise -7.1 ± 0.7 mV (n=6, n=7, beziehungsweise n=7). Auch die Strom-Spannungs-Beziehungen der Mutanten waren kaum unterscheidbar von der Kurve, welche sich für den HERGwt ergab. Die glockenförmigen Strom-Spannungs-Beziehungen erreichten alle ihr Maximum bei einer Spannung von etwa 10 mV. Dies galt jedoch nicht für HERG-G965X, welche bereits bei etwa 0mV ihr Maximum erreichte und somit negativer lag als der Wildtyp (Abbildung 4.22 a – d; links). Wurde jedoch 14-3-3 ϵ mit dem HERGwt koexprimiert, dann war eine Verschiebung der glockenförmigen Strom-Spannungs-Beziehung zu negativeren Spannungen zu beobachten (Abbildung 4.22 a, rechts). Dies konnte deutlich an der Verschiebung des Maximums zu etwa 0mV erkannt werden. Eine ähnliche Verschiebung zu negativeren Potentialen konnte man auch für die spannungsabhängige Aktivierung beobachten (Abbildung 4.22 a; links).

	V1/2 [mV]	Steigungsfaktor [mV]	n
HERG	-6.3 ± 0.6	6.8 ± 0.2	12
HERG &14-3-3 ϵ	$-17.1 \pm 1.0^{***}$	6.9 ± 0.1	8
G965X	-4.0 ± 1.0	9.5 ± 0.5	6
G965X &14-3-3 ϵ	-6.9 ± 1.6	8.5 ± 0.5	7
R1014fsX38	-7.6 ± 0.7	8.5 ± 5.4	7
R1014fsX38 &14-3-3 ϵ	-6.8 ± 1.2	8.4 ± 0.3	5
V1038fsX20	-7.1 ± 0.8	8.4 ± 0.4	7
V1038fsX20 &14-3-3 ϵ	$-1.4 \pm 1.3^{**}$	9.3 ± 4.3	5

Tabelle 3

Die spannungsabhängige Aktivierung wurde durch die in Abbildung 4.20 abgebildeten Experimente ermittelt. Das statistische Signifikanzlevel wurde jeweils im Vergleich von Wildtyp oder Mutante ohne 14-3-3 ϵ zu Wildtyp oder Mutante mit 14-3-3 ϵ berechnet (** entspricht $p < 0.01$ und *** entspricht $p < 0.001$).

Die Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung für HERGwt mit 14-3-3 ϵ erreichte ihre halbmaximalen Aktivierung bei einer Spannung von -17.1 ± 1.0 mV (n=8). Eine vergleichbare Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung oder der Strom-Spannungs-Beziehung durch die Koexpression von 14-3-3 ϵ konnte für die Mutanten G965X und R1014fsX38 nicht beobachten werden (Abbildung 3.22 b – d). Die halbmaximale Aktivierung für HERG-G965X und HERG-R1014fsX38 betrug -6.91 ± 1.6 mV, beziehungsweise -6.75 ± 1.2 mV (n=7, beziehungsweise n=5). Diese Werte unterschieden sich somit nicht von den Werten, welche man für die alleinige Expression der Mutanten ohne 14-3-3 ϵ erhielt.

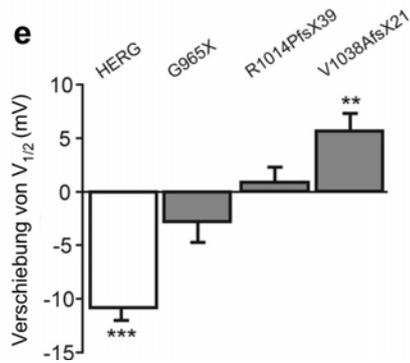
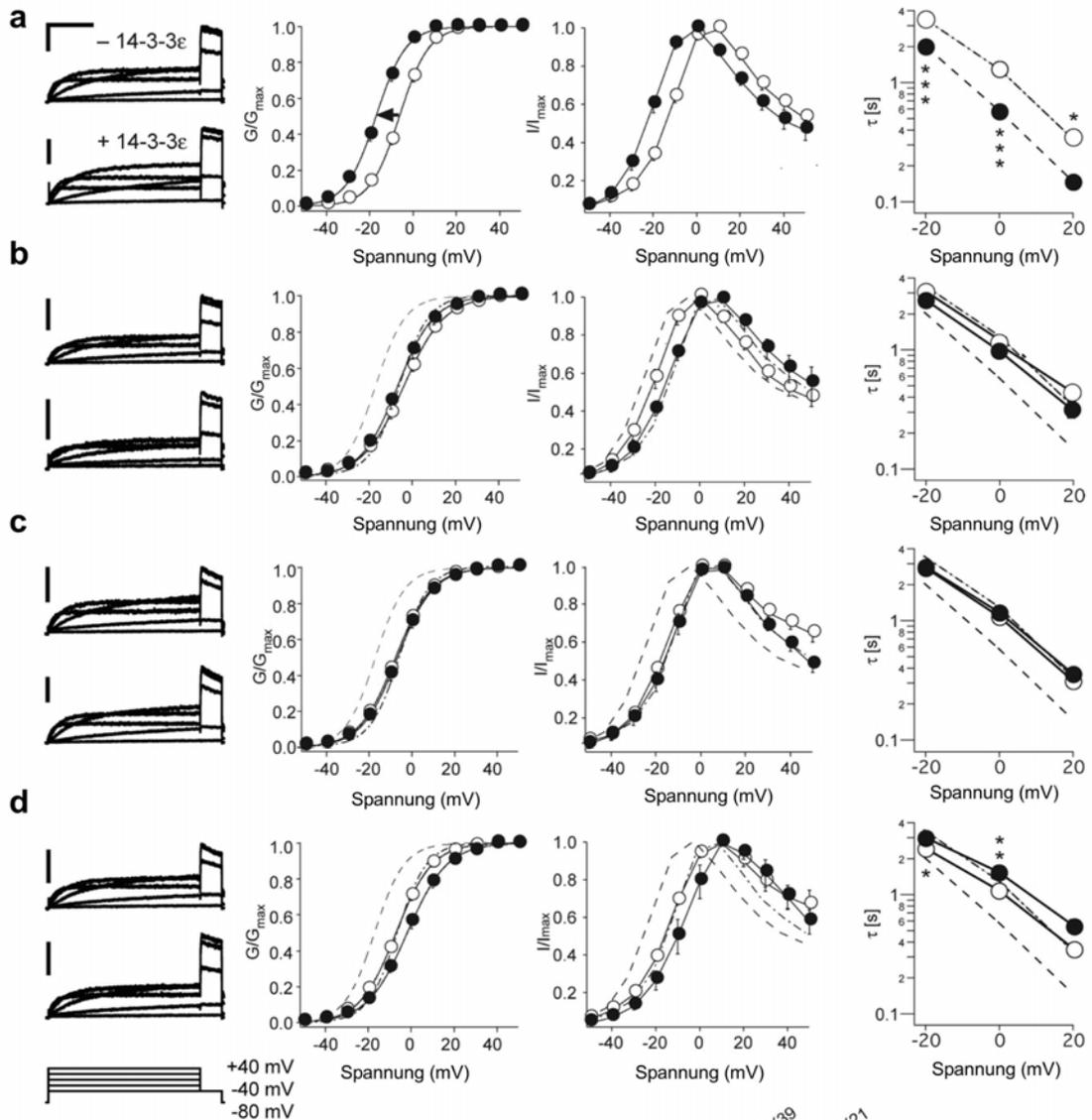


Abbildung 4.22

Koexpression von HERG, HERG-G965X, HERG-1014PfsX39 und HERG-V1038AfsX21 mit 14-3-3 ϵ . Repräsentative Stromspuren (linke Spalte) von HERGwt oder HERG Mutanten in Anwesenheit (obere Stromspur der jeweiligen Zeile) und in Abwesenheit von 14-3-3 ϵ (untere Stromspur der jeweiligen Zeile). **a)** Die spannungsabhängige Aktivierung des HERGwt mit 14-3-3 ϵ zeigt eine Verschiebung zu negativeren Potentialen verglichen mit HERGwt ohne 14-3-3 ϵ (zweite Spalte). Die glockenförmige Strom-Spannungs-Kurve des HERGwt mit 14-3-3 ϵ zeigt eine ähnliche Verschiebung zu negativeren Potentialen verglichen mit HERGwt ohne 14-3-3 ϵ (dritte Spalte). Außerdem ist die HERG Kanalaktivierung in der Gegenwart von 14-3-3 ϵ schneller, was sich in kleineren Aktivierungszeitkonstanten widerspiegelt (rechte Spalte) **b)** Für HERG-G965X konnte kein Effekt von 14-3-3 ϵ weder auf die spannungsabhängige Aktivierung, noch auf die glockenförmige Strom-Spannungs-Kurve und auch nicht auf die Aktivierungszeitkonstanten beobachtet werden. **c)** HERG-R1014fsX38 zeigte in Anwesenheit von 14-3-3 ϵ eine spannungsabhängige Aktivierung und eine glockenförmige Strom-Spannungs-Kurve, welche sich nicht von denen in der Abwesenheit von 14-3-3 ϵ unterschieden. Es konnte auch keine Änderung der Kanalaktivierung beobachtet werden. **d)** Zellen, die HERG-V1038fsX20 und 14-3-3 ϵ exprimierten, zeigten bezüglich der spannungsabhängigen Aktivierung und auch die glockenförmige Strom-Spannungs-Kurve eine deutliche Verschiebung zu positiveren Potentialen verglichen mit Zellen, die nur mit HERG-V1038fsX20 transfiziert wurden. Die Aktivierungszeitkonstanten für Spannungen von -20 und 0mV erhöhten sich signifikant durch die Anwesenheit von 14-3-3 ϵ . **e)** Der Vergleich der Veränderung von $V_{1/2}$ zeigt für HERGwt eine signifikante Verschiebung zu negativen Potentialen und für HERG-V1038fsX20 keine deutliche Verschiebung zu positiveren Spannungen, aber keine Veränderung für HERG-G965X und HERG-R1014PfsX39.

Die gestrichelten Kurven zeigen den HERGwt in Abwesenheit (gepunktet und gestrichelt) und in Gegenwart von 14-3-3 ϵ (nur gestrichelt).

Die Verbindungslinien der Aktivierungszeitkonstanten haben keine theoretische Bedeutung. Die spannungsabhängige Aktivierung des HERGwt mit und ohne 14-3-3 ϵ wurde in sämtliche Abbildungen der Mutanten gestrichelt mit eingezeichnet um den Unterschied zu verdeutlichen. (* entspricht $p < 0.05$; ** entspricht $p < 0.01$ und *** entspricht $p < 0.001$)

Die Koexpression von 14-3-3 ϵ mit HERG-V1038fsX20 führte zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu depolarisierenden Potentialen mit einem $V_{1/2}$ -Wert von -1.42 ± 1.3 mV (n=5). Eine Verschiebung des Maximums der Strom-Spannungs-Kurve zu negativeren Potentialen konnte für die HERG Mutanten nicht beobachtet werden (Abbildung 4.22 b – d).

Der Vergleich der Verschiebung der $V_{1/2}$ -Werte durch 14-3-3 ϵ ergab für HERGwt eine hoch signifikante Verschiebung von 10.8 ± 1.2 mV zu negativeren Spannungen. Für die Mutanten G965X und V1038fsX20 konnte kein Effekt durch die Koexpression von 14-3-3 ϵ beobachtet werden (Abbildung 4.22 b und d und Tabelle 3). Die Anwesenheit von 14-3-3 ϵ veränderte hingegen die spannungsabhängige Aktivierung von R1014fsX38, indem eine Verschiebung von 5.69 ± 1.7 mV zu positiveren Potentialen zu beobachten war (Abbildung 4.22 e und Tabelle 3).

4.6.3 Funktionelle Modulation der mit HERGwt koexprimierten HERG-Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 durch 14-3-3 ϵ

Im weiteren wurde untersucht, ob der Effekt der Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 auf die durch 14-3-3 ϵ hervorgerufenen Effekte dominant war.

Zuerst untersuchten wir, ob der HERGwt mit den HERG Mutanten heteromere Kanalkomplexe bildet. Immunpräzipitationsexperimente mit *flag* Epitop-markierten HERGwt Untereinheiten und HA Epitop-markierten HERG Mutanten Untereinheiten belegten, dass alle drei HERG Mutanten Untereinheiten mit dem HERGwt interagierten (Isbrandt et al., 2002; Abbildung 4.23 a). Um den heterozygoten Zustand zu simulieren und verlässlich die unterschiedlichen cDNAs mit 14-3-3 ϵ zu koexprimieren, erstellte ich einen bi-cistronischen Expressionsvektor, welcher die cDNA des HERGwt und eine der HERG Mutanten enthielt (Abbildung 4.23 b). Da die cDNA des HERGwt und der HERG Mutanten unter der Kontrolle

unterschiedlicher Promotoren stand, wurde untersucht, in welchem relativen Verhältnis die exprimierten Proteinmengen zueinander standen (Abbildung 4.23 c). Da die Expression der HERG Mutanten cDNA unter der Kontrolle des starken $P_{EF-1\alpha}$ Promotors stand und die cDNA der jeweiligen HERG Mutante durch den schwächeren P_{CMV} Promotors kontrolliert wurde, wurden höhere Proteinmengen an HERGwt Untereinheiten erhalten (Schulze-Bahr et al., 2003; Abbildung 4.23 c).

Für die Koexpression der heteromeren HERG Kanalkomplexe mit 14-3-3 ϵ wurde der bereits verwendete Vektor verwendet, in welchem 14-3-3 ϵ und EGFP miteinander gekoppelt vorlagen. Dies ermöglichte auch die Selektion transfizierter Zellen.

Für die elektrophysiologische Untersuchung klemmte ich die CHO-Zellen auf ein Haltepotential von -80mV und verwendete das bereits bekannte $IV_{3,5s}$ -Protokoll. Nachdem die Mutanten mit dem Wildtyp koexprimiert wurden, erhielt ich in der Abwesenheit von 14-3-3 ϵ spannungsabhängige Aktivierungen, welche denen des Wildtyps ähnelten. Die halbmaximale Aktivierung für die Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 koexprimiert mit dem HERGwt ergab Werte von $-8.0 \pm 1.2 \text{ mV}$, $-10.4 \pm 0.9 \text{ mV}$, beziehungsweise $-4.9 \pm 1.4 \text{ mV}$ (Tabelle 4; $n=8$, $n=13$, beziehungsweise $n=9$). Diese $V_{1/2}$ -Werte der HERG-Mutanten unterschieden sich kaum vom Wildtyp mit einer Spannung der halbmaximalen Aktivierung von $-6.6 \pm 1.3 \text{ mV}$ ($n=12$). Die Steigungsfaktoren der Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 betragen $11.9 \pm 0.9 \text{ mV}$, $10.5 \pm 0.7 \text{ mV}$, beziehungsweise $13.0 \pm 1.2 \text{ mV}$ ($n=8$, $n=13$, beziehungsweise $n=9$). Da der Steigungsfaktor für den Wildtyp $11.2 \pm 0.5 \text{ mV}$ betrug ($n=12$), unterschieden sich auch die Steigungsfaktoren der Mutanten nicht von dem des Wildtyps.

Wurde der Wildtyp zusammen mit 14-3-3 ϵ exprimiert, dann konnte man die bereits beschriebene Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung in Richtung negativer Potentiale erkennen. Der $V_{1/2}$ -Wert für HERGwt mit 14-3-3 ϵ betrug $-15.2 \pm 0.9 \text{ mV}$ und verschob sich somit um $8.5 \pm 1.6 \text{ mV}$ zu negativeren Spannungen (Abbildung 4.23 d; $n=16$). Die Präsenz von 14-3-3 ϵ hatte keinen Effekt auf den $V_{1/2}$ -Wert der Mutanten, welche mit HERGwt koexprimiert wurden. Für die Spannungen der halbmaximalen Aktivierung der

Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 erhielt man Werte von -8.2 ± 1.6 mV, -12.7 ± 1.5 mV, beziehungsweise -8.2 ± 1.0 mV (Abbildung 4.23 d und Tabelle 4; n=8, n=12, beziehungsweise n=7). Somit bewirkte die Anwesenheit von 14-3-3 ϵ keine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung der HERG Mutanten, wie sie beim HERGwt zu beobachten war. Allen gemeinsam war jedoch die Tatsache, dass weder der Wildtyp, noch die mit dem Wildtyp koexprimierten Mutanten eine Veränderung des Steigungsfaktors aufwiesen – sei es mit oder ohne 14-3-3 ϵ (Tabelle 4). Im Gegensatz zum HERGwt, der durch 14-3-3 ϵ in seinem $V_{1/2}$ -Wert um 8.5 ± 1.6 mV zu negativeren Spannungen verschoben wurde, konnte man für die HERG-Mutanten keine Veränderung – weder zu positiveren, noch zu negativeren Spannungen – beobachten (Abbildung 4.23 e).

	$V_{1/2}$ [mV]	Steigungsfaktor [mV]	n
HERGwt	-6.6 ± 1.3	11.2 ± 0.5	12
HERGwt & 14-3-3 ϵ	$-15.2 \pm 0.9^{***}$	8.6 ± 0.5	16
G965X & HERGwt	-8.0 ± 1.2	11.9 ± 0.9	8
G965X mit HERGwt & 14-3-3 ϵ	-8.2 ± 1.6	11.7 ± 0.4	8
R1014fsX38	-10.4 ± 1.0	10.5 ± 0.7	13
R1014fsX38 mit HERGwt & 14-3-3 ϵ	-12.7 ± 1.5	9.6 ± 1.4	12
V1038fsX20	-4.9 ± 1.4	13.0 ± 1.2	9
V1038fsX20 mit HERGwt & 14-3-3 ϵ	-8.2 ± 1.0	11.5 ± 1.3	7

Tabelle 4

Die halbmaximalen Aktivierungspotentiale $V_{1/2}$ und die Steigungsfaktoren für HERGwt und die mit HERGwt koexprimierten HERG Mutanten in Gegenwart oder Abwesenheit von 14-3-3 ϵ . Die statistische Auswertung verglich jeweils HERGwt oder HERG Mutante ohne 14-3-3 ϵ mit HERGwt oder HERG Mutante mit 14-3-3 ϵ (***) entspricht $p < 0.001$).

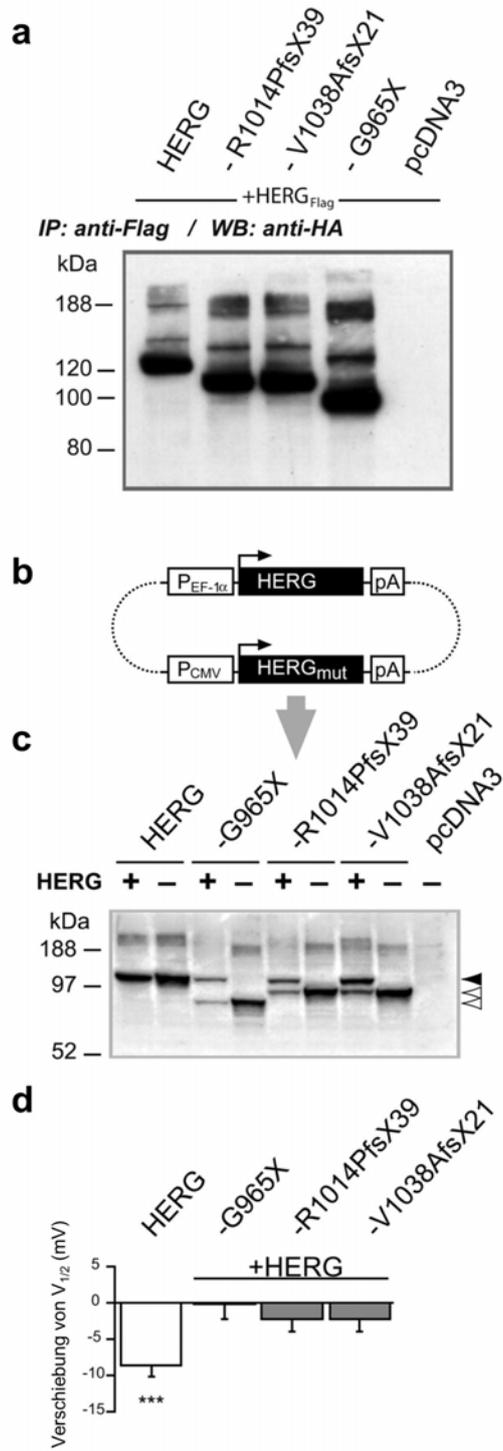


Abbildung 4.23

Koexpression von HERGwt mit HERG-G965X, HERG-R1014fsX39 oder HERG-V1038AfsX21 in Abwesenheit oder in Gegenwart von 14-3-3 ϵ . **a)** Immunpräzipitation von *flag* Epitop-markierten HERGwt koexprimiert mit HA Epitop-markierten HERGwt oder HERG Mutante und anschließendes Immunoblotting und Detektion mit anti-HA Antikörpern zeigt das alle HERG Mutanten Untereinheiten heteromere Kanalkomplexe mit HERGwt Untereinheiten bilden. **b)** Schematische Darstellung eines bi-cistronischen Expressionskonstrukts, welches für die Koexpression von HERGwt mit HERG Mutanten in der Abwesenheit und Gegenwart von 14-3-3 ϵ verwendet wurde. HERGwt und HERG-Mutanten cDNA sind auf einem gemeinsamen Plasmid lokalisiert. Weiterhin befinden sich Promotoren (PCMV, PEF-1 α) und Polyadenylationssignale (pA) als strukturelle durch weiße Kästchen gekennzeichnet auf dem Vektor. Das Startcodon des offenen Leserahmens ist durch einen horizontalen Pfeil gekennzeichnet. **c)** Western-Blot Analyse zur Abschätzung der relativen Proteinmengen an HERGwt und HERG-Mutanten nach Expression in CHO-Zellen mit Hilfe des oben dargestellten bi-cistronischen Plasmids (Spalten mit +). Zum Vergleich wurden Lysate von CHO-Zellen aufgetragen, welche mit einem HERGwt oder einer der HERG Mutanten codierenden pcDNA3-Vektor transfiziert wurden (Spalten mit -). HERG Protein wurde mit Hilfe von Antikörpern, welche gegen den N-Terminus von HERG gerichtet waren, detektiert. Die Pfeile rechts markieren die Positionen der nur teilweise glykosylierten Untereinheiten von HERGwt (schwarzer Pfeil) und der HERG Mutanten (weiße Pfeile). **d)** Analyse der 14-3-3 ϵ -induzierten Verschiebung von V1/2 in Experimenten der mit HERGwt koexprimierten HERG Mutanten. Die signifikante Verschiebung des V1/2-Wertes von HERGwt (n=12) zu negativeren Potentialen konnte für die HERG Mutanten (n=7-8) nicht beobachtet werden. (***) entspricht p<0.001)

4.7 Computergestützte Simulation einer ventrikulären Kardiomyozyte

Um die pathophysiologische Relevanz des Verlustes des 14-3-3 ϵ -induzierten Effektes auf den HERG zu untersuchen, wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. Clancy eine computergestützte Simulation von Herzaktionspotentialen in einer ventrikulären Myozyte durchgeführt. Das HERG-Kanalmodell basierte auf einem bereits veröffentlichten *Markov*-Modell, welches an unsere experimentell ermittelten HERG-Daten angepasst wurde (Clancy und Rudy, 2001) (Abbildung 4.24 a und b). Da die HERG-Kanalaktivierung durch 14-3-3 ϵ von der PKA-Phosphorylierung abhängig ist und diese wiederum durch β -adrenerge Stimulation aktiviert wird, verwendeten wir ein Modell einer β -adrenerg stimulierten Kardiomyozyte, um die Auswirkungen der HERG-Kanalregulation zu untersuchen (Terrenoire *et al.*, 2005; Saucerman *et al.*, 2003). Unter der Annahme, dass die Modifikationen von HERG PKA und Proteinphosphatase 1 (PP1) den Kinetiken von I_{CaL} , Phospholamban (PLB) und I_{Ks} ähneln, wurden die so entsprechend modifizierten Kinetiken des HERG in das Modell eingefügt. Das HERG-Modell stellt die wesentlichen Eigenschaften der Kinetiken des phosphorylierten und nicht-phosphorylierten HERG dar, was sich in den sehr guten Angleichungen der Modelfunktionen an die experimentell ermittelten Werte der Leitfähigkeit-Spannungs-Beziehung und der Strom-Spannungskurve widerspiegelt (Abbildung 4.24 a und b). Insbesondere die besondere Eigenschaft von HERG aufgrund einer extrem schnellen Inaktivierung bei anfänglicher Depolarisation nur kleine Ströme zu produzieren, wird durch das Modell sehr gut dargestellt (Abbildung 4.24 c). Sehr schnelle Repolarisation wiederum führt zu einer deutlichen Zunahme der Leitfähigkeit aufgrund von schneller Erholung der Kanäle aus der Inaktivierung. Anschließend kann man eine langsame Abnahme des Stroms beobachten, was auf den Übergang der offenen zu geschlossenen Kanälen zurückzuführen ist (Abbildung 4.24 c). Diese Eigenschaften ermöglichen es HERG-Kanälen als wichtige Repolarisationsreserve zu fungieren und vorzeitigen Erregungen und der Ausbildung von Herzarrhythmien

vorzubeugen (Smith *et al.*, 1996; Miller, 1996). Aufgrund der Erholung eines großen Anteils der Kanäle aus der Inaktivierung durch eine kurze Repolarisation, kommt es nach einer anschließenden zweiten Depolarisation zu sehr großen Auswärtsströmen. Die nicht-phosphorylierten (schwarze Linie) und phosphorylierten (rote Linie) HERG Kanäle reagieren beide mit einer Erhöhung des Stroms. Aber im Gegensatz zum nicht-phosphorylierten Kanal weist der phosphorylierte HERG Kanal eine wesentlich höhere Aktivität und kürzere Zeitkonstanten auf, so dass der phosphorylierte HERG-Kanal mehr Strom produziert (Abbildung 4.24 c). Die Computersimulation zeigt, dass der phosphorylierte HERG-Kanal viel effektiver vorzeitige Erregungen oder frühe Nachdepolarisationen als die Mutanten unterdrückt.

Die PKA-abhängige Phosphorylierung unterschiedlicher Proteine in ventrikulären Kardiomyozyten nach β -adrenerger Stimulation ist gut untersucht (Bers *et al.*, 2002). Das Zusammenspiel der Ionenkanäle und Rezeptoren nach β -adrenerger Stimulation ist jedoch noch nicht gut verstanden. Um den Effekt der HERG-Phosphorylierung in einem realistischeren Modell zu untersuchen, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Clancys Gruppe ein modifiziertes Luo-Rudy Modell verwendet (Hancox *et al.*, 1998). Die simulierten Zellen mit HERGwt (schwarze Linie) oder HERG Mutanten (rote Linie) wurden 100mal mit einer fixierten Zykluslänge von 500ms erregt. Anschließend wurde nach einem sehr kurzen diastolischen Intervall ein vorzeitiger Stimulus gegeben, welcher eine ektopische Erregung oder ein Phase-2 Wiedereintritt simulieren sollte (7.2ms nach 95%iger Repolarisation) (Abbildung 4.24 d). In einer normalen Zelle vermittelte der phosphorylierte HERGwt-Kanal einen sehr großen Auswärtsstrom, welcher effektiv einen vorzeitigen zweiten Stimulus unterdrücken konnte (Abbildung 4.24 d und e). In einer Zelle mit mutiertem HERG-Kanal führte der vorzeitige Stimulus zur Entstehung eines sich abzeichnenden Aktionspotentials, welches potentiell sich in das umliegende Gewebe ausbreiten und somit einen Phase-2 Wiedereintritt hervorrufen kann.

Weiterhin testeten wir die Auswirkung des phosphorylierten HERG auf die Anpassung der Aktionspotentialdauer. Simulationen von Modellzellen mit HERGwt oder HERG Mutante wurden vor und nach β -adrenerger Stimulation

(Isoprenalin induziert = ISO) mit einer fixierten Zykluslänge (von 200 bis 1000ms) für 100 Herzschläge aktiviert. Die Aktionspotentialdauer des 100. Herzschlages wurde aufgenommen und als Funktion gegen die Zykluslänge aufgetragen (Abbildung 4.24 f). Computersimulierte Zellen mit HERGwt hatten unter β -adrenerger Stimulation wesentlich kürzere Aktionspotentiale und eine stärkere Anpassung (mehr Verkürzung bei kürzeren Zykluslängen) als Zellen ohne β -adrenerge Stimulation. Weiterhin fanden sich für Simulationen von Zellen mit HERG Mutante (d.h. ohne HERG Phosphorylierung, aber phosphorylierten I_{Ks} und I_{CaL}) etwas längere Aktionspotentialdauern und eine verminderte Adaptation – insbesondere bei sehr langen Zykluslängen (Abbildung 4.24 f).

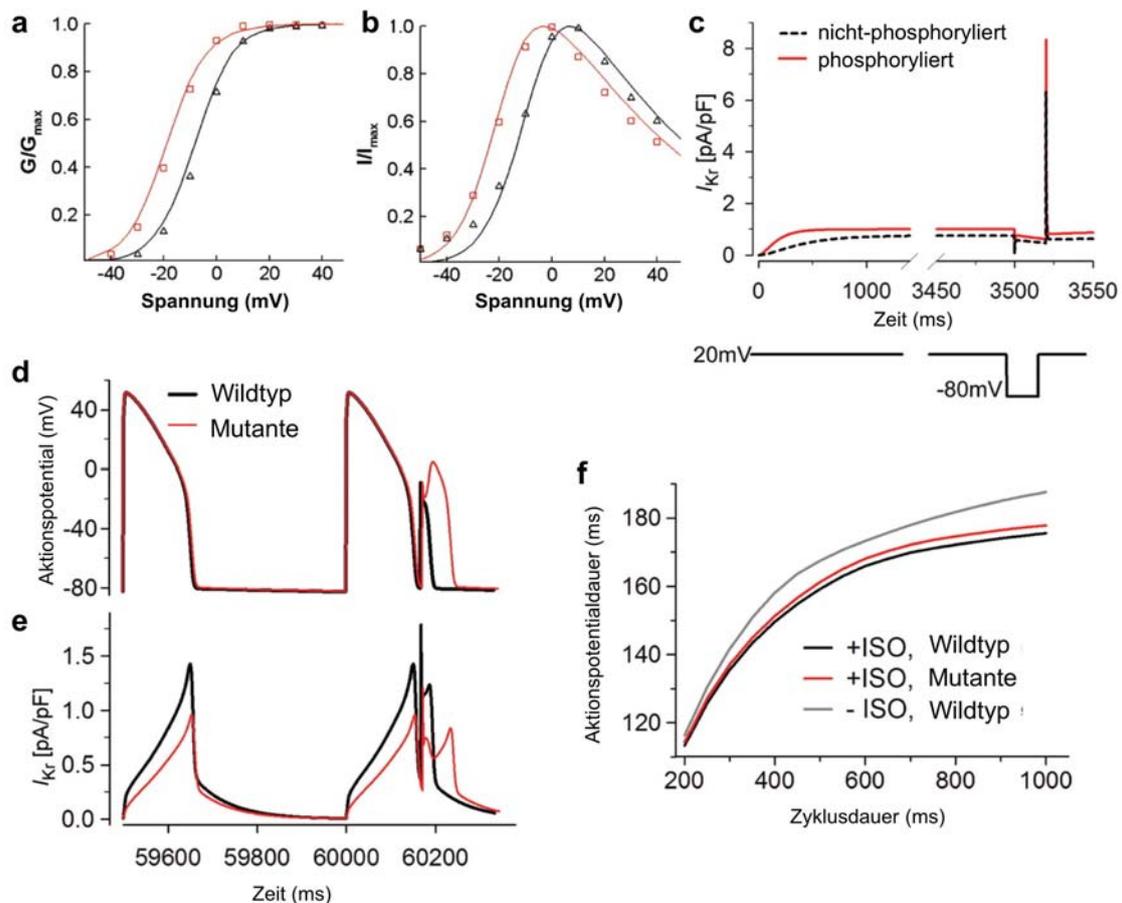


Abbildung 4.24

Analyse der physiologischen Relevanz der PKA-abhängigen $V_{1/2}$ Verschiebung von HERG durch computergestützte Simulation von Herzaktionspotentialen.

a – b) Experimentell erhaltene (Symbole) und computersimulierte (Linie) HERG-Kanalkinetiken. Rote Kreise und rote Linien repräsentieren den phosphorylierten HERG Kanal; schwarze Kreise und schwarze Linien repräsentieren den nicht-phosphorylierten HERG Kanal. **a)** Aktivierungskurven, bzw. Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung. **b)** Strom-Spannungs-Beziehung. **c)** Das HERG-Modell beinhaltet alle wesentlichen Eigenschaften von HERG (Smith *et al.*, 1996; Miller, 1996). Das Kommandoprotokoll (untere Teilabbildung) ist dargestellt: Depolarisation auf +20 mV von -80 mV für 3.5 s, anschließend Repolarisation auf -80 mV für 20 ms und dann erneute Depolarisation auf +20 mV. **d)** β -adrenerge Stimulation resultiert in Phosphorylierung von HERG und führt zu einer verbesserten Unterdrückung von vorzeitigen Erregungen. Zellen, welche die nicht-phosphorylierbare HERG Mutante enthalten, vermögen die vorzeitige Erregung nicht effektiv zu unterdrücken. Die simulierten Zellen mit HERGwt (schwarze Linie) oder HERG-Mutanten (rote Linie) wurden 100mal mit einer fixierten Zykluslänge von 500 ms erregt. Anschließend

wurde nach einem sehr kurzen diastolischen Intervall ein vorzeitiger Stimulus gegeben, welcher eine ektopische Erregung oder einen Phase-2 Wiedereintritt simulieren sollte (7.2 ms nach 95 %iger Repolarisation). In der normalen Zelle erzeugte der phosphorylierte HERGwt einen sehr großen Auswärtsstrom, welcher effektiv den vorzeitigen Stimulus unterdrücken konnte. In der Zelle mit mutiertem HERG führte der vorzeitige Stimulus zur Entstehung eines deutlicheren Aktionspotentials. **e)** Der phosphorylierte HERG Strom (schwarz) führt zu einer schnellen Repolarisation bevor Na^+ oder Ca^{2+} Kanäle aktiviert werden können. In der Zelle mit mutiertem HERG ist der Strom deutlich kleiner und vermag deshalb nicht die Aktivierung depolarisierender Einwärtsströme zu verhindern. **f)** Die simulierten Zellen mit HERGwt oder HERG-Mutante wurden vor oder nach Isoprenalin-induzierter β -adrenerger Stimulation (ISO) für 100mal mit einer fixierten Zykluslänge (von 200 bis 1000ms) erregt. Die Aktionspotentialdauer des 100. Herzschlages wurde angenommen und als Funktion gegen die Zykluslänge aufgetragen. Schwarze Linie: Wildtyp Zellen nach β -adrenerger Stimulation. Rote Linie: Zellen mit mutiertem HERG (d.h. ohne HERG Phosphorylierung, aber phosphorylierten I_{Ks} und I_{CaL}) nach β -adrenerger Stimulation. Graue Linie: Wildtyp Zellen vor β -adrenerger Stimulation. Die Simulationen wurden ausgeführt von der Arbeitsgruppe von Dr. Collen Clancy.

5 Diskussion

In dieser Arbeit erfolgte die elektrophysiologische, immunzytochemische und proteinbiochemische Analyse von fünf bisher nicht beschriebenen LQT2-Mutationen (HERG) der identifizierten Mutationen. Alle Mutationen waren im C-Terminus des HERG-Kaliumkanaluntereinheit lokalisiert. Vier der Mutationen (G965X, R1014fsX38, V1038fsX20 und R744X) führten zu einer Verkürzung des Kanalproteins und bei einer Mutation (S818L) lag eine Punktmutation vor, die zum Austausch einer Aminosäure führte. Bei den vier Mutationen, welche zu einer Verkürzung des Kanalproteins führen, handelte es sich um neuartige, bisher weder beschriebene noch charakterisierte Mutationen. Hingegen war die Mutation S818L bereits in früheren Arbeiten beschrieben worden (Berthet *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurden die Mutationen elektrophysiologisch und zellbiologisch untersucht. Die elektrophysiologischen Untersuchungen zeigten, dass die Mutanten (G965X, R1014fsX38, V1038fsX20) zum HERG-Wildtyp sehr ähnliche Ströme produzierten, wohingegen bei der Expression der Mutanten R744X und S818L kein Strom nachgewiesen werden konnte.

5.1 Die transportdefizienten Mutationen R744X und S818L

Zwei Gründe können für das Ausbleiben eines Stroms nach der Expression der Mutanten R744X und S818L angeführt werden. Erstens ist es möglich, dass die Kanaluntereinheiten der Mutanten normal prozessiert und transportiert werden, d.h. die Kanalproteine werden auf der Plasmamembran exprimiert, bilden aber keine funktionellen Kanäle aus. Für Mutationen in der Pore des HERG-Kanals (V612L, T613M und L615V) konnte gezeigt werden, dass die mutierten Kanalproteine auf der Plasmamembran erscheinen, aber ihre Aktivität eingebüßt hatten (Huang *et al.*, 2001).

Eine Alternative ist, dass die Kanalproteine fehlerhaft gefaltet oder prozessiert, in intrazellulären Zellorganellen zurückgehalten und nicht

weitertransportiert werden. Das Auftreten einer Transportfehlfunktion, bei welchem es nicht zum Einbau der Kanalproteine in die Plasmamembran kommt, sondern zu einer Akkumulation der Kanalproteine in intrazellulären Domänen, ist für Mutationen in Ionenkanälen weit verbreitet (Bidaud *et al.*, 2006; Heusser *et al.*, 2005; Kleizen *et al.*, 2000; Lai & Jan, 2006). Zahlreiche Mutationen, die zu Transportfehlfunktionen führen, wurden auch für den Kaliumkanal HERG bereits gezeigt. (Zhou *et al.*, 1998; Furutani *et al.*, 1999; Splawski *et al.*, 2000; Ficker *et al.*, 2000).

Zur leichteren Lokalisierung der HERG-Kanäle in Zellkompartimenten wurden die HERG-Proteine N-terminal mit einem HA-Epitop markiert und mit den Mutanten R744X und S818L transfizierte COS7-Zellen immunzytochemisch untersucht. Aufgrund der Tatsache, dass HERG-R744X lediglich in perinukleären Bereichen nachgewiesen werden konnte und die Western Blot Analyse lediglich unvollständig glykosylierte Untereinheiten aufzeigte, scheint diese Mutation zu einer vollständigen Retention im ER zu führen. Es kommt also bereits im ER sofort nach Synthese der Kanalproteine zu einer vollständigen Retention. Im Gegensatz zu HERG-R744X finden sich bei HERG-S818L in den immunhistochemischen Anfärbungen zusätzlich zu den perinukleären Bereichen auch einige Anhäufungen in peripheren, nahe der Plasmamembran liegenden Abschnitten. Die Western Blot Analyse wies vollständig glykosylierte Kanaluntereinheiten nach, so dass ein Transport der mutierten Kanäle bis in den Golgi-Apparat noch möglich sein sollte, während der weitere Transport defekt zu sein scheint. HERG-S818L kann deshalb ebenfalls als eine transportdefekte Mutante angesehen werden. Im Fall von HERG-R744X führte die Mutation nämlich zu einer vollständigen Retention bereits im ER, während der Aminosäureaustausch in der cNBD-Domäne (S818L) zur Retention im ER und auch im Golgi-Apparat führt.

5.1.1 Mechanismus der Retention im ER

Das ER spielt bei der Qualitätskontrolle bezüglich der synthetisierten und prozessierten Proteine und den Weitertransport dieser eine wichtige Rolle. Die Aminosäuresequenz RXR (mit X als irgendeine Aminosäure) konnte als putatives ER-Retentionssignal in Prokaryonten, sowie in Eukaryonten identifiziert werden. Eine entsprechende Sequenz findet sich bei HERG an den Positionen 1005-1007 in Form von RGR (Zerangue *et al.*, 1999; Kupersmidt *et al.*, 2002). Im HERGwt ist das ER-Retentionssignal offensichtlich maskiert. Die RGR-Sequenz kann wahrscheinlich nicht als Grund für die Retention der Mutanten S818L und R744X herangezogen werden.

Das Ausbleiben von Strömen nach der Expression von HERG-R744X ist eher darauf zurückzuführen, dass durch die Verkürzung um 311 oder mehr Aminosäuren am C-Terminus keine funktionellen Kanäle ausgebildet werden können. Die Mutante HERG-R744X ist somit wesentlich kürzer als die benötigte Länge für die funktionelle Expression auf der Zellmembran (Aydar & Palmer, 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass bei der Deletion der Aminosäuren 860 bis 899 oder einer entsprechenden Verkürzung keine Ströme messbar waren und man auch keine vollständig glykosylierten Kanaluntereinheiten nachweisen konnte (Akhavan *et al.*, 2003). Diese Beobachtung stimmt sehr gut mit unseren Ergebnissen überein, dass HERG-R744X, welche die Aminosäuren 860 bis 899 nicht enthält, keine vollständig glykosylierte Form aufweist, sondern nur die unvollständige Golgi-Apparat unabhängige Glykosylierung. Der fehlerhafte Transport von HERG-R744X könnte auf dem Fehlen von Aminosäuresequenzen im C-Terminus beruhen, welche für den Transport aus dem ER notwendig sind.

Konstrukt	Messung von Strom
HERGwt	Ja
HERG Δ 147	Nein
HERG Δ 159	Ja
HERG Δ 147&LGL	Ja
HERG Δ 311 oder mehr	Nein
HERG Δ 860-899	Nein
HERG Δ 416 (R744X)	Nein

Tabelle 5

Die funktionellen Expressionen unterschiedlicher HERG-Konstrukte auf der Plasmamembran sind zusammengestellt. Das Δ beschreibt die C-terminale Verkürzung um die angegebene Anzahl an Aminosäuren. Die Angabe LGL bedeutet, dass das ER-Retentionssignal RGR zu LGL mutiert wurde. Außerdem ist HERG-R744X aufgelistet mit seiner entsprechenden C-terminalen Verkürzung.

(Angaben aus Aydar & Palmer *et al.*, 2001; Akhavan *et al.*, 2003; Kupershmidt *et al.*, 2002)

5.1.2 Mechanismus der Retention im Golgi-Apparat

Nachdem die Membranproteine im ER synthetisiert wurden, werden sie zum Golgi-Apparat weitertransportiert, wo wesentliche posttranslationale Modifikationen stattfinden. Die für den weiteren Transport zur Plasmamembran essentiell sind. Für transportdefekte HERG-Mutationen konnte eine fehlende Interaktion mit GM130 – einem Protein des Golgi-Apparats nachgewiesen werden (Roti Roti *et al.*, 2003). Die untersuchten LQT-Syndrom assoziierten Mutationen (V822M, S818P und R823W) befanden sich alle in der zyklischen Nukleotidbindedomäne (cNBD). Eine klare Lokalisation von HERGwt und von GM130 konnte in perinukleären Regionen nachgewiesen werden, welche mit dem cis-Golgi-Apparat

übereinstimmten. Da eine fehlende Interaktion von HERG-S818P mit GM130 nachgewiesen werden konnte, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass ein ähnlicher Mechanismus der hier untersuchten Mutanten HERG-S818L zugrunde liegt.

5.1.3 Temperatursensitivität transportdefizienter Mutationen

Für einige transportdefiziente Mutationen (T65P, N470D, R572W), welche im Vergleich zum Wildtyp stark reduzierte Ströme aufwiesen, konnte eine dramatische Erhöhung der funktionellen Expression auf der Plasmamembran durch eine Erniedrigung der Inkubationstemperatur erreicht werden (Paulussen *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 1999; Ficker *et al.*, 2003). Die erniedrigte Inkubationstemperatur führt wahrscheinlich durch langsamere Faltung der Proteine zu einer Erhöhung des Anteils korrekt geformter Kanaluntereinheiten und somit zu einer höheren funktionellen Expression auf der Plasmamembran.

Ob die Mutanten HERG-R744X und HERG-S818L durch eine Erniedrigung der Temperatur auf 25°C aktive Kanäle ausbilden, wurde von mir nicht untersucht. Für HERG-S818L wurde gezeigt, dass bei der Expression in *Xenopus* Oozyten und bei einer Inkubationstemperatur von 14-16°C keine messbaren Ströme detektierbar waren (Nakajima *et al.*, 2000)). Es ist deshalb nicht eindeutig erklärt, ob Faltungsprobleme und/oder intrinsische Signale, welche für den subzellulären Transport von Bedeutung sind, für den pathophysiologischen Mechanismus von HERG-R744Y und HERG-S818L verantwortlich sind.

5.1.4 Haplo-Gendosis-Effekt transportdefizienter HERG-Mutanten

Mutationen im LQT2-Gen sind mit einem autosomal-dominanten Erbgang assoziiert, weshalb bereits bei Anwesenheit eines defekten Allels zur Ausprägung der Krankheit führt. Zwei grundlegende Mechanismen der Krankheitsausprägung können unterschieden werden – ein dominant-negativer Effekt und eine Haploinsuffizienz. Normalerweise würde es durch die Anwesenheit von einem defekten und einem korrekten Allel zur Reduktion der funktionstüchtigen Proteine um 50% führen, wenn es zu keiner gegenseitigen Beeinflussung der defekten und der korrekten Kanaluntereinheiten kommt. Eine Halbierung der Gendosis von HERG führt also zu einer 50% Reduktion des schnell aktivierenden repolarisierenden Kaliumstroms I_{Kr} . Die Interaktion und gegenseitige Beeinflussung von defekten und korrekten Kanaluntereinheiten führt zur Zusammensetzung und zum Aufbau der tetrameren HERG-Kanäle aus funktionierenden und funktionslosen Untereinheiten (Gong *et al.*, 2004). Die Anwesenheit fehlerhafter Untereinheiten kann dabei zum vollständigen Funktionsverlust des gesamten Tetramers führen (Kagan *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 2004).

Meine Untersuchungen der Koexpression von HERGwt mit HERG-R744X, bzw. HERG-S818L zeigten keinen Unterschied der Stromdichte beim Vergleich mit Kontrollzellen, die lediglich mit HERGwt transfiziert worden waren. Die zusätzliche Koexpression der Mutanten führte somit zu keiner Beeinträchtigung der funktionellen Expression des Wildtyps. Weiterhin betragen die erhaltenen Stromdichten der Koexpressionen aus gleichen Teilen HERGwt und Mutante etwa 50% der erwarteten Kontrollstromdichte. Der Pathomechanismus sollte somit auf eine Halbierung der schnellen Komponente des repolarisierenden Kaliumstroms I_{Kr} zurückzuführen sein – also auf Haploinsuffizienz.

Obwohl sich die Mutanten HERG-R744X und HERG-S818L prinzipiell bezüglich ihres Pathomechanismus zu gleichen scheinen, existiert wahrscheinlich ein grundlegender Unterschied. Für HERG-S818L konnte gezeigt werden, dass trotz des fehlenden dominant-negativen Effektes eine

Interaktion mit dem Wildtyp stattfindet (Nakajima *et al.*, 2000). Für die LQT-Syndrom assoziierte Mutante HERG-Q725X konnte gezeigt werden, dass dieser defekten Untereinheit die Fähigkeit zur Bildung von Multimeren mit sich selbst oder mit dem Wildtyp nicht möglich war, da HERG-Q725X bei alleiniger Expression oder auch bei der Koexpression mit dem Wildtyp lediglich als Monomer vorlag (Gong *et al.*, 2004). Ein ähnlicher Defekt der Multimerisierung wird wahrscheinlich auch HERG-R744X zugrunde liegen, da auch hier eine fast gleichlange Verkürzung des C-Terminus vorliegt wie bei HERG-Q725X.

Der Transportdefekt von HERG-R744X mit vollständiger Retention im ER liegt also wahrscheinlich an einem Unvermögen zur Tetramerisierung. Im Gegensatz dazu liegen bei HERG-S818L eine vollständige Prozessierung und ein Transport bis in den Golgi-Apparat vor. Somit scheint auch eine Fähigkeit zur Tetramerisierung mit dem Wildtyp vorzuliegen, obwohl kein dominant-negativer Effekt auf die Stromdichten zu beobachten ist. Weitere Experimente (Immunpräzipitation, immunzytochemische Lokalisationsdiagnostik nach Koexpression von HERG-S818L mit HERGwt) sind notwendig um die Frage einer möglichen Tetramerisierung von HERG-S818L mit HERGwt zu klären.

5.2 Die HERG-Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20

Die elektrophysiologische Analyse ergab, dass die biophysikalischen Eigenschaften der Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 mit denen des Wildtyps bezüglich Aktivierung, Deaktivierung, Inaktivierung und Stromdichte übereinstimmen. Eine Verkürzung des C-Terminus von HERG um 194 Aminosäuren, wie bei HERG-G965X scheint somit weder einen Einfluss auf die funktionelle Expression auf der Plasmamembran, noch auf die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals zu haben. Die Tatsache, dass eine C-terminale Verkürzung von HERG um weniger als 311 Aminosäuren zur Ausprägung von funktionellen Strömen führt, stimmt sehr gut mit unseren Beobachtungen überein (Aydar & Palmer *et al.*, 2001)).

Dem C-Terminus von HERG konnten Funktionen bei der Multimerisierung und der Regulation des subzellulären Transportes zugeschrieben werden (Gong *et al.*, 2004; Roti Roti *et al.*, 2002); Kupershmidt *et al.*, 2002). Erst kürzlich wurde eine funktionelle Interaktion des Proteins 14-3-3 ϵ mit HERG beschrieben, die von der Phosphorylierung einer N-terminalen und C-terminalen PKA-Phosphorylierungsstelle (S283 und S1137) abhängt (Kagan *et al.*, 2002)).

5.2.1 Regulation von HERG durch Proteinkinase A

Die sympathoadrenerge Modulation im Herzen wird durch die Proteinkinase A (PKA) vermittelt, welche die unterschiedlichsten Proteine phosphoryliert – den L-Typ Kalziumkanal (Zhao *et al.*, 1994; Gerhardstein *et al.*, 1999), Phospholamban (Simmerman *et al.*, 1998), Troponin I (Sulakhe *et al.*, 1995), den Ryanodinrezeptor (Marx *et al.*, 2000) und das Myosin-Bindende-Protein C (Kunst *et al.*, 2000). Die PKA erkennt ganz spezifische Aminosäuresequenzen. Im HERG wurden vier PKA-Phosphorylierungsstellen identifiziert, welche sich an den Positionen S283, S890, T895 und S1137 befinden (Thomas *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2000; Abbildung 5.1).

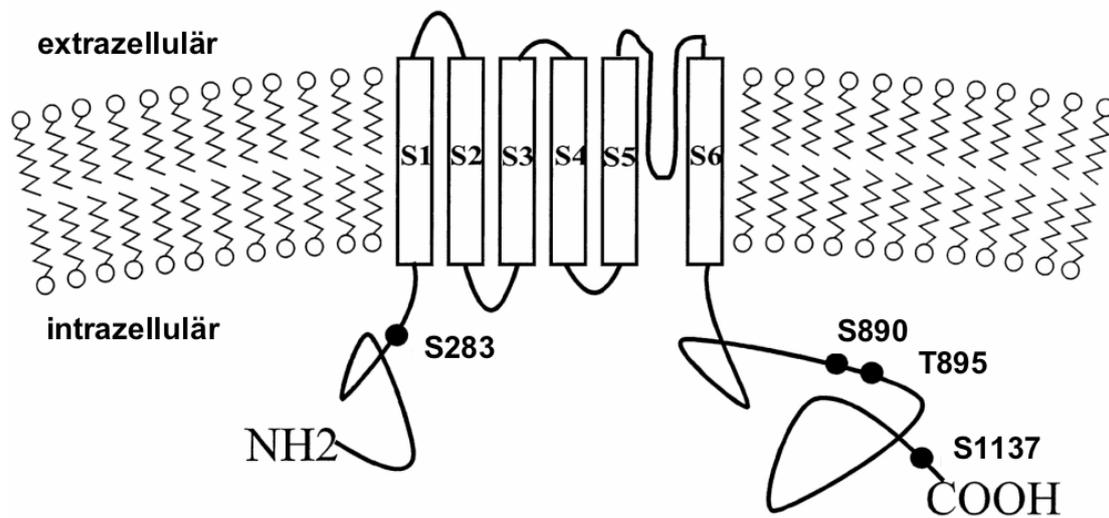


Abbildung 5.1

In die hypothetische Struktur von HERG mit seinen sechs Transmembrandomänen sind die putativen PKA-spezifischen Phosphorylierungsstellen eingezeichnet und mit ihrer entsprechenden Aminosäure und Position bezeichnet. (modifiziert nach Thomas *et al.*, 1999)

In *Xenopus* Oozyten und in CHO-Zellen führte die PKA-abhängige Phosphorylierung von HERG zu einer Amplitudenreduktion der Tail-Ströme, sowie zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu positiveren Potentialen (Karle *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2004). Eine derartige Modulation kann potentiell zu einer Abnahme der Aktivität der schnellen Komponente des repolarisierenden Kaliumstroms I_{Kr} im Herzen führen.

Durch die zusätzliche Expression von 14-3-3 ϵ – der häufigsten 14-3-3 Isoform im Herzen – konnte in CHO-Zellen eine direkte, funktionelle Interaktion dieses zytosolischen Proteins mit PKA-phosphoryliertem HERG nachgewiesen werden. Die Wechselwirkung führt zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu hyperpolarisierenden Potentialen. Im Ergebnis würde die HERG Aktivität gesteigert werden und somit I_{Kr}

Amplituden bei Spannungen, welche für die kardiale Aktionspotentialdauer maßgeblich sind, erhöhen (Kagan *et al.*, 2001).

Weiterhin haben einige Arbeiten von einer Erhöhung der HERG-Ströme durch β -Agonisten berichtet (Cui *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2001), wohingegen andere Gruppen eine PKA-abhängige Erniedrigung der HERG-Amplituden zeigen konnten (Karle *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2004). Diese Diskrepanz könnte darauf zurückgeführt werden, dass die PKA-abhängige Phosphorylierung von HERG zu einer beschleunigten Deaktivierung und somit zu einer Reduktion des Stroms führt (Karle *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2004), wohingegen die direkte Bindung von zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) an die zyklischen Nukleotid-Bindedomäne von HERG zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu negativeren Potentialen und somit zu einer Erhöhung des Stroms führt (Cui *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2001). Da diese Arbeiten in der Abwesenheit von 14-3-3 ϵ durchgeführt wurden, ist es wahrscheinlich, dass die Diskrepanzen darauf zurückzuführen sind, dass mit 14-3-3 ϵ eine wesentliche physiologische Komponente der HERG Regulation fehlte.

5.2.2 Struktur, Funktion und Regulation von 14-3-3

Bisher sind sieben Isoformen des 14-3-3 Proteins in Säugetieren bekannt (β , ϵ , γ , η , σ , τ und ζ), von welchen die Isoform 14-3-3 ϵ die häufigste Form im Herzen ist. Die etwa 28-33kDa großen, sauren Proteine kommen in Zellen als Dimere vor (Fu *et al.*, 2000; Kagan *et al.*, 2001).

Eine Rolle von 14-3-3 Proteinen bei der Regulation von Apoptose, Signaltransduktion und Zellzyklus konnte gezeigt werden. So interagieren beispielsweise Raf-1, p53, α_2 -Adrenorezeptoren, Glukokortikoid-Rezeptor and Na^+/H^+ Austauscher, PI3-Kinase und IGF-I Rezeptor mit 14-3-3 Proteinen (Fu *et al.*, 2000; Clark *et al.*, 1997; Thorson *et al.*, 1998; Prezeau *et al.*, 1999; Widen *et al.*, 2000; Yip-Schneider *et al.*, 2000; Lehoux *et al.*, 2001). Für eine funktionelle Interaktion ist eine Phosphorylierung von Serinen und/oder

Threoninen notwendig, welche in bestimmte Aminosäuresequenzen eingebettet sind. Zwei unterschiedliche Motive sind bekannt:

Modus I	R	(S/Φ)	X	pS	X	P
Modus II	R	X	(S/Φ)	pS	X	P

wobei R für Arginin, S für Serin, pS für phosphoryliertes Serin, Φ für eine aromatisch Aminosäure, X für irgendeine Aminosäure und P für Prolin steht (Yaffe *et al.*, 1997). Die Phosphorylierung kann von unterschiedlichen Proteinkinasen abhängig – beispielsweise Proteinkinase A durchgeführt werden (Tzivion & Avruch, 2002).

5.2.3 Funktionelle Interaktion von 14-3-3 ϵ mit HERG

Es konnte eine Modulation unterschiedlichster Ionenkanäle durch 14-3-3 gezeigt werden (Zhou *et al.*, 1999; Booij *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2000). Eine Interaktion von HERG mit 14-3-3 ϵ führt zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung des Kanals. Für diese Modulation des HERG-Kanals müssen die Serine S283 und S1137 phosphoryliert vorliegen. Für die molekulare Interaktion von 14-3-3 ϵ mit HERG ist hingegen bereits die Phosphorylierung an einer dieser beiden Serine ausreichend. Für funktionelle Effekte durch 14-3-3 ϵ ist neben der Phosphorylierung von HERG auch die Bindung von 14-3-3 ϵ als Dimer notwendig (Kagan *et al.*, 2002). Die Notwendigkeit zweier Phosphorylierungsstellen für die funktionelle Bindung von 14-3-3 wurde bereits in verschiedenen Proteinen des Zytoskeletts (Vimentin und Keratin), Rezeptoren (IGF-I Rezeptor) und auch Ionenkanälen (*Slowpoke*) gezeigt, wobei in all diesen Fällen die Bindung eines 14-3-3 Dimers gezeigt werden konnte oder angenommen wird (Craparo *et al.*, 1997; Tzivion *et al.*, 2000; Ku *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1999).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch der PKA-phosphorylierte β -Adrenorezeptor 14-3-3 ϵ bindet und somit mit dem PKA-phosphorylierten HERG um die Bindung mit 14-3-3 ϵ konkurriert (Tutor *et al.*, 2006). Eine

erhöhte Bindung von 14-3-3 ϵ an den β -Adrenorezeptor führte zu einer verminderten Bindung von 14-3-3 ϵ an HERG, was zu einer Verminderung des HERG Stroms führt, wie er auch von einigen Gruppen beschrieben worden ist (Karle *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2004; Tutor *et al.*, 2006). Wohingegen eine verminderte Bindung von 14-3-3 ϵ an den β -Adrenorezeptor zu einer erhöhten Bindung von 14-3-3 ϵ an HERG resultiert, was zu einer Erhöhung des HERG Stroms führt, wie es von anderen Gruppen beschrieben wurde (Kagan *et al.*, 2002; Tutor *et al.*, 2006). Das Wechselspiel zwischen HERG, β -Adrenorezeptor und 14-3-3 ϵ scheint daher stark von dem relativen Verhältnis dieser Proteine zueinander abzuhängen. Die physiologische Regulation der Interaktion von 14-3-3 ϵ mit HERG bedarf daher noch weiterer Untersuchungen.

5.2.4 Physiologische Relevanz der Interaktion von 14-3-3 ϵ mit HERG

Auch in dieser Arbeit konnte bei Koexpression von HERG mit 14-3-3 ϵ eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung um etwa 10mV zu hyperpolarisierenden Spannungen beobachtet werden, wie sie bereits von Kagan *et al.* beschrieben wurde (Abbildung 3.21a). Die Tatsache, dass unterschiedliche Arbeiten gezeigt haben, dass durch PKA-abhängige Phosphorylierung eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu positiveren Spannungen zu beobachten war, wir aber eine eindeutige Verschiebung zu negativeren Potentialen sahen, kann durch Unterschiede in der experimentellen Durchführung erklärt werden. Die beobachtete Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung durch PKA-abhängige Phosphorylierung wurde nämlich ausschließlich in *Xenopus* Oozyten gesehen (Kiehn *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1999). Die Untersuchungen wurden also in Systemen durchgeführt, welche sich stark von ventrikulären Kardiomyozyten unterscheiden – Oozyten versus Körperzellen, Amphibienzellen versus Säugetierzellen. Außerdem liegt auch kein Nachweis für die Anwesenheit von 14-3-3 ϵ in Oozyten vor, so dass in der Abwesenheit von 14-3-3 ϵ der

Hauptgrund für das Fehlen einer hyperpolarisierenden Verschiebung zu sehen ist.

Außerdem zeigen die computergestützten Simulationen einer β -adrenerg stimulierten Kardiomyozyte, dass die experimentell erhaltenen Ergebnisse die klinische Ausprägung bei den Patienten erklären könnte (Abbildung 4.24). Das Modell des Herzaktionspotentials zeigte zwar, dass die Mutation im HERG lediglich eine geringfügige Verlängerung des QT-Intervalls hervorruft, aber dass durch die fehlende PKA-abhängige Aktivierung von HERG eine wesentliche Repolarisationsreserve des Herzens fehlt. Dies würde deshalb die Ausbreitung der Erregung in angrenzendes Gewebe erleichtern und Phase 2-Reentry ermöglichen, was zu Herzarrhythmien oder sogar zum plötzlichen Herztod führen könnte. Die humangenetischen Untersuchungen und die auf den experimentellen Daten basierende Computersimulation zeigen sehr anschaulich, dass bei diesen Patienten die Ausprägung des LQT-Syndroms auf eine fehlende PKA-abhängige Aktivierung des HERG zurückzuführen ist.

Außer der Computersimulation, welche Hinweise auf die physiologische Relevanz der Interaktion von HERG mit $14\text{-}3\text{-}3\epsilon$ liefert, konnte in physiologischen Experimenten mit unterschiedlichen kardialen Myozyten aus verschiedenen Tieren durch β -adrenerge Stimulation und konsekutive Proteinkinase A Aktivierung, die spannungsabhängigen Aktivierung des repolarisierenden Kaliumstroms I_K zu negativeren Potentialen verschoben werden (Tabelle 2). Man muss jedoch bedenken, dass der repolarisierende Kaliumstrom I_K aus einer schnellen und eine langsamen Komponente aufgebaut ist – I_{Kr} , beziehungsweise I_{Ks} . Die Verschiebung von $V_{1/2}$ um 10mV zu negativen Spannungen, welche in zwei unterschiedliche Arbeiten durch Applikation von Isoprenalin – einem β -adrenergen Agonisten – in ventrikulären Kardiomyozyten des Meerschweinchens beobachtet werden konnte, kann zum größten Teil auf HERG zurückgeführt werden. Eine Arbeit von Heath und Terrar zeigte nämlich, dass der Anteil von I_{Kr} am gesamten repolarisierenden Kaliumstrom etwa 58% beträgt (Heath & Terrar, 1996). Eine weitere Arbeit zeigte, dass sich der $V_{1/2}$ -Wert der schnellen Komponente des repolarisierenden Kaliumstroms I_{Kr} (HERG) in ventrikulären Kardiomyozyten

des Meerschweinchens durch die Applikation von Isoprenalin um 5mV zu hyperpolarisierenden Spannungen verschiebt. Bei der Applikation eines PKA-Aktivator (Forskolin) konnte man sogar eine hyperpolarisierende Verschiebung um 10mV beobachten (Heath & Terrar *et al.*, 2000).

Eine deutliche hyperpolarisierende Verschiebung von $V_{1/2}$ des repolarisierenden Kaliumstroms I_K um 10mV konnte auch nach Applikation von Isoprenalin in Schrittmacherzellen des Kaninchens beobachtet werden (Lei *et al.*, 1999). In diesen spezifischen Zellen besteht der repolarisierende Kaliumstrom I_K hauptsächlich aus der schnellen Komponente (HERG), so dass in diesem Zellsystem der Effekt auf den I_K einem Effekt auf den I_{Kr} gleichgesetzt werden kann (Lei & Brown *et al.*, 1996). Diese Beobachtungen, wie auch andere Arbeiten in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten (Lei *et al.*, 1999; Lei & Brown, 1996; Giles *et al.*, 1989; Sauviat *et al.*, 2002; Duchatelle-Gourdon *et al.*, 1989; Yazawa & Kameyama, 1990; Walsh & Kass, 1991; Heath & Terrar, 1996; Heath & Terrar, 2000), deuten daraufhin, dass *in vivo* eine hyperpolarisierende Verschiebung des repolarisierenden Kaliumstroms I_K , aber insbesondere der schnellen Komponente I_{Kr} , auftreten kann (Tabelle 2).

$V_{1/2}$ -Verschiebung	Zelltyp (Spezies)	repolarisierende Strom
- 10 mV ^a	Schrittmacherzellen (Kaninchen)	überwiegend I_{Kr} ^b
- 10 mV ^c	Vorhofmyozyten (Frosch)	I_{Kr} ist bedeutend ^d
- 13 mV ^e	Kardiomyozyten (Frosch)	keine Angaben
- 10 mV ^{f und g}	ventrikuläre Myozyten (Meerschweinchen)	58% I_{Kr} und 42% I_{Ks} ^h
- 5 mV ⁱ	ventrikuläre Myozyten (Meerschweinchen)	100% I_{Kr} (I_{Ks} zu 100% inhibiert)

Tabelle 6

Durch die Applikation von Isoprenaline wird in unterschiedlichen Zellen der Wert für die halbmaximale Aktivierung verschoben. Die Fußnoten entsprechen folgenden Literaturangaben:

- a Lei *et al.*, 1999
- b Lei & Brown, 1996
- c Giles *et al.*, 1989
- d Sauviat *et al.*, 2002
- e Duchatelle-Gourdon *et al.*, 1989
- f Yazawa & Kameyama, 1990
- g Walsh & Kass, 1991
- h Heath & Terrar, 1996
- i Heath & Terrar, 2000

Der β -adrenerge Effekt auf die schnelle Komponente des repolarisierenden Kaliumstroms in kardialen Zellen kann durch eine funktionelle Interaktion von 14-3-3 ϵ mit HERG erklärt werden. Weiterhin deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die β -adrenerge depolarisierende Verschiebung von $V_{1/2}$, welche man in *Xenopus* Oozyten beobachten konnte, wahrscheinlich physiologisch in kardialen Myozyten nicht relevant ist, da durch β -adrenerge Stimulation in diesen Zellen eine Verschiebung zu negativen Potentialen beobachtet werden konnte. Obwohl *Kagan et al.* (Kagan et al., 2001) die PKA-abhängige Modulation von HERG durch 14-3-3 ϵ als eine adrenerge Regulation ansehen, muss diese Annahme kritisch betrachtet werden. Kardiomyozyten exprimieren nämlich außer dem β_1 -Rezeptor noch verschiedene, andere G-Proteingekoppelte Rezeptoren, welche potentiell zu einer Erhöhung der cAMP Produktion führen können.

Insbesondere bei der Stimulation der Rezeptoren für glucagon-like peptide-1 (GLP1), Prostaglandin E_1 (PDE $_1$) und Histamin konnte eine deutliche Erhöhung des cAMP Spiegels in Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Bers, 2002; Vila Petroff *et al.*, 2001; Buxton & Brunton, 1982). Obwohl die Höhe der cAMP-Produktion durch GLP1, PDE $_1$ und Histamin mit einer entsprechenden Stimulation der adrenergen Rezeptoren durch Isoprenalin vergleichbar war, führte der erhöhte cAMP Spiegel nicht zu einer erhöhten Inotropie oder Chronotropie (Bers, 2002). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass cAMP nicht generell in der gesamten Zelle erhöht und erniedrigt wird, sondern die Wirkung dieses Signalmoleküls in Mikrodomänen organisiert zu sein scheint (Steinberg & Brunton, 2001). Obwohl man diese Hypothese bereits in den 1970er Jahren postulierte, wurden erst in den letzten Jahren Proteine entdeckt, welche die Bildung von makromolekularen Komplexen und Mikrodomänen ermöglichen. Die Bildung einer ganzen Reihe von cAMP spezifischen Mikrodomänen scheint durch A-Proteinkinase-Ankerproteine (AKAPs) realisiert zu werden, welche eine Familie mit mehr als 30 Proteinen bilden (Steinberg & Brunton, 2001). Beispielsweise bindet AKAP18/15 den L-Typ Kalziumkanal, mA-KAP liegt mit dem Ryanodine Rezeptor gekoppelt vor und erst kürzlich wurde eine funktionelle Interaktion von Yotiao mit KCNQ1 beschrieben (Fraser *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 1998; Hulme *et al.*, 2001;

Kapiloff *et al.*, 1999; Kapiloff *et al.*, 2001; Marx *et al.*, 2000; Marx *et al.*, 2001; Dodge *et al.*, 2001; Potet *et al.*, 2001; Marx *et al.*, 2002). Für eine sympathoadrenerge Modulation der Ionenkanäle scheint die Bildung dieser makromolekularen Komplexe notwendig zu sein. Im Falle des I_{Ks} (KCNQ1) ist AKAP Yotiao daran beteiligt. Für I_{Kr} (HERG) konnte eine derartige Komplexbildung noch nicht beschrieben werden. Deswegen kann ein direkter kausaler und physiologischer Zusammenhang zwischen der PKA-abhängigen Phosphorylierung von HERG und einer β_1 -Adrenozeptor vermittelten sympathoadrenergen Stimulation des I_{Kr} bisher nur angenommen werden und bedarf weiterer experimenteller Klärung (Abbildung 5.2).

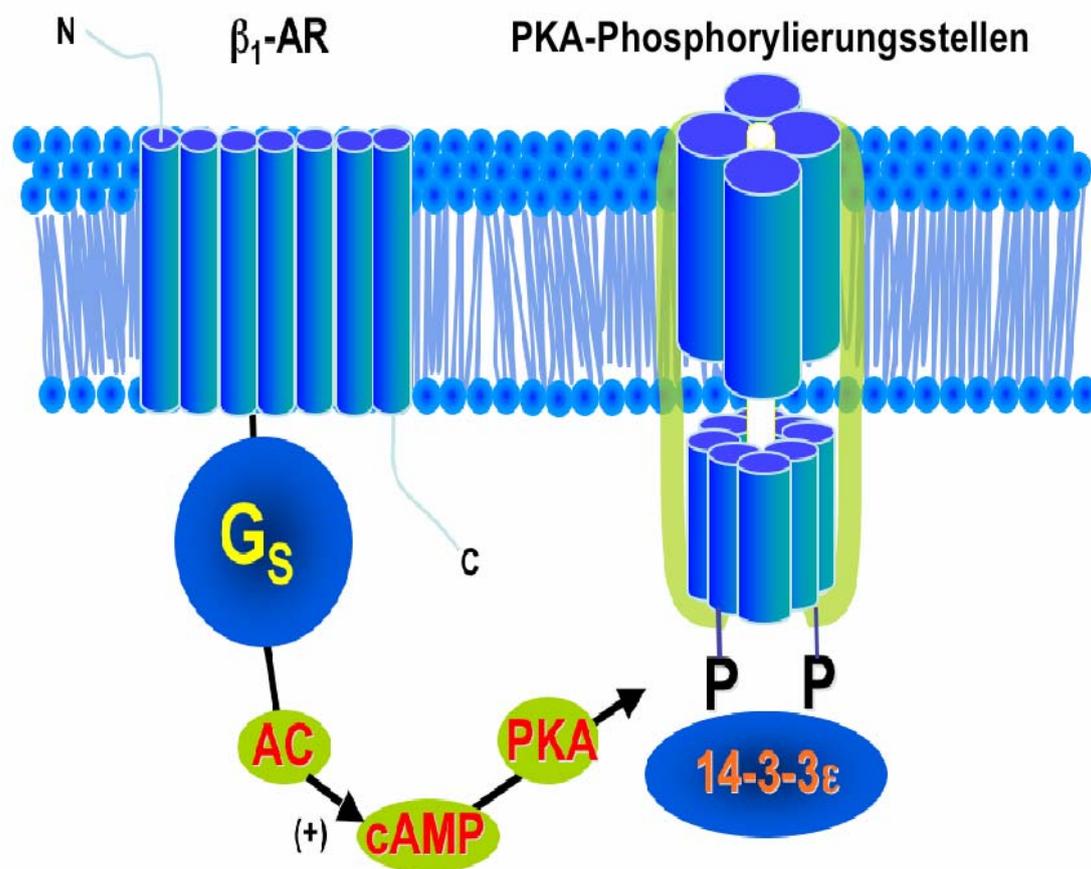


Abbildung 5.2

Die sympathoadrenerge Stimulation des β -Rezeptors führt zu einer Aktivierung des stimulatorischen G-Proteins und dadurch zur Aktivierung der Adenylatzyklase. Die Adenylatzyklase erhöht den cAMP Spiegel, wobei das cAMP die Proteinkinase A aktiviert. Die Proteinkinase A führt zur PKA-spezifischen Phosphorylierung von HERG, wodurch eine funktionelle Interaktion mit 14-3-3 mit dem phosphorylierten HERG möglich wird.

5.2.5 Pathophysiologischer Mechanismus der Interaktion von 14-3-3 ϵ mit HERG

Die funktionelle Interaktion von 14-3-3 ϵ mit HERG führte zu einer ähnlichen Modulation der spannungsabhängigen Aktivierung, wie sie bereits von Kagan *et al.* beschrieben wurde (Abbildung 4.21a). Die fehlende Modulation der HERG-Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 durch 14-3-3 kann auf die fehlende C-terminale PKA-Phosphorylierungsstelle zurückgeführt werden, welche in diesen Deletionsmutationen nicht mehr vorhanden ist. Obwohl 14-3-3 ϵ über die N-terminale PKA-Phosphorylierungsstelle weiterhin an HERG binden kann, findet keine funktionelle Modulation mehr statt. Für die molekulare Bindung scheint somit die N-terminale PKA-Phosphorylierungsstelle auszureichen, wobei für die funktionelle Interaktion beide PKA-Phosphorylierungsstellen in HERG notwendig sind. Weiterhin ist die Dimerisierung von 14-3-3 ϵ für die Bindung an HERG essentiell.

Der Erbgang der unterschiedlichen HERG-Mutationen ist autosomal-dominant, so dass bereits ein defektes Allel für die Ausprägung des Phänotyps ausreicht. Da nach Expression der Mutanten mit dem Wildtyp keine Modulation durch 14-3-3 ϵ beobachtet werden konnte, kann ein dominant-negativer Effekt der Mutationen angenommen werden (Abbildung 4.22). Kagan *et al.* (Kagan *et al.*, 2001) konnten zeigen, dass nach Expression einer dominant-negativen 14-3-3 ϵ Mutante zusammen mit 14-3-3 ϵ Wildtyp keine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung von HERG gemessen wird. Offensichtlich reicht ein 14-3-3 ϵ Heterodimer bestehend aus einem HERG bindenden 14-3-3 ϵ und einem HERG nicht bindenden 14-3-3 ϵ für die funktionelle Interaktion nicht aus. Darüber hinaus zeigen meine Ergebnisse, dass ein HERG Tetramer, bestehend aus 14-3-3 ϵ bindendem Wildtyp und nicht bindender Mutante zwar mit 14-3-3 ϵ molekular interagiert, aber funktionell nicht moduliert wird. Wahrscheinlich sind alle acht 14-3-3 ϵ Bindungsstellen – jeweils vier C- und vier N-terminale PKA-Phosphorylierungsstellen eines HERG Tetramers – für die funktionelle Interaktion notwendig. Das stoichiometrische Verhältnis von

14-3-3ε Dimeren zum HERG Tetramer bedarf jedoch noch genauerer Untersuchungen.

Die PKA-abhängige Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung von HERG um 10mV zu negativeren Potentialen führt zu einer Erhöhung des repolarisierenden Kaliumstroms I_K bei Spannungen von -20 bis +10mV. Insbesondere bei diesen Spannungen ist der Einfluss des repolarisierenden Kaliumstroms auf das Herzaktionspotential am größten (Kagan *et al.*, 2001). Der beobachtete Effekt ist abhängig von der Phosphorylierung durch PKA und wird potentiell somit durch sympathoadrenerge Stimulation ausgelöst. Insbesondere für LQT2-Patienten wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen einer plötzlichen sympathischen Stimulation (Erschrecken, akustischer Stimulus) und der Auslösung von kardialen Ereignissen (ventrikuläre Herzarrhythmien, Synkopen, Torsade de Pointes) gefunden (Wilde *et al.*, 1999).

Auch bei den von uns untersuchten Patienten mit den HERG-Mutationen G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 wurden die Synkopen und ventrikulären Tachyarrhythmien durch akuten, emotionalen Stress oder körperliche Belastung ausgelöst. Die Auslösung der kardialen Ereignisse durch Erhöhung des Sympathikus bei diesen Patienten kann potentiell durch den hier beschriebenen Pathomechanismus erklärt werden, aber nicht die bereits im Ruhezustand gemessene verlängerte QT-Zeit. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass auch nicht stimulierte, also sich im Ruhezustand befindende Kardiomyozyten bereits cAMP Konzentrationen von 2.0 bis 4.0 pmol/mg aufweisen, welches für die Aufrechterhaltung einer basalen PKA-Aktivität ausreichend wäre (Malan *et al.*, 2003; Luiken *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1996; Hussain *et al.*, 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch spezifische Inhibition der Proteinkinase A oder durch Stimulation der Phosphatasen in nicht stimulierten Kardiomyozyten eine Erniedrigung des L-Typ Kalziumstroms beobachtet werden konnte, was auf eine immer vorhandene Phosphorylierung der Proteine auch in nicht stimulierten Kardiomyozyten hindeutet (Hussain *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2000; duBell *et al.*, 1996). Die Applikation eines unspezifischen Inhibitors für Proteinkinasen führte in Kardiomyozyten zur Reduktion von I_{Kr} , wohingegen eine Erhöhung

von I_{Kr} durch Proteinkinase Aktivatoren erreicht werden konnte (Heath & Terrar *et al.*, 2000). Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass auch in nicht stimulierten Zellen eine basale Phosphorylierung der Proteine vorliegt und somit bereits im Ruhezustand eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung von HERG zu negativeren Potentialen vorliegt. Diese basale PKA-Aktivität könnte erklären, warum es bereits im Ruhezustand zu einer verlängerten QT-Zeit kommt.

5.2.6 Der HERG/14-3-3 ϵ Komplex – Grundlage für einen makromolekularen Signalkomplex?

Bisher hatte man Ionenkanäle und Rezeptoren meist isoliert und allein stehend betrachtet. Es mehren sich jedoch die Hinweise, dass viele Ionenkanäle und Rezeptoren in makromolekularen Signalkomplexen angeordnet sind. Die Ausbildung von Regulatoren und Modulatoren um das Gerüst eines Ionenkanals herum konnte im Herzen für den kardialen Ryanodinrezeptor, den L-Typ Kalziumkanal und für den I_{Ks} -Kaliumkanal beschrieben werden (Kapiloff *et al.*, 2002). Während die Signalkomplexe des Ryanodinrezeptors und des L-Typ Kalziumkanals an der Regulation der Depolarisation der Herzmuskelzelle beteiligt sind, moduliert der Signalkomplex des I_{Ks} -Kaliumkanal Repolarisationsphase. Der makromolekulare Signalkomplex um den I_{Ks} -Kaliumkanal besteht aus Yotiao (ein AKAP), Proteinkinase A und Proteinphosphatase 1 (Marx *et al.*, 2002). Ein für HERG spezifisches AKAP wurde bisher noch nicht gefunden. Kürzlich wurde jedoch eine Interaktion von 14-3-3 mit einem AKAP beschrieben (Diviani *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2004). Somit ist es vorstellbar, dass 14-3-3 ϵ nicht nur eine modulierende Funktion auf HERG hat, sondern als Linker zwischen dem Kaliumkanal und einem AKAP fungieren könnte. Ein makromolekularer Signalkomplex ist somit auch für HERG vorstellbar (Abbildung 5.3).

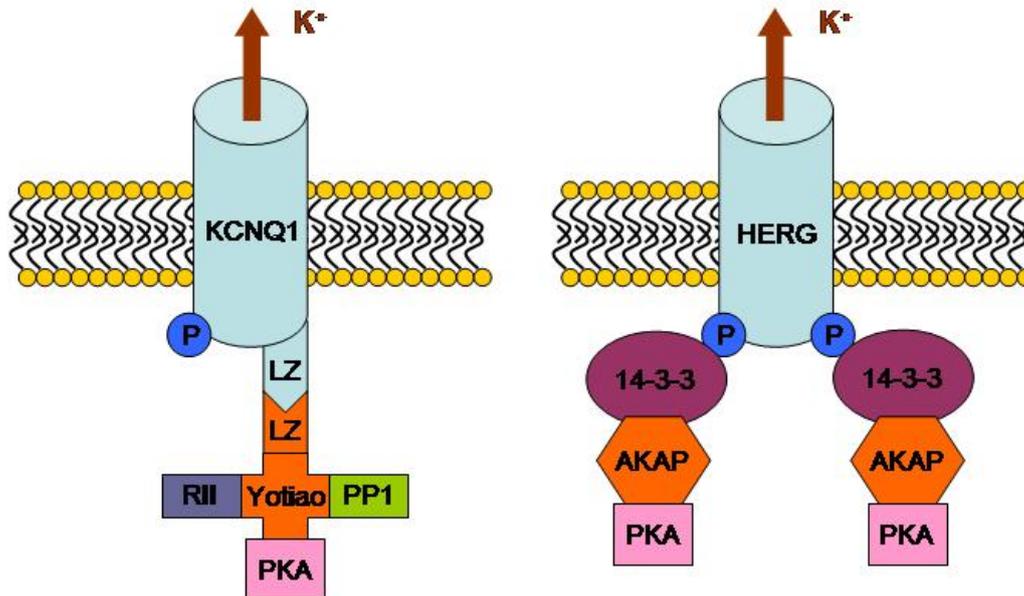


Abbildung 5.3

(links) Der KCNQ1 Kaliumkanal bindet über einen Leuzinzipper (LZ) Yotiao, welches zur Gruppe der A-Kinase-Ankerproteine (AKAP) gehört. Yotiao fungiert als Adapter für andere Proteine – Proteinphosphatase 1 (PP1), Proteinkinase A (PKA) und der regulatorischen Untereinheit der Proteinkinase A (RII), welche somit indirekt an den KCNQ1 Kanal gebunden werden. (rechts) Der HERG Kaliumkanal bindet im PKA-abhängig phosphorylierten (P) Zustand an intrazellulären Domänen 14-3-3ε. Eine Interaktion von 14-3-3 mit einem AKAP konnte gezeigt werden. 14-3-3ε könnte somit als Linker zwischen dem HERG Kaliumkanal und PKA fungieren.

6 Zusammenfassung

In fünf nicht verwandten Familien wurden unterschiedliche Mutationen gefunden, welche alle im C-Terminus von HERG lokalisiert waren und deren Träger insbesondere unter emotional oder durch Stress ausgelösten kardialen Attacken litten. Bei der elektrophysiologischen Untersuchung der Mutanten konnte für HERG-R744X und S818L kein Strom detektiert werden, wohingegen die Ströme der anderen Mutanten denen des Wildtyps glichen.

Für HERG-R744X und S818L konnte immunzytochemisch ein Defekt des subzellulären Transportes nachgewiesen werden. Bei der Koexpression mit dem Wildtyp stellte sich heraus, dass dieser Defekt nicht dominant-negativ war, sondern wohl eher auf eine Haploinsuffizienz zurückzuführen ist. Die Mutationen zeigten unterschiedliche Transportdefekte. R744X blieb im ER und wurde nicht glykosyliert. S818L wurde bis zum Golgi-Apparat transportiert und entsprechend glykosyliert.

Die in ihren biophysikalischen Eigenschaften dem Wildtyp gleichenden Mutanten G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 unterschieden sich vom Wildtyp in ihrer Sensitivität durch $14-3-3\epsilon$. Der Effekt war dominant-negativ und führte zum Verlust einer $14-3-3\epsilon$ -abhängigen Änderung der spannungsabhängigen Aktivierung, welche sich im Wildtyp HERG als Verschiebung um $\sim 10\text{mV}$ zu negativeren Potentialen manifestierte. Computersimulationen von β -adrenerg stimulierten Kardiomyozyten zeigten, dass der Verlust der PKA-abhängigen Aktivierung von HERG die Entstehung von Herzarrhythmien begünstigt.

Das klinische Bild und die Symptomatik der Träger der Mutationen HERG-R744X und S818L sind durch den nicht dominant-negativen Transportdefekt erklärbar, welcher zu einer Reduktion von I_{Kr} um 50% führt. Das klinische Bild der Patienten mit den Mutationen G965X, R1014fsX38 und V1038fsX20 kann durch den Verlust der $14-3-3\epsilon$ -abhängigen Regulation von HERG erklärt werden, da dies ebenfalls zu einer Reduktion der HERG-Aktivität führt.

7 Literaturverzeichnis

Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA (1999). MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*, **97**, 175-187.

Akhavan A, Atanasiu R, Shrier A (2003). Identification of a COOH-terminal segment involved in maturation and stability of human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *J Biol Chem*, **278**, 40105-40112.

An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*, **403**, 553-556.

Aydar E, Palmer C (2001). Functional characterization of the C-terminus of the human ether- \tilde{A} -go-go-related gene K(+) channel (HERG). *J Physiol*, **534**, 1-14.

Bers DM (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, **415**, 198-205.

Berthet M, Denjoy I, Donger C, Demay L, Hammoude H, Klug D, Schulze-Bahr E, Richard P, Funke H, Schwartz K, Coumel P, Hainque B, Guicheney P (1999). C-terminal HERG mutations: the role of hypokalemia and a KCNQ1-associated mutation in cardiac event occurrence. *Circulation*, **99**, 1464-1470.

Bidaud I, Mezghrani A, Swayne LA, Monteil A, Lory P (2006). Voltage-gated calcium channels in genetic diseases. *Biochim Biophys Acta*, **1763**, 1169-1174.

Booij PP, Roberts MR, Vogelzang SA, Kraayenhof R, De Boer AH (1999). 14-3-3 proteins double the number of outward-rectifying K⁺ channels available for activation in tomato cells. *Plant J*, **20**, 673-683.

Booker PD, Whyte SD, Ladusans EJ (2003). Long QT syndrome and anaesthesia. *Br J Anaesth*, **90**, 349-366.

Buxton IL, Brunton LL (1983). Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. *J Biol Chem*, **258**, 10233-10239.

Chan HC, Wu WL, So SC, Chung YW, Tsang LL, Wang XF, Yan YC, Luk SC, Siu SS, Tsui SK, Fung KP, Lee CY, Waye MM (2000). Modulation of the Ca(2+)-activated Cl(-) channel by 14-3-3epsilon. *Biochem Biophys Res Commun*, **270**, 581-587.

Chevillard C, Attali B, Lesage F, Fontes M, Barhanin J, Lazdunski M, Mattei MG (1993). Localization of a potassium channel gene (KCNE1) to 21q22.1-q22.2 by in situ hybridization and somatic cell hybridization. *Genomics*, **15**, 243-245.

Chen J, Zou A, Splawski I, Keating MT, Sanguinetti MC (1999). Long QT syndrome-associated mutations in the Per-Arnt-Sim (PAS) domain of HERG potassium channels accelerate channel deactivation. *J Biol Chem*, **274**, 10113-8.

Choe CU, Harrison KD, Grant W, Ehrlich BE (2004). Functional coupling of chromogranin with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor shapes calcium signaling. *J Biol Chem*, **279**, 35551-6.

Clancy CE, Rudy Y (2001). Cellular consequences of HERG mutations in the long QT syndrome: precursors to sudden cardiac death. *Cardiovasc Res*, **50**, 301-313.

Clark GJ, Drugan JK, Rossman KL, Carpenter JW, Rogers-Graham K, Fu H, Der CJ, Campbell SL (1997). 14-3-3 zeta negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain. *J Biol Chem*, **272**, 20990-20993.

Craparo A, Freund R, Gustafson TA (1997). 14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner. *J Biol Chem*, **272**, 11663-11669.

Cui J, Melman Y, Palma E, Fishman GI, McDonald TV (2000). Cyclic AMP regulates the HERG K(+) channel by dual pathways. *Curr Biol*, **10**, 671-674.

Cui J, Kagan A, Qin D, Mathew J, Melman YF, McDonald TV (2001). Analysis of the cyclic nucleotide binding domain of the HERG potassium channel and interactions with KCNE2. *J Biol Chem*, **276**, 17244-17251.

Diviani D, Abuin L, Cotecchia S, Pansier L(2004). Anchoring of both PKA and 14-3-3 inhibits the Rho-GEF activity of the AKAP-Lbc signaling complex. *EMBO J*, **23**, 2811-2820.

Dodge KL, Khouangsathiene S, Kapiloff MS, Mouton R, Hill EV, Houslay MD, Langeberg LK, Scott JD (2001). mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J*, **20**, 1921-1930.

duBell WH, Lederer WJ, Rogers TB (1996). Dynamic modulation of excitation-contraction coupling by protein phosphatases in rat ventricular myocytes. *J Physiol*, **493**, 793-800.

Duchatelle-Gourdon I, Hartzell HC, Lagrutta AA (1989). Modulation of the delayed rectifier potassium current in frog cardiomyocytes by beta-adrenergic agonists and magnesium. *J Physiol*, **415**, 251-274.

Ficker E, Dennis AT, Obejero-Paz CA, Castaldo P, Taglialatela M, Brown AM (2000). Retention in the endoplasmic reticulum as a mechanism of dominant-negative current suppression in human long QT syndrome. *J Mol Cell Cardiol*, **32**, 2327-2337.

Ficker E, Thomas D, Viswanathan PC, Dennis AT, Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Wible BA, Kaufman ES, Iyengar S, Schwartz PJ, Rudy Y, Brown AM (2000). Novel characteristics of a misprocessed mutant HERG channel linked to hereditary long QT syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **279**, 1748-1756.

Ficker E, Dennis AT, Wang L, Brown AM (2003). Role of the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel HERG. *Circ Res*, **92**, 87-100.

Fraser ID, Tavalin SJ, Lester LB, Langeberg LK, Westphal AM, Dean RA, Marrion NV, Scott JD (1998). A novel lipid-anchored A-kinase Anchoring Protein facilitates cAMP-responsive membrane events. *EMBO J*, **17**, 2261-2272.

Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **40**, 617-647.

Furutani M, Trudeau MC, Hagiwara N, Seki A, Gong Q, Zhou Z, Imamura S, Nagashima H, Kasanuki H, Takao A, Momma K, January CT, Robertson GA, Matsuoka R (1999). Novel mechanism associated with an inherited cardiac arrhythmia: defective protein trafficking by the mutant HERG (G601S) potassium channel. *Circulation*, **99**, 2290-2294.

Gerhardstein BL, Puri TS, Chien AJ, Hosey MM (1999). Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry*, **38**, 10361-10370.

Giles W, Nakajima T, Ono K, Shibata EF (1989). Modulation of the delayed rectifier K⁺ current by isoprenaline in bull-frog atrial myocytes. *J Physiol*, **415**, 233-249.

Gong Q, Keeney DR, Robinson JC, Zhou Z (2004). Defective assembly and

trafficking of mutant HERG channels with C-terminal truncations in long QT syndrome. *J Mol Cell Cardiol*, **37**, 1225-1233.

Gossen M, Bujard H (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5547-5551.

Gray PC, Johnson BD, Westenbroek RE, Hays LG, Yates JR 3rd, Scheuer T, Catterall WA, Murphy BJ (1998). Primary structure and function of an A kinase anchoring protein associated with calcium channels. *Neuron*, **20**, 1017-1026.

Hancox JC, Levi AJ, Witchel HJ (1998). Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native "rapid" delayed rectifier K current during the cardiac ventricular action potential. *Pflugers Arch*, **436**, 843-853.

Hawley-Nelson P, Ciccarone V, Gebeyehu G, Jese J, Felgner PL (2002). Lipfectamine reagent. *Focus* **15.73**,80.

Heath BM & Terrar DA (1996). Separation of the components of the delayed rectifier potassium current using selective blockers of IKr and IKs in guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Exp Physiol*, **81**, 587-603.

Heath BM & Terrar DA (2000). Protein kinase C enhances the rapidly activating delayed rectifier potassium current, IKr, through a reduction in C-type inactivation in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol*, **522**, 391-402.

Heusser K, Schwappach B. Trafficking of potassium channels (2005). *Curr Opin Neurobiol*, **15**, 364-369.

Huang FD, Chen J, Lin M, Keating MT, Sanguinetti MC (2001). Long-QT syndrome-associated missense mutations in the pore helix of the HERG potassium channel. *Circulation*, **104**, 1071-1075.

Hulme JT, Ahn M, Hauschka SD, Scheuer T, Catterall WA (2002). A novel leucine zipper targets AKAP15 and cyclic AMP-dependent protein kinase to the C terminus of the skeletal muscle Ca²⁺ channel and modulates its function. *J Biol Chem*, **277**, 4079-4087.

Hussain M, Drago GA, Bhogal M, Colyer J, Orchard CH (1999). Effects of the protein kinase A inhibitor H-89 on Ca²⁺ regulation in isolated ferret ventricular myocytes. *Pflugers Arch*, **437**, 529-37.

Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.

Isbrandt D, Friederich P, Solth A, Haverkamp W, Ebneith A, Borggreffe M, Funke H, Sauter K, Breithardt G, Pongs O, Schulze-Bahr E (2002). Identification and functional characterization of a novel KCNE2 (MiRP1) mutation that alters HERG channel kinetics. *J Mol Med*, **80**, 524-532.

Jervell A & Lange-Nielsen F (1957). Congenital deaf mutism, functional heart disease with prolongation of the QT interval, and sudden death. *Am Heart J*, **54**, 59-78.

Jiang C, Atkinson D, Towbin JA, Splawski I, Lehmann MH, Li H, Timothy K, Taggart RT, Schwartz PJ, Vincent GM, Moss AJ, Keating MT (1994). Two long QT syndrome loci map to chromosomes 3 and 7 with evidence for further heterogeneity. *Nat Genet*, **8**, 141-147.

Jin J, Smith FD, Stark C, Wells CD, Fawcett JP, Kulkarni S, Metalnikov P, O'Donnell P, Taylor P, Taylor L, Zougman A, Woodgett JR, Langeberg LK, Scott JD, Pawson T (2004). Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular

organization. *Curr Biol*, **14**, 1436-1450.

Kagan A, Yu Z, Fishman GI, McDonald TV (2000). The dominant negative LQT2 mutation A561V reduces wild-type HERG expression. *J Biol Chem*, **275**, 11241-11248.

Kagan A, Melman YF, Krumerman A, McDonald TV (2002). 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K⁺ channel activity. *EMBO J*, **21**, 1889-1898.

Kapiloff MS, Schillace RV, Westphal AM, Scott JD (1999). mAKAP: an A-kinase anchoring protein targeted to the nuclear membrane of differentiated myocytes. *J Cell Sci*, **112**, 2725-36.

Kapiloff MS, Jackson N, Airhart N (2001). mAKAP and the ryanodine receptor are part of a multi-component signaling complex on the cardiomyocyte nuclear envelope. *J Cell Sci*, **114**, 3167-3176.

Kapiloff MS (2002). Contributions of protein kinase A anchoring proteins to compartmentation of cAMP signaling in the heart. *Mol Pharmacol*, **62**, 193-199.

Kiehn J, Karle C, Thomas D, Yao X, Brachmann J, Kubler W (1998). HERG potassium channel activation is shifted by phorbol esters via protein kinase A-dependent pathways. *J Biol Chem*, **273**, 25285-25291.

Kozak M (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, **44**, 283-292.

Kleizen B, Braakman I, de Jonge HR (2000). Regulated trafficking of the CFTR chloride channel. *Eur J Cell Biol*, **79**, 544-556.

Ku NO, Liao J, Omary MB (1998). Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO J*, **17**, 1892-1906.

Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RH (2000). Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res*, **86**, 51-58.

Kupersmidt S, Yang T, Chanthaphaychith S, Wang Z, Towbin JA, Roden DM (2002). Defective human Ether- \AA -go-go-related gene trafficking linked to an endoplasmic reticulum retention signal in the C terminus. *J Biol Chem*, **277**, 27442-8.

Lai HC, Jan LY. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels (2006). *Nat Rev Neurosci*, **7**, 548-62.

Lehoux S, Abe Ji, Florian JA, Berk BC (2001). 14-3-3 Binding to Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1 is associated with serum-dependent activation of Na⁺/H⁺ exchange. *J Biol Chem*, **276**, 15794-15800.

Lei M & Brown HF (1996). Two components of the delayed rectifier potassium current, I_K, in rabbit sino-atrial node cells. *Exp Physiol*, **81**, 725-741.

Lei M, Brown HF, Terrar DA (2000). Modulation of delayed rectifier potassium current, i_K, by isoprenaline in rabbit isolated pacemaker cells. *Exp Physiol*, **85**, 27-35.

Leonoudakis D, Mailliard W, Wingerd K, Clegg D, Vandenberg C (2001). Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with synapse-associated protein SAP97. *J Cell Sci*, **114**, 987-998.

Luo CH, Rudy Y (1994). A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. II. Afterdepolarizations, triggered activity, and potentiation. *Circ Res*, **74**, 1097-1113.

Malan D, Levi RC, Alloatti G, Marcantoni A, Bedendi I, Gallo MP (2003). Cyclic AMP and cyclic GMP independent stimulation of ventricular calcium current by peroxynitrite donors in guinea pig myocytes. *J Cell Physiol*, **197**, 284-296.

Lindl T und Bauer J (1989). Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Luiken JJ, Willems J, Coort SL, Coumans WA, Bonen A, Van Der Vusse GJ, Glatz JF (2002). Effects of cAMP modulators on long-chain fatty-acid uptake and utilization by electrically stimulated rat cardiac myocytes. *Biochem J*, **367**, 881-887.

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemlit N, Marks AR (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, **101**, 65-76.

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang YM, Rosemlit N, Marks AR (2001). Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *J Cell Biol*, **153**, 699-708.

Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, Kass RS. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science*, **295**, 496-499.

Miller C (1996). The inconstancy of the human heart. *Nature*, **379**, 767-768.

Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogne K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H, Bennett V (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*, **421**, 634-639.

Moss AJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Tzivoni D, Locati EH, MacCluer J, Hall WJ, Weitkamp L, Vincent GM, Garson A Jr, et al (1991). The long QT syndrome. Prospective longitudinal study of 328 families. *Circulation*, **84**, 1136-1144.

Nakajima T, Kurabayashi M, Ohyama Y, Kaneko Y, Furukawa T, Itoh T, Taniguchi Y, Tanaka T, Nakamura Y, Hiraoka M, Nagai R (2000). Characterization of S818L mutation in HERG C-terminus in LQT2. Modification of activation-deactivation gating properties. *FEBS Lett*, **481**, 197-203.

Mullis K, Faloona F, scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **51Pt 1**:263-273

Noda T, Takaki H, Kurita T, Suyama K, Nagaya N, Taguchi A, Aihara N, Kamakura S, Sunagawa K, Nakamura K, Ohe T, Horie M, Napolitano C, Towbin JA, Priori SG, Shimizu W (2002). Gene-specific response of dynamic ventricular repolarization to sympathetic stimulation in LQT1, LQT2 and LQT3 forms of congenital long QT syndrome. *Eur Heart J*, **23**, 975-983.

Paulussen A, Raes A, Matthijs G, Snyders DJ, Cohen N, Aerssens J (2002). A novel mutation (T65P) in the PAS domain of the human potassium channel HERG results in the long QT syndrome by trafficking deficiency. *J Biol Chem*, **277**, 48610-48616.

Pongs O (1999). Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to

excitement. *FEBS Lett*, **452**, 31-35.

Potet F, Scott JD, Mohammad-Panah R, Escande D, Baro I (2001). AKAP proteins anchor cAMP-dependent protein kinase to KvLQT1/IsK channel complex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **280**, 2038-2045.

Prezeau L, Richman JG, Edwards SW, Limbird LE (1999). The zeta isoform of 14-3-3 proteins interacts with the third intracellular loop of different alpha2-adrenergic receptor subtypes. *J Biol Chem*, **274**, 13462-13469.

Reuter H (1967). The dependence of slow inward current in Purkinje fibers on the extracellular calcium concentration. *J Physiol (Lond.)*, **192**, 479-492.

Reuter H & Scholz H (1977). A study of the ion selectivity and the kinetic properties of calcium dependent slow inward current in mammalian cardiac muscle. *J Physiol (Lond.)*, **264**, 17-47.

Roden DM, Balser JR, George AL Jr, Anderson ME (2002). Cardiac ion channels. *Annu Rev Physiol*, **64**, 431-475.

Romano C (1963). Congenital cardiac arrhythmias. *Lancet* **1**, 658.

Ward OC (1964). A new familial cardiac syndrome in children. *J Med Assoc*, **54**, 103-106.

Roti EC, Myers CD, Ayers RA, Boatman DE, Delfosse SA, Chan EK, Ackerman MJ, January CT, Robertson GA (2002). Interaction with GM130 during HERG ion channel trafficking. Disruption by type 2 congenital long QT syndrome mutations. Human Ether-Å -go-go-Related Gene. *J Biol Chem*, **277**, 47779-47785.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich

HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.

Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Ed.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-5467.

Sanguinetti MC, Curran ME, Spector PS, Keating MT (1996). Spectrum of HERG K⁺-channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 2208-2212.

Saucerman JJ, Brunton LL, Michailova AP, McCulloch AD (2003). Modeling beta-adrenergic control of cardiac myocyte contractility in silico. *J Biol Chem*, **278**, 47997-48003.

Sauviat MP, Colas A, Pages N (2002). Does lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) increase the rapid delayed rectifier outward K⁺ current (I_{Kr}) in frog atrial myocytes? *BMC Pharmacol*, **2**, 15.

Schott JJ, Charpentier F, Peltier S, Foley P, Drouin E, Bouhour JB, Donnelly P, Vergnaud G, Bachner L, Moisan JP, LeMarec H, Pascal O (1995). Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am J Hum Genet*, **57**, 1114-1122.

Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O, Isbrandt D (2003). Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest*, **111**, 1537-1545.

Schwartz PJ, Periti M, Malliani A (1975). The long Q-T syndrome. *Am Heart J*, **89**, 378-390.

Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AA, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R (2001). Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation*, **103**, 89-95.

Simmerman HK, Jones LR (1998). Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev*, **78**, 921-947.

Smith PL, Baukrowitz T, Yellen G (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature*, **379**, 833-6.

Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT (1997). Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet*, **17**, 338-340.

Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT (2000). Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation*, **102**, 1178-1185.

Sokolov S, Scheuer T, Catterall WA (2007). Gating pore current in an inherited ion channelopathy. *Nature*, **446**, 76-78.

Steinberg SF, Brunton LL (2001). Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **41**, 751-773.

Sulakhe PV, Vo XT (1995). Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli: roles of cyclic nucleotides, calcium, protein kinases and phosphatases and depolarization. *Mol Cell Biochem*, **149-150**, 103-126.

Terrenoire C, Clancy CE, Cormier JW, Sampson KJ, Kass RS (2005). Autonomic control of cardiac action potentials: role of potassium channel kinetics in response to sympathetic stimulation. *Circ Res*. **96**: e25-34.

Thomas D, Zhang W, Karle CA, Kathofer S, Schols W, Kubler W, Kiehn J (1999). Deletion of protein kinase A phosphorylation sites in the HERG potassium channel inhibits activation shift by protein kinase A. *J Biol Chem*, **274**, 27457-27462.

Thorson JA, Yu LW, Hsu AL, Shih NY, Graves PR, Tanner JW, Allen PM, Piwnicka-Worms H, Shaw AS (1998). 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol Cell Biol*, **18**, 5229-5238.

Tutor AS, Delpon E, Caballero R, Gomez R, Nunez L, Vaquero M, Tamargo J, Mayor F Jr, Penela P (2006). Association of 14-3-3 proteins to beta1-adrenergic receptors modulates Kv11.1 K⁺ channel activity in recombinant systems. *Mol Biol Cell*, **17**, 4666-4674.

Tyson J, Tranebjaerg L, Bellman S, Wren C, Taylor JF, Bathen J, Aslaksen B, Sorland SJ, Lund O, Malcolm S, Pembrey M, Bhattacharya S, Bitner-Glindzicz M (1997). IsK and KvLQT1: mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Hum Mol Genet*, **6**, 2179-2185.

Tzivion G, Luo ZJ, Avruch J (2000). Calyculin A-induced vimentin

phosphorylation sequesters 14-3-3 and displaces other 14-3-3 partners in vivo. *J Biol Chem*, **275**, 29772-29778.

Tzivion G & Avruch J (2002). 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem*, **277**, 3061-3064.

Vila Petroff MG, Egan JM, Wang X, Sollott SJ (2001). Glucagon-like peptide-1 increases cAMP but fails to augment contraction in adult rat cardiac myocytes. *Circ Res*, **89**, 445-452.

Walsh KB & Kass RS (1988). Regulation of a heart potassium channel by protein kinase A and C. *Science*, **242**, 67-69.

Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT (1995). SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell*, **80**, 805-811.

Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet*, **12**, 17-23.

Widen C, Zilliacus J, Gustafsson JA, Wikstrom AC (2000). Glucocorticoid receptor interaction with 14-3-3 and Raf-1, a proposed mechanism for cross-talk of two signal transduction pathways. *J Biol Chem*, **275**, 39296-39301.

Wilde AA, Jongbloed RJ, Doevendans PA, Duren DR, Hauer RN, van Langen IM, van Tintelen JP, Smeets HJ, Meyer H, Geelen JL (1999). Auditory stimuli as a trigger for arrhythmic events differentiate HERG-related (LQTS2) patients from KVLQT1-related patients (LQTS1). *J Am Coll Cardiol*, **33**, 327-332.

Xu H, Stein B, Liang B (1996). Characterization of a stimulatory adenosine A_{2a} receptor in adult rat ventricular myocyte. *Am J Physiol*, **270**, 1655-1661.

Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*, **91**, 961-971.

Yazawa K, Kameyama M (1990). Mechanism of receptor-mediated modulation of the delayed outward potassium current in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol*, **421**, 135-50.

Yip-Schneider MT, Miao W, Lin A, Barnard DS, Tzivion G, Marshall MS (2000). Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. *Biochem J*, **351**, 151-159.

Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY (1999). A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* **22**, 537-548.

Zerangue N, Malan MJ, Fried SR, Dazin PF, Jan YN, Jan LY, Schwappach B (2001). Analysis of endoplasmic reticulum trafficking signals by combinatorial screening in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 2431-2436.

Zhao XL, Gutierrez LM, Chang CF, Hosey MM (1994). The alpha 1-subunit of skeletal muscle L-type Ca channels is the key target for regulation by A-kinase and protein phosphatase-1C. *Biochem Biophys Res Commun*, **198**, 166-173.

Zhou Y, Schopperle WM, Murrey H, Jaramillo A, Dagan D, Griffith LC, Levitan IB (1999). A dynamically regulated 14-3-3, Slob, and Slowpoke potassium channel complex in *Drosophila* presynaptic nerve terminals. *Neuron*, **22**, 809-818.

Zhou YY, Cheng H, Song LS, Wang D, Lakatta EG, Xiao RP (1999). Spontaneous beta(2)-adrenergic signaling fails to modulate L-type Ca(2+) current in mouse ventricular myocytes. *Mol Pharmacol*, **56**, 485-493.

Zhou Z, Gong Q, Epstein ML, January CT (1998). HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects. *J Biol Chem*, **273**, 21061-21066.

Zhou Z, Gong Q, January CT (1999). Correction of defective protein trafficking of a mutant HERG potassium channel in human long QT syndrome. Pharmacological and temperature effects. *J Biol Chem*, **274**, 31123-31126.

Zhu J & Ferrier GR (2000). Regulation of a voltage-sensitive release mechanism by Ca(2+)-calmodulin-dependent kinase in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **279**, 2104-2115.

Zou A, Xu QP, Sanguinetti MC (1998). A mutation in the pore region of HERG K⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes reduces rectification by shifting the voltage dependence of inactivation. *J Physiol*, **509**, 129-137.

8 Anhang

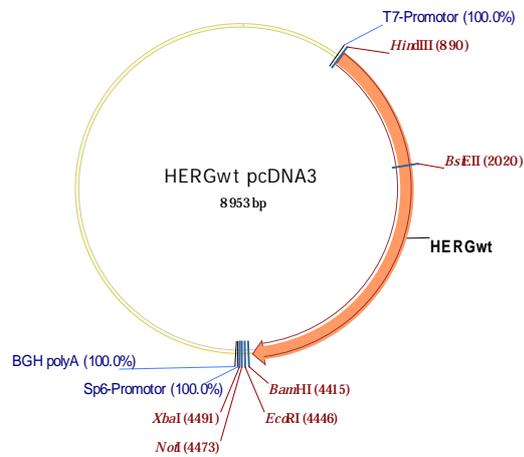
8.1 Abkürzungsverzeichnis

μ	micro (10 ⁻⁶)
°C	Grad Celsius
A	Ampère
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Coulomb, Kapazität
C-Terminus	Carboxyterminus einer Proteinkette
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CHO	<i>Chinese hamster ovary cells</i>
COS7	<i>African green monkey kidney cells</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Potential
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
F	Farad
G	Giga (10 ⁹)
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HERG	<i>human ether-à-go-go</i>
I	Strom
JLN	Jervell-Lange-Nielsen Syndrom
K	Kalium
kbp	Kilobasenpaare
KOH	Kaliumhydroxid

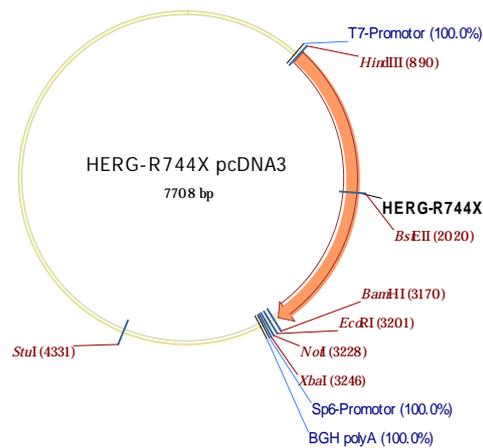
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LB	Luria bertani
LQT	Langes QT-Zeit Syndrom
m	milli (10^{-3})
M	Mega (10^6)
min	Minute
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	nano (10^{-9})
N-Terminus	Aminoterminus einer Proteinkette
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p	pico (10^{-12})
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
T	absolute Temperatur
TAE	Tris-Azetat-EDTA
Tris	Tris (-hydroxymethyl)-aminoethan
U	<i>Unit</i> , Enzymeinheit
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
V _{1/2}	Potenzial der halbmaximalen Aktivierung
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

8.2 Klonkarten

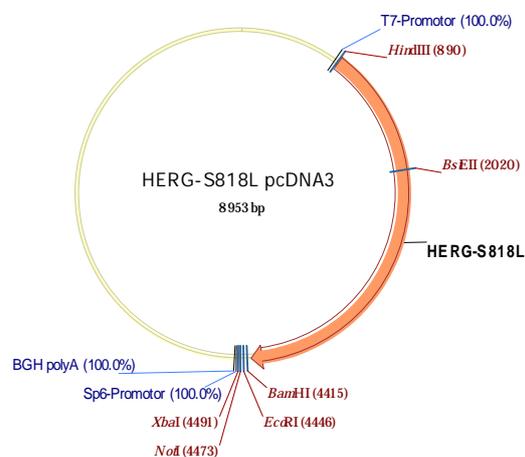
8.2.1 pcDNA3-HERGwt



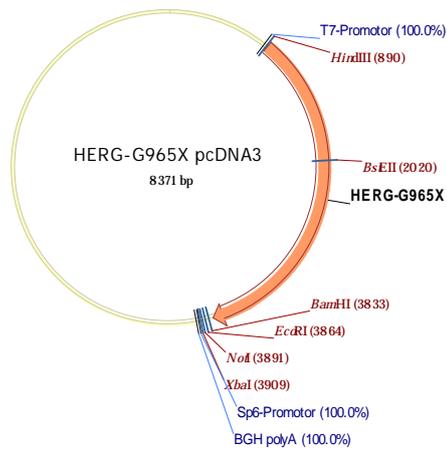
8.2.2 pcDNA3-HERG-R744X



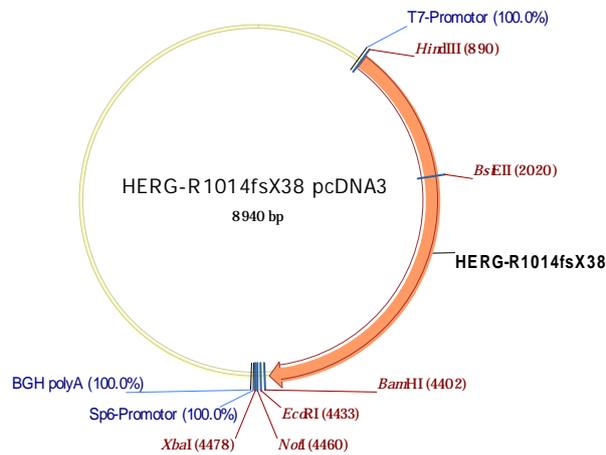
8.2.3 pcDNA3-HERG-S818L



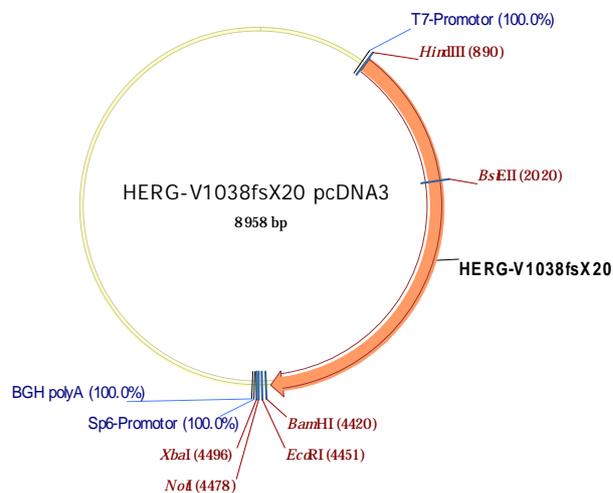
8.2.4 pcDNA3-HERG-G965X



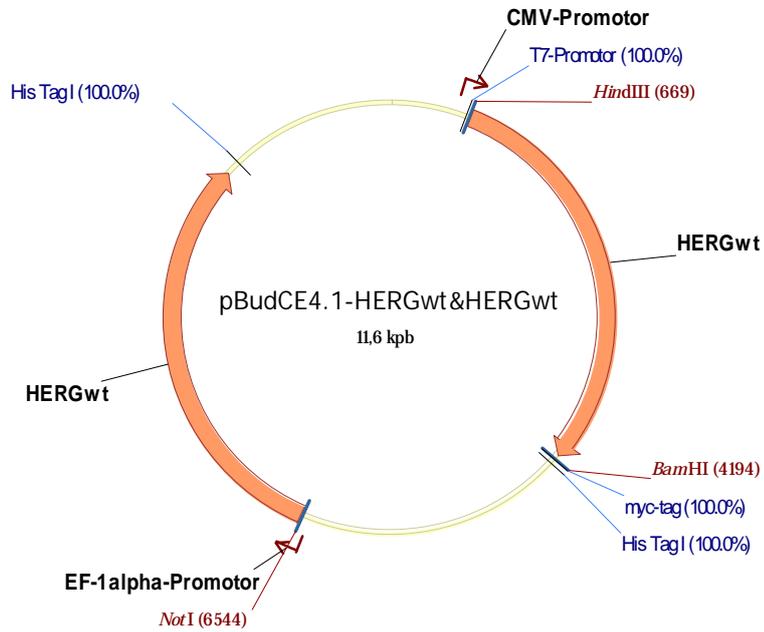
8.2.5 pcDNA3-HERG-R1014fsX38



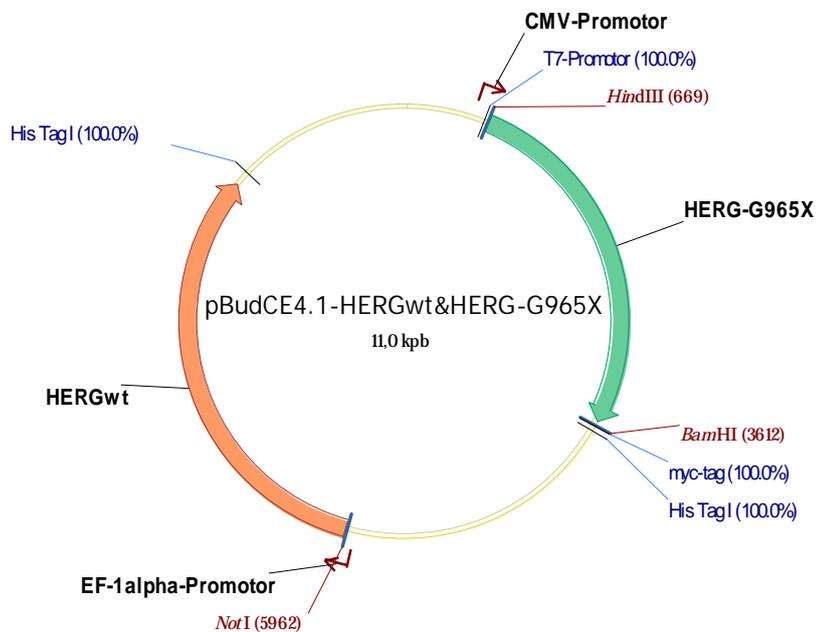
8.2.6 pcDNA3-HERG-V1038fsX20



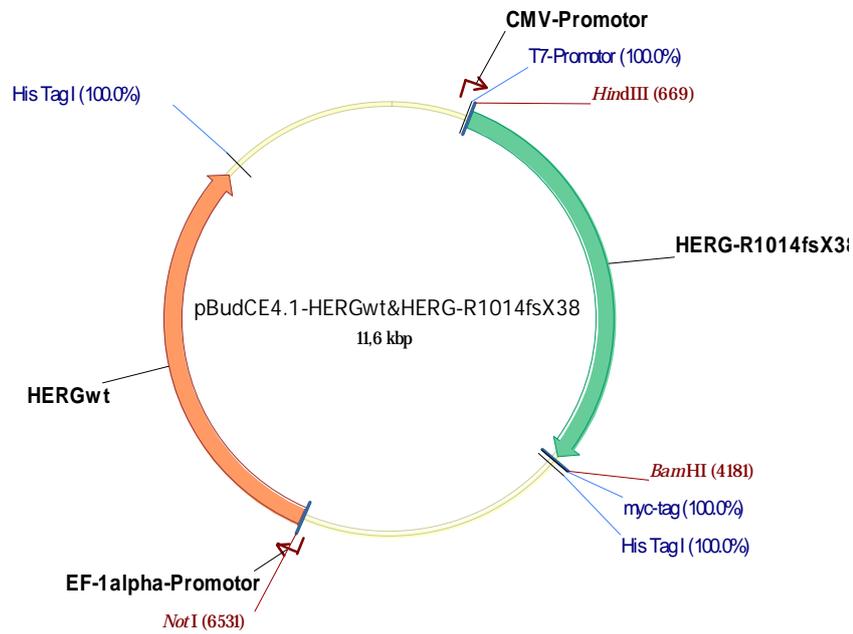
8.2.7 pBudCE4.1 mit HERG-wt ($P_{EF-1\alpha}$) & HERGwt (P_{CMV})



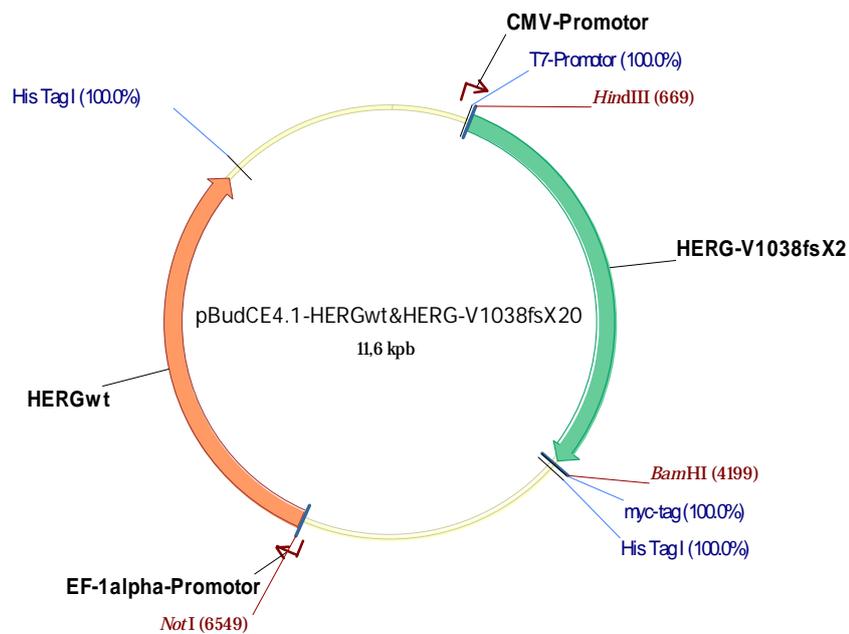
8.2.8 pBudCE4.1 mit HERG-wt ($P_{EF-1\alpha}$) & HERG-G965X (P_{CMV})



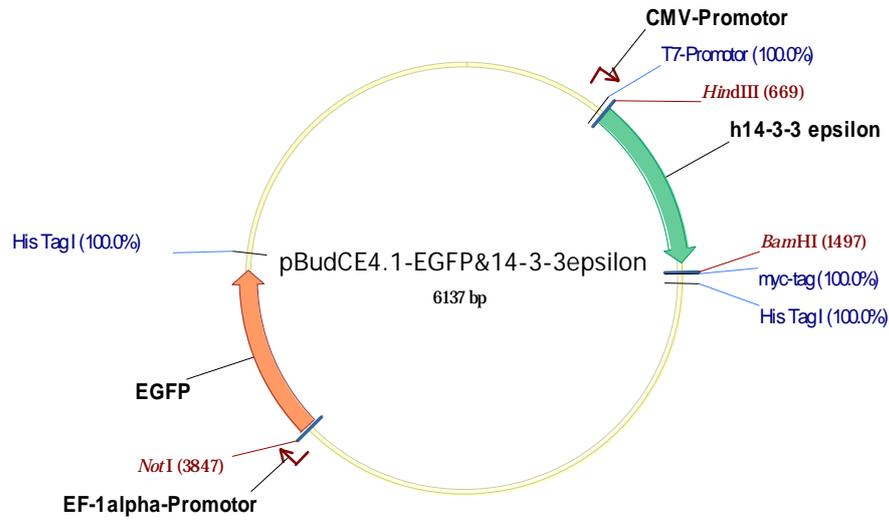
8.2.9 pBudCE4.1 mit HERG-wt ($P_{EF-1\alpha}$) & HERG-R1014fsX38 (P_{CMV})



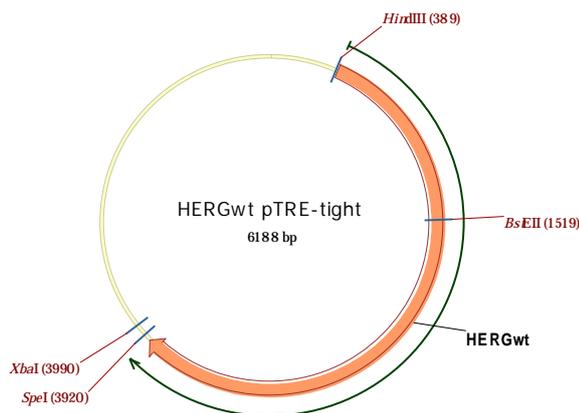
8.2.10 pBudCE4.1 mit HERG-wt ($P_{EF-1\alpha}$) & HERG-V1038fsX20 (P_{CMV})



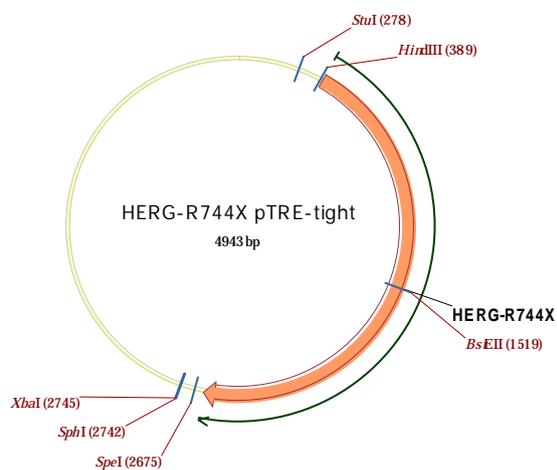
8.2.11 pBudCE4.1 mit EGFP ($P_{EF-1\alpha}$) & humanes 14-3-3 epsilon (P_{CMV})

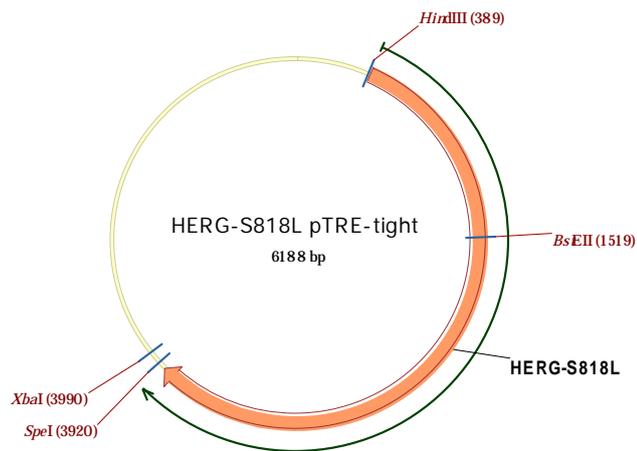
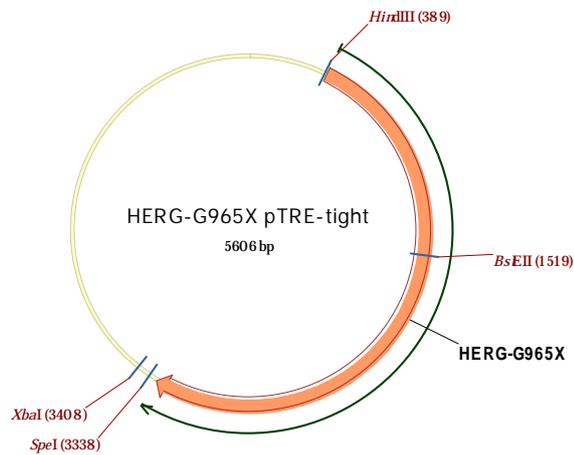
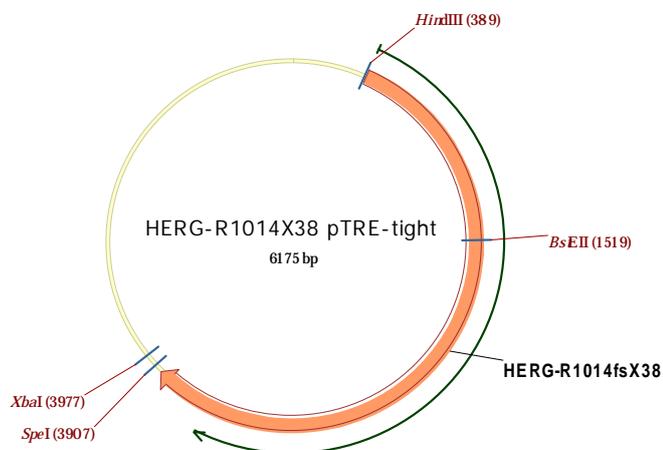


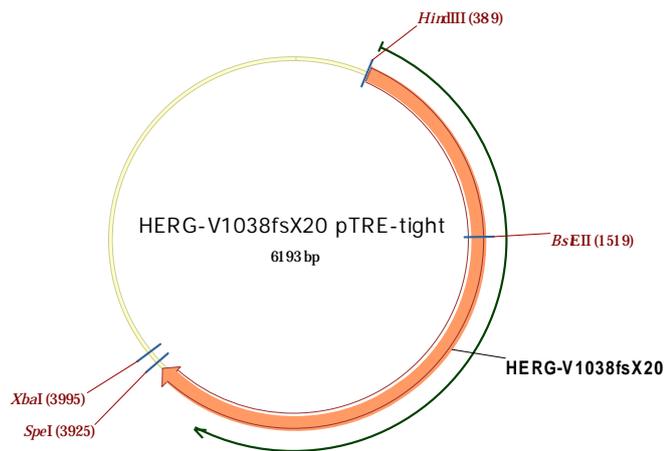
8.2.12 pTRE-tight-HERGwt



8.2.13 pTRE-tight-HERG-R744X



8.2.14 pTRE-tight-HERG-S818L**8.2.15 pTRE-tight-HERG-G965X****8.2.16 pTRE-tight-HERG-R1014fsX38**

8.2.17 pTRE-tight-HERG-V1038fs20

8.3 Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Olaf Pongs für die zellbiologischen Lektionen, die wissenschaftlichen Diskussion, die Durchsicht und Betreuung der Arbeit. Dr. Dirk Isbrandt möchte ich für die molekularbiologische Einführung, für zahlreiche lehrreiche Ratschläge und Diskussionen, sowie für die Überlassung und Betreuung dieser Arbeit danken. Weiterhin gilt mein Dank Kathrin Sauter für ihre molekularbiologische Unterstützung und Hilfe. Für die Einführung in die Elektrophysiologie und für viele elektrophysiologische Diskussionen und Ratschläge danke ich Dr. Axel Neu. Weiterhin möchte ich Dr. Eric Schulze-Bahr, Dr. Pascale Guicheney und Dr. Silvia Priori für die Kooperation während dieses Projektes danken. Ich danke Cornelia Siebrans für zahlreiche elektrophysiologische Diskussionen. Mein ausdrücklicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Neurale Signaltransduktion, welche durch wissenschaftliche, aber insbesondere gesellige Stunden die Fertigstellung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

8.5 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

8.5.1 Originalartikel

Choe CU, Schulze-Bahr E, Neu A, Xu J, Zhu ZI, Sauter K, Bähring R, Priori S, Guicheney P, Monnig G, Neapolitano C, Heidemann J, Clancy CE, Pongs O, Isbrandt D (2006). C-terminal HERG (LQT2) mutations disrupt IKr channel regulation through 14-3-3epsilon. *Hum Mol Genet.* **15**, 2888-902.

Jacob SN, Choe CU, Uhlen P, DeGray B, Yeckel MF, Ehrlich BE (2005). Signaling micro-domains regulate InsP₃-mediated intracellular calcium transients in cultured neurons. *J Neurosci*, **25**, 2853-2864.

Choe CU, Harrison KD, Grant W, Ehrlich BE (2004). Functional coupling of chromogranin with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor shapes calcium signaling. *J Biol Chem*, **279**, 35551-35556.

Thrower EC, Choe CU, So SH, Jeon SH, Ehrlich BE, Yoo SH (2003). A functional interaction between chromogranin B and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ channel. *J Biol Chem*, **278**, 49699-49706.

8.5.2 Übersichtsartikel

Choe CU, Ehrlich BE (2006). The Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork. *Sci STKE*. 2006 Nov 28;2006(363):re15.

8.5.3 Kongressbeiträge/Posterpräsentationen

Choe CU, Isbrandt D, Neu A, Priori S, Guicheney P, Mönning G, Napolitano C, Heidemann J, Pongs O, Schulze-Bahr E (2005). C-terminal *HERG* (LQT2) mutations disrupt *I_{Kr}* channel regulation through 14-3-3ε. Mit dem 2. Posterpreis ausgezeichnete Posterpräsentation auf dem 3. Deutsch-

Niederländischen Kongress für Molekulare Kardiologie, Münster, Deutschland.

Choe CU, Harrison KD, Grant W, Ehrlich BE (2004). Functional coupling of chromogranin with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor shapes calcium signaling. Posterpräsentation auf dem 48. Jahreskongress der *Biophysical Society* in Baltimore, USA.

Jacob SN, Choe CU, Uhlen P, deGray B, Yeckel MF, Ehrlich BE (2004). Signaling micro-domains regulate InsP₃-mediated intracellular calcium transients in cultured neurons. Posterpräsentation auf dem 48. Jahreskongress der *Biophysical Society* in Baltimore, USA.

Thrower EC, Choe CU, So SH, Jeon SH, Ehrlich BE, Yoo SH (2003). A functional interaction between chromogranin B and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ channel. Posterpräsentation auf dem 47. Jahreskongress der *Biophysical Society* in San Antonio, USA.

Geng L, Choe CU, Yu ZH, Okuhaya D, Maeda Y, Cai Y, Tian X, Ehrlich BE and Somlo S (2003). Functional Interaction of Polycystin-2 with the SNARE protein, Syntaxin-5. Posterpräsentation auf der *Renal Week 2003* der *American Society of Nephrology* in San Diego, USA.

Jiang QX, Choe CU, Thrower EC, Chester DW, Ehrlich BE and Sigworth FJ (2003). Three-dimensional Rearrangement for the Gating of an Inositol-1,4,5-trisphosphate Receptor. Präsentation auf dem *47. Jahrestreffen der Biophysical Society* in San Antonio, USA.

8.6 Erklärung

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

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

Chi-un Choe