

Regulation von kardialer KCNQ1- und TRPM4b-Ionenkanalaktivität

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades im
Department Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von
Martin Kruse

Hamburg, 08.01.2009

Diese Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. O. Pongs im
Institut für Neurale Signalverarbeitung am Zentrum für Molekulare
Neurobiologie Hamburg (ZMNH) angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet und diese Arbeit an keiner anderen Stelle zuvor eingereicht habe.

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Hahn
2. Gutachter: Prof. Dr. O. Pongs
Datum der Disputation: 27.02.2009

Hamburg, den 08.01.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Erregungsweiterleitung im Herzen	1
1.2	Fehlfunktionen im humanen Herzen durch disregulierte Ionenkanäle . .	1
1.2.1	<i>Long QT - Syndrome</i>	3
1.2.2	KCNQ1	5
1.2.3	<i>Progressive Familial Heart Block Type I</i>	6
1.2.4	TRPM4	8
1.3	Aufgabenstellung der Arbeit	9
2	Material	11
2.1	Chemikalien und Gebrauchsmaterialien	11
2.2	Lösungen und Puffer	11
2.3	Bakterienstämme und Zelllinien	19
2.4	Nährmedien	19
2.5	Zellkulturmedien und -lösungen	20
2.6	Molekulargewichtsstandards	21
2.7	Plasmidvektoren	21
2.8	Mauslinien	22
3	Methoden	23
3.1	Gewebepräparation	23
3.1.1	Isolierung ventrikulärer Myozyten aus adulten Mäusen	23
3.2	RNA-Synthese mittels <i>in vitro</i> Transkription	24
3.3	Nukleinsäure-analytische Methoden	24
3.3.1	DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien	24
3.3.2	Genotypisierung von <i>KCNQ1</i> ^{-/-} Mäusen mittels PCR	25
3.3.3	DNA-Gelelektrophorese	26
3.3.4	DNA-Konzentrationsbestimmung	26
3.3.5	RNA-Konzentrationsbestimmung	26
3.4	Klonierung von Plasmiden	27
3.4.1	Modifikation von DNA mittels Restriktionsendonucleasen	27
3.4.2	Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels präparativer Agarose- Gelelektrophorese	27
3.4.3	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	27

3.4.4	Ligation von DNA	27
3.4.5	Transformation in <i>E.coli</i>	28
3.4.6	Plasmid-Mini-Präparationen (Miniprep)	28
3.4.7	Plasmid-Midi-Präparationen (Midiprep)	28
3.4.8	Sequenzierung von DNA	29
3.5	Zellbiologische Methoden	30
3.5.1	Präparation von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten sowie Injektion von cRNA	30
3.5.2	Kultivierung von Gewebekulturzellen	30
3.5.3	Transfektion von Gewebekulturzellen	30
3.6	Protein-analytische Methoden	31
3.6.1	Aufreinigung von Membranproteinen zur Western-Blot-Analyse	31
3.6.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	32
3.6.3	Immunpräzipitation	32
3.6.4	Protein-Gelelektrophorese	32
3.6.5	Immunodetektion von TRPM4b mittels Western Blot	33
3.6.6	Immunfluoreszenzanalyse zur Untersuchung von TRPM4b-Lo- kalisierung	34
3.6.7	Untersuchung von Oberflächenexpression mittels <i>Fluorescence</i> <i>Activated Cell Sorting</i> (FACS)	34
3.7	Elektrophysiologie	35
3.7.1	Patch-Clamp-Technik	35
3.7.2	Aufbau des Meßstandes	37
3.7.3	Patchpipetten und Elektroden	38
3.7.4	Mikroskop	38
3.7.5	Applikation von Pharmaka	38
3.7.6	Bestimmung der Konzentration von freien Ca^{2+} -Ionen in Mess- lösungen	38
3.7.7	Aufnahme der Meßdaten	39
3.7.8	Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Regulation des spannungsgesteuerten Kaliumkanals KCNQ1 in ventri- kulären Myozyten adulter Mäuse	40
4.1.1	Identifizierung eines KCNQ1-vermittelten Kalium-Auswärts- stroms in ventrikulären Myozyten adulter C57Bl/6J-Mäuse	40
4.1.2	Reversibilität einer Linopirdine-vermittelten Inhibition von Ka- liumauswärtsströmen	42
4.1.3	Vergleich von Linopirdine-sensitiven Kaliumauswärtsströmen mit mKCNQ1-Strömen in Oozyten von <i>Xenopus laevis</i>	44
4.1.4	Messung von Kaliumauswärtsströmen in ventrikulären Myozy- ten adulter <i>KCNQ1</i> ^{-/-} - Mäuse	46

Inhaltsverzeichnis

4.1.5	Stimulation von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen durch Isoproterenol . . .	47
4.1.6	Regulation von KCNQ1-Aktivität durch Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren	49
4.1.7	Analyse der Erregbarkeit ventrikulärer Myozyten von C57Bl/6J und <i>KCNQ1</i> ^{-/-} -Mäusen	54
4.2	Disregulation von TRPM4b-Kanalaktivität im Herzen von PFHBI-Patienten	64
4.2.1	Identifikation einer Mutation in <i>TRPM4</i> von PFHBI-Patienten .	64
4.2.2	Expression von TRPM4b ^{E7K} führt zu einer Erhöhung der Stromdichte in transient transfizierten Zellen	66
4.2.3	Untersuchung der Ca^{2+} -Abhängigkeit von TRPM4b-Ionenkanälen	69
4.2.4	Inside-out Patch-Clamp Messungen zeigen keine veränderte Regulation des TRPM4b ^{E7K} -Ionenkanal durch Nukleotidanaloga .	71
4.2.5	Stimulation von TRPM4b-Kanälen durch PtdIns(4,5)P ₂	71
4.2.6	Einzelkanalanalysen von TRPM4b-Ionenkanälen	74
4.2.7	Analyse der Oberflächen- und Gesamtexpression von TRPM4b-Kanälen	76
4.2.8	Inhibition Dynein-mediierter Endozytose erhöht die Stromdichte durch TRPM4b ^{wt} -Kanäle	82
4.2.9	Protein Kinase A Stimulation zeigt keinen Einfluß auf TRPM4b ^{wt} vermittelte Stromdichte	83
4.2.10	SUMOylierung beeinflusst TRPM4b-vermittelte Stromdichte .	85
5	Diskussion	91
6	Zusammenfassung	100
7	Abstract	101
	Literaturverzeichnis	102
	Abbildungsverzeichnis	113
A	Abkürzungsverzeichnis	116
B	Klonkarten	119
C	Oligonukleotide	124
D	Gefahrstoffliste	126

1 Einleitung

1.1 Erregungsweiterleitung im Herzen

Die geregelte Kontraktion des Herzens basiert auf einer koordinierten Weiterleitung elektrischer Erregung durch das gesamte Herz (Abbildung 1.1) (Randall et al. (1998), Fuster et al. (2004)). Hierbei geht die elektrische Erregung vom Sinusknoten aus und verläuft über den linken und rechten Vorhof bis zum Atrioventrikular-Knoten (AV-Knoten). Der Verlauf der elektrischen Erregung führt zu einer gerichteten Welle der Kontraktion über die Wände der Vorhöfe, welche einen Blutfluss in die Ventrikel bewirkt.

Die elektrische Erregung der Ventrikel verläuft vom AV-Knoten zum His-Bündel, hinter dem eine Verzweigung in den linken und rechten Tawara-Schenkel (Erregung des linken respektive rechten Ventrikels) auftritt. Die beiden Tawara-Schenkel werden von den Purkinje-Fasern gebildet, welche im Falle des linken Tawara-Schenkels in den linksanterioren und linksposterioren Faszikel aufgespalten sind. Über die Purkinje-Fasern verläuft die elektrische Erregung nun bis zum Apex des Herzens, von wo aus die Kontraktion beider Ventrikel über das Ventrikelmyokard ausgelöst wird. Der räumliche Erregungsverlauf im Ventrikel stellt sicher, dass es zu einer Pumpwirkung der Ventrikel in Richtung der die Herzkammern entleerenden Gefäße kommt (Randall et al. (1998), Fuster et al. (2004)).

1.2 Fehlfunktionen im humanen Herzen durch disregulierte Ionenkanäle

Die Erregungsweiterleitung erfolgt durch die zeitliche und räumliche Aufeinanderfolge von Aktionspotentialen im Herzen (Randall et al. (1998)). Für die Ausbildung dieser Aktionspotentiale sind hauptsächlich spannungsabhängige Ionenkanäle verant-

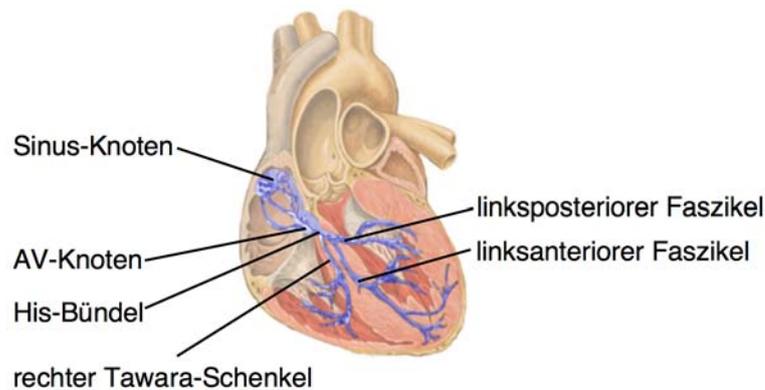


Abbildung 1.1: **Erregungsleitungssystem im menschlichen Herzen.** AV-Knoten: Atrioventrikular-Knoten. Darstellung modifiziert nach: J. Heuser, http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Reizleitungssystem_1.png.

wortlich, integrale Membranproteine, welche bei definierten Membranpotentialen in der Lage sind, Ionen entsprechend des an der Zellmembran herrschenden elektrochemischen Gradienten durch die lipophile Plasmamembran passieren zu lassen. Die Kanäle zeichnen sich durch eine hohe Selektivität für bestimmte Ionen gegenüber anderen sowie durch eine spezifische Regulation der jeweiligen Kanalaktivität aus (Hille (2001)). Eine Disregulation der Aktivität eines bestimmten an der Ausbildung von Aktionspotentialen im Herzen beteiligten Ionenkanals führt daher häufig zu einer pathologischen Situation, welche einen klinisch manifestierenden Phänotyp zur Folge hat (Crotti et al. (2008), Boussy et al. (2008)).

Kardiomyopathien, welche im Zusammenhang mit Disregulation von Ionenkanälen stehen, sind unter anderem das Brugada-Syndrom, das Sinusknoten-Syndrom, Wolff-Parkinson-White-Syndrom sowie das *long QT Syndrome* (LQTS). Während für das Brugada-, Sinusknoten- und Wolff-Parkinson-White-Syndrom eine Disregulation der Aktivität des spannungsabhängigen Natriumkanals in verschiedenen Bereichen des Herzens als ursächlich beschrieben werden konnte (Hong et al. (2004), Antzelevitch (2007), Benson et al. (2003), Sternick et al. (2006)), ist das Auftreten von LQTS in vielen Fällen mit einer Fehlfunktionalität von Kaliumionenkanälen assoziiert (Crotti et al. (2008), Goldenberg und Moss (2008) und Boussy et al. (2008)). Analog zur Situation bei Kardiomyopathien ist auch das Auftreten isolierter kardialer Übertragungserkrankungen (ICCD) wie *Progressive Familial Heart Block Type I / Type II* (PFHBI / PFHBII) mit ei-

ner Disregulation von Ionenkanalaktivität assoziiert worden, allerdings konnte bis zum Beginn dieser Arbeit keine molekulare Ursache für das Auftreten dieser Erkrankungen identifiziert werden (Brink et al. (1995), de Meeus et al. (1995)).

1.2.1 Long QT - Syndrome

LQTS wurde erstmalig im Jahr 1957 von A. Jervell und F. Lange-Nielsen klinisch beschrieben (Jervell und Lange-Nielsen (1957)). Sie publizierten die Krankengeschichte einer norwegischen Familie, deren vier Kinder alle taubstumm waren und zudem unter wiederholten Schwindelattacken und Anfällen von Bewusstlosigkeit litten. Alle Kinder zeigten in Elektrokardiogrammen eine signifikante Verlängerung des QT-Intervalls, welches einen Indikator für die Repolarisationsphase der ventrikulären Aktionspotentiale darstellt (Randall et al. (1998), Fuster et al. (2004)). Drei der vier Kinder starben später an einem plötzlichen Auftreten ventrikulärer Arrhythmien. Genetische Untersuchungen zeigten, dass rezessive Mutationen in den Genen *KCNQ1* bzw. *KCNE1* für das Auftreten dieser Form der Krankheit verantwortlich sind (Splawski et al. (2000), Priori und Napolitano (2004), Schwartz et al. (2006), Crotti et al. (2008)). *KCNQ1* kodiert für den spannungsabhängigen Kaliumkanal I_{Ks} , welcher zusammen mit der β -Untereinheit *KCNE1*, dem Genprodukt von *KCNE1*, den langsamen repolarisierenden Kaliumstrom I_{Ks} , neben I_{Kr} der wichtigste repolarisierende Kaliumstrom, im humanen Herzen leitet (Crotti et al. (2008)).

Ein Großteil der von LQTS betroffenen Patienten weist neben den für die Krankheit namensgebenden Verlängerungen des QT-Intervalls im Elektrokardiogramm nicht die von Jervell und Lange-Nielsen beschriebene Taubheit auf. Diese Form des LQTS, welche statistisch etwa 80 % aller LQTS-Patienten betrifft, wird nach ihren Erstbeschreibern als Romano-Ward-Syndrom (R-W) bezeichnet (Chiang und Roden (2000)), während die mit Taubheit assoziierte Form von LQTS als Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom (J-LN) bekannt ist (Chiang und Roden (2000), Crotti et al. (2008)). R-W-Patienten weisen im Gegensatz zu J-LN-Patienten keine rezessiven Mutationen, sondern vielmehr dominante Mutationen in den Genen *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1* oder *KCNE2* auf (Crotti et al. (2008)). Mutationen in *KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1* oder *SCN5A* stellen den größten Anteil, folglich sind Mutationen in diesen vier Genen die häufigste Ursache für das Auftreten von LQTS. Die Gene *KCNQ1*, *KCNH2* und *SCN5A* kodieren für spannungsabhängige Ionenkanäle. Neben dem bereits genannten Kaliumkanal

KCNQ1 handelt es sich um den spannungsabhängigen Kaliumkanal HERG (*KCNH2*) und den spannungsabhängigen Natriumkanal SCN5A (*SCN5A*) (Chiang und Roden (2000)). *KCNE1* kodiert für eine Beta-Untereinheit des KCNQ1-Kanals. Je nach der ursächlichen Mutation für das Auftreten von LQTS spricht man daher auch von LQT1 (*KCNQ1*), LQT2 (*KCNH2*), LQT3 (*SCN5A*) oder LQT5 (*KCNE1*) (Crotti et al. (2008)).

Eine Besonderheit unter den bisher untersuchten Formen des LQTS stellt LQT4 dar, welches durch eine Mutation in *ankyrin B* verursacht wird (Mohler et al. (2003)). Das Gen kodiert für Ankyrin B, ein Protein, welches zu einer Familie von Proteinen gehört, die integrale Membranproteine mit Komponenten des Zytoskeletts verknüpfen (Bennett und Baines (2001)). Ankyrine binden zahlreiche Ionenkanäle, wie den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, die Na^+ / K^+ -ATPase, den spannungsabhängigen Natriumkanal und den $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (Mohler et al. (2003)). Gramolini und Mitarbeiter konnten bei Expression des mutierten Ankyrin B in einem Mausmodell eine Reduktion der Expression der Na^+ / K^+ -ATPase, des $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -Austauschers und des Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptors (InsP_3R) nachweisen, welches mit einem gestörten Ca^{2+} -Gleichgewicht im Zytoplasma der untersuchten Kardiomyozyten assoziiert war (Mohler et al. (2003)). Bisher stellt LQT4 hiermit die einzige Form des LQTS dar, welche nicht primär durch eine Disregulation eines Ionenkanals verursacht wird, sondern nur über eine sekundäre Modulation von Ionenkanalaktivität.

Im Fall von LQT1-3 führt eine Disregulation von Ionenkanalaktivität zu einer nicht korrekt verlaufenden Repolarisation der ventrikulären Aktionspotentiale. Mutationen in *KCNQ1* oder *KCNH2* führen in allen beschriebenen Fällen zu einer Reduktion an Kanalaktivität (Peroz et al. (2008), Sanguinetti et al. (1996a)), welches mit verringerten Einzelkanalleitfähigkeiten, Offenwahrscheinlichkeiten oder Proteindichten in der Zellmembran assoziiert ist. Hierdurch kommt es zu einer Reduktion der Amplituden der beiden wichtigsten repolarisierenden Kaliumströme im humanen Ventrikel, I_{Ks} beziehungsweise I_{Kr} , welcher durch HERG geleitet wird. LQT3-Mutationen in *SCN5A* dagegen führen zu einer erhöhten Aktivität des spannungsabhängigen Natriumkanals *SCN5A* im Ventrikel (Crotti et al. (2008), Bennett et al. (1995)), welches zu einer Neuausbildung von Aktionspotentialen führt, während die Repolarisation des Ventrikels noch nicht vollständig abgeschlossen ist (Crotti et al. (2008)). Diese verfrühten Aktionspotentiale können schließlich zum Auftreten von tödlich verlaufenden Arrhythmien führen.

1.2.2 KCNQ1

Durch genetische Analysen an von LQTS betroffenen Familienmitgliedern einer Großfamilie aus Utah, USA, gelang es Keating und Mitarbeitern 1996, das für das Auftreten der Krankheit verantwortliche Gen auf Chromosom 11 zu identifizieren (Wang et al. (1996)). Die Aminosäuresequenz des isolierten Proteins wies eine hohe Homologie zu bereits bekannten Kaliumionenkanälen auf und wurde daher als KvLQT1 bezeichnet. Durch eine Angleichung der Nomenklatur für Kaliumionenkanäle wird KvLQT1 heutzutage als KCNQ1 bezeichnet. Mutationen in *KCNQ1* waren in allen untersuchten Fällen mit dem Auftreten von LQTS korreliert (Wang et al. (1996)). Transkripte für KCNQ1 wurden in verschiedenen Geweben nachgewiesen, u.a. in der Niere, Lunge und Plazenta, wobei die stärkste Expression im Herz detektiert wurde (Wang et al. (1996)). Diese Entdeckung führte zur Hypothese, dass *KCNQ1* für einen Kaliumionenkanal kodiert, der in LQTS-Patienten eine Disregulation aufweist, welches zu einer Störung der ventrikulären Repolarisation und damit zur Verlängerung des QT-Intervalls im Elektrokardiogramm führt.

Noch im selben Jahr veröffentlichten die Arbeitsgruppen von Keating und Lazdunski zeitgleich die ersten elektrophysiologischen Analysen heterolog exprimierter KCNQ1-Kanäle, wobei die Arbeitsgruppe von Lazdunski die Klonierung und Analyse muriner KCNQ1-Kanäle beschrieb (Sanguinetti et al. (1996b), Barhanin et al. (1996)). Eine Expression von KCNQ1-Kanälen in COS-7-Zellen und Oozyten von *Xenopus laevis* führte jeweils zu einem spannungsabhängigen, schnell aktivierenden und langsam deaktivierenden Kalium-Auswärtsstrom. Diese Charakteristik unterschied sich insofern von dem an ventrikulären Myozyten gemessenen Kaliumauswärtsstrom I_{Ks} , als dass dieser eine deutlich langsamere Aktivierungskinetik aufweist und im Gegensatz zu einer Expression von KCNQ1 keine Saturierung in der maximalen Stromamplitude bei einer Verlängerung des depolarisierenden Messpulses zeigt (Barhanin et al. (1996), Sanguinetti et al. (1996b)). Dieses Paradoxon konnte von beiden Arbeitsgruppen durch eine Koexpression von KCNQ1-Kanälen mit der Untereinheit KCNE1 gelöst werden, welche zu einer signifikanten Verlangsamung der Aktivierungskinetiken von KCNQ1 und einem nicht saturierenden Anstieg der Stromamplitude führte, die nicht von den für nativen I_{Ks} ermittelten Parametern unterscheidbar sind. Ein endgültiger Beweis für die molekulare Identität des I_{Ks} konnte 2001 von Pfeifer und Mitarbeitern durch die Herstellung und Analyse von *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen geführt werden (Casimiro et al. (2001)). Neona-

tale Mäuse weisen einen dem humanen Herzen vergleichbaren I_{K_s} -Strom auf, welcher an ventrikulären Myozyten neonataler *KCNQ1*^{-/-}-Mäuse nicht mehr nachweisbar ist.

KCNQ1-Kanäle sind in *in vitro* Expressionssystemen durch Ca^{2+} -Ionen reguliert. Diese Regulation wird durch das Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin vermittelt (Shamgar et al. (2006)). Die Bindung von Ca^{2+} / Calmodulin an den KCNQ1 / KCNE1-Komplex ist essentiell für eine Aktivierung des Kanalkomplexes (Boucherot et al. (2001), Shamgar et al. (2006)). Neben der bereits genannten Regulation der intrazellulären Kalzium-Ionen-Konzentrationen ist auch eine Bindung von PtdIns(4,5)P₂ an KCNQ1-Kanäle notwendig, um diese zu aktivieren (Lopes et al. (2005)). Sowohl die Regulation der Konzentration an Ca^{2+} -Ionen im Zytoplasma als auch von PtdIns(4,5)P₂ ist durch Signalwege möglich, welche durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden. Bisher ist in der Literatur nur eine positive Stimulation von KCNQ1-Kanalaktivität durch Protein Kinase A - vermittelte Phosphorylierung beschrieben, welche über einen an das stimulatorische G-Protein $G_{\alpha S}$ gekoppelten Signalweg aktiviert wird (Marx et al. (2002), Kurokawa et al. (2004)). Eine Modulation der Konzentrationen von Ca^{2+} -Ionen und PtdIns(4,5)P₂ durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit nachfolgender Änderung von KCNQ1-Kanalaktivität in primären Kardiomyozyten ist bisher noch nicht beschrieben worden.

1.2.3 Progressive Familial Heart Block Type I

Progressive Familial Heart Block Type I (PFHBI) ist eine autosomal dominant vererbte, progressiv verlaufende Erkrankung des kardialen Erregungsweiterleitungssystems, welche unbehandelt häufig tödlich verläuft (Brink und Torrington (1977), Van der Merwe et al. (1988), Torrington et al. (1986), Brink et al. (1995)). In einem ersten Stadium der Erkrankung kommt es zu einer Blockade der Erregungsweiterleitung im rechten Tawara-Schenkel, wobei die Erregung für den rechten Ventrikel dann vom linken Ventrikel ausgeht (Abbildung 1.2). Dieses ist diagnostisch im Elektrokardiogramm nachweisbar. Während dieses Stadium der Erkrankung für die Betroffenen phänotypisch noch unauffällig verläuft, kommt es im weiteren Verlauf der Erkrankung zu einem zusätzlich Block der Erregungsweiterleitung im linken Tawara-Schenkel, wodurch die elektrische Innervation der Ventrikel vollständig ausfällt und es zu einem kompletten Herzblock kommt (Brink und Torrington (1977), Brink et al. (1995)). Nach derzeitigem Stand besteht die einzige Behandlung in der Implantation eines Herzschrittma-

chers., welche für die betroffenen Patienten häufig schon zwischen dem zehnten und zwanzigsten Lebensjahr notwendig ist (Brink et al. (1995)).

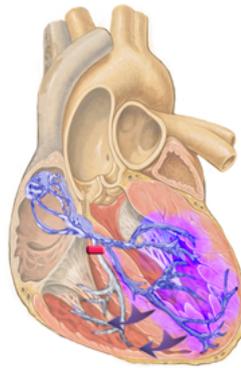


Abbildung 1.2: **Rechtsschenkelblock.** Schematische Darstellung eines Rechtsschenkelblocks. Dargestellt ist der Ort der Blockade des Erregungsweiterleitungssystem im rechten Tawara-Schenkel (roter Balken) sowie der Verlauf der Erregung des rechten über den linken Ventrikel (blaue Pfeile). Modifiziert nach: J. Heuser, http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Reizleitungssystem_RSB.png.

1995 gelang es P. Brink und Mitarbeitern, den für PFHBI verantwortlichen Genlokus in einer großen südafrikanischen Familie auf einen Bereich des Chromosoms 19, 19q13.2-13.3, einzugrenzen (Brink et al. (1995)). Eine erste Analyse der verschiedenen Gene in diesem Bereich lenkte die Aufmerksamkeit zunächst auf das *DMK* Gen, welches für das Protein Myotonin Protein Kinase kodiert (Brink et al. (1995)). Durch weitere genetische Analysen konnte dieses Gen aber als für PFHBI verantwortlich ausgeschlossen werden. In weiteren Studien konnte nachfolgend auch der *KLK1* Locus ausgeschlossen werden (Brink et al. (1995)), welcher für eine Reihe von Kallikreinen kodiert (Richards et al. (1991)), die intravaskulär exprimiert sind. Nachdem auch weitere Loci, wie z.B. der *APOC2* Locus durch Rekombinationsanalysen ausgeschlossen werden konnten (Brink et al. (1995)), ergab eine Analyse, dass auch Gene, welche für Ionenkanäle kodieren, in 19q13.2-13.3 lokalisiert sind. Diese Entdeckung führte zur Hypothese, dass eine Disregulation von Ionenkanalaktivität ursächlich für das Auftreten von PFHBI sein könnte. In einer ersten Untersuchung des *KCNA7* Gens, welches für den spannungsabhängigen Kaliumionenkanal KCNA7 kodiert, konnte dieses aller-

dings ebenfalls als Ursache für PFHBI ausgeschlossen werden (Bardien-Kruger et al. (2002)).

In einer unabhängigen Charakterisierung einer libanesischen Familie, welche an ICCD erkrankte Familienangehörige aufwies, konnten P. Bouvagnet und Mitarbeiter den Locus für ICCD ebenfalls auf 19q13.2-13.3 eingrenzen (de Meeus et al. (1995)). Auch in dieser Untersuchung konnte aber bisher kein verantwortliches Gen identifiziert werden, so dass die molekulare Ursache für das Auftreten von PFHBI zu Beginn dieser Arbeit unbekannt war.

1.2.4 TRPM4

Penner und Mitarbeiter beschrieben 2002 die Klonierung des Gens für einen Ca^{2+} -aktivierten und für monovalente Kationen spezifischen Ionenkanal (Launay et al. (2002)), welcher der Familie der *transient receptor potential* (TRP) - Ionenkanäle zugerechnet werden kann (Harteneck et al. (2000), Clapham et al. (2001)). TRP-Kanäle sind derzeit in drei Hauptfamilien gruppiert, TRPC (*canonical TRP*), TRPV (*vanilloid TRP*) und TRPM (*melastatin-like TRP*), wobei der von Penner und Mitarbeitern klonierte Ionenkanal aufgrund von Sequenzhomologie der Familie TRPM zugeordnet wurde (Launay et al. (2002)). Es stellte sich heraus, dass der klonierte Kanal eine Spleiß-Variante des TRPM4-Kanals war, welcher sich von diesem nur durch eine Elongation um 174 Aminosäuren am N-Terminus unterscheidet. Die unterschiedlichen Isoformen werden als TRPM4a (1040 Aminosäuren) und TRPM4b (1214 Aminosäuren) bezeichnet (Nilius und Vennekens (2006)).

Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene zeigten eine Expression von TRPM4b in unterschiedlichen Geweben, u.a. in der Plazenta, der Skelettmuskulatur, der Leber, der Niere und dem Pankreas sowie im Herz (Launay et al. (2002)). Erste elektrophysiologische Charakterisierungen des Kanals in HEK293- und COS-7-Zellen ergaben eine starke Ca^{2+} -Abhängigkeit der Kanalöffnung mit einem K_D von ~ 400 nM (Launay et al. (2002), Nilius et al. (2005)). Arbeiten von Nilius und Mitarbeitern zeigten das Vorliegen von insgesamt fünf Calmodulin-Bindedomänen (Nilius et al. (2005), Nilius und Vennekens (2006)), von denen zwei N-terminal und drei C-terminal lokalisiert sind. Eine Deletion der N-terminalen Bindestellen führte nicht zu einem Verlust der Calmodulin-Bindfähigkeit, während eine Deletion der C-terminalen Bindedomänen zu einem vollständigen Verlust der Calmodulin-Bindung und einem inaktiven Kanal

fürte (Nilius et al. (2005)). Weiterhin beschrieb die Arbeitsgruppe, dass der Kanal Phosphorylierungsstellen für Protein Kinase A und Protein Kinase C aufweist (Nilius und Vennekens (2006)) und zudem durch intrazelluläre Nukleotidtriphosphate inhibiert wird (Nilius et al. (2004)). Intensiv werden TRPM4b-Kanäle auch durch die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ moduliert, welches eine starke Erhöhung der Kanalaktivität zur Folge hat (Nilius et al. (2006)).

Die physiologische Funktion des TRPM4b-Kanals ist derzeit noch nicht geklärt. Aufgrund der Eigenschaft des Kanals, im Bereich des Ruhemembranpotentials vieler Zelltypen einen Ca²⁺-abhängigen repolarisierenden Kalium-Einwärtsstrom leiten zu können, wird TRPM4b als ein die Aktivität von elektrisch erregbaren Zellen modulierender Kanal beschrieben (Launay et al. (2002), Launay et al. (2004), Nilius und Vennekens (2006)). In diesem Kontext sind Beobachtungen von Penner und Mitarbeitern von Bedeutung, welche in Experimenten an Jurkat-Zellen als Modellsystem für T-Lymphozyten festgestellt haben, dass ein Verlust an TRPM4-Kanalaktivität in diesen Zellen durch siRNA-Applikation oder Expression einer dominant-negativen Kanal-Untereinheit zu einem signifikant verstärkten Influx von Ca²⁺-Ionen aus dem extrazellulären Medium führt (Launay et al. (2004)). Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass TRPM4b-Kanalaktivität in Kardiomyozyten ein Regulator des für die Depolarisierung bei der Generierung eines Aktionspotentials notwendigen Ca²⁺-Influsses sein könnte (Launay et al. (2004), Nilius und Vennekens (2006)).

1.3 Aufgabenstellung der Arbeit

KCNQ1- und TRPM4-Kanäle sind im Bereich des Schwellenwertpotentials zur Aktionspotentialgenerierung aktiv. Beide Kanäle sind aufgrund dieser Charakteristik sowie - im Fall von KCNQ1 - aufgrund von genetischen Studien mit dem Auftreten kardialer Erkrankungen in Verbindung gebracht worden. Eine Untersuchung dieser Kanal-funktionen in Mausmodellen war bisher nicht möglich, da eine elektrophysiologische Identifikation der durch die Kanäle vermittelten Ströme in kardialen Zellen noch nicht gelungen ist.

Bisherige Arbeiten haben gezeigt, dass eine Disregulation von KCNQ1-Kanalaktivität im Herzen ursächlich für das Auftreten von verschiedenen Varianten des LQTS ist (Wang et al. (1996)). Diese Disregulation wird durch Mutationen in *KCNQ1* verur-

sacht, welche zur Expression von KCNQ1-Kanälen führen, die teilweise nicht mehr auf physiologische Regulationsmechanismen der Kanalaktivität reagieren können. Um diese Regulation *ex vivo* an primären Kardiomyozyten oder *in vivo* untersuchen zu können, wäre der Einsatz genetisch veränderter Mausmodelle wünschenswert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher eine Identifikation des KCNQ1-vermittelten Kaliumauswärtsstroms in ventrikulären Myozyten adulter C57Bl/6J-Mäuse durchgeführt werden. Nach einer erfolgreichen Entwicklung eines Meßprotokolls zur Isolierung dieses Kaliumstroms war eine Nutzung des etablierten Messprotokolls geplant, um die Auswirkungen der Aktivierung verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren auf KCNQ1-Kanalaktivität zu untersuchen und damit ein genaueres Verständnis der physiologischen Regulation von KCNQ1-Aktivität im Herzen zu erhalten.

Da das Gen *TRPM4* in dem für PFHBI ursächlichen Bereich auf Chromosom 19 lokalisiert ist, stellt es einen möglichen Kandidaten für die molekulare Ursache des Auftretens dieser Krankheit dar. Durch eine Kooperation mit Kardiologen und Human-genetikern in Stellenbosch, Südafrika, und Münster, Deutschland, wurde untersucht, ob in PFHBI-Patienten Mutationen in *TRPM4* vorliegen. Im Falle der Isolation einer Mutation sollte das mutierte Protein in heterologen Expressionssystemen elektrophysiologisch und zellbiologisch charakterisiert werden. Insbesondere sollte untersucht werden in welcher Art und Weise die Mutation die TRPM4-Kanalfunktion beeinflusst. Durch diese Arbeiten sollte ein detaillierteres Verständnis der physiologischen Funktion von TRPM4b-Kanalaktivität sowie der Regulation dieses Ionenkanals erreicht werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Gebrauchsmaterialien

Sämtliche Kits, Chemikalien und Gebrauchsmaterialien wurden - sofern nicht anderweitig erwähnt - von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech, Fluka, Macherey & Nagel, Merck, Millipore, Pharmacia, Roth, Sigma-Aldrich in p.A. - oder Reinstqualität bezogen.

Enzyme, Molekulargewichtsstandards und Nukleosidtriphosphate wurden bei den Firmen Ambion, Amersham Buchler, Bioline, Invitrogen, New England Biolabs, Roche und MBI Fermentas erworben.

Oligonukleotide wurden bei der Firma Bioline synthetisiert, die Sequenzen sind im Anhang genannt.

2.2 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden mit doppelt bidestilliertem Wasser angesetzt (sofern nicht anders angegeben) und ggf. autoklaviert und sterilisiert ($22\ \mu\text{m}$). Verwendete Lösungen und Puffer sind in alphabetischer Reihenfolge angegeben.

Badlösung	135	mM	Natriumchlorid
(Myozyten, Voltage-Clamp)	0,33	mM	Di-Natriumhydrogenphosphat
	1,8	mM	Kalziumchlorid
	0,53	mM	Magnesiumchlorid
	5,5	mM	Glukose
	5	mM	HEPES
			pH 7,4

2 Material

Badlösung (Myozyten, Current-Clamp)	143	mM	Natriumchlorid
	0,25	mM	Natriumdihydrogenphosphat
	5,4	mM	Kaliumchlorid
	1,8	mM	Kalziumchlorid
	0,5	mM	Magnesiumchlorid
	5,6	mM	Glukose
	5	mM	HEPES
			pH 7,35
Badlösung (Myozyten, Ca ²⁺ -Messungen)	140	mM	Tetraethylammoniumchlorid
	10	mM	Glukose
	3,0	mM	4-Aminopyridin
	1,8	mM	Kalziumchlorid
	1,0	mM	Magnesiumchlorid
	10	mM	HEPES
		pH 7,4	
Badlösung (TRPM4b-Messungen)	156	mM	Natriumchlorid
	5	mM	Kalziumchlorid
	10	mM	Glukose
	10	mM	HEPES
		pH 7,2	
Badlösung (inside-out-Messungen)	156	mM	Cesiumchlorid
	0.3	mM	Kalziumchlorid
	1	mM	Magnesiumchlorid
	10	mM	HEPES
		pH 7,2	

2 Material

Badlösung	150	mM	Natriumchlorid
(KCNH ₂ -Messungen)	1,8	mM	Kalziumchlorid
	1,0	mM	Magnesiumchlorid
	4	mM	Kaliumchlorid
	5	mM	Glukose
	10	mM	HEPES
			pH 7,4
Blockpuffer	5	% (w/v)	Milchpulver
(Western Blot)	0,05	% (v/v)	Tween 20
			in PBS aufnehmen
Blockpuffer	10	% (w/v)	Pferdeserum
(Immunfluoreszenz)	0,2	% (w/v)	BSA
			in PBS aufnehmen
Bradford Stocklösung	32	% (v/v)	Ethanol abs.
	59	% (v/v)	88 % Phosphorsäure
	350	mg/300 ml	Serva Blau G
Bradford Meßlösung	425	ml	bidestilliertes Wasser
	15	ml	Ethanol 95 %
	30	ml	Phosphorsäure 88 %
	30	ml	Bradford Stocklösung
			Lösung filtriert und
			lichtgeschützt gelagert

2 Material

Carrier-Lösung	3	% (w/v)	BSA
(Immunfluoreszenz)	0,2	% (v/v)	Triton-X-100
			in PBS aufnehmen
DNA-Probenpuffer (5x)	20	% (v/v)	Ficoll 400
	0,025	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,025	% (w/v)	Xylencyanol
dNTP-Stammlösung	20	mM	pro dATP, dCTP, dGTP, dTTP
ECL-Lösung 1	1	% (v/v)	Luminol 250 mM
(Western Blot)	0,4	% (v/v)	p-Coumaric acid 90 mM
	10	% (v/v)	Tris-HCl 1 M pH 8,5
ECL-Lösung 2	0,06	% (v/v)	Wasserstoffperoxid 30 %
(Western Blot)	10	% (v/v)	Tris-HCl 1 M pH 8,5
ECL-Lösung 3	5	ml	ECL-Lösung 1
(Western Blot)	5	ml	ECL-Lösung 2
FACS-Puffer	0,5	% (w/v)	BSA
	0,02	% (w/v)	Natriumazid
			in PBS aufnehmen

2 Material

FVPPK-Lösung (Myozyten, Pipettenlösung)	60	mM	Kaliumchlorid
	5	mM	Kaliumfluorid
	5	mM	EGTA
	0,1	mM	Natriumvanadat
	10	mM	Kaliumpyrophosphat
	10	mM	HEPES pH 7,4
Gentamycin-Lösung	7,5	mM	Natriumchlorid
	2	mM	Kaliumchlorid
	2	mM	Kalziumchlorid
	1	mM	Magnesiumchlorid
	5	mM	Natriumpyruvat
	5	mM	HEPES
	50	$\mu\text{g/ml}$	Gentamycin pH 7,5
HEPES-Lyse-Puffer	150	mM	Natriumchlorid
	10	mM	HEPES
	0,5	%	Triton-X-100 pH 7,4
Hybridisierungslösung (Western Blot)	2	% (w/v)	Milchpulver in PBS aufnehmen
PCR-Puffer (10x)	200	mM	Tris-HCl pH 8,4
	500	mM	Kaliumchlorid

2 Material

Perfusionspuffer	113	mM	Natriumchlorid
(Myozytenisolierung)	4,7	mM	Kaliumchlorid
	0,6	mM	Kaliumhydrogenphosphat
	0,6	mM	Di-Natriumhydrogenphosphat
	1,2	mM	Magnesiumsulfat
	12	mM	Natriumhydrogencarbonat
	10	mM	Kaliumhydrogencarbonat
	10	mM	HEPES
	10	mM	Taurin
	5,5	mM	Glukose
			pH 7,4
Pipettenlösung	120	mM	Cesiumchlorid
(Myozyten, Ca ²⁺ -Messungen)	1	mM	Magnesiumchlorid
	10	mM	EGTA
	4	mM	Magnesium-ATP
	5	mM	HEPES
			pH 7,2
Pipettenlösung	156	mM	Cesiumchlorid
(TRPM4b-Messungen)	1	mM	Magnesiumchlorid
	10	mM	EGTA
	9,84	mM	Kalziumchlorid
	10	mM	HEPES
			pH 7,2
Pipettenlösung	156	mM	Natriumchlorid
(inside-out-Messungen)	5	mM	Kalziumchlorid
	10	mM	Glukose
	10	mM	HEPES
			pH 7,4

2 Material

Pipettenlösung (KCNH ₂ -Messungen)	126	mM	Kaliumchlorid
	2	mM	Magnesiumsulfat
	4	mM	Magnesium-ATP
	5	mM	EGTA
	0,5	mM	Kalziumchlorid
	25	mM	HEPES pH 7,3
Puffer A (Immunpräzipitation)	0,1	M	Citratsäure
	0,1	M	tri-Natrium-Citrat pH 5,0
Puffer B (Immunpräzipitation)	150	mM	Natriumchlorid
	50	mM	HEPES
	0,5	% (v/v)	Triton-X-100 pH 7,4
Oozyten-Ringer-Lösung	82,5	mM	Natriumchlorid
	2	mM	Kaliumchlorid
	1	mM	Magnesiumchlorid
	55	mM	HEPES pH 7,5
Oozyten-Messlösung	79,5	mM	Natriumchlorid
	2	mM	Kaliumchlorid
	2	mM	Kalziumchlorid
	1	mM	Magnesiumchlorid
	5	mM	HEPES pH 7,5

2 Material

Stop 1 - Lösung (Myozytenisolierung)	10 0,0125	% (v/v) mM	Rinderserum Kalziumchlorid in Perfusionspuffer
Stop 2 - Lösung (Myozytenisolierung)	5 0,0125	% (v/v) mM	Rinderserum Kalziumchlorid in Perfusionspuffer
TAE (50x)	2 100	M mM	Tris-Acetat pH 8,0 EDTA
TE-Puffer	10 1	mM mM	Tris-HCl pH 7,5 EDTA
Verdaupuffer (Myozytenisolierung)	0,1 0,0125	mg/ml mM	Blendzyme 3 (Roche) Kalziumchlorid in Perfusionspuffer
Waschlösung (Western Blot)	0,05	% (v/v)	Tween 20 in PBS

2.3 Bakterienstämme und Zelllinien

Escherichia coli XL1-blue superkompetente Zellen (Invitrogen, USA)

HEK 293 *Human embryonic kidney cells*
(DSMZ-Nr.: ACC305)

CHO *Chinese hamster ovary cells*
(DSMZ-Nr.: ACC126)

COS-7 *African green monkey kidney cells*
(DSMZ-Nr.: ACC60)

2.4 Nährmedien

LB-Medium	10	g/l	Casein-Extrakt
	10	g/l	Natriumchlorid
	5	g/l	Hefe-Extrakt
			pH 7,4 (NaOH)

LB-Platten	20	g/l	Agar in LB-Medium
------------	----	-----	-------------------

2.5 Zellkulturmedien und -lösungen

Nährmedium
(CHO)

MEM Alpha Medium (mit Nukleotiden),
supplementiert mit: 10 % (v/v) fötales Kälberserum,
50 U/ml Penicillin/Streptomycin und
4 mM L-Glutamin

Nährmedium
(HEK293, COS-7)

DMEM-Nut-Mix F12 (1:1)
supplementiert mit: 10 % (v/v) fötales Kälberserum,
50 U/ml Penicillin/Streptomycin und
4 mM L-Glutamin

OPTI-MEM I

Serumreduziertes Medium, bei dem es sich
um modifiziertes MEM-Alpha-Medium handelt,
welches mit L-Glutamin, HEPES, Natriumcarbonat,
Natriumpyruvat, Hypoxanthin, Thymidin,
Spurenelementen und Wachstumsfaktoren
ergänzt wurde

2.6 Molekulargewichtsstandards

Hyperladder I (Bioline, Deutschland)	DNA-Marker mit 14 Banden der folgenden Fragmentgrößen und DNA-Konzentrationen (ng / 5 μ l Hyperladder I) 200 bp (20 ng), 400 bp (40 ng), 600 bp (60 ng), 800 bp (80 ng), 1000 bp (100 ng), 1500 bp (15 ng), 2000 bp (20 ng), 2500 bp (25 ng), 3000 bp (30 ng), 4000 bp (40 ng), 5000 bp (50 ng), 6000 bp (60 ng), 8000 bp (80 ng), 10000 bp (100 ng)
Multi-Colored-Standard (Invitrogen Inc., USA)	Protein-Marker mit 9 Banden der folgenden Molekulargewichte: 3 kDa, 6 kDa, 11 kDa, 17 kDa, 19 kDa, 31 kDa, 52 kDa, 98 kDa und 185 kDa

2.7 Plasmidvektoren

pcDNA3 (Invitrogen Inc., USA)	Vektor zur Expression von cDNAs in eukaryontischen Zellen
pGEM (Promega, USA)	Vektor zur <i>in vitro</i> Transkription von cDNAs

2.8 Mauslinien

C57Bl/6J

Inzuchtlinie, aus welcher Mäuse als Kontrolltiere verwendet wurden.
Herkunft: Jackson Laboratories
Ben Harbor, Maine, USA

B6.192P2-*KCNQ1*^{tm1Kpfe}
(kurz: *KCNQ1*^{-/-})

Mäuse mit einer Insertion einer Neomycin-Kassette in den *KCNQ1*-Lokus, welche zu einem nicht funktionalen *KCNQ1*-Gen führt.
Herkunft: Karl Pfeifer,
National Institutes of Health
Bethesda, MD 20892, USA

3 Methoden

3.1 Gewebepräparation

3.1.1 Isolierung ventrikulärer Myozyten aus adulten Mäusen

Zur Präparation ventrikulärer Myozyten aus Herzen adulter Mäuse wurden 10-16 Wochen alte männliche C57Bl/6J- oder *KCNQ1*^{-/-}-Mäuse verwendet. Um die Blutgerinnung während der Präparation zu verhindern, wurde den Tieren zehn Minuten vor Einleitung der Narkose mit nachfolgender Dekapitierung 20 μ l Heparinlösung subkutan injiziert.

Die Tiere wurden durch eine Inhalationsnarkose mit Isofloran narkotisiert und nachfolgend durch Dekapitierung getötet. Der Thorax wurde eröffnet und das Herz entfernt, indem alle Blutgefäße bis auf die Aorta direkt am Herzen durchtrennt wurden. Die Aorta wurde circa 5 mm nach dem sichtbaren Austritt aus dem Herzen durchtrennt. Das Herz wurde aus dem Thoraxraum gehoben und an der Aorta auf einer Länge von circa 3 mm auf einer Kanüle (27 G x 3/4) befestigt. Im Anschluß erfolgte eine retrograde Perfusion des isolierten Herzens mittels Perfusionspuffer über einen Zeitraum von acht Minuten. Die Perfusionslösung wurde hiernach gewechselt und das Herz für zehn Minuten mit Verdauopuffer retrograd perfundiert. Nach erfolgter Perfusion des Herzens wurde dieses von der Kanüle gelöst und die Ventrikel von den Vorhöfen abgeschnitten. Beide Ventrikel wurden in eine Petrischale mit 2,5 ml Verdauopuffer überführt und dort mittels steriler Pinzetten in kleine Stücke auseinandergezogen. Die erhaltene Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit vorgelegten 2,5 ml Stop 1 - Lösung überführt und in diesem Reaktionsgefäß sanft trituriert.

Nachdem die Zellen für vier bis sechs Minuten sedimentieren konnten, wurde der Überstand der Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für eine Minute bei $180 \times g$ bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Im Anschluß wurde das Pellet in 5 ml Stop 2 - Lösung aufgenommen. Während der Zentrifugation wurde das Pellet der

Sedimentation mit 5 ml Stop 2 - Lösung versetzt und anschließend mit dem resuspendierten Pellet vereinigt.

Die erhaltene Zellsuspension wurde mit 50 μ l einer 10 mM CaCl_2 -Lösung versetzt und durch Schwenken durchmischt. Nach etwa vier Minuten wurde diese Zugabe wiederholt. Nach weiteren vier Minuten erfolgte eine Zugabe von 100 μ l 10 mM CaCl_2 -Lösung mit nachfolgender Durchmischung. Die Ca^{2+} -Äquilibration wurde nach weiteren vier Minuten durch die Zugabe von 30 μ l einer 100 mM CaCl_2 -Lösung abgeschlossen, wodurch eine finale Ca^{2+} -Konzentration von ungefähr 0,5 mM erreicht wurde. Die Myozyten wurden in dieser Lösung bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb der folgenden drei bis fünf Stunden für Patch-Clamp-Experimente eingesetzt.

3.2 RNA-Synthese mittels *in vitro* Transkription

Alle Reaktionsgefäße wurden sterilisiert und bei 240 °C über Nacht ausgebacken. Sämtliche Lösungen wurden mit DEPC- H_2O angesetzt.

Das zu transkribierende DNA-Fragment wurde durch geeignete Klonierungsmethoden in den Vektor pGEM überführt und 4 μ g in einem Volumen von 100 μ l durch Restriktion linearisiert. Die DNA wurde mittels Phenol / Chloroform - Extraktion aufgereinigt und durch Zugabe von 0.1 Volumina 3 M Natriumacetat (pH 4.8) und 3 Volumina EtOH abs. für 60 Minuten bei -70 °C gefällt. Der pelletierte Niederschlag wurde in 500 μ l 70 % EtOH gewaschen und die DNA in 6.5 μ l DEPC- H_2O aufgenommen. Die nachfolgende *in vitro* Transkription erfolgte mittels des mMessage Machine Kit (Ambion Inc., Texas, USA) nach Herstellerangaben. Die synthetisierte cRNA wurde mittels Phenol / Chloroform - Extraktion aufgereinigt, gefällt und final in 20 μ l DEPC- H_2O aufgenommen. Die cRNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

3.3 Nukleinsäure-analytische Methoden

3.3.1 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien

Die Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien von *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen erfolgte nach Herstellerangaben durch das *Invisorb Spin Tissue Mini Kit* (Invitek GmbH, Deutschland).

3.3.2 Genotypisierung von *KCNQ1*^{-/-} Mäusen mittels PCR

Genotypisierungen von durchschnittlich 21 Tage alten Mäusen der Linie *KCNQ1*^{-/-} wurden mittels PCR durchgeführt. Die PCR besteht aus drei aufeinander folgenden Reaktionsschritten. In einem ersten Schritt wird als initiale Matrize vorliegende genomische DNA durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert, wonach sich im zweiten Schritt etwa 18-24 Nukleotide lange Oligonukleotide (Primer) bei Temperaturen von 50-60 °C anlagern können, welche sich spezifisch an ihre Zielsequenzen im jeweils nachzuweisenden Transgen anlagern. Diese Primer sind in Bezug auf ihre Sequenz so konzipiert, dass sie nur im Transgen und nicht an weiteren genomischen Sequenzen binden. Im letzten Schritt der PCR kommt es bei 72 °C zur Anlagerung einer speziellen DNA-Polymerase (Taq-DNA-Polymerase) an die freien 3'-OH-Enden der Primer sowie zur von hier ausgehenden Elongation. Hiernach wird durch Erhitzen auf 95 °C der nächste Denaturierungsschritt eingeleitet. Es werden 25-30 Zyklen durchgeführt, wodurch es zu einer starken Amplifizierung der durch die beiden Primer flankierten DNA kommt, welche dann mittels Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden kann. Als Matrizen-DNA diente in allen Fällen aus Schwanzbiopsien gewonnene DNA-Lösung. Sämtliche PCR-Versuche wurden in einem *Trio-Block Headed Lid* (Biometra, USA) durchgeführt.

Als Standardansatz für alle PCR-Experimente wurde ein Reaktionsvolumen von 50 µl gewählt, das Volumen der DNA-Lösung betrug 2 µl. Die jeweiligen Oligonukleotide wurden mit Stoffmengen von 25 pmol eingesetzt, die Endkonzentration der Nukleotide (dNTPs) lag bei 0,4 mM. Der 10x konzentrierte PCR-Puffer wurde mit einem Volumen von 5 µl eingesetzt, MgCl₂ in einer finalen Stoffmenge von 100 pmol. Die Taq-DNA-Polymerase wurde mit 2,5 U verwendet.

Ein Nachweis für das Vorliegen eines wt- bzw. durch Insertion des Neomycin-Resistenzgens zerstörten *KCNQ1*-Gens erfolgte nach den unter Casimiro et al. (2001) genannten Bedingungen. Der Nachweis des wt-Allels erfolgte mittels der Oligonukleotide KO-for und KO-rev, das Vorliegen des Neomycin-Resistenzgens wurde mittels der Oligonukleotide Neo-for und KO-rev untersucht. Alle drei Oligonukleotide wurden im Rahmen einer sogenannten Duplex-PCR gleichzeitig eingesetzt. Hierbei wurde zunächst eine initiale Denaturierung über 5 Minuten bei 95 °C durchgeführt, gefolgt von 30 Zyklen der PCR-Reaktion. Pro Zyklus wurde für 30 Sekunden bei 95 °C die genomische DNA denaturiert, bevor über 45 Sekunden die Anlagerung der Oligonukleotide bei 50 °C erfolgte. Abgeschlossen wurde die Reaktion bei 72 °C durch einen 90

Sekunden währenden Elongationsschritt. Um eine höhere Effizienz der PCR zu erreichen, wurde dem Reaktionsansatz DMSO (5 % (v/v) *f.c.*) zugesetzt. Von den erhaltenen PCR-Produkten wurden jeweils 20 μ l einer DNA-Gelelektrophorese unterzogen. Die erwartete Fragmentgröße für das wt-Allel betrug 240 bp, die erwartete Größe für das durch Insertion des Neomycin-Resistenzgens zerstörte *KCNQ1*-Allel lag bei 370 bp.

3.3.3 DNA-Gelelektrophorese

Aufzutrennende DNA wurde mit 1/4 des Probenvolumens an DNA-Ladepuffer versetzt und auf 1-2%ige TAE-Agarosegele aufgetragen. Um diese herzustellen, wurden zuvor 1,4-2,8 g Agarose (Invitrogen, USA) durch Aufkochen in 140 ml TAE gelöst. Die erhaltene Lösung wurde nach Abkühlen auf etwa 50 °C mit 8 μ l Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt. Als Laufpuffer diente TAE. Die Gelelektrophorese erfolgte horizontal in Gellaufkammern (Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Deutschland) bei 20 V/cm.

3.3.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

DNA-Lösung wurde 1:100 in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 - Lösung verdünnt. Die Absorption von 100 μ l der erhaltenen Lösung wurde photometrisch an einem *Ultrospec 3000* Photometer (Pharmacia Biotech, Grossbritannien) gegen 10 mM Tris-HCl pH 8,0 - Lösung als Nullabgleich bei 260 und 280 nm bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösung erfolgte aus den gemessenen Daten mittels der Kalkulator-Funktion des Photometers.

3.3.5 RNA-Konzentrationsbestimmung

Konzentration von *in vitro* transkribierter RNA wurde mittels des Ribogreen Quantifizierungs - Reagenz (Molecular Probes, Oregon, USA) bestimmt. Synthetisierte und aufgereinigte RNA wurde in TE-Puffer verdünnt und nach Herstellerangaben mit Ribogreen - Reagenz versetzt. Im Anschluß erfolgte die Quantifizierung durch Fluoreszenzmessung (Perkin Elmer LS 50 B, Perkin Elmer, Massachusetts, USA) gegen einen vom Hersteller mitgelieferten Standard.

3.4 Klonierung von Plasmiden

3.4.1 Modifikation von DNA mittels Restriktionsendonucleasen

Zu restringierende DNA wurde mit 1 U Restriktionsenzym (Fermentas Inc., Glen Burnie, MD, USA) pro μg DNA in einem Gesamtansatz von 40-100 μl versetzt. Dem Reaktionsansatz wurde die entsprechende Menge 10x-Reaktionspuffer zugesetzt und der gesamte Ansatz über 4-18 h bei der optimalen Reaktionstemperatur der jeweiligen Restriktionsendonuclease inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 1/4 des Probenvolumens an DNA-Ladepuffer oder durch Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 20 Minuten beendet.

3.4.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese

Aufzureinigende DNA-Fragmente wurden wie unter 3.3.3 beschrieben einer DNA-Gelelektrophorese unterzogen. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels eines Skalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels des *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) nach Herstellerangaben.

3.4.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Aufgereinigte und restringierte DNA-Fragmente wurden mit 1 U *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (Fermentas Inc., Glen Burnie, MD, USA) pro 4 μg DNA versetzt und in einem Gesamtansatz von 40 μl mit entsprechendem Reaktionspuffer für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß wurde die dephosphorylierte DNA wie unter 3.4.2 beschrieben aufgearbeitet und zur Ligation eingesetzt.

3.4.4 Ligation von DNA

Ligationsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 20 μl erstellt. Zur Ligation wurden 30 ng restringierter und dephosphorylierter Plasmid-Vektor und ein dreifacher Überschuss an zu insertierender DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde durch

Zugabe von 1 U T4-DNA-Ligase (Fermentas Inc., Glen Burnie, MD, USA), 2 μ l 10x-Reaktionspuffer und einem entsprechenden Volumen komplettiert. Die Inkubation erfolgte über 3 h bei 20-22 °C bzw. über 18 h bei 16 °C. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung bei 75 °C für 20 Minuten beendet und die DNA anschließend zur Transformation eingesetzt.

3.4.5 Transformation in *E.coli*

Pro Transformationsansatz wurden 100 μ l chemisch kompetenter *E.coli* auf Eis aufgetaut und in ein vorgekühltes 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden mit 2 μ l einer gekühlten 0,1 M β -Mercaptoethanol-Lösung versetzt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 5 μ l des Ligationsansatzes zugesetzt und das Reaktionsgemisch für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 30 Minuten erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C über 45 Sekunden, gefolgt von einer zweiminütigen Inkubation auf Eis. Dem Transformationsansatz wurden 900 μ l SOC-Medium zugesetzt und der Ansatz für 1 h bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Im Anschluß wurden 100-900 μ l des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion ausplattiert und die Platten kopfüber über 18 h bei 37 °C inkubiert.

3.4.6 Plasmid-Mini-Präparationen (Miniprep)

Jeweils 8 Klone des Transformationsansatzes wurden in je 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum in Standard-Laborreagenzgläsern angeimpft und die Kulturen für 20 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Von diesen Kulturen wurde aus je 1,5 ml nach Herstellerangaben mittels des *NucleoSpin® Plasmid Quick Pure Kits* (Macherey & Nagel, Deutschland) Plasmid-DNA der jeweiligen Klone isoliert. Die Plasmid-DNA wurde in 50 μ l H₂O aufgenommen, ein Aliquot von 2 μ l wurde mittels DNA-Agarosegelelektrophorese auf korrekte Größe der Plasmid-DNA überprüft.

3.4.7 Plasmid-Midi-Präparationen (Midiprep)

Um eine größere Menge an Plasmid-DNA eines Klones zu erhalten, wurden 50 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum mit einer Kolonie des Klones inokuliert und für 20 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

Die Kultur wurde mittels des *NucleoBond®PC 100 Kits* (Macherey & Nagel, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgearbeitet und die Plasmid-DNA isoliert. Die erhaltene DNA wurde in 50 μ l 10 mM Tris-HCl pH 8,0 aufgenommen. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde photometrisch wie geschildert gemessen und durch Zugabe von 10 mM Tris-HCl pH 8,0 auf 1 μ g/ μ l eingestellt.

3.4.8 Sequenzierung von DNA

Sequenzierung von DNA wurde als zyklische Sequenzierung durchgeführt. Diese Methode basiert auf einer Kombination der klassischen Polymerase-Ketten-Reaktion mit der Didesoxy-Terminationsmethode. Im Gegensatz zu einer Standard-PCR wird nur ein Oligonukleotid (Primer) eingesetzt, zusätzlich enthält der Reaktionsansatz nicht nur dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate), sondern auch ddNTPs (Didesoxyribonukleosidtriphosphate), welche zu einem Abbruch der Kettenreaktion führen und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Durch das definierte stöchiometrische Verhältnis von dNTPs zu ddNTPs kommt es während der Polymerase-Reaktion statistisch an jedem Nukleotid der DNA-Matrize zu einem Kettenabbruch, wodurch letztlich eine definierte Fragmentierung der synthetisierten DNA entsteht. Alle Fragmente besitzen ein identisches 5'-Ende, welches durch das eingesetzte Oligonukleotid bestimmt wird, und variable 3'-Enden. Aufgrund der Tatsache, dass die Fluoreszenzfarbstoffe der eingesetzten ddNTPs Fluoreszenzmaxima bei unterschiedlichen Wellenlängen besitzen, ist durch die sukzessive Betrachtung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe die Sequenz der DNA ermittelbar.

Sämtliche Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden in der Servicegruppe Sequenzierung des Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) durchgeführt. Zur Sequenzierung wurde 1 μ g Plasmid-DNA versetzt mit 10 pmol des jeweiligen Oligonukleotides in einem Gesamtvolumen von 8 μ l abgegeben.

Sequenzierungen von genomischer DNA zur Identifikation von Mutationen in *TRPM4* wurden in der Arbeitsgruppe von E. Schulze-Bahr (Abteilung für Kardiologie und Angiologie, Universitätskrankenhaus Münster, Münster, Deutschland) durchgeführt. Genomische DNA wurde aus venösen Blutproben isoliert und alle Exone des *TRPM4*-Gens mittels PCR über intronische Oligonukleotide amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden nachfolgend wie zuvor genannt der Sequenzierung zugeführt.

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Präparation von *Xenopus laevis* Oozyten sowie Injektion von cRNA

Adulten *Xenopus laevis* Fröschen wurden mittels chirurgischer Entnahme Oozyten entfernt, welche für 4 h in Oozyten-Ringer Lösung mit 1,3 mg/ml Kollagenase (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) inkubiert wurden. Die Zellen wurden konstant auf einem Horizontalschüttler mit 100 U/min inkubiert, um die Follikelschicht zu entfernen. Im Anschluß wurden die präparierten Oozyten in Gentamycin-Lösung überführt und über Nacht bei 18 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Oozyten mit einem Volumen von 40 nl cRNA-Lösung injiziert. Es wurde pro Oozyte eine Gesamtmenge von 2 ng cRNA injiziert. Die nachfolgende Inkubation der Oozyten erfolgte erneut bei 18 °C über 72-96 h bis zur elektrophysiologischen Analyse.

3.5.2 Kultivierung von Gewebekulturzellen

HEK293, COS-7 sowie CHO-Zellen wurden in Gewebekulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit einer Grundfläche von 75 cm² kultiviert. Die Flaschen wurden mit jeweils 15 ml Zellmedium gefüllt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Sobald die Zellen etwa 80 % Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Im Anschluß erfolgte die Zugabe von 5 ml einer 0.05 %igen Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) wurden die Zellen für fünf Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 5 ml Zellmedium abgestoppt und die Zellen hierin trituriert. Es wurden 10 µl der erhaltenen Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) ausgezählt und nachfolgend 5E5 Zellen in einem Volumen von 15 ml in einer neuen Gewebekulturflasche ausgesät.

3.5.3 Transfektion von Gewebekulturzellen

Für Patch-Clamp- sowie für Immunfluoreszenz-Experimente wurden 5E4 Zellen in Gewebekulturschalen eines Durchmessers von 2 cm (Thermo Fisher Scientific, Rochester, New York, USA) ausgesät. Im Fall von Western-Blot-Experimenten wurden jeweils

5E5 Zellen in Gewebekulturschalen eines Durchmessers von 5 cm ausgesät. Im erstgenannten Fall wurden pro Transfektionsreaktion 1 μg Plasmid-DNA mit TRPM4b-cDNA sowie 0.6 μg Plasmid-DNA mit EGFP-cDNA als Transfektionsmarker in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) vorgelegt und mit 250 μl OPTI-MEM I versetzt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 250 μl OPTI-MEM I vorgelegt und 5 μl Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) zugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation wurden beide Reaktionsansätze vereinigt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur weiter inkubiert. In der Zwischenzeit wurde von den 24 h zuvor ausgesäten Gewebekulturzellen das Zellmedium abgesaugt und diese einmal mit OPTI-MEM I gewaschen. Nach erfolgter Inkubation wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen pipettiert und diese für 4-6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz abgesaugt, die Zellen einmal mit Zellmedium gewaschen und nachfolgend mit frischem Zellmedium für 18-24 h bis zur weiteren Analyse bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Im Fall einer Transfektion für nachfolgende Western-Blot-Experimente galt die gleiche Transfektionsvorschrift, allerdings wurden alle genannten Volumina und einzusetzenden DNA-Mengen um einen Faktor fünf erhöht.

3.6 Protein-analytische Methoden

3.6.1 Aufreinigung von Membranproteinen zur Western-Blot-Analyse

Sämtliche verwendeten Lösungen wurden im Verhältnis 1:100 mit Protease-Inhibitor-Mix (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) versetzt. Transient transfizierte Gewebekulturzellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und nachfolgend in einem Volumen von 500 μl eiskaltem PBS auf Eis abgekratzt. Die Zellen wurden zweimalig mit PBS gewaschen und nachfolgend in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert und in 1 ml eiskaltem H₂O wieder aufgenommen. Die Zellen wurden insgesamt dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C und 2000 \times g für drei Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde für 20 Minuten bei 4 °C und 20000 \times g zentrifugiert. Der Überstand wurde er-

neut abgenommen und das erhaltene Membranpellet in 30 μl HEPES-Lyse-Puffer aufgenommen.

3.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zu bestimmende Proteinlösungen wurden in einem Gesamtvolumen von 100 μl 1:100 und 1:25 in H_2O verdünnt und mit 900 μl Bradford-Meßlösung versetzt. Nach 3-5 minütiger Inkubation wurde die Absorption der Proben bei 595 nm in einem *Ultrospec 3000* Photometer (Pharmacia Biotech, Grossbritannien) gegen H_2O , versetzt mit 900 μl Bradford-Meßlösung, vermessen. Um eine Konzentrationsbestimmung zu ermöglichen, wurde eine BSA-Standardreihe (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bis zu 6,25 $\text{ng}/\mu\text{l}$) in derselben Meßreihe zusätzlich bestimmt. Es wurden nur Meßergebnisse ausgewertet, welche Absorptionswerte ≤ 1 aufwiesen und zudem im linearen Bereich der BSA-Kalibrierungsfunktion lagen.

3.6.3 Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation von TRPM4b-Proteinen aus Gesamtzelllysaten wurden monoklonale Maus Anti-FLAG-Antikörper (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) an magnetische Dynabeads Protein G - Beads (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) gekoppelt. Hierzu wurden 50 μl Dynabeads Protein G - Beads zweimal mit 0,01 % Tween-20 in Puffer A gewaschen und nachfolgend mit 50 μl Anti-FLAG-Antikörper und 50 μl Puffer A versetzt und für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Beads wurden zweimal mit 0,01 % Tween-20 in Puffer A gewaschen, bevor der letzte Waschschritten 500 μl Puffer B erfolgte. Die Beads wurden in 90 μl HEPES-Lysispuffer (1:100 mit Protease-Inhibitor-Mix versetzt, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) resuspendiert.

Es wurden nachfolgend 25 μg Proteinlösung in einem Volumen von 70 μl HEPES-Lysispuffer mit 30 μl Bead-Suspension versetzt und für 1 h bei 4 °C mit 12 rpm auf einem Rotator inkubiert. Im Anschluß wurden die Proben viermal mit Puffer B gewaschen und die Beads final in 20 μl Ladepuffer (siehe 3.6.4) aufgenommen, für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert und direkt zur Protein-Gelelektrophorese eingesetzt.

3.6.4 Protein-Gelelektrophorese

Membranproteinfraktionen wurden nach Herstellerangaben mittels *NUPAGE® Novex Bis-Tris Gels* (Invitrogen Inc., USA) einer denaturierenden Gelelektrophorese unterzo-

gen. Hierzu wurden 50 μg Membranprotein mit den entsprechenden Volumina an H_2O , *NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)* und *NuPAGE® Reducing Agent (10x)* (Invitrogen Inc., USA) versetzt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Die Gelelektrophorese erfolgte in *XCell Surelock™ Mini-Cell*-Laufkammern (Invitrogen Inc., USA) in *NuPAGE® MES-SDS Running Buffer*, versetzt mit *NuPAGE® Antioxidant* (Invitrogen Inc., USA) über 90 min bei 125 V.

Als Größenmarker wurde in allen Fällen *MultiMark® Multi-Colored Standard* verwendet.

3.6.5 Immunodetektion von TRPM4b mittels Western Blot

Um den mit einem N-oder C-terminalen FLAG-Tag versehenen Ionenkanal TRPM4b in Membranproteinfraktionen nachzuweisen, erfolgten Immunodetektionen mittels Western Blot. Hierzu wurden zunächst jeweils 50 μg Membranprotein der zu untersuchenden Proben wie beschrieben einer Proteingelelektrophorese unterzogen. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die Proteine auf *PROTRAN® Nitrocellulose Transfer Membran* (Schleicher & Schuell, Deutschland) mittels *NuPAGE® Transfer Buffer* in *Bio-RAD Mini-Protean II™*-Blotkammern (Bio-RAD Inc., USA) über 16-20 h bei 40 mA übertragen.

Um unspezifische Hybridisierung des Antikörpers zu minimieren, wurden die Membranen für 20 Minuten bei 4 °C sowie nachfolgend für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Blockpuffer inkubiert. Zum TRPM4b-Nachweis diente ein monoklonaler Maus-Anti-FLAG-Tag-Antikörper (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), mit welchem die jeweiligen Membranen in einer Verdünnung von 1:1000 über Nacht bei 4 °C in Hybridisierungslösung inkubiert wurden. Die Membranen wurden dreimal für je 10 min in Waschlösung geschwenkt, bevor sie mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden. Hierzu wurde ein Peroxidase-konjugierter anti-Maus Kaninchen-IgG-Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) in einer Verdünnung von 1:5000 in Hybridisierungslösung verwendet. Nach einstündiger Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Membranen viermal je 10 min in Waschlösung geschwenkt, bevor sie für 1 min in 10 ml ECL-Lösung 3 inkubiert wurden. Die Membranen wurden in Klarsichtfolie gehüllt und für 10 sec bis zu 2 min auf Biomax®MR - Röntgenfilme (Kodak, USA) aufgelegt. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte in einer Optimax Typ TR Filmentwicklungsmaschine (MS Laborgeräte, Deutschland).

3.6.6 Immunfluoreszenzanalyse zur Untersuchung von TRPM4b-Lokalisation

Expressionsplasmide, welche für TRPM4b mit einem N-terminalen FLAG-Tag kodierten, wurden transient in COS-7-Zellen transfiziert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Zellmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden nachfolgend für 10 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert, bevor sie im Anschluß zweimal mit PBS gewaschen wurden. Die Permeabilisierung erfolgte mit 0,2 % Triton-X-100 für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Vermeidung unspezifischer Bindung des primären Antikörpers wurden die Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit Blockpuffer inkubiert. Nachfolgend wurden die Präparate dreimal mit 0,2 % Triton-X-100 gewaschen. Die Zellen wurden hiernach für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:500 mit dem primären Antikörper (monoklonaler Maus Anti-FLAG-Antikörper, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in Carrierlösung inkubiert. Im Anschluß erfolgten erneut drei Waschschriffe mit 0,2 % Triton-X-100. Nach Nachweis des primären Antikörpers per Immunfluoreszenz wurde ein Ziege Anti-Maus Alexa546 Antikörper (Molecular Probes, Carlsbad, Kalifornien, USA) in einer Verdünnung von 1:1000 in Carrierlösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur eingesetzt. Es folgte ein einmaliges Waschen der Zellen mit 0,2 % Triton-X-100. Im zweiten Waschschriff wurde der Waschlösung DAPI-Lösung (Molecular Probes, Carlsbad, Kalifornien, USA) in einer Verdünnung von 1:1000000 zugesetzt. Ein dritter und vierter Waschschriff erfolgten wieder mit 0,2 % Triton-X-100. Die Präparate wurden nachfolgend mit Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA) eingedeckelt und bis zur Analyse an einem *Zeiss Axioskop 2 MOT*-Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

3.6.7 Untersuchung von Oberflächenexpression mittels *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)*

Zur Untersuchung von Oberflächenexpression von TRPM4b-Proteinen wurden TRPM4b beziehungsweise TRPM4b^{E7K} Ionenkanäle mit einem extrazellulär gelegenen c-Myc-Tag in HEK293 Zellen exprimiert. Die Zellen wurden 18 h nach erfolgter Transfektion durch Behandlung mittels Accutase (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)

nach Herstellerangaben abgelöst und einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 500 μl FACS-Puffer resuspendiert und auf eine Dichte von $1\text{E}5$ Zellen / 100 μl eingestellt. Jeweils 100000 Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und in diesem mit 2 μl Maus Anti-c-Myc-FITC Antikörper (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) versetzt und für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend wurde den Zellen jeweils 1 ml FACS-Puffer zugesetzt und diese nach der folgenden Zentrifugation in je 400 μl FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden nun bis abschließenden Analyse bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

3.7 Elektrophysiologie

Alle elektrophysiologischen Experimente wurden bei Raumtemperatur (21 - 23 °C) durchgeführt. Zur Ansteuerung des eingesetzten Patch-Clamp-Verstärkers diente das Programm *Pulse* (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland). Aufgenommene Messdaten wurden mittels der Programme *PulseFit* (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland), *Kaleidagraph 3.5* (Synergy Software, Reading, PA, USA), *Igor Pro 6.0* (Wave-Metrics Inc., Lake Oswego, OR, USA) und *Excel 2003* (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) analysiert. Eine statistische Auswertung zur Ermittlung von Standardabweichungen sowie Signifikanzanalysen mittels des *Student T-Test* erfolgten ebenfalls durch Einsatz von *Excel 2003*.

Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte entsprechend Gleichung 3.1.

$$\sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}} \quad (3.1)$$

3.7.1 Patch-Clamp-Technik

Das Prinzip der Patch-Clamp-Technik basiert auf der Etablierung eines sehr engen Kontaktes zwischen einer Glaskapillare und der Zellmembran, welcher einen elektrischen Widerstand im Bereich mehrerer $\text{G}\Omega$ erzeugt. Die Glaskapillare ist mit einem Elektrolyten gefüllt, der wiederum in Kontakt mit einer Meßelektrode innerhalb der Glaskapillare steht. Die unter einem Überdruck stehende Glaskapillare wird mit ihrer etwa 1 μm weiten Öffnung an die Zelloberfläche herangeführt, bis die Oberfläche der Zelle fast erreicht ist. Durch eine Änderung der Druckverhältnisse hin zu einem Anlegen von Unterdruck an der Glaskapillare kommt es nun zu einer endgültigen Annäherung der

Zellmembran und der Oberfläche der Glaskapillare unter Ausbildung des bereits beschriebenen Widerstandes im Gigaohm-Bereich (sog. Giga-Seal). Die erhaltene Meßkonfiguration wird als *cell attached*-Konfiguration bezeichnet und erlaubt die Strommessung von innerhalb der Öffnung der Glaskapillare liegender Ionenkanäle. Durch das Anlegen weiteren Unterdrucks kann ein Durchbrechen der Zellmembran unterhalb der Öffnung der Glaskapillare erreicht werden, wodurch die Elektrolyt-Flüssigkeit in der Glaskapillare sich mit dem Zytoplasma der Zelle vermischt und sich innerhalb kurzer Zeit eine definierte Ionenzusammensetzung des Zellinneren erreichen läßt. Diese Meßkonfiguration wird als *whole-cell*- oder Ganz-Zell-Konfiguration bezeichnet und erlaubt eine Messung des Stromflusses über die gesamte Zellmembran. Eine Darstellung beider Meßkonfiguration ist in Abbildung 3.1 wiedergegeben.

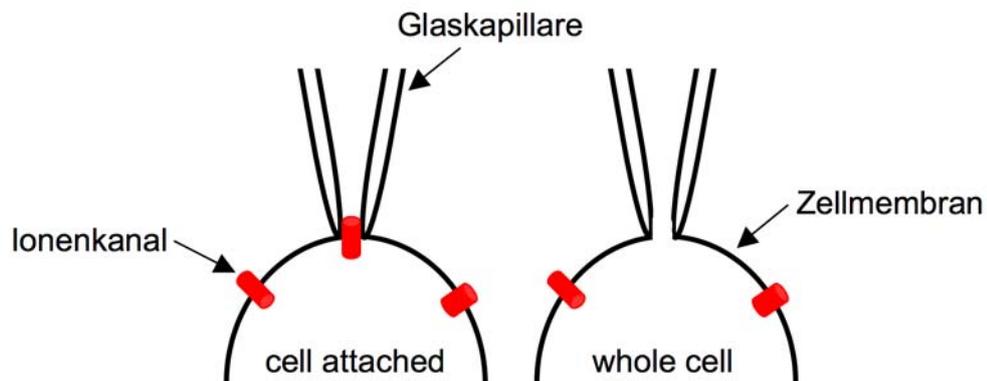


Abbildung 3.1: **Patch-Clamp-Meßkonfigurationen.** Dargestellt sind die *cell attached* und *whole-cell* Patch-Clamp-Meßkonfigurationen.

Eine Abwandlung der *whole-cell* Patch-Clamp-Konfiguration stellt die *Perforated* Patch-Clamp-Konfiguration dar. Bei dieser Meßkonfiguration wird ein der *whole-cell*-Konfiguration vergleichbarer Zugang zum Zellinneren geschaffen, indem der Elektrolytlösung innerhalb der Glaskapillare porenbildende Substanzen zugesetzt werden. Die Zellmembran wird nun nicht durch das Anlegen von Unterdruck durchbrochen, sondern der elektrische Zugang wird durch die Inkorporation der porenbildenden Substanzen, wie z.B. Amphotericin B oder Nystatin, geschaffen (Vicente et al. (2003)). Die gebildeten Poren leiten selektiv nur monovalente Kationen, wodurch ein elektrischer Zugang zum Zellinneren geschaffen wird ohne das Zytoplasma wie im Falle der *whole-cell*-

Konfiguration vollständig durch die Elektrolytlösung auszutauschen. Diese Meßkonfiguration erlaubt eine Untersuchung von Ionenkanalmodulationen durch intrazelluläre Signalwege.

In der Patch-Clamp-Technik wird vom Experimentator eine Soll-Spannung V_S vorgegeben. Über die Meßelektrode wird nun nach Etablierung eines elektrischen Zuganges zur Zelle die tatsächliche Membranspannung V_M gemessen. Im Falle einer Abweichung von V_M zu V_S kommt es zu einer Injektion eines Stromes durch die Meßelektrode, welcher zu einer Aufhebung der Differenz zwischen V_S und V_M führt. Diese Strominjektion wird registriert und entspricht in ihrem zeitlichen Verlauf dem primären Ionenstrom, welcher zur Differenz zwischen V_S und V_M geführt hat. Eine Besonderheit der Patch-Clamp-Technik besteht im Vorhandensein nur einer Elektrode, welche sowohl als Meßelektrode als auch zur Strominjektion in der Zelle dient. Diese Funktionalität wird durch den Einsatz eines Strom-Spannungswandlers ermöglicht. Dieser besteht aus einem Vorverstärker, welcher ständig die Eingangssignale V_S und V_M miteinander abgleicht. Liegt eine Differenz zwischen diesen beiden Signalen vor, so generiert der Vorverstärker eine Ausgangsspannung, welche der Differenz zwischen V_S und V_M proportional ist. Dieses hoch verstärkte Signal wird an den Hauptverstärker weitergeleitet, welches es registriert und digitalisiert. Im Anschluß wird über einen Spannungsabfall am Rückkopplungswiderstand des Vorverstärkers ein in die Zelle fließender Strom erzeugt, der die Differenz zwischen V_S und V_M aufhebt. Je niedriger nun die Zugangswiderstand (Serienwiderstand R_S) zur Zelle ist, desto schneller erfolgt eine Aufhebung von Differenzen zwischen V_S und V_M . Aus diesem Grund sollte R_S nicht höher als $10\text{ M}\Omega$ sein.

3.7.2 Aufbau des Meßstandes

Zur Minimierung von störenden Schwingungen des Untergrundes wurde die Meßtechnik auf einem mittels Druckluft gedämpften Schwingungstisch (T250, Physik Instrumente, Waldborn, Deutschland) eingesetzt. Gegen elektromagnetische Wellen wurde der Meßplatz durch den Einsatz eines Faraday-Käfigs abgeschirmt.

3.7.3 Patchpipetten und Elektroden

Patchpipetten wurden aus Borosilikatglass mit einem äußeren Durchmesser von 1.5 mm und einem inneren Durchmesser von 0.86 mm (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) mit einem horizontalen Ausziehgerät (DMZ-Puller, Zeitz, Augsburg, Deutschland) zu einem finalen Widerstand von 2-3 M Ω bei einer Pipettenöffnung von etwa 1 μ m gezogen. Als Meßelektrode diente ein chlorierter Silberdraht, die elektrische Verbindung der Badlösung zum Erdleiter des Vorverstärkers wurde über ein Silber / Silberchlorid-Pellet hergestellt (jeweils World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA). Zur Positionierung des Vorverstärkers mit der angeschlossenen Meßelektrode wurde ein elektrisch angetriebener Mikromanipulator eingesetzt (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland).

3.7.4 Mikroskop

Patch-Pipetten wurden unter mikroskopischer Kontrolle an die zu untersuchenden Zellen angenähert. Hierzu diente ein inverses Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

3.7.5 Applikation von Pharmaka

Zur Applikation von Agonisten sowie Antagonisten gegen Ionenkanäle und G-Protein gekoppelte Rezeptoren wurde ein Motor-gesteuertes Applikationssystem eingesetzt (VC-66MCS, Warner Instruments Inc, Hamden, CT, USA). Dieses Applikationssystem ermöglichte einen Austausch der die Zelle umgebende Badlösung innerhalb von 20-50 ms, wodurch eine Desensibilisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren vermindert werden sollte.

3.7.6 Bestimmung der Konzentration von freien Ca²⁺-Ionen in Messlösungen

Die Konzentration von freien Ca²⁺-Ionen in für Patch-Clamp Messungen verwendeten Lösungen wurde mittels des *Calcium Calibration Buffer Kit* (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA) nach Herstellerangaben bestimmt.

3.7.7 Aufnahme der Meßdaten

Die Meßdaten wurden vom Vorverstärker an den Hauptverstärker (EPC9, HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) weitergegeben und dort ohne Filterung digitalisiert an einen Steuerungs- und Aufnahmecomputer (Dell Inc, Round Rock, Texas, USA) geleitet.

3.7.8 Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik

Die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik wurde zur elektrophysiologischen Analyse von in *Xenopus laevis* exprimieren Ionenkanälen verwendet. Hierbei wurden zwei Mikroelektroden in die zu messende Oozyte penetriert, von denen eine zur Bestimmung des Membranpotentials der Oozyte diente, während die andere Strom injizierte, um das gewünschte Membranpotential einzustellen. Die Mikroelektroden wurden aus Borosilikatglas mit einer Wandstärke von 0,15 mm (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) mit einem vertikalen Elektrodenziehgerät hergestellt und anschließend mit einer Microforge (Narishige, Tokyo, Japan) gebrochen. Die Elektroden wurden mit 3 M Kaliumchlorid-Lösung befüllt und wiesen einen Eingangswiderstand von 0.2-0.3 M Ω auf.

Die Signale wurden über den Vorverstärker an den Hauptverstärker (Oocyte-Clamp OC-725, Warner Instrument Inc., Connecticut, USA) geleitet. Mittels einer ITC-16-AD/DA-Schnittstelle wurden die Steuer- und Meßdaten an einen Computer geleitet (Dell Inc, Round Rock, Texas, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Regulation des spannungsgesteuerten Kaliumkanals KCNQ1 in ventrikulären Myozyten adulter Mäuse

4.1.1 Identifizierung eines KCNQ1-vermittelten Kalium-Auswärtsstroms in ventrikulären Myozyten adulter C57Bl/6J-Mäuse

Ventrikuläre Myozyten adulter männlicher C57Bl/6J-Mäuse wurden wie unter 3.1.1 beschrieben isoliert. Die Zellen wurden elektrophysiologisch mittels der Perforated-Patch-Clamp-Technik untersucht. Diese Messkonfiguration ermöglicht durch den Einsatz porenbildender Substanzen (hier: 300 $\mu\text{g/ml}$ Amphotericin B) in der Pipettenlösung die Möglichkeit, einen elektrischen Zugang zum Zellinneren zu schaffen, ohne die Zellmembran zu zerstören und einen Austausch des Zytoplasmas durch die Pipettenlösung herbeizuführen. Diese Meßkonfiguration stellt daher eine gute Möglichkeit dar, Stimulierungen G-Protein gekoppelter Signalwege durchzuführen und die Auswirkung auf die Aktivität von Ionenkanälen zu untersuchen.

Um gezielt KCNQ1-vermittelte Kaliumauswärtsströme messen zu können, wurden die Meßbedingungen wie folgt gewählt. L-Typ-Kalzium-Kanäle wurden durch Applikation von 1 μM Nifedepine zur Badlösung inhibiert. Natrium-Kanäle wurden inaktiviert, indem das Membranpotential auf ein Haltepotential von -40 mV eingestellt wurde (Bezanilla und Armstrong (1977), Kass (2006)). Desweiteren wurde der schnelle transiente Kaliumauswärtsstrom I_{to} , welcher durch Kv4-Kanäle geleitet wird, inaktiviert, indem die Myozyten ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV für zwei Sekunden auf ein Potential von -30 mV geklemmt wurden, bevor die verbleibenden Kalium-

Kanäle durch einen einsekündigen Potentialsprung auf +60 mV aktiviert wurden (Patel und Campbell (2005)). Durch K⁺-Kanäle-geleitete *Tail*-Ströme wurden durch eine nachfolgende Rückkehr auf ein Haltepotential von -40 mV gemessen. Ein typischer nach diesem Pulsprotokoll aufgenommener Kaliumauswärtsstrom ist in Abbildung 4.1 A, das zugrundeliegende Pulsprotokoll ist in Abbildung 4.1 B dargestellt.

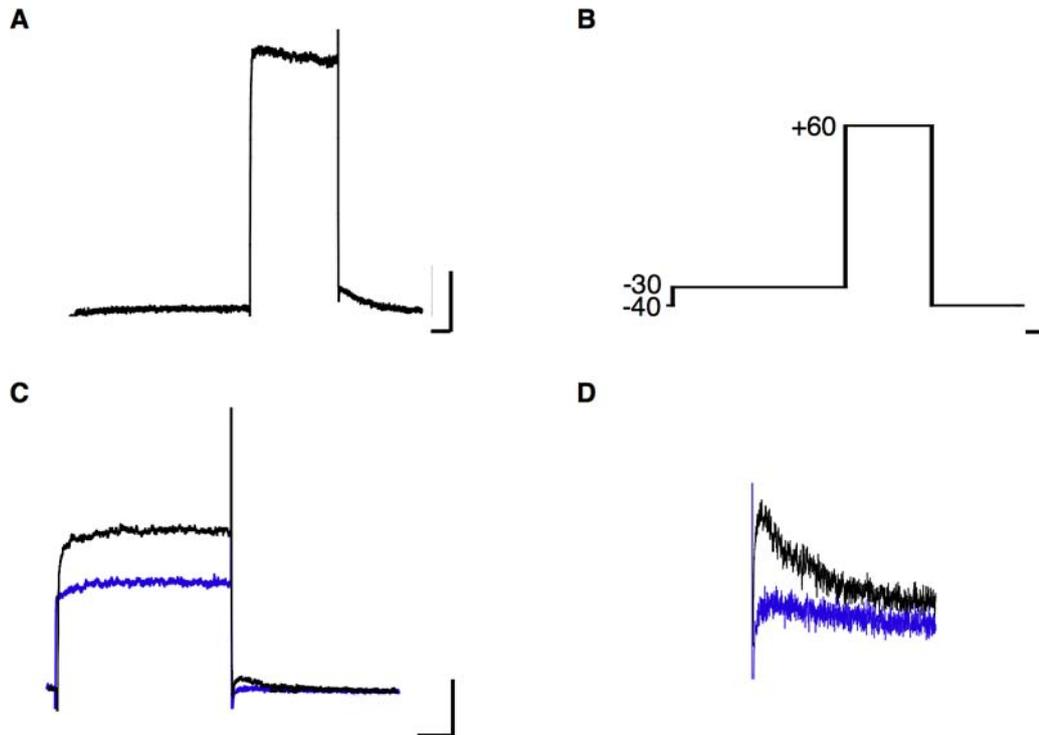


Abbildung 4.1: **Detektion eines KCNQ1-geleiteten Kaliumstroms.** **A:** Dargestellt ist ein Kaliumauswärtsstrom einer ventrikulären Myozyte. Zeitskala: 200 ms, Amplitudenskala: 200 pA. **B:** Verwendeten Pulsprotokoll: Das Haltepotential lag bei -40 mV, es folgte ein Vorpuls auf -30 mV. Auswärtsströme wurden durch Depolarisierung auf 60 mV aktiviert. Zahlenangaben stellen Membranpotentiale in mV dar. Zeitskala: 200 ms. **C:** Verbleibende Kaliumauswärtsströme der in A gezeigten Zelle nach Applikation von 5 mM TEA und 50 µM 4-AP (schwarz) sowie der zusätzlichen Applikation von 50 µM Linopirdine (blau). Skalen wie in A angegeben. **D:** Vergrößerung der in C gezeigten *Tail*-Ströme.

Die gemessenen Kaliumauswärtsströme werden anhand der Literatur überwiegend von Kv2.1- und KCNQ1-Kanälen vermittelt (Nerbonne (2000)). Eine selektive Inhi-

bierung der Kv2.1-Kanäle ist schwierig, da jede elektrophysiologische Inaktivierung durch ein entsprechendes Pulsprotokoll auch KCNQ1-Kanäle inaktivieren würde. Die Myozyten wurden deshalb während der Messungen mit 5 mM TEA und 50 μ M 4-AP superfundiert, um eine pharmakologische Inhibition von Kv2.1-Kanälen zu erreichen (McCrossan et al. (2003)). Die Auswirkung dieser Superfusion auf die Messung der in Abbildung 4.1 A gezeigten Stromspur einer typischen ventrikulären Myozyte ist in Abbildung 4.1 C gezeigt. Im Vergleich zu Abbildung 4.1 A ist eine Reduktion der Amplitude des Kaliumauswärtsstromes ersichtlich, welche im wesentlichen auf eine Inhibition von Kv2.1-Kanälen zurückzuführen sein sollte, da die verwendeten Konzentrationen von 5 mM TEA und 50 μ M deutlich unterhalb des für KCNQ1 publizierten IC₅₀-Wertes lag (TEA: >50 mM) beziehungsweise KCNQ1-Kanäle insensitiv gegenüber 4-AP sind (Kurokawa et al. (2001), Yang et al. (1997)).

Die Kinetik der Aktivierung des verbliebenen Kaliumauswärtsstromes sowie die bei -40 mV gemessenen *Tail*-Ströme, welche TEA und 4-AP insensitiv sind, waren typisch für einen KCNQ1-vermittelten Kaliumauswärtsstrom. Um dieses weitergehend zu untersuchen, wurden die Myozyten zusätzlich zu TEA und 4-AP auch mit 50 μ M Linopirdine superfundiert, einen Inhibitor von KCNQ-Kanälen (IC₅₀: 42 \pm 4 μ M) (Ohya et al. (2003)). In Abbildung 4.1 C sowie in der Vergrößerung der *Tail*-Ströme in Abbildung 4.1 D sind typische Stromspuren vor Applikation von Linopirdine (schwarz) sowie nach Applikation von Linopirdine (blau) dargestellt. Ein Vergleich dieser Stromspuren zeigt eine deutliche Sensitivität des gemessenen Kaliumauswärtsstromes für Linopirdine. Die Kinetik und Linopirdine-Sensitivität der *Tail*-Ströme stand in Einklang mit der für *in vitro* exprimierte KCNQ1-Kanäle berichteten Eigenschaften (Ohya et al. (2003)). Deshalb wird geschlossen, dass die gemessenen Ströme überwiegend durch KCNQ1-Kanäle vermittelt wurden.

4.1.2 Reversibilität einer Linopirdine-vermittelten Inhibition von Kaliumauswärtsströmen

Um sicherzustellen, dass die Applikation von Linopirdine zu einer reversiblen Inhibition der KCNQ1-Kanäle führte, wurde das in Abbildung 4.2 dargestellte Experiment durchgeführt. Gezeigt es ist die typische Stromamplitude einer Myozyte nach Applikation von 5 mM TEA sowie 50 μ M 4-AP (schwarze Balken) bzw. nach zusätzlicher Applikation von 50 μ M Linopirdine (roter Balken).

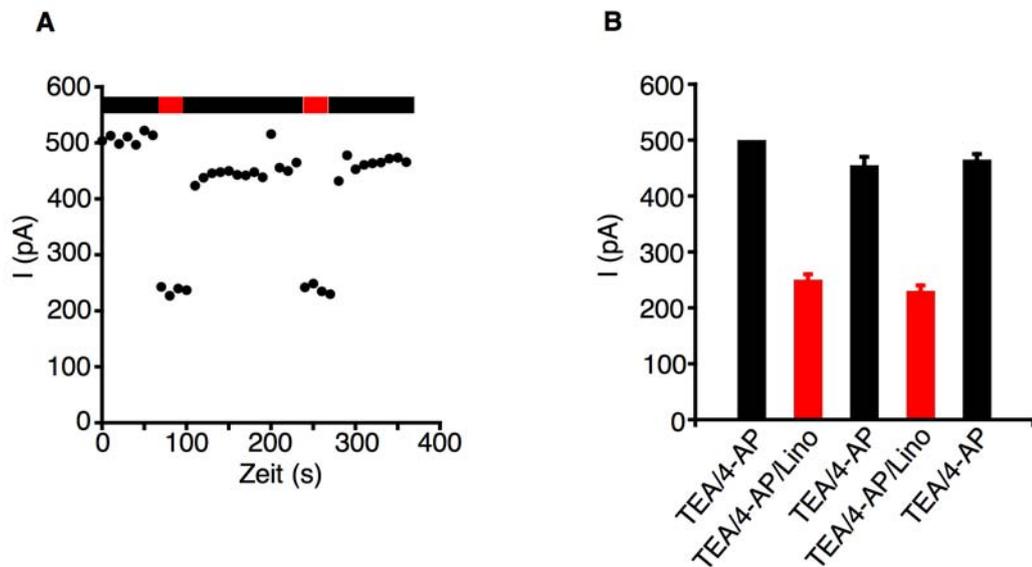


Abbildung 4.2: **Reversibilität einer Linopirdine-vermittelten Inhibition von Kalium-Auswärtsströmen.** **A:** Zeitliche Darstellung des Ein- und Auswaschens von $50 \mu\text{M}$ Linopirdine. Die Messung wurde wie in Abbildung 4.1 beschrieben durchgeführt. Schwarze Balken: TEA/4-AP-Applikation, rote Balken: TEA/4-AP/Linopirdine-Applikation. **B:** Quantitative Auswertung des in A dargestellten Experimentes zur Reversibilität der Linopirdine-Applikation.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Inhibierung der Stromamplitude durch Linopirdine nach Auswaschen des Linopirdines wieder aufgehoben war. Eine quantitative Auswertung des in Abbildung 4.2 A gezeigten Experimentes ist in Abbildung 4.2 B aufgeführt. Die Reversibilität der Linopirdine-Inhibition ist in dieser Darstellung deutlich sichtbar. Die Daten zeigen, dass eine Inhibition von KCNQ1-Kanalaktivität durch Linopirdine nicht auf einem indirekten Effekt, z.B. einer dauerhaften Modifikation des KCNQ1-Proteins durch den Inhibitor, basiert. Somit war Linopirdine für einen temporären direkten Block von KCNQ1-Kanalaktivität bei der Untersuchung von ventrikulären Myozyten geeignet.

4.1.3 Vergleich von Linopirdine-sensitiven Kaliumauswärtsströmen mit mKCNQ1-Strömen in Oozyten von *Xenopus laevis*

Expression von mKCNQ1-Kanälen in Oozyten von *Xenopus laevis* vermittelte spannungsabhängige Kaliumauswärtsströme, welche makroskopisch nicht von Linopirdine-sensitiven Kaliumauswärtsströmen der Mausmyozyte zu unterscheiden waren (Abbildung 4.3). Diese Beobachtung war ein weiteres Indiz für das Vorliegen eines KCNQ1-geleiteten Kaliumauswärtsstroms in ventrikulären Myozyten von adulten C57Bl/6J-Mäusen.

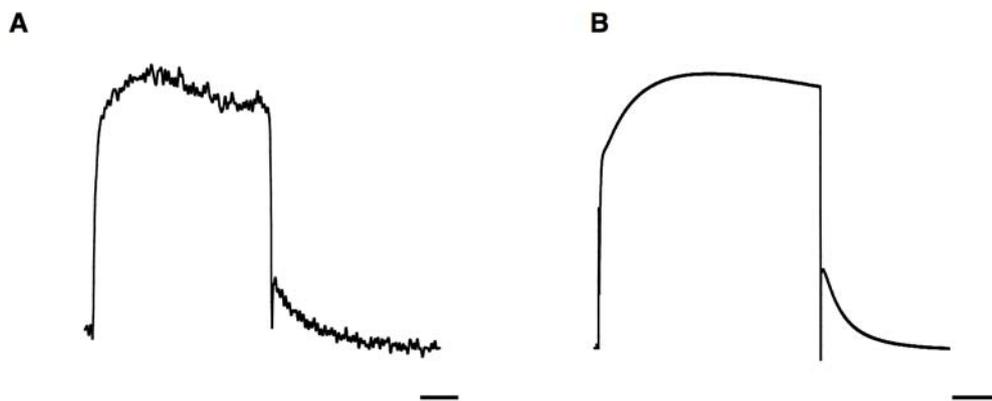


Abbildung 4.3: **Vergleich mit mKCNQ1-Strömen aus heterologer Expression.** **A:** Linopirdine-sensitiver Strom gemessen in ventrikulären Myozyten. Zeitskala: 200 ms. **B:** Oozyten von *Xenopus laevis* wurden mit cRNA für mKCNQ1 injiziert. Kaliumauswärtsströme wurden durch Depolarisierung auf +60 mV aktiviert. Zeitskala: 1000 ms.

Ein weiteres Kriterium zur Korrelation eines in primären Zellen elektrophysiologisch gemessenen Stroms mit einem bestimmten spannungsabhängigen Ionenkanal stellt die Ermittlung des Membranpotentials dar, bei welchem die Hälfte aller Kanäle aktiviert ist ($V_{1/2}$). Diese Kenngröße war für heterolog exprimierte klonierte KCNQ1-Kanäle der Maus bekannt. Zum Vergleich mit den in primären Zellen gemessenen $V_{1/2}$ -Werten wurde $V_{1/2}$ für heterolog in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimierte murine KCNQ1-Kaliumkanäle ermittelt. KCNQ1-Kanäle wurden ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV durch Depolarisierung auf Membranpotentiale zwischen -80 mV und

+60 mV in 10 mV-Schritten aktiviert, wobei zwischen jeder Depolarisierung das Haltepotential wieder auf -100 mV eingestellt wurde, um eine Erholung der KCNQ1-Kanäle aus der Inaktivierung zu ermöglichen. Mit vergleichbaren Messprotokollen wurden KCNQ1-*Tail*-Ströme an ventrikulären Myozyten von C57Bl/6J-Mäusen gemessen. Die erhaltenen GV-Daten sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

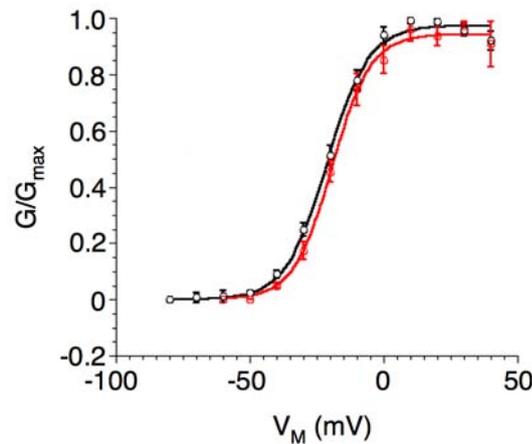


Abbildung 4.4: **GV-Kurven von Kaliumauswärtsströmen in Oozyten und ventrikulären Myozyten.** Oozyten von *Xenopus laevis* wurden mit cRNA für mKCNQ1 injiziert, das Pulsprotokoll wurde wie in Abbildung 4.3 angegeben appliziert. Linopirdine-sensitive Kaliumauswärtsströme wurden in ventrikulären Myozyten wie in Abbildung 4.1 dargestellt gemessen. Schwarz: GV-Kurve aus Messungen an Oozyten, rot: GV-Kurve aus Messungen an ventrikulären Myozyten.

Durch Applikation eines Boltzmann-Fits an die in Abbildung 4.4 dargestellten Meßdaten wurden die in Tabelle 4.1 angegebenen Werte für $V_{1/2}$, τ (Zeitkonstante der Deaktivierung) und z (Steigungsfaktor) erhalten. Für in Oozyten exprimierte mKCNQ1-Kanäle als auch für an ventrikulären Myozyten von C57Bl/6J-Mäusen gemessene Linopirdine-sensitive Kaliumauswärtsströme wurden $V_{1/2}$ - und z -Werte ermittelt, die sich nicht signifikant unterschieden (Tabelle 4.1). Eine Analyse der Zeitkonstanten der Deaktivierung von KCNQ1-Kanälen in *Tail*-Strömen an ventrikulären Myozyten bzw. Oozyten zeigte keine signifikanten Unterschiede. Zu beachten ist, dass die für die Auswertung verwendeten *Tail*-Ströme bei unterschiedlichen Membranpotentialen, -60 mV (Oozyten) bzw. -40 mV (Myozyten) gemessen wurden.

	τ (ms)	$V_{1/2}$ (mV)	z	Meßpotential (mV)
Myozyte (n = 4)	319 ± 112	-19.3 ± 0.8	3.70 ± 0.37	-40
Oozyte (n = 6)	472 ± 28	-21.3 ± 0.6	3.27 ± 0.22	-60

Tabelle 4.1: **Spannungsabhängigkeit Linopirdine-sensitiver Ströme** τ : Zeitkonstante der Deaktivierung; $V_{1/2}$: Potential der halbmaximalen Aktivierung; z : Steigungsfaktor; Messpotential: Potential, bei dem die *Tail*-Ströme gemessen wurden. Fehlerangaben stellen die Standardabweichung des Mittelwertes (SD) dar.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass es möglich war, an ventrikulären Myozyten adulter C57Bl/6J-Männchen selektiv einen KCNQ1-vermittelten Kaliumauswärtsstrom zu messen, der mit einem heterolog in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimierten mKCNQ1-Kaliumstrom (siehe Abbildung 4.3) in Bezug auf Aktivierungskinetiken, Spannungsabhängigkeit, Deaktivierungskinetik und Pharmakologie übereinstimmte.

4.1.4 Messung von Kaliumauswärtsströmen in ventrikulären Myozyten adulter *KCNQ1*^{-/-} - Mäuse

Dass es sich bei dem isolierten Kaliumauswärtsstrom tatsächlich um einen KCNQ1-geleiteten Strom handelte, wurde durch elektrophysiologische Messungen an ventrikulären Myozyten von männlichen *KCNQ1*^{-/-} - Mäusen bestätigt. Die Messprotokolle waren wie in 4.1.1 beschrieben. Die resultierenden Stromspuren sind in Abbildung 4.5 ersichtlich.

Abbildung 4.5 A zeigt - analog zu den in Abbildung 4.1 dargestellten Stromspuren aus Zellen von C57Bl/6J-Tieren - einen Kaliumauswärtsstrom, der allerdings die für KCNQ1 typischen *Tail*-Ströme nicht aufwies und dessen Amplitude nach Applikation von 50 μ M Linopirdine nur gering reduziert war. Offensichtlich blockt Linopirdine auch andere Kaliumkanäle (z.B. Kv2.1), allerdings mit deutlich geringerer Effizienz. Wie in Abbildung 4.5 B gezeigt, konnten nach Applikation von TEA und 4-AP keine für KCNQ1 typischen *Tail*-Ströme identifiziert werden. Die in Zellen von C57Bl/6J-Tieren beobachteten *Tail*-Ströme sind daher offensichtlich durch KCNQ1-Kanäle geleitet.

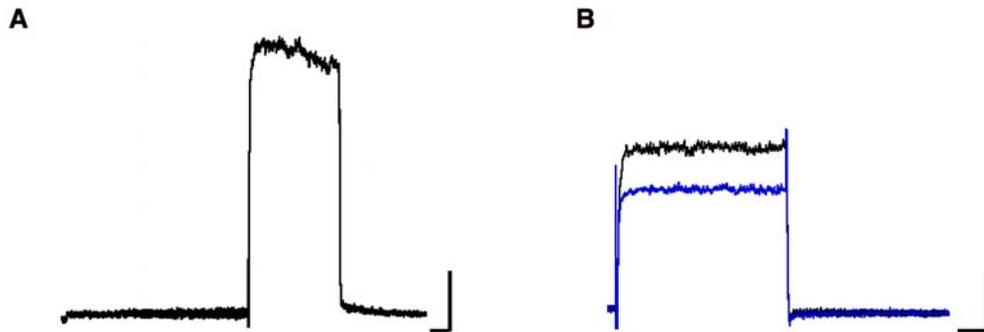


Abbildung 4.5: **Kaliumauswärtsströme in ventrikulären Myozyten adulter *KCNQ1*^{-/-}-Mäuse.** **A:** Kaliumauswärtsströme wurden in ventrikulären Myozyten wie in Abbildung 4.1 beschrieben gemessen. Zeitskala: 200 ms, Amplitudenskala: 200 pA. **B:** Perforated Patch-Clamp-Messung an der in **A** gezeigten ventrikulären Myozyte nach Applikation von 5 mM TEA und 50 μ M 4-AP (schwarz) sowie nach der zusätzlichen Applikation von 50 μ M Linopirdine (blau). Skalen wie in **A** angegeben.

4.1.5 Stimulation von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen durch Isoproterenol

Die Regulation der KCNQ1-Kanalaktivität im humanen Myokard spielt eine wesentliche Rolle bei der Steuerung und Adaption des Herzrhythmus. Inwieweit dies auf das Myokard der Maus zutrifft und dieses in dieser Beziehung als Modellsystem dienen kann, war zu Beginn dieser Arbeit weitestgehend unbekannt. Ventrikuläre Myozyten wurden mit Agonisten für verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren behandelt und die Auswirkung auf die Amplitude des KCNQ1-vermittelten Kaliumauswärtstroms wurde gemessen. Bei diesem experimentellen Ansatz ist es wichtig zu kontrollieren, ob das Ausbleiben einer Auswirkung von G-Protein gekoppelter Rezeptor-Aktivierung an einer Schädigung der Zellen durch die Präparation liegt. In Positivkontrollen wurden die Zellen daher zunächst mit 100 nM Isoproterenol - einem Agonisten für β -1- und β -2-adrenerge Rezeptoren - stimuliert und die Auswirkung auf die Amplitude des durch den L-Typ Ca^{2+} -Kanal geleiteten Kalzium-Einwärtsstrom gemessen. Für dieses Experiment ist in der Literatur eine Zunahme der Amplitude an Ca^{2+} -Einwärtsstrom um einen Faktor 2 publiziert (Maier et al. (1999), Aulbach et al. (1999)),

so dass mit Hilfe dieses Experiments eine Evaluation der Qualität der präparierten Myozyten möglich war.

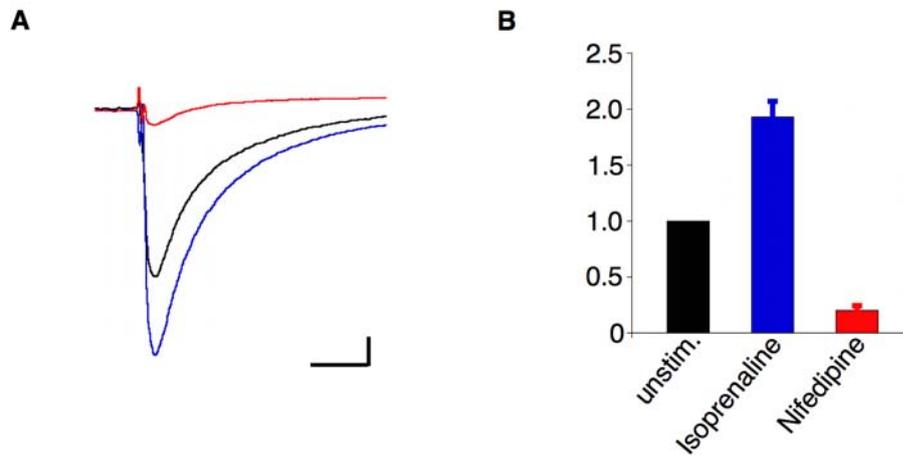


Abbildung 4.6: **Stimulation von L-Typ- Ca^{2+} -Strömen durch Isoproterenol-Applikation.** **A:** L-Typ- Ca^{2+} -Ströme wurden in ventrikulären Myozyten adulter männlicher C57Bl/6J-Mäuse gemessen. Die Zellen wurden bei einem Membranpotential von -80 mV gehalten und durch Depolarisation auf 0 mV L-Typ- Ca^{2+} -Ströme aktiviert. Durch Applikation von 100 nM Isoproterenol kam es zu einer Zunahme von L-Typ- Ca^{2+} -Strömen (blau) in Relation zum basalen Niveau (schwarz). Applikation von 1 μM Nifedipine (rot) führte zu einer Inhibition von L-Typ- Ca^{2+} -Strömen. Zeitskala: 20 ms, Amplitudenskala: 400 pA. **B:** Statistische Auswertung der in **A** gezeigten Messungen. Fehlerbalken stellen den s.e.m. dar ($n = 7$).

Messungen von L-Typ Ca^{2+} -Strömen wurden in der Ganz-Zell Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Die Zellen wurden bei einem Membranpotential von -80 mV gehalten und durch Depolarisation auf 0 mV L-Typ Ca^{2+} -Ströme aktiviert. Um zu verifizieren, dass es sich bei den gemessenen Strömen um L-Typ Ca^{2+} -Ströme handelte, wurde am Ende eines jeden Versuchs 1 μM Nifedipine appliziert, das einen Inhibitor für L-Typ Ca^{2+} -Kanälen darstellt (Segawa et al. (1999)). Wie in Abbildung 4.6 **A** ersichtlich ist, konnten Ca^{2+} -Einwärtsströme durch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle gemessen werden, welche durch Applikation von 100 nM Isoproterenol markant vergrößert wurden. Eine statistische Auswertung (siehe Abbildung 4.6 **B**) ergab für die Applikation von Isoproterenol eine Steigerung der Amplitude von L-Typ Ca^{2+} -Strömen um einen Faktor 1.93 ± 0.14

(Mittelwert \pm s.e.m., n = 7). Dieses Ergebnis stimmte sehr gut mit den in der Literatur publizierten Werten überein und deutete auf eine gute Qualität der präparierten ventrikulären Myozyten hin.

4.1.6 Regulation von KCNQ1-Aktivität durch Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Die Untersuchung der Regulation von KCNQ1-Aktivität durch Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren erfolgte nach dem in Abbildung 4.7 dargestellten Versuchsprotokoll. Hierbei wurden ventrikuläre Myozyten von adulten, männlichen C57Bl/6J-Mäusen mittels der Perforated Patch-Clamp-Technik untersucht. Das Pulsprotokoll zur Messung von Kaliumauswärtsströmen wurde wie in Abbildung 4.1 gezeigt über den gesamten Versuchszeitraum durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst über einen Zeitraum von 2 Minuten mit 5 mM TEA und 50 μ M 4-AP superfundiert, bevor ab der dritten bis zum Ende der sechsten Minute der jeweilig zu untersuchende Agonist zusätzlich appliziert wurde. Ab der siebten Minute des Versuches wurde der Agonist ausgewaschen und stattdessen wurde mit 50 μ M Linopirdine superfundiert, um Änderungen der Amplitude des Kaliumauswärtsstroms auf eine Änderung der KCNQ1-vermittelten Stromamplitude zurückführen zu können. In der letzten Minute des Versuchsprotokolls erfolgte wiederum ein Auswaschen des KCNQ1-Inhibitors Linopirdine, um die Reversibilität des gesamten Versuchsablaufs im Vergleich zur Ausgangsamplitude des KCNQ1-vermittelten Kaliumauswärtsstroms zu erfassen.

Abbildung 4.8 zeigt die zeitabhängige Änderung der Amplitude KCNQ1-vermittelter Kaliumauswärtsströme nach Applikation von Agonisten verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren nach dem in Abbildung 4.7 dargestellten Applikationsprotokoll. Zum Vergleich wurden die Amplitudenänderungen auf die größte beobachtete Änderung skaliert. Die Aktivität von KCNQ1-Kanälen *in vitro* wird durch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) stimuliert (Zhang et al. (2003)). Deshalb wurden verschiedene Agonisten gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren appliziert, welche PtdIns(4,5)P₂-gekoppelte Signalwege in primären Kardiomyozyten aktivieren (Cho et al. (2005)). Eine Inkubation der untersuchten ventrikulären Myozyten mit Glukagon, Bradykinin und Angiotensin-II führte zu keinen meßbaren Veränderungen der durch KCNQ1-vermittelten Amplitude des Kaliumauswärtsstroms im Beobachtungszeitraum. Die Applikation von Endothelin-1 hatte eine leichte Abnahme der KCNQ1-

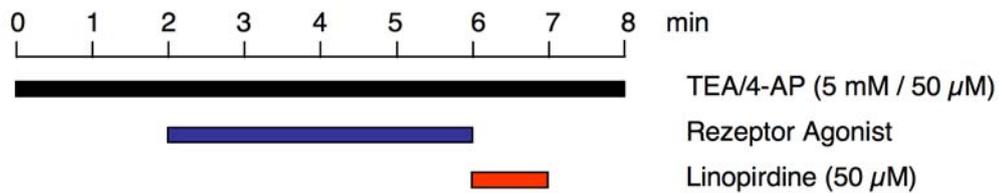


Abbildung 4.7: **Protokoll zur hormonellen Stimulation ventrikulärer Myozyten.**

Ventrikuläre Myozyten adulter männlicher Mäuse wurden in der Perforated Patch-Clamp-Konfiguration untersucht. Die Zellen wurden nach dem angegebenen zeitlichen Protokoll mit den genannten Inhibitoren und Agonisten superfundiert und laufend nach dem in Abbildung 4.1 genannten Pulsprotokoll die Kaliumauswärtsströme gemessen.

vermittelten Stromamplitude zur Folge, während die Applikation von Phenylephrine - einem Agonisten für α -adrenerge Rezeptoren - eine in Relation zu Endothelin-1 verdoppelte Abnahme der Stromamplitude zur Folge hatte.

Erwartungsgemäß führte eine Aktivierung von Signalwegen, welche zu einer Verringerung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat - Spiegeln im Zytoplasma führen, im Falle von Endothelin-1 und Phenylephrine zu einer Abnahme der KCNQ1-vermittelten Amplitude von Kaliumauswärtsströmen. Um zu untersuchen, ob eine Aktivierung von Protein Kinase A abhängigen Signalwegen zu einer Änderung der gemessenen Stromamplitude führt, wurden die zu untersuchenden Zellen mit Isoproterenol stimuliert. Unter diesen Versuchsbedingungen wurde eine Zunahme der Amplitude beobachtet. In weiteren Versuchen wurden Serotonin-Rezeptoren mit Serotonin stimuliert. Mitglieder dieser Familie aktivieren je nach Rezeptor Protein Kinase A - abhängige Signalwege (vermittelt über das stimulatorische G-Protein G_S) oder Phospholipase C - abhängige Signalwege (vermittelt durch die Untereinheit G_q) (Martin et al. (1998), Hoyer et al. (2002)). Für die Applikation des Rezeptor-Agonisten Serotonin wurde unter den genannten Versuchsbedingungen eine signifikante Zunahme des KCNQ1-vermittelten Kaliumauswärtsstroms gemessen, welche in der gesamten Versuchsreihe die größte beobachtete Änderung der KCNQ1-Stromamplitude darstellte.

Um zu ermitteln, ob die von Serotonin hervorgerufene Stimulation des Kaliumauswärtsstroms durch einen über das G_S - oder G_q -Protein gekoppelten Serotonin-Rezeptor verursacht wird, wurden ventrikuläre Myozyten von C57Bl/6J-Mäusen entweder mit

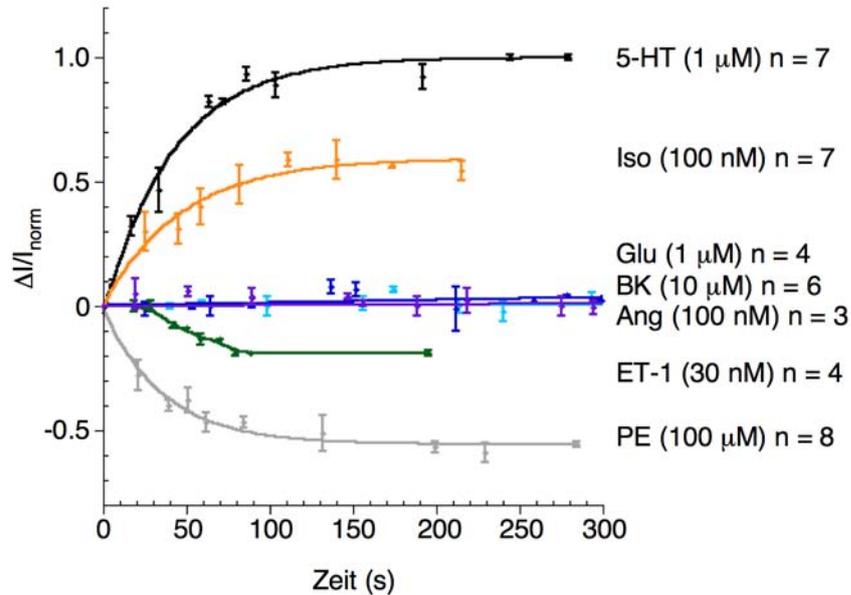


Abbildung 4.8: **Zu- oder Abnahme von Kaliumauswärtsströmen nach Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren.** Ventrikuläre Myozyten adulter männlicher Mäuse wurden nach dem in Abbildung 4.7 genannten Protokoll mit Agonisten für G-Protein gekoppelte Rezeptoren stimuliert. Die Änderung der Amplituden des gemessenen Kaliumauswärtsstroms ist für jeden Agonisten in Abhängigkeit von der Zeit und normalisiert auf die maximale beobachtete Änderung dargestellt. 5-HT: Serotonin, Iso: Isoproterenol, Glu: Glukagon, BK: Bradykinin, Ang: Angiotensin-II, ET-1: Endothelin-1, PE: Phenylephrine. Konzentrationen: siehe Cho et al. (2005), Maier et al. (1999) und Mukai et al. (2001).

5 nM GR1138, einem Inhibitor für 5-HT₄-Rezeptoren (G_S-gekoppelt) (Qvigstad et al. (2005)), oder mit 1 μM Ketanserin, einem Antagonisten für 5-HT_{2A}-Rezeptoren (G_q-gekoppelt) (Leysen et al. (1982)), inkubiert. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um die im Herzen vorwiegend exprimierten Serotonin-Rezeptoren (Kaumann und Levy (2006)), weshalb einer der beiden Rezeptoren als die wahrscheinlichste molekulare Ursache für den beobachteten Effekt angenommen werden konnte. Inkubation der Zellen mit dem Antagonisten in An- bzw. Abwesenheit von 1 μM Serotonin sollte zeigen, ob die Serotonin-induzierte Zunahme des Kaliumauswärtsstroms durch den Serotoninrezeptor-Antagonisten inhibiert wird. Die Applikation von GR1138 zusammen mit Serotonin führte zu einer Zunahme von 88.5 ± 5.9 % (Mittelwert ± s.e.m., n = 4) der maximal mit Serotonin gemessenen Amplitudenzunahme. Im Gegenzug konnte bei Applikation von Ketanserin zusammen mit Serotonin keine signifikante Zunahme (1.0 ± 3.0 %; Mittelwert ± s.e.m., n = 4) der Amplitude festgestellt werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Serotonin-vermittelte Steigerung der Kaliumauswärtsstromamplitude über die Aktivierung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt wird.

Eine Zunahme der Amplitude an KCNQ1-vermitteltem Kaliumauswärtsstrom nach Stimulation der Zellen mit Serotonin führte zu keiner signifikanten Änderung der gemessenen Kinetik der Aktivierung und Inaktivierung von KCNQ1-geleiteten Strömen. Es wurde weiterhin keine signifikante Änderung der Spannungsabhängigkeit unter Serotonin-Applikation beobachtet (siehe Tabelle 4.2).

Pharmaka	τ_{akt} (ms)	τ_{inakt} (ms)	$V_{1/2}$ (mV)	Anzahl
TEA/4-AP	77.1 ± 29.7	260.8 ± 50.4	-19.8 ± 0.9	5
TEA/4-AP/Serotonin	66.5 ± 38.0	224.3 ± 36.5	-15.0 ± 0.7	5

Tabelle 4.2: **Kenndaten von KCNQ1-geleiteten Kaliumauswärtsströmen vor und nach Stimulation mit Serotonin.** τ -Werte für die Aktivierung (τ_{akt}) und Inaktivierung (τ_{inakt}) von KCNQ1-geleiteten Kaliumauswärtsströmen wurden jeweils durch einfach exponentiellen Fit ermittelt. $V_{1/2}$ -Werte wurden wie unter 4.1.3 beschrieben ermittelt. Fehlerangaben stellen den s.e.m. dar.

Wie in Abbildung 4.9 A ersichtlich ist, kam es unter konstanter Superfusion von TEA/4-AP und zusätzlicher Applikation von Serotonin an ventrikulären Myozyten adulter männlicher C57Bl/6J-Mäuse zu einer Zunahme der Amplitude des Gesamtauswärts-

stroms (siehe Tabelle 4.3) und der gemessenen Tail-Ströme (blaue Stromspur). Applikation von Linopirdine führte nach Inkubation der ventrikulären Myozyten mit Serotonin zu einer signifikanten Abnahme der Gesamtamplitude des Auswärtsstroms als auch zu einem vollständigen Block der zuvor beobachteten Tail-Ströme (rote Stromspur).

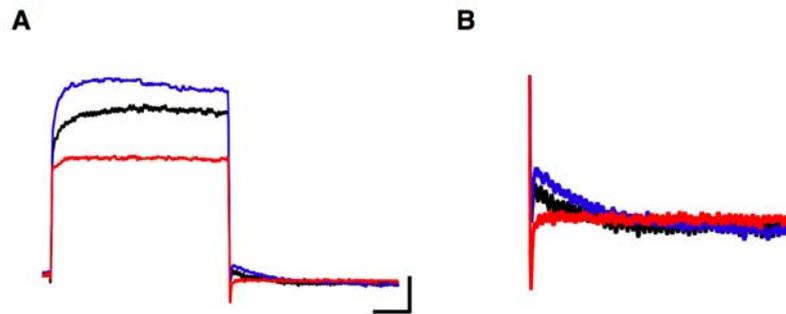


Abbildung 4.9: **Darstellung von Kaliumauswärtsströmen in ventrikulären Myozyten nach Serotonin-Applikation.** **A:** Darstellung der Amplituden des Kaliumauswärtsstroms einer ventrikulären Myozyte einer adulten männlichen C57Bl/6J-Maus nach Applikation von TEA/4-AP (schwarz) bzw. der zusätzlichen Applikation von Serotonin (blau) oder Linopirdine (rot). Zeitskala: 200 ms, Amplitudenskala: 100 pA. Messungen erfolgten wie in den Abbildungen 4.1 und 4.7 angegeben. **B:** Vergrößerung der in **A** gezeigten Tail-Ströme.

Ventrikuläre Myozyten adulter männlicher *KCNQ1*^{-/-}-Mäuse wurden nach dem in Abbildung 4.7 dargestellten Protokoll ebenfalls mit Serotonin inkubiert und die Amplituden der Kaliumauswärtsströme gemessen. Wie in Tabelle 4.3 ersichtlich ist, führte die Applikation von Serotonin bei ventrikulären Myozyten von *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen zu keiner signifikanten Zunahme der Amplitude des Kaliumauswärtsstroms ($5\% \pm 2\%$; Mittelwert \pm s.e.m.). Die durch Inkubation der Wild-Typ-Zellen mit Serotonin verursachte Zunahme der Amplitude des Kaliumauswärtsstroms ($29\% \pm 4\%$; Mittelwert \pm s.e.m.) ist offensichtlich durch KCNQ1 vermittelt. Ein Indiz für die Spezifität des beobachteten Effektes durch Serotonin-Applikation ist die Reduktion des Kaliumauswärtsstroms durch Linopirdine. Applikation von Linopirdine führt bei Mäusen beider untersuchter Genotypen zu einer Reduktion des Kaliumauswärtsstroms auf ein identisches Endniveau von ungefähr 75 % der Ausgangsamplitude. Dieses bedeutet, dass die durch Serotonin hervorgerufene Steigerung der Amplitude an Kaliumauswärtsstrom

Linopirdine-sensitiv ist, allerdings zeigt das Ergebnis auch einen partiell unspezifischen Block weiterer Kaliumauswärtsströme durch Linopirdine in *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen.

Genotyp	Pharmaka	I/I_{norm}	Anzahl
C57Bl/6J	TEA/4-AP	1.00 ± 0.00	7
	TEA/4-AP/Serotonin	1.29 ± 0.04	7
	TEA/4-AP/Linopirdine	0.75 ± 0.03	7
<i>KCNQ1</i> ^{-/-}	TEA/4-AP	1.00 ± 0.00	7
	TEA/4-AP/Serotonin	1.05 ± 0.02	7
	TEA/4-AP/Linopirdine	0.76 ± 0.01	7

Tabelle 4.3: **Stimulation von Kaliumauswärtsströmen durch Serotonin in C57Bl/6J- und *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen** Dargestellt sind die auf die Werte vor Applikation von Serotonin normierten Amplituden von Kaliumauswärtsströmen in ventrikulären Myozyten von C57Bl/6J- und *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen. Applikationsprotokolle sowie Konzentrationen der einzelnen Pharmaka sind in den Abbildung 4.7 und 4.8 angegeben. Fehlerangaben stellen den s.e.m. dar.

Die zeitliche Entwicklung der Zunahme des gemessenen Kaliumauswärtsstroms einer repräsentativen Wild-Typ-Zelle bei Applikation von Serotonin ist in Abbildung 4.10 dargestellt. In allen untersuchten Fällen wurde eine relativ langsame Zunahme der Stromamplitude beobachtet, welche nach einem Zeitraum von etwa drei bis vier Minuten in ein Plateau überging. Ein Auswaschen des Serotonins durch Applikation von Linopirdine sowie nachfolgender Superfusion mit TEA/4-AP-haltiger Badlösung führte im Beobachtungszeitraum von etwa zwei Minuten nach Beendigung der Inkubation mit Serotonin nicht zu einem Rückgang der zuvor gestiegenen Amplitude des Kaliumauswärtsstroms.

4.1.7 Analyse der Erregbarkeit ventrikulärer Myozyten von C57Bl/6J und *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen

KCNQ1-Kaliumkanäle sind bereits bei sehr niedrigen Membranpotentialen von -60 mV aktiv (siehe Abbildung 4.4), so dass sowohl das Ruhemembranpotential beeinflussen, wie auch bei positiven Membranpotentialen zur Repolarisierung des Aktionspotentials beitragen können. Beide Aktivitäten sind dazu geeignet, das Auftreten von Aktions-

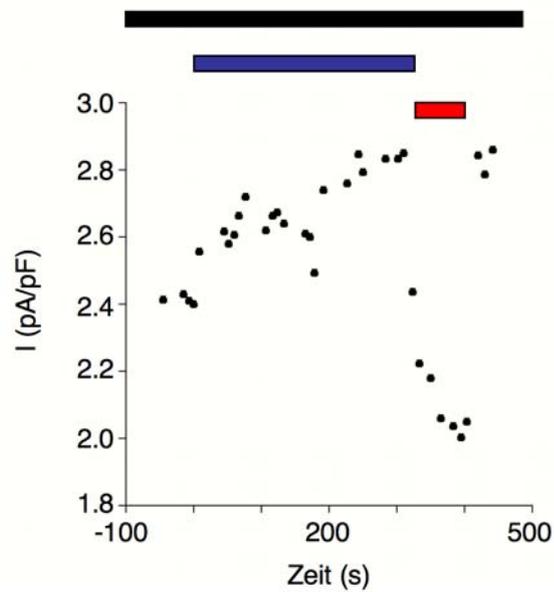


Abbildung 4.10: **Amplituden-Entwicklung von KCNQ1-vermittelter Stromdichte nach Serotonin-Applikation.** Zeitliche Auftragung der auf die Zellgröße normalisierten Amplitude des Kaliumauswärtsstroms der in Abbildung 4.9 gezeigten Myozyte. Balken symbolisieren die in Abbildung 4.7 dargestellte Pharmaka-Applikation. Schwarz: TEA/4-AP; TEA/4-AP/Serotonin; Rot: TEA/4-AP/Linopirdine.

potentialen in ventrikulären Myozyten zu beeinflussen. Um den Einfluss von KCNQ1-Kanalaktivität auf die Erregbarkeit von ventrikulären Myozyten zu untersuchen, wurden Zellen von C57Bl/6J- und *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen im Current-Clamp-Modus in der Perforated Patch-Clamp-Technik elektrophysiologisch charakterisiert. Das Membranpotential wurde durch Strominjektion auf -70 mV gehalten. Nachfolgend wurden Aktionspotentialen durch depolarisierende Strominjektionen mit Injektions-Frequenzen von 5-10 Hz ausgelöst. Während bei einer Depolarisationsfrequenz von 5 Hz ventrikuläre Myozyten von C57Bl/6J-Mäusen auf praktisch jeden Strominjektionspuls mit der Ausbildung eines nachfolgenden Aktionspotentials antworteten, wurde bei einer Injektionsfrequenz von 8 Hz ein Ausbleiben von fast 50 % aller Aktionspotentialen beobachtet (Abbildung 4.11 A). Eine nachfolgende Superfusion derselben Zelle mit Badlösung, welcher Serotonin in einer finalen Konzentration von 1 μ M zugesetzt wurde, führte zu einer wesentlichen Steigerung der Erregbarkeit und einer verstärkten Ausbildung von Aktionspotentialen (Abbildung 4.11 B). Die zur Depolarisierung der Zellmembran injizierte Strommenge wurde während des Versuches nicht verändert. Superfusion mit reiner Badlösung reduzierte die Ausbildung von Aktionspotentialen wieder auf das in Abbildung 4.11 A dargestellte Maß.

Eine Injektion von depolarisierenden Strömen mit einer Frequenz von 8 Hz - analog zur in Abbildung 4.11 A dargestellten Situation einer Zelle einer C57Bl/6J-Maus - führte im Fall von ventrikulären Myozyten von *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen gleichfalls zu einer Fehlrate bei der Auslösung von Aktionspotentialen nach depolarisierenden Strominjektionen (Abbildung 4.12 A). Eine nachfolgende Applikation von Serotonin führte im Gegensatz zu Zellen von C57Bl/6J-Mäusen nicht zu einer wesentlichen Verbesserung der Fehlrate (Abbildung 4.12 B).

Eine vollständige Auflistung der Erfolgsrate an ausgelösten Aktionspotentialen bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen ist in Tabelle 4.4 angegeben. Für ventrikuläre Myozyten von C57Bl/6J-Mäusen wurde bei einer Stimulationsfrequenz von 5 Hz unter Superfusion mit Badlösung eine 90 % ige Erfolgsrate (90.0 ± 20.0 %) beobachtet. Bei einer Frequenz von 8 Hz wurde eine deutliche Abnahme der Erfolgsrate auf 56.1 ± 10.9 % beobachtet. Eine Stimulationsfrequenz von 10 Hz zeigte eine Erfolgsrate von 45.0 ± 10.6 %. Im Fall von ventrikulären Myozyten von *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen ist in Relation zur Situation in Zellen von C57Bl/6J-Tieren eine Reduktion der Erfolgsrate an generierten Aktionspotentialen um ca. die Hälfte bei allen untersuchten Stimulationsfrequenzen zu beobachten. Bei einer Injektionsfrequenz von 5 Hz lag die Erfolgsrate

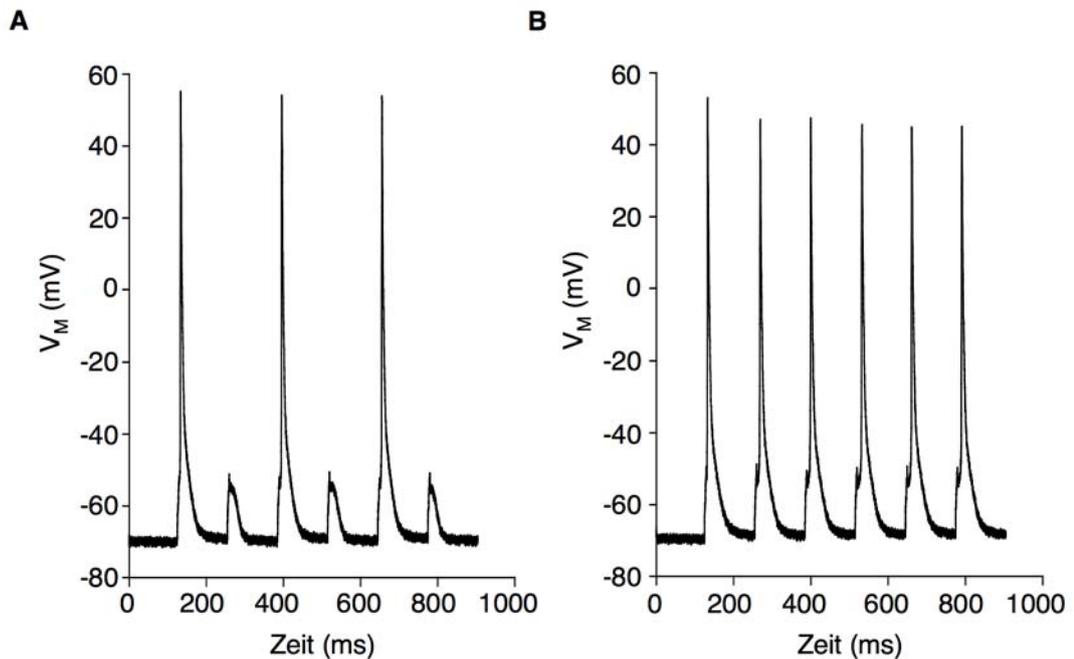


Abbildung 4.11: **Serotonin-Applikation führt zu einer Steigerung der Erregbarkeit von ventrikulären Myozyten von C57Bl/6J-Mäusen.** **A:** Ventrikuläre Myozyten wurden in der Perforated Patch-Clamp-Technik im Current-Clamp analysiert. Das Membranpotential wurde durch Strominjektion auf -70 mV gehalten und Aktionspotentiale durch depolarisierende Strominjektionen bei einer Frequenz von 8 Hz ausgelöst. **B:** Dargestellt sind Ableitungen derselben Zelle wie in **A**, allerdings während der Applikation von 1 μ M Serotonin.

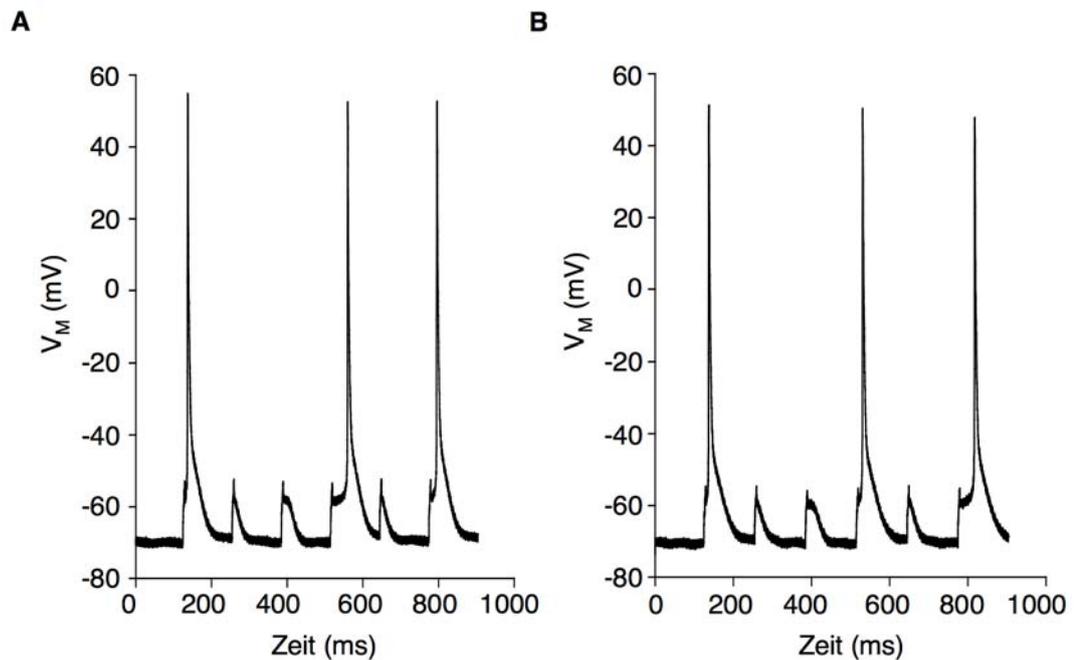


Abbildung 4.12: **Erregbarkeit ventrikulärer Myozyten von $KCNQ1^{-/-}$ -Mäusen wird durch Serotonin-Applikation nicht auf das Niveau von C57Bl/6J-Myozyten gesteigert.** **A:** Herzmuskelzellen von $KCNQ1^{-/-}$ -Mäusen wurden wie in Abbildung 4.11 A im Current-Clamp-Modus analysiert **B:** Darstellung von Ableitungen derselben Zelle wie in A während der Applikation von $1 \mu\text{M}$ Serotonin.

bei $KCNQ1^{-/-}$ -ventrikulären Myozyten bei $47.7 \pm 7.8 \%$. Für Stimulationsfrequenzen von 8 und 10 Hz wurden Erfolgsraten von $25.0 \pm 7.2 \%$ und $18.3 \pm 5.3 \%$ gemessen. Die Ergebnisse lassen daher auf eine Reduktion der Erregbarkeit ventrikulärer Myozyten bei einem Verlust von KCNQ1-Aktivität schließen.

Genotyp	Stimulationsfrequenz	Erfolgsrate
C57Bl/6J (n = 5)	5 Hz	$90.0 \pm 20.0 \%$
	8 Hz	$56.1 \pm 10.9 \%$
	10 Hz	$45.0 \pm 10.6 \%$
$KCNQ1^{-/-}$ (n = 6)	5 Hz	$47.7 \pm 7.8 \%$
	8 Hz	$25.0 \pm 7.2 \%$
	10 Hz	$18.3 \pm 5.3 \%$

Tabelle 4.4: **Erregbarkeit ventrikulärer Myozyten von C57Bl/6J- und $KCNQ1^{-/-}$ -Mäusen.** Ventrikuläre Myozyten adulter männlicher C57Bl/6J- sowie $KCNQ1^{-/-}$ -Mäuse wurden im Current-Clamp-Modus der Perforated Patch-Clamp-Technik durch Strominjektion auf ein Membranpotential von -70 mV eingestellt. Nachfolgend erfolgten depolarisierende Strominjektionen zur Auslösung von Aktionspotentialen. Angegeben sind in % die Erfolgsraten an generierten Aktionspotentialen bei den angegebenen Stimulationsfrequenzen unter Superfusion der Zellen durch Badlösung. Fehlerangaben stellen den s.e.m. dar.

Eine Superfusion von ventrikulären Myozyten von C57Bl/6J- und $KCNQ1^{-/-}$ -Mäusen mit Badlösung, der Serotonin in einer finalen Konzentration von $1 \mu\text{M}$ zugesetzt wurde, führte zu einer Verbesserung der Erfolgsraten an generierten Aktionspotentialen bei beiden untersuchten Genotypen (siehe Tabelle 4.5). Außer bei einer Stimulationsfrequenz von 5 Hz, bei welcher ventrikuläre Myozyten von C57Bl/6J-Mäusen bereits ohne Serotonin-Applikation eine annähernd 100 %ige Erfolgsrate aufwiesen, wurde die Erfolgsrate unabhängig vom untersuchten Genotyp durch Stimulation mit Serotonin um $\sim 40\text{-}50 \%$, bezogen auf die Erfolgsrate vor Applikation von Serotonin, verbessert. Dieses Ergebnis ist ein Indiz für die Stimulation mindestens eines weiteren Ionenkanals durch Serotonin, dessen molekulares Korrelat nicht weiter untersucht wurde.

Die Erfolgsrate bei der Generierung von Aktionspotentialen hängt entscheidend von der Verfügbarkeit spannungsabhängiger Natrium-Kanäle ab. Können sich diese nicht schnell genug von der Inaktivierung erholen, steht für das folgende Aktionspotential ein zu geringer Anteil der Gesamtpopulation an spannungsabhängigen Natrium-

Genotyp	Stimulationsfrequenz	Erfolgsrate
C57Bl/6J (n = 5)	5 Hz	99.4 ± 1.1 %
	8 Hz	78.9 ± 23.7 %
	10 Hz	60.6 ± 10.9 %
<i>KCNQ1</i> ^{-/-} (n = 6)	5 Hz	66.2 ± 14.6 %
	8 Hz	38.9 ± 8.6 %
	10 Hz	26.9 ± 9.3 %

Tabelle 4.5: **Einfluß von Serotonin auf die Erregbarkeit ventrikulärer Myozyten von C57Bl/6J- und *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen.** Ventrikuläre Myozyten adulter männlicher C57Bl/6J- (n = 5) sowie *KCNQ1*^{-/-}-Mäuse (n = 6) wurden wie unter Tabelle 4.4 angegeben untersucht. Dargestellt sind in % die Erfolgsraten bei der Generierung von Aktionspotentialen unter Superfusion der Zellen durch Badlösung, welcher Serotonin in einer finalen Konzentration von 1 µM zugesetzt wurde. Fehlerangaben stellen den s.e.m. dar.

Kanälen zur Verfügung. Dadurch kann die Myozyte nicht ausreichend depolarisiert werden (Fozzard und Hanck (1996)). Um zu überprüfen, ob eine nicht vollständige Erholung spannungsabhängiger Natrium-Kanäle aus der Inaktivierung die Ursache für die verminderte Feuerungsrate von Zellen von *KCNQ1*^{-/-}-Myozyten sein kann, wurden *KCNQ1*^{-/-}-Zellen bei einer Stimulationsfrequenz von 10 Hz vor jeder neuen Depolarisation durch eine kurze Strominjektion kurzfristig hyperpolarisiert. Wie in Abbildung 4.13 ersichtlich ist, sind die untersuchten Zellen unter den genannten Bedingungen in der Lage, auf jede depolarisierende Strominjektion mit der Ausbildung eines Aktionspotentials zu antworten. Dieses Ergebnis deutet auf eine unvollständige Erholung spannungsabhängiger Natrium-Kanäle aus der Inaktivierung aufgrund einer unzureichenden Repolarisation des Membranpotentials durch KCNQ1-Kanäle hin.

Im folgenden wurde deshalb untersucht, wie sich das Fehlen des KCNQ1-Kanals auf den Zeitverlauf der Aktionspotentialreparisation (APD) auswirkt. Es wurden APDs bei 50%iger beziehungsweise 90%iger Repolarisation (APD50 bzw. APD90) des Membranpotentials bezogen auf die maximale Depolarisation untersucht. Die erhaltenen Werte sind in den Tabellen 4.6 (APD50) und 4.7 angegeben.

Unter den gewählten Meßbedingungen konnte kein signifikanter Unterschied in den APD50-Werten zwischen Messungen an Zellen von C57Bl/6J-Mäusen oder *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen festgestellt werden. Beobachtet wurde eine leichte Verringerung des APD50-

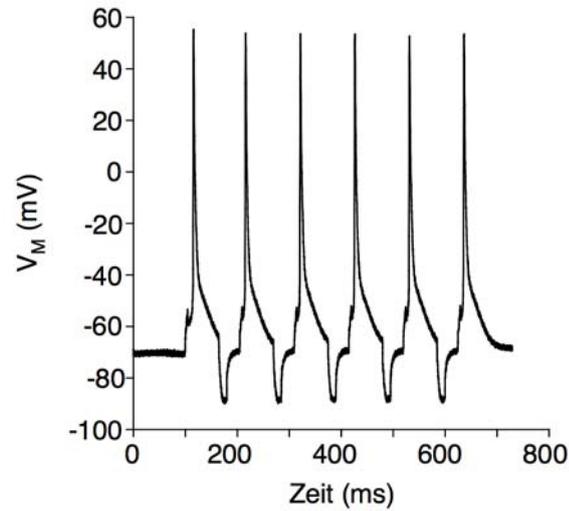


Abbildung 4.13: **Hyperpolarisierende Strominjektion führen zu einer Steigerung der Erregbarkeit von ventrikulären Myozyten von $KCNQ1^{-/-}$ -Mäusen.** Ventrikuläre Myozyten von $KCNQ1^{-/-}$ -Mäusen wurden wie in Abbildung 4.11 beschrieben im Current-Clamp-Modus analysiert. Abweichend vom genannten Protokoll wurde vor jeder depolarisierenden Strominjektion ein hyperpolarisierender Strom in die Zelle injiziert. Die Injektionsfrequenz lag bei 10 Hz.

Genotyp	Stimulationsfrequenz	Badlösung	Serotonin
C57Bl/6J (n = 5)	5 Hz	6.65 ± 1.76 ms	6.12 ± 1.30 ms
	8 Hz	6.50 ± 1.71 ms	6.09 ± 1.36 ms
	10 Hz	6.52 ± 1.51 ms	5.92 ± 1.33 ms
$KCNQ1^{-/-}$ (n = 6)	5 Hz	5.28 ± 0.76 ms	5.46 ± 0.86 ms
	8 Hz	4.88 ± 0.75 ms	5.03 ± 0.81 ms
	10 Hz	5.13 ± 0.78 ms	5.23 ± 0.84 ms

Tabelle 4.6: **APD50-Werte ventrikulärer Myozyten von C57Bl/6J- und $KCNQ1^{-/-}$ -Mäusen** Ventrikuläre Myozyten adulter männlicher C57Bl/6J- sowie $KCNQ1^{-/-}$ -Mäuse wurden wie in Tabelle 4.4 beschrieben untersucht und die Zeit bis zu einer 50%igen Repolarisation des Membranpotentials ausgewertet. Angegeben sind die gemittelten APD50-Werte in ms, Fehlerangaben stellen den s.e.m. dar.

4 Ergebnisse

Genotyp	Stimulationsfrequenz	Badlösung	Serotonin
C57Bl/6J (n = 5)	5 Hz	30.08 ± 4.04 ms	32.30 ± 4.11 ms
	8 Hz	31.73 ± 6.10 ms	30.91 ± 4.39 ms
	10 Hz	33.47 ± 5.97 ms	33.63 ± 4.67 ms
<i>KCNQ1</i> ^{-/-} (n = 6)	5 Hz	47.12 ± 7.03 ms	48.57 ± 7.84 ms
	8 Hz	44.32 ± 5.98 ms	48.63 ± 8.02 ms
	10 Hz	47.41 ± 7.33 ms	49.34 ± 7.67 ms

Tabelle 4.7: **APD90-Werte ventrikulärer Myozyten von C57Bl/6J- und *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen** Die Tabelle gibt analog Tabelle 4.6 die Zeit bis zu einer 90%igen Repolarisation des Membranpotentials an. Angegeben sind die gemittelten APD90-Werte in ms, Fehlerangaben stellen den s.e.m. dar.

Intervalls bei allen untersuchten Stimulationsfrequenzen für Myozyten von *KCNQ1*^{-/-}-Tieren in Relation zu Zellen von C57Bl/6J-Mäusen, welche allerdings nicht statistisch signifikant war. Im Gegensatz zu dieser Feststellung wurde eine statistisch signifikante Verlängerung der APD90-Intervalle um ~ 11-14 ms bei allen Stimulationsfrequenzen in *KCNQ1*^{-/-}-Myozyten gemessen. Die Messdaten zeigten eine deutliche Unabhängigkeit der APD-Intervalle von den gewählten Stimulationsfrequenzen in Zellen beider untersuchter Genotypen, indem keine Variabilität der APD-Intervalle bei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen festgestellt wurde. Aus den erhaltenen Ergebnissen kann daher geschlossen werden, dass ein Verlust von *KCNQ1*-Kaliumauswärtsstrom in einer frühen Phase der Repolarisation keine Auswirkungen zeigt, während sich eine von der Stimulationsfrequenz unabhängige Verlängerung des APD90-Intervalls in *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen beobachten ließ.

Eine Stimulation mit Serotonin führte nicht zu messbaren Veränderungen in den APD50- bzw. APD90-Intervallen bei Myozyten von C57Bl/6J -oder *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen gegenüber den ohne Applikation von Serotonin gemessenen APD-Intervallen. Es wurde unter Stimulation mit Serotonin eine statistisch nicht signifikante Verringerung der APD50-Intervalle bei allen Stimulationsfrequenzen in Myozyten von *KCNQ1*^{-/-}-Tieren gemessen, die statistisch nicht signifikant war. Die APD90-Intervalle zeigten erneut eine signifikante Verlängerung, die allerdings von Serotonin unbeeinflusst war. Zusammenfassend ist daher festzustellen, dass Serotonin-Applikation zu Myozyten von C57Bl/6J -oder *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen unter den gewählten Bedingungen nicht zu detektierbarer Modulation der APD-Intervalle führte, aber die frequenzabhängige Ausfall-

quote der generierten Aktionspotentiale deutlich verbesserte. Diese Befunde deuteten auf eine Beeinflussung des Schwellenwertpotentials durch KCNQ1-Kanäle hin.

Neben KCNQ1-Kanälen können auch durch Hyperpolarisierung aktivierte und durch zyklische Nukleotide modulierte Kanäle (HCN-Kanäle), der transiente Einwärtsstrom I_{ti} sowie der TRPM4-Kanal eine Modulation des Schwellenwertpotentials durch Aktivität im Bereich des Ruhemembranpotentials beeinflussen (Barbuti und DiFrancesco (2008), Guinamard et al. (2004), Launay et al. (2002)). Da für die isolierte kardiale Übertragungserkrankung PFHBI eine Fehlfunktionalität eines Ionenkanals als ursächlich vermutet wurde (Brink et al. (1995)), wurde nachfolgend die Rolle von TRPM4-Ionenkanalaktivität im Zusammenhang mit PFHBI untersucht.

4.2 Disregulation von TRPM4b-Kanalaktivität im Herzen von PFHBI-Patienten

4.2.1 Identifikation einer Mutation in *TRPM4* von PFHBI-Patienten

Bereits 1995 wurden 86 Mitglieder einer südafrikanischen Familie, von denen 39 von PFHBI betroffen waren, humangenetisch untersucht. Im Rahmen dieser Charakterisierungen wurde der genetische Locus für PFHBI auf einen 10 cM großen Bereich des Chromosoms 19 (19q13.2-13.3) eingegrenzt (Brink et al. (1995)) (Abbildung 4.14).

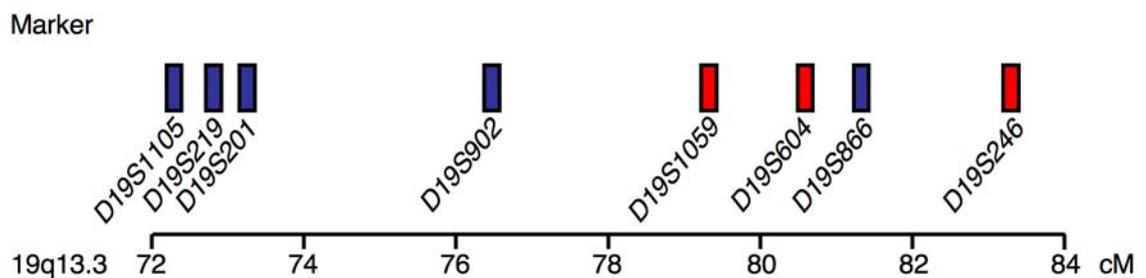


Abbildung 4.14: **Identifikation des Genlokus für PFHBI.** 1995 konnte durch Brink und Mitarbeiter (Brink et al. (1995)) der Locus für PFHBI auf einen Bereich zwischen den Markern *D19S902* und *D19S866* auf Chromosom 19 (19q13.2-q13.3) eingegrenzt werden. Durch P. Brink und V. Corfield sowie E. Schulze-Bahr und Mitarbeiter wurde der Locus für PFHBI auf einen 0.35 MB großen Bereich zwischen den Markern *D19S1059* und *D19S604* bestimmt. Blau: 1995 verwendete Marker; rot: 2008 verwendete Marker.

In einer Kooperation zwischen der Universität Stellenbosch (Süd-Afrika), vertreten durch P. Brink und V. Corfield, sowie der Abteilung für Kardiologie und Angiologie des Universitätskrankenhauses Münster, vertreten durch die Arbeitsgruppe von E. Schulze-Bahr, und dem Institut für Neurale Signalverarbeitung des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg (vertreten durch O. Pongs und den Autoren), konnte durch in der Arbeitsgruppe von P. Brink und V. Corfield durchgeführte Marker-Analysen bei 91 Mitgliedern der Familie der Locus für PFHBI auf einen 4.3 cM großen Abschnitt zwischen den Markern *D19S1059* und *D19S604* auf Chromosom 19 eingegrenzt werden.

Eine Kalkulation des 2-Punkt Lod-Wertes für den Marker *D19S246* ergab einen Wert von 11.17. Der identifizierte Abschnitt auf Chromosom 19 weist die kodierenden Sequenzen für 25 Gene auf, von denen für sieben eine kardiale Expression bekannt ist (Abbildung 4.15) (Kaneko et al. (2004), Pederson et al. (2004), Heidecker et al. (2008), Bardien-Kruger et al. (2002), Gregory et al. (2006), Launay et al. (2002), Paine et al. (2000)).

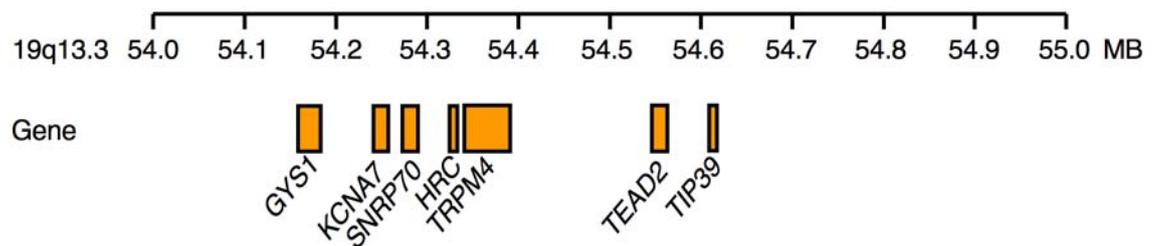


Abbildung 4.15: **Kardial exprimierte Gene im Bereich des Lokus für PFHBI.** Kardial exprimierte Gene im Bereich zwischen den Markern *D19S1059* und *D19S604*. *GYS1*: glycogen synthase; *KCNA7*: potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 7; *SNRP70*: U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa; *HRC*: sarcoplasmic reticulum histidine-rich calcium-binding protein precursor; *TRPM4*: transient receptor potential cation channel subfamily M member 4; *CD37*: leukocyte antigen 37; *TEAD2*: transcriptional enhancer factor TEF-4; *PTH2*: tuberoinfundibular peptide of 39 residues precursor.

KCNA7 konnte durch vorhergehende Studien als molekulare Ursache für PFHBI ausgeschlossen werden (Bardien-Kruger et al. (2002)). Aufgrund seiner chromosomalen Position und der prominenten Expression in kardialem Gewebe (Launay et al. (2002)) wurde daher das Gen für den spannungsabhängigen Ionenkanal *TRPM4b* als Kandidatengenen für PFHBI erachtet und sequenziert (Eric Schulze-Bahr, Münster, Deutschland). Die Sequenz-Analyse genomischer DNA von 91 Familienmitgliedern zeigte, dass ein Nukleotidaustausch (G-A an Position 19 in Exon 1) ausschließlich in heterozygoter Form bei allen von PFHBI betroffenen Familienmitgliedern ($n = 34$) auftrat (Abbildung 4.16). Durch den Nukleotidaustausch kommt es zum Wechsel eines für Glutaminsäure kodierenden Codons zu einem Codon für Lysin an Position sieben der Aminosäuresequenz von *TRPM4b*.

Glutaminsäure 7 liegt in einer zwischen verschiedenen Spezies konservierten Regi-

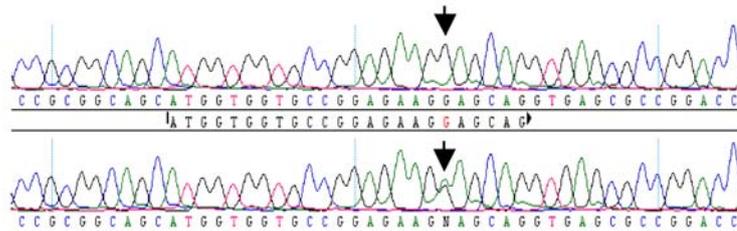


Abbildung 4.16: **Sequenzierung von *TRPM4b* in PFHBI-Patienten.** Obere Spur: Ausschnitt des Fluorograms der Sequenzierung von *TRPM4b* eines gesunden Familienmitgliedes. Unten: Untersuchung von *TRPM4b* in einem PFHBI-Patienten. Gekennzeichnet ist in beiden Fluorogrammen Nukleotid 19 (Daten von Eric Schulze-Bahr, Münster, Deutschland).

on von *TRPM4*. Wie in Abbildung 4.17 A ersichtlich, findet sich an dieser Position sowohl im humanen Genom als auch in Genomen weiterer Säuger-Spezies oder niederer Verwandter Organismen in *TRPM4* ein Codon für Glutaminsäure oder Asparaginsäure. Im Fall des humanen *TRPM4b* Proteins liegt diese konservierte Domäne direkt am Beginn einer N-terminalen Calmodulin-Bindedomäne (Abbildung 4.17 B).

4.2.2 Expression von *TRPM4b*^{E7K} führt zu einer Erhöhung der Stromdichte in transient transfizierten Zellen

Um zu untersuchen, ob eine Expression von *TRPM4b*^{E7K}-Kanälen zu einer Veränderung der Spannungsabhängigkeit sowie zu verringerten oder erhöhten Stromdichte im Vergleich zu *TRPM4b*^{wt}-Kanälen führt, wurden HEK293-Zellen transient mit Plasmiden kodierend für entweder *TRPM4b*^{wt} oder *TRPM4b*^{E7K} transfiziert und in der Ganz-Zell Patch-Clamp Konfiguration untersucht. Eine Aktivierung von *TRPM4b*-Kanälen wurde durch ein Rampenprotokoll ausgehend von einem Membranpotential von -60 mV erreicht. Durch das angewendete Rampenprotokoll wurde das Membranpotential während eines Zeitraums von 250 ms von -120 mV auf +100 mV depolarisiert. Im Anschluß erfolgte eine Repolarisation auf -60 mV. Für dieses Protokoll ist eine Aktivierung von *TRPM4b*^{wt}-Kanälen in der Literatur beschrieben (Fliegert et al. (2007)). Eine Auftragung normalisierter Stromamplituden von *TRPM4b*^{wt}- und *TRPM4b*^{E7K}-Kanälen gegen das Membranpotential zeigte eine unveränderte Spannungsabhängigkeit

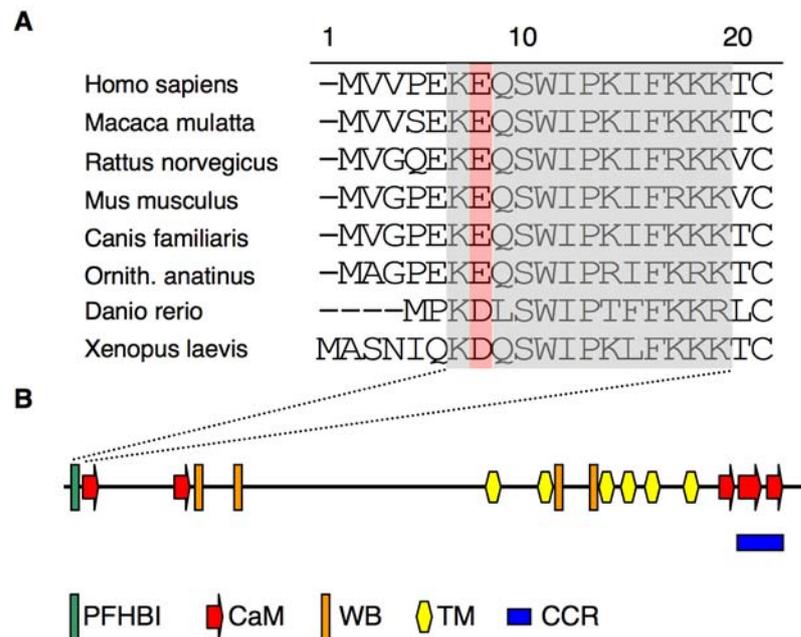


Abbildung 4.17: **Glu 7 liegt in einer hochkonservierten Region von TRPM4b.** **A:** Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der N-Termini von TRPM4b zwischen verschiedenen Spezies zeigt eine Konservierung einer aziden Aminosäureseitenkette (rot) an Position 7/8 in *TRPM4* in einer konservierten Domäne (grau). **B:** Illustration der Topologie von humanem TRPM4b und der Lage funktioneller Domänen (modifiziert nach Nilius und Vennekens (2006)). PFHBI: PFHBI-Domäne; CaM: Calmodulin-Bindungsdomäne; WB: Walker B ATP-Bindedomäne; TM: Transmembrandomäne; CCR: *coiled-coiled*-Domäne.

von TRPM4b^{E7K}-Kanälen (Abbildung 4.18). Hieraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass keine funktionelle Interaktion zwischen dem Spannungssensor und dem die Mutation innehabenden N-Terminus vorliegt.

Eine Analyse der Stromdichten (pA/pF) unter den vorig genannten Meßbedingungen bei einem Membranpotential von 80 mV zeigte eine signifikant erhöhte Stromdichte geleitet von TRPM4b^{E7K}-Kanälen. Eine alleinige Expression von TRPM4b^{wt}-Kanälen führte unter den genannten Bedingungen zu einer Stromdichte von 21.7 ± 3.2 pA/pF (s.e.m., n = 9), während für eine alleinige Expression von TRPM4b^{E7K}-Kanälen 40.3 ± 5.2 pA/pF (s.e.m., n = 10) gemessen wurde (Abbildung 4.19). Vergleichbare Meßergebnisse wurden auch in CHO-Zellen erhalten, so dass die beobachtete Erhöhung der

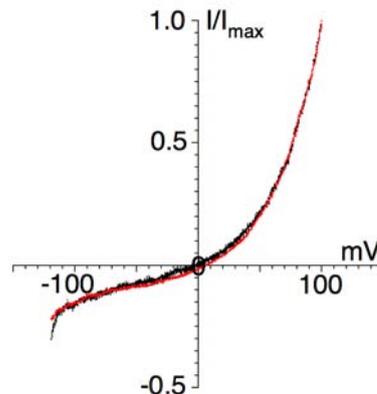


Abbildung 4.18: **Expression von TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanälen in HEK293-Zellen.** TRPM4b-Kanäle wurden in HEK293-Zellen exprimiert und 24 h nach Transfektion mittels der Ganz-Zell Patch-Clamp-Technik untersucht. Die Zellen wurden bei einem Membranpotential von -60 mV gehalten. TRPM4b-geleitete Ströme wurden durch ein Rampenprotokoll von -120 auf +100 mV für 250 ms aktiviert. Aufgetragen sind exemplarisch auf maximal gemessene Stromamplitude normalisierte Ströme durch TRPM4b^{wt}- (schwarz) und TRPM4b^{E7K}-Kanäle gegen das Membranpotential.

Stromdichte offensichtlich unabhängig vom verwendeten Gewebekulturzellensystem ist.

Da die PFHBI-Erkrankung in der untersuchten Familie dominant vererbt wurde, musste davon ausgegangen werden, dass die mutierte TRPM4b^{E7K}-Untereinheit einen dominanten Effekt auf wt-TRPM4b-Untereinheiten ausübte. Um dies zu untersuchen, wurden TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanäle in einem Verhältnis von 1:1 in HEK293-Zellen koexprimiert. Unter diesen Bedingungen wurde eine deutlich erhöhte Stromdichte von 38.8 ± 3.4 pA/pF (s.e.m., n = 5) bei einem Membranpotential von 80 mV gemessen (Abbildung 4.19). Insgesamt wurde somit eine signifikant erhöhte Stromdichte bei TRPM4b^{E7K}-Kanälen in Relation zu TRPM4b^{wt}-Kanälen beobachtet, welche auch im Fall einer heterozygoten Expression von TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanälen beobachtet wurde.

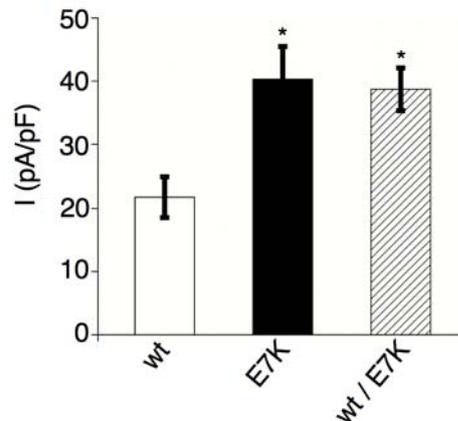


Abbildung 4.19: **Messung der Stromdichte von TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanäle exprimierender HEK293-Zellen.** Strommessungen von TRPM4b-Ionenkanäle exprimierender HEK293-Zellen erfolgten wie in Abbildung 4.18 angegeben. Im Falle einer heterozygoten Expression wurden Plasmide für TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanäle im Verhältnis 1:1 und in einer der homozygoten Situation entsprechenden Stoffmenge transfiziert. Stromdichten wurden bei einer Spannung von 80 mV ausgewertet. n (wt) = 9, n (E7K) = 10, n (wt/E7K) = 5. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm s.e.m. angegeben. Statistische Signifikanz wurden mittels des ungepaarten Student's T-Test analysiert. $P < 0.05$.

4.2.3 Untersuchung der Ca²⁺-Abhängigkeit von TRPM4b-Ionenkanälen

Eine Erhöhung der Aktivität eines Ionenkanals durch eine Mutation führt häufig zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des betreffenden Kanals. Die Offenwahrscheinlichkeit des TRPM4b-Kanals ist durch intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen sowie die Konzentrationen von intrazellulären Nukleotiden und PtdIns(4,5)P₂ reguliert (Nilius und Vennekens (2006)). Da der Nukleotidaustausch 19 G-A zum Wechsel des Codons einer Aminosäure führt, welche direkt in einer Calmodulin-Bindedomäne im N-Terminus von TRPM4b liegt (Nilius et al. (2005), Nilius und Vennekens (2006)), wurde überprüft, ob die Ca²⁺-Abhängigkeit der TRPM4b^{E7K}-Kanal-Aktivierung im Vergleich zur TRPM4b^{wt}-Kanal-Aktivierung verändert ist. Zu diesem Zweck wurden HEK293-Zellen transient mit Plasmiden kodierend für TRPM4b^{wt} oder TRPM4b^{E7K}

transfiziert und nachfolgend mittels Ganz-Zell Patch-Clamp-Messungen untersucht. Die Messungen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben durchgeführt, wobei die Konzentration an freiem Ca^{2+} in der Pipettenlösung variiert wurde. Die Konzentrationen an freiem Ca^{2+} in der Pipettenlösung wurde jeweils mittels des Ca^{2+} -bindenden Fluoreszenzfarbstoffes Fluo4FF vor Aufnahme der elektrophysiologischen Experimente bestimmt. Der TRPM4b-Kanal wurde wie zuvor beschrieben mittels Rampenprotokollen aktiviert und die Stromdichte bei Membranpotentialen zwischen -80 mV und 80 mV gemessen. Eine Auftragung der normalisierten Stromdichten in Abhängigkeit von der Konzentration an freiem Ca^{2+} ist in Abbildung 4.20 dargestellt.

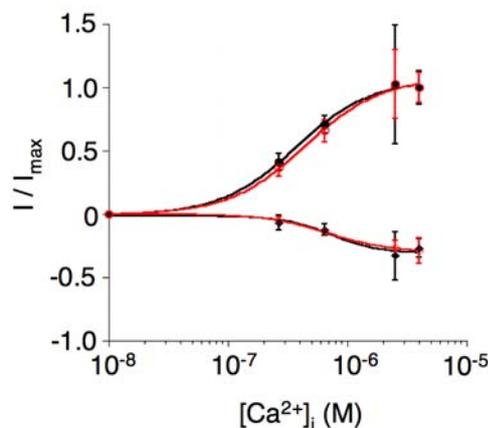


Abbildung 4.20: **Bestimmung der Ca^{2+} -Abhängigkeit von TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanälen.** Ca^{2+} -Abhängigkeiten von TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanälen wurden in HEK293-Zellen mittels der Ganz-Zell Patch-Clamp-Technik mit verschiedenen Konzentrationen von freiem Ca^{2+} gemessen. Stromdichten wurden bei -80 und 80 mV ausgewertet und auf die zum jeweiligen Genotyp maximale gemessene Amplitude normiert. TRPM4b^{wt}: schwarz, TRPM4b^{E7K}: rot. n-Werte: 7-16. Normalisierte Stromdichten sind als Mittelwerte \pm s.e.m. angegeben.

Eine halb-maximale Aktivierung des TRPM4b^{wt}-Kanals wurde bei einer Konzentration von $0.44 \pm 0.03 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (s.e.m.) festgestellt. Für den TRPM4b^{E7K}-Kanal wurde eine Konzentration von $0.40 \pm 0.04 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (s.e.m.) für eine halb-maximale Aktivierung gemessen. Diese Werte zeigten keine signifikante Abweichung voneinander und stimmten mit dem in der Literatur angegebenen Wert von $0.4 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (Launay et al.

(2002)) gut überein.

4.2.4 Inside-out Patch-Clamp Messungen zeigen keine veränderte Regulation des TRPM4b^{E7K}-Ionenkanal durch Nukleotidanaloga

Nilius und Mitarbeiter haben 2004 eine Regulation von TRPM4b-Kanälen durch intrazelluläre Nukleotide dargestellt (Nilius et al. (2004)). Durch Bindung von Adenosintriphosphat an zytoplasmatisch lokalisierte Walker B - Motive in TRPM4b-Kanälen (siehe Abbildung 4.17 B) konnten sie eine Inhibition von TRPM4b-vermittelten Ionenströmen nachweisen. Durch inside-out Patch-Clamp-Messungen an TRPM4b^{wt}- oder TRPM4b^{E7K}-Kanälen wurde daher die Inhibition von TRPM4b-Kanälen durch das Nukleotidanaloga AMP-PNP untersucht. Zu diesem Zweck wurde der TRPM4b-Kanal in HEK293-Zellen exprimiert und in der inside-out Patch-Clamp-Konfiguration die zytoplasmatische Seite des Kanals mit Badlösung oder Badlösung, welche 0.5 mM AMP-PNP enthielt, superfundiert. Der TRPM4b-Kanal wurde von einem Membranpotential von 0 mV ausgehend durch einen 250 ms langen Puls auf 100 mV nach einem 500 ms langen Vorpuls auf -100 mV aktiviert. Ein Vergleich von Stromspuren von TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanälen vor und nach Superfusion mit AMP-PNP ist in Abbildung 4.21 A dargestellt.

Die Applikation von 0.5 mM AMP-PNP führte zu einer Abnahme der von TRPM4b^{wt}-Kanälen vermittelten Stromamplitude von $72.5 \pm 2.5 \%$ (s.e.m., n = 3), für TRPM4b^{E7K}-Kanäle wurde eine Inhibition von $71.3 \pm 3.9 \%$ (s.e.m., n = 3) gemessen (Abbildung 4.21 B). Die Ergebnisse zeigten, dass die Regulation des TRPM4b^{E7K}-Kanals durch zytoplasmatisches ATP im Vergleich zum TRPM4b^{wt}-Kanal unverändert ist.

4.2.5 Stimulation von TRPM4b-Kanälen durch PtdIns(4,5)P₂

Der TRPM4b-Kanal wird in seiner Aktivität durch PtdIns(4,5)P₂ beeinflusst (Voets und Nilius (2007)). Eine Erhöhung der PtdIns(4,5)P₂-Konzentration führt zu einer Erhöhung der TRPM4b-Kanalaktivität. Potentielle Auswirkungen der Mutation in TRPM4b auf die PtdIns(4,5)P₂-Sensitivität des Kanals wurden in inside-out Patch-Clamp-Experimenten an TRPM4b^{wt} oder TRPM4b^{E7K} exprimierenden HEK293-Zellen untersucht. In den Experimenten wurde Badlösung mit 10 μ M PtdIns(4,5)P₂ versetzt. Das Mem-

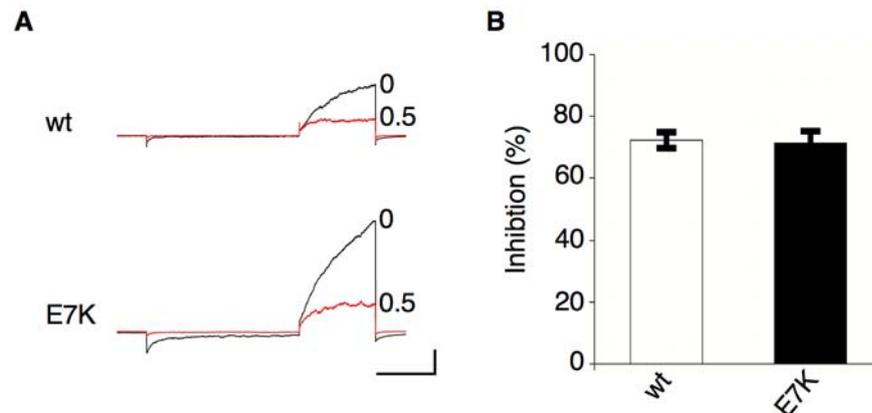


Abbildung 4.21: **Inhibition von TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanälen durch AMP-PNP-Applikation.** **A:** Inhibition von TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanälen durch AMP-PNP-Applikation wurde mittels inside-out Patches analysiert. Das Haltepotential lag bei 0 mV, Kanäle wurden durch einen 250 ms langen Puls auf 100 mV nach einem 500 ms langen Vorpuls auf -100 mV aktiviert. Schwarze Stromspuren wurden vor, rote Stromspuren nach Applikation von 0.5 mM AMP-PNP gemessen. Zeitskala: 200 ms, Amplitudenskala: 200 pA. Nummern geben die Konzentration an AMP-PNP in mM an. **B:** Quantitative Auswertung des in **A** gezeigten Experimentes. Prozentuale Inhibitionen von TRPM4b-Auswärtsströmen sind als Mittelwerte \pm s.e.m. angegeben. TRPM4b^{wt}, TRPM4b^{E7K}: n = 3.

branpotential wurde bei 0 mV gehalten, bevor der TRPM4b-Kanal durch einen Potentialsprung auf 100 mV ausgehend von einem Vorpuls auf -100 mV aktiviert wurde (Voets und Nilius (2007)). Hierbei gemessene exemplarische Stromspuren sowie gemessene Stromamplituden vor und nach Applikation von PtdIns(4,5)P₂ sind in Abbildung 4.22 aufgeführt.

Für den TRPM4b^{wt}-Kanal wurde eine mittlere Zunahme der Stromamplitude um einen Faktor 2.32 ± 0.12 (s.e.m., n = 7) gemessen, während für den TRPM4b^{E7K}-Kanal eine Zunahme um einen Faktor 2.38 ± 0.15 (s.e.m., n = 7) erhalten wurde. Die Ergebnisse zeigten für den mutierten TRPM4b-Kanal keine im Vergleich zum Wildtypen veränderte Sensitivität für PtdIns(4,5)P₂.

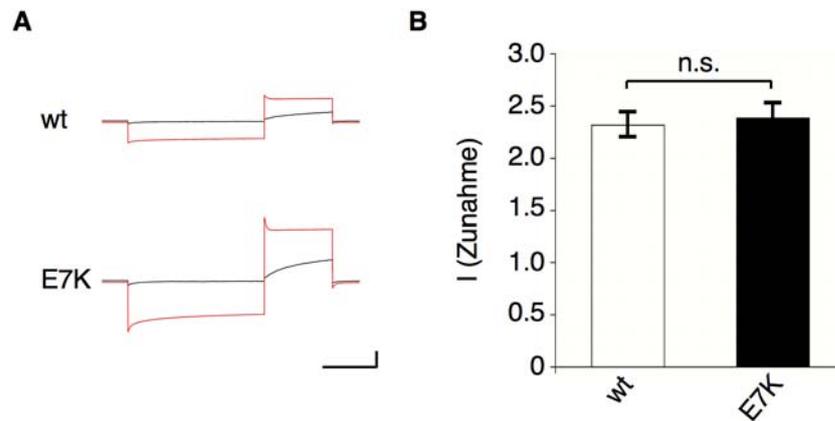


Abbildung 4.22: **Stimulation von TRPM4b-Kanälen durch PtdIns(4,5)P₂.** TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanäle wurden in HEK293-Zellen exprimiert und in der inside-out Patch-Clamp Konfiguration untersucht. **A:** Exemplarische Stromspuren gemessen an Patches von TRPM4b^{wt} (wt) oder TRPM4b^{E7K} (E7K) exprimierenden HEK293-Zellen. Das Haltepotential lag bei 0 mV, TRPM4b-Kanäle wurden durch einen Potentialsprung auf 100 mV nach einem vorherigen Sprung auf ein Membranpotential von -100 mV aktiviert. Dargestellt sind Stromspuren vor (schwarz) und nach Applikation von 10 μ M PtdIns(4,5)P₂ (rot). Zeitskala: 200 ms, Amplitudenskala: 1 nA. **B:** Auswertung der Zunahme an Stromamplitude bei 100 mV nach Applikation von 10 μ M PtdIns(4,5)P₂. TRPM4b^{wt}, TRPM4b^{E7K}: n = 7, n.s. = nicht signifikant.

4.2.6 Einzelkanalanalysen von TRPM4b-Ionenkanälen

Die Stromdichte durch TRPM4b-Kanäle kann als das Produkt dreier Faktoren betrachtet werden: der Einzelkanalleitfähigkeit γ , der Offenwahrscheinlichkeit P_O sowie der Anzahl der Kanäle in der Plasmamembran n (siehe Gleichung 4.1).

$$I = \gamma \cdot P_O \cdot n \quad (4.1)$$

Da in den bisher beschriebenen Untersuchungen zur Ca^{2+} -Abhängigkeit, der Inhibition durch intrazelluläre Nukleotide und einer Stimulation durch $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ keine Ursache für die beobachtete Stromerhöhung festgestellt werden konnte, wurde durch Einzelkanalmessungen von TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanälen eine potentielle Veränderung der Parameter γ und P_O untersucht. Da Einzelkanalmessungen die Beobachtung stromleitender Öffnungen einzelner Ionenkanäle erlauben, können beide Parameter direkt durch diese Messungen erfasst werden. Einzelkanalmessungen wurden an transient transfizierten CHO-Zellen in der inside-out Patch-Clamp-Konfiguration durchgeführt. Erhaltene Patches wurden bei verschiedenen Membranpotentialen charakterisiert. Ein Beispiel für repräsentative Stromspuren ist in Abbildung 4.23 dargestellt.



Abbildung 4.23: **Einzelkanalmessungen von TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanälen.** Einzelkanalmessungen von TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanälen wurden an transient transfizierten CHO-Zellen in der inside-out-Konfiguration durchgeführt. Dargestellt sind bei einem Membranpotential von -100 mV aufgenommene Stromspuren. Zeitskala: 1 s, Amplitudenskala: 5 pA.

Aus Stromspuren wie den in Abbildung 4.23 wurden Histogramme erstellt, welche eine Berechnung der Einzelkanalleitfähigkeit erlauben. Abbildung 4.24 A zeigt Histogramme von TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanälen, welche aus Stromspuren bei ei-

nem Membranpotential von -100 mV erstellt wurden. Wie ersichtlich, konnte kein Unterschied in der Einzelkanalleitfähigkeit zwischen beiden Genotypen festgestellt werden (TRPM4b^{wt}: 19.1 ± 0.8 pS, s.e.m., n = 8; TRPM4b^{E7K}: 18.8 ± 0.4 pS, s.e.m., n = 9). Dieses Ergebnis wurde auch bei allen weiteren untersuchten Membranpotentialen zwischen -100 und 100 mV erhalten. Eine Berechnung der Offenwahrscheinlichkeit P_O aus Histogrammen von Messungen bei 100 mV ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanälen (TRPM4b^{wt}: 0.25 ± 0.09 , s.e.m., n = 8; TRPM4b^{E7K}: 0.26 ± 0.02 , s.e.m., n = 9).

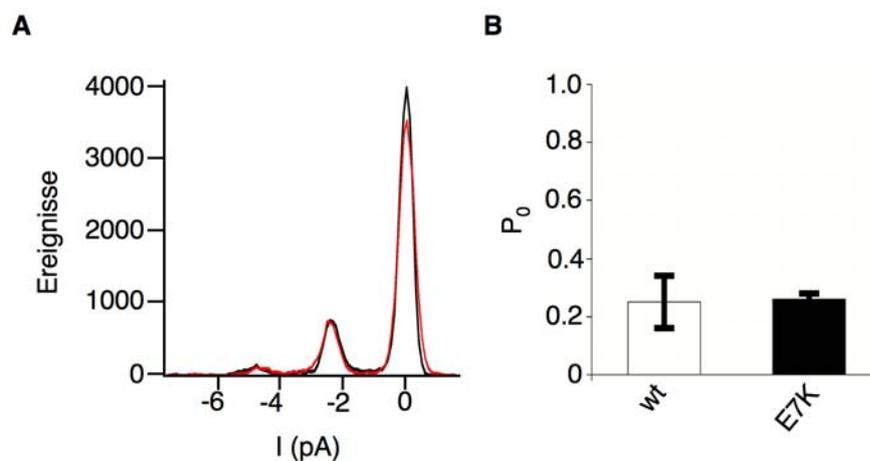


Abbildung 4.24: **Einzelkanalleitfähigkeiten und Offenwahrscheinlichkeiten von TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanälen.** **A:** Histogrammplot von TRPM4b^{wt}- (schwarz) und TRPM4b^{E7K}-Kanälen (rot) bei einem Membranpotential von -100 mV. **B:** Darstellung der Offenwahrscheinlichkeiten (P_O) bei einem Membranpotential von 100 mV von TRPM4b^{wt}- (n = 8) und TRPM4b^{E7K}-Kanälen (n = 9). Angegebene Offenwahrscheinlichkeiten sind Mittelwerte \pm s.e.m..

Das vorliegende Ergebnis deutet, da keine Unterschiede zwischen den Einzelkanalleitfähigkeiten und Offenwahrscheinlichkeiten von TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanälen nachgewiesen werden konnten, auf eine erhöhte Anzahl an TRPM4b^{E7K}-Kanälen in der Zellmembran als Ursache der gemessenen erhöhten Stromdichte hin. Diese Hypothese sollte mittels der nachfolgend dargestellten Experimente überprüft werden.

4.2.7 Analyse der Oberflächen- und Gesamtexpression von TRPM4b-Kanälen

Um eine erhöhte Oberflächenexpression des TRPM4b^{E7K}-Kanals direkt nachzuweisen, wurde der TRPM4b-Kanal mit einem Myc-Tag versehen. Dieses wurde hinter Leu 722 in die Aminosäuresequenzen von TRPM4b^{wt} bzw. TRPM4b^{E7K} zwischen den Transmembransegmenten eins und zwei inseriert. Das Tag sollte daher in einem extrazellulär lokalisierten Bereich des TRPM4b-Kanals vorliegen und für anti-Myc Antikörper an nicht-permeabilisierten Zellen zugänglich sein.

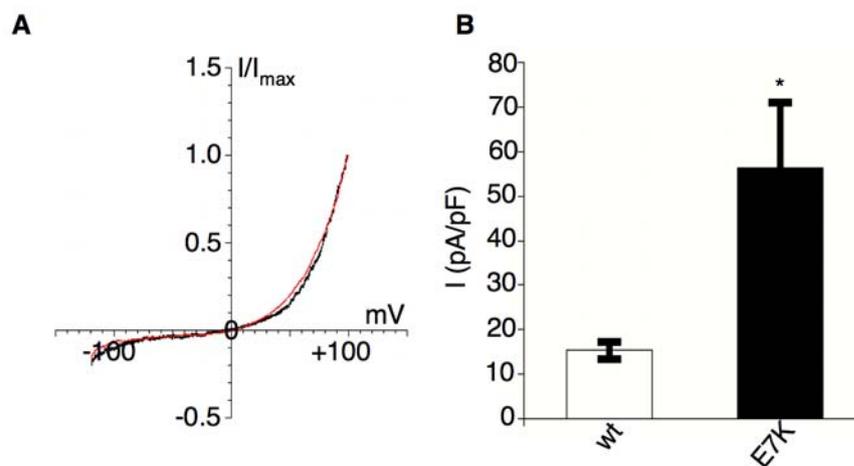


Abbildung 4.25: **Charakterisierung von Myc-getaggten TRPM4b-Kanälen.** **A:** Mit einem extrazellulären Myc-Tag versehene TRPM4b^{wt}- (schwarz) und TRPM4b^{E7K}-Kanäle (rot) wurden in HEK293-Zellen exprimiert und wie in Abbildung 4.18 angegeben analysiert. **B:** Stromdichten (pA/pF) der in **A** dargestellten Experimente wurden wie in Abbildung 4.18 beschrieben analysiert. n (wt) = 5, n (E7K) = 7. Statistische Signifikanz wurde mittels des ungepaarten Student's T-Test untersucht. $P < 0.05$.

Zunächst wurden Myc-getaggte TRPM4b-Kanäle in HEK293-Zellen exprimiert, um zu überprüfen, ob die Insertion des Tags die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle oder die Stromdichten verändert. Wie in Abbildung 4.25 dargestellt, waren die Myc-getaggten TRPM4b-Kanäle nicht von ungetaggten Kanälen zu unterscheiden. Die Insertion des Myc-Tags führte daher offensichtlich nicht zu einer Veränderung in der Expression und den elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle, wodurch sie für

eine Analyse mittels FACS verwendet werden konnten.

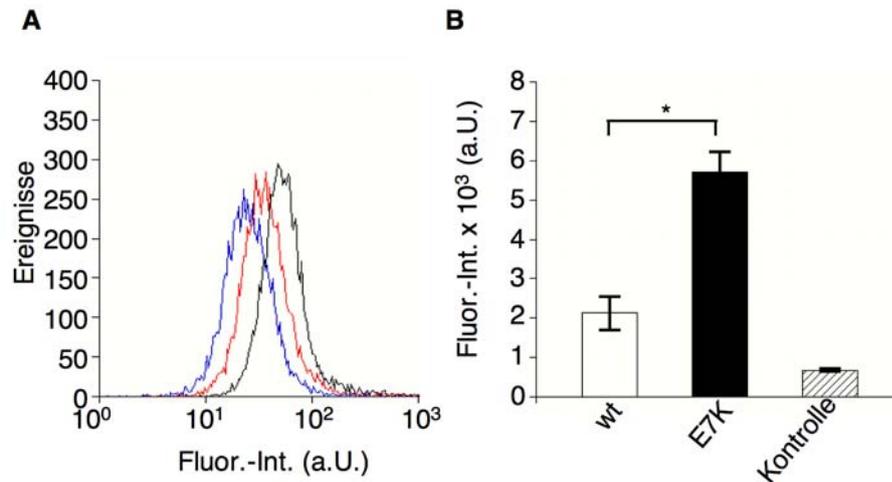


Abbildung 4.26: **Analyse der Oberflächendichte von TRPM4b-Proteinen mittels FACS.** **A:** TRPM4b-Oberflächenexpression wurde in transient transfizierten HEK293-Zellen mittels FACS-Analyse untersucht. Die Zellen exprimierten nicht-getaggten TRPM4b^{wt}-Kanal (blau), Myc-getaggten TRPM4b^{wt}-Kanal (rot) oder Myc-getaggten TRPM4b^{E7K}-Kanal (schwarz). Zur Epitopmarkierung wurde ein Anti-Myc-Antikörper eingesetzt, der direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt vorlag. **B:** Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten der in **A** gezeigten Analyse. Angegeben sind Mittelwerte \pm s.e.m. ($n = 9$ für alle Genotypen). Statistische Signifikanz wurde mittels des ungepaarten Student's T-Test untersucht. $P < 0.05$.

Die Analyse der Oberflächenexpression Myc-getaggtter TRPM4b-Kanäle erfolgte an HEK293-Zellen, die transient mit Plasmiden für TRPM4b^{wt}-, Myc-getaggttes TRPM4b^{wt} bzw. Myc-getaggttes TRPM4b^{E7K} transfiziert wurden. Nach 24 h wurden die Zellen wie unter 3.6.7 beschrieben mit FITC-gekoppelten Anti-Myc-Antikörpern gefärbt und per FACS auf Fluoreszenzintensität untersucht. Wie in Abbildung 4.26 dargestellt, wurde für den Myc-TRPM4b^{E7K}-Kanal eine signifikant erhöhte Oberflächenexpression in Relation zu Myc-TRPM4b^{wt}-Kanal festgestellt. Eine Transfektion von HEK293-Zellen mit nicht-getaggttem TRPM4b^{wt}-Kanal ergab ein Fluoreszenzniveau, welches wiederum signifikant unter dem für Myc-TRPM4b^{wt} beobachteten Intensitätsniveau lag.

Ausgehend von dem durch Messung der Oberflächenexpression erhaltenen Befund

einer erhöhten Expression von TRPM4b^{E7K}-Kanälen in der Zellmembran ergab sich die Fragestellung, ob diese erhöhte Oberflächenexpression mit einer erhöhten Gesamtexpression korreliert. Zur Untersuchung dieses Sachverhaltes wurde am C-Terminus von TRPM4b-Kanälen nach Asparaginsäure 1214 ein FLAG-Tag eingefügt, welches eine Detektion von FLAG-getaggten TRPM4b-Kanälen mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz-Untersuchungen ermöglichen sollte. Analog zur Validierung Myc-getaggtter TRPM4b-Kanäle wurden auch FLAG-getaggte TRPM4b-Kanäle elektrophysiologisch auf korrekte Expression und unveränderte Eigenschaften untersucht. Es konnte kein Unterschied zwischen nicht-getaggtten TRPM4b-Kanälen und FLAG-getaggtten Konstrukten festgestellt werden (Abbildung 4.27).

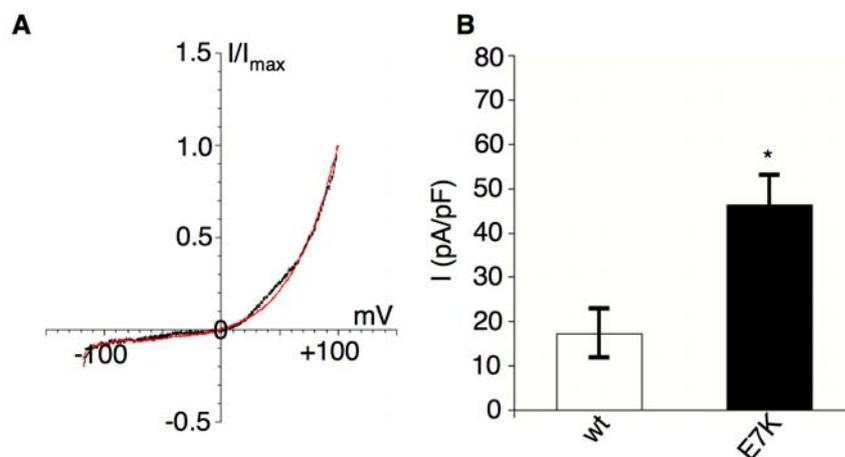


Abbildung 4.27: **Elektrophysiologische Untersuchung von FLAG-getaggten TRPM4b-Kanälen.** **A:** C-terminal FLAG-getaggte TRPM4b-Kanäle wurden entsprechend dem in Abbildung 4.18 dargestellten Vorgehen elektrophysiologisch in HEK293-Zellen analysiert. Schwarz: TRPM4b^{wt}, rot: TRPM4b^{E7K}. **B:** Dargestellt sind die mittleren Stromdichten sowie die zugehörigen s.e.m. bei einem Membranpotential von 80 mV der exemplarisch in **A** gezeigten Messungen. $n = 7$ für beide Genotypen. Statistische Signifikanz wurde mittels des ungepaarten Student's T-Test untersucht. $P < 0.05$.

Zur Untersuchung der Frage, ob in transfizierten Zellen eine erhöhte Gesamtexpression von TRPM4b^{E7K}-Protein vorliegt, wurden FLAG-TRPM4b^{wt}- bzw. FLAG-TRPM4b^{E7K} in COS-7-Zellen exprimiert. Das Gesamtzelllysate wurde im Western-Blot

4 Ergebnisse

mittels Anti-FLAG-Antikörpern angefärbt. Hierbei wurde auf der Höhe des apparenten Molekulargewichtes von TRPM4b im Lysat von Zellen, welche mit Plasmiden für TRPM4b^{wt} oder TRPM4b^{E7K} transient transfiziert worden waren, nicht aber im Lysat von Zellen, welche nur mit dem Expressionsvektor ohne cDNA transfiziert worden waren, ein Signal erhalten. Die Signalstärke war für FLAG-TRPM4b^{E7K} deutlich stärker als für FLAG-TRPM4b^{wt} (Abbildung 4.28). Zur Kontrolle identischer Beladung wurde eine Färbung mit Anti-Actin-Antikörpern durchgeführt (siehe Abbildung 4.28). Die Western-Immunoblot-Ergebnisse deuteten daraufhin, dass die Expression von FLAG-TRPM4b^{E7K}-Protein in transfizierten Zellen im Gleichgewicht höher war als die von FLAG-TRPM4b^{wt}-Protein.

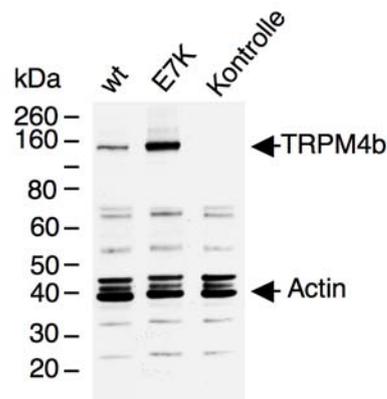


Abbildung 4.28: **Nachweis von TRPM4b-Kanälen mittels Western Blot.** HEK293-Zellen wurden transient mit Plasmiden kodierend für TRPM4b-Kanäle, welche mit einem C-terminalen FLAG-Tag markiert wurden, transfiziert und nach 24 h wie unter 3.6.1 und 3.6.5 beschrieben aufgearbeitet und mittels Western-Blot auf TRPM4b-Expression untersucht. Als Negativ-Kontrolle dienten Zellen, in welche nur der Vektor des Expressionsplasmids ohne TRPM4b-cDNA transfiziert wurde. Zur Kontrolle identischer Beladung wurde ein zusätzlicher Nachweis auf Actin (Maus Anti-Actin-Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung) geführt.

Zur Validierung des mittels Western-Blot Analyse erhaltenen Ergebnisses einer erhöhten Gesamtexpression von TRPM4b^{E7K} wurden COS-7-Zellen wie zuvor beschrieben mit Plasmiden für FLAG-TRPM4b^{wt} oder FLAG-TRPM4b^{E7K} transient transfiziert und einer immunhistochemischen Untersuchung mittels Anti-FLAG-Antikörpern

unterzogen. Die Visualisierung erfolgte über sekundäre Antikörper, welche mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa546 gekoppelt waren, und nachfolgende Fluoreszenz-Mikroskopie. Als Kontrolle dienten Zellen, welche nur mit dem Expressionsplasmid ohne kodierende cDNA transfiziert wurden (Abbildung 4.29 A).

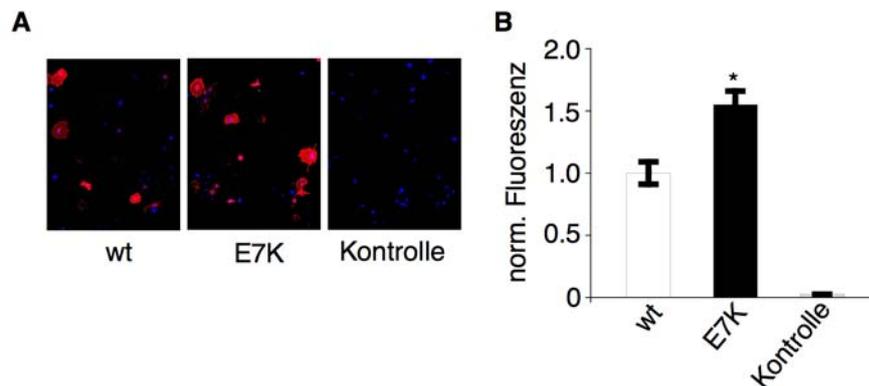


Abbildung 4.29: **Immunhistochemische Analyse der Expression von TRPM4b-Kanälen.** **A:** COS-7-Zellen wurden transient mit TRPM4b^{wt}-, TRPM4b^{E7K} (jeweils mit N-terminalem FLAG-Tag markiert) oder leerem Expressionsplasmid transfiziert und nach 48 h wie unter 3.6.6 beschrieben mit Anti-FLAG-Antikörpern immunhistochemisch untersucht. Rot: Alexa-546 (TRPM4b-Nachweis), blau: DAPI-Kernfärbung. **B:** Quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität von jeweils 60 Zellen der in A dargestellten Experimente. Angegeben sind die normalisierten gemittelten Fluoreszenzintensitäten ± s.e.m.. Statistische Signifikanz wurde mittels des ungepaarten Student's T-Test untersucht. $P < 0.05$.

Eine quantitative Auswertung der Alexa546-Fluoreszenzintensitäten von jeweils 60 Zellen mittels der Software *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) ergab eine signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität für TRPM4b^{E7K}-Kanäle exprimierende COS-7-Zellen in Relation zu TRPM4b^{wt}-Kanälen exprimierenden Zellen (Abbildung 4.29 B). Dieses Ergebnis bestätigte die Western-Blot Analysen und zeigte eine erhöhte TRPM4b^{E7K}-Expression im Vergleich zu TRPM4b^{wt} hin.

Nach den vorliegenden Daten beruhte die erhöhte Stromdichte auf einer erhöhten TRPM4b^{E7K}-Kanalichte in der Plasmamembran. Vermutlich ist dies auf einen verminderten Abbau des TRPM4b^{E7K}-Kanalproteins zurückzuführen. Demzufolge sollte eine Inhibierung des Proteinabbaus zu einer erhöhten TRPM4b^{wt}-Oberflächenexpression

4 Ergebnisse

führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde Myc-getaggtter TRPM4b-Kanal in HEK293-Zellen exprimiert. Teile der transfizierten Zellen wurden mit $10 \mu\text{M}$ MG132, einem Inhibitor des Proteasoms (Lee und Goldberg (1996)), inkubiert, um den Abbau des TRPM4b-Proteins zu inhibieren. Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigten, dass eine Blockade des Proteasoms im Fall des Myc-getaggtten TRPM4b^{wt}-Kanals zu einer signifikanten Zunahme der Oberflächenexpression um einen Faktor 3.1 ± 0.3 (s.e.m., $n = 3$) führte, während sich für Myc-getaggtten TRPM4b^{E7K}-Kanal keine signifikante Zunahme der Oberflächenexpression ergab ($P = 0.12$, $n = 3$) (Abbildung 4.30).

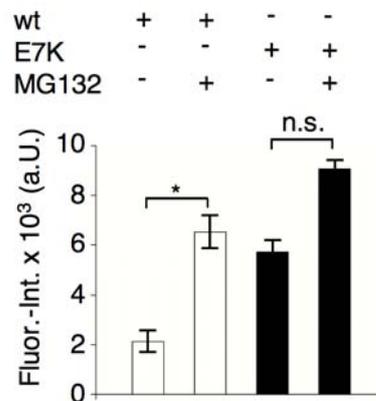


Abbildung 4.30: **Inhibition des Proteasoms erhöht die Oberflächenexpression von TRPM4b^{wt}-Kanälen.** Myc-getaggte TRPM4b-Kanäle wurden in HEK293-Zellen exprimiert. Aliquots der transfizierten Zellen wurden parallel mit $10 \mu\text{M}$ MG132, einem Inhibitor für proteasomalen Proteinabbau, inkubiert. Nach 18 h wurde die Oberflächenexpression von Myc-getaggtten TRPM4b-Kanälen mittels FACS analysiert (siehe 3.6.7). Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (a.U.) \pm s.e.m. ($n = 3$). Statistische Signifikanz wurde mittels des ungepaarten Student's T-Test untersucht. $P < 0.05$, n.s. = nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigten die Daten, dass die Gesamt- und Oberflächenexpression des TRPM4b^{E7K}-Kanal im Vergleich zu TRPM4b^{wt} erhöht ist und die erhöhte TRPM4b^{E7K}-Stromdichte durch eine erhöhte Anzahl an TRPM4b-Kanälen in der Zellmembran hervorgerufen wird.

4.2.8 Inhibition Dynein-mediierter Endozytose erhöht die Stromdichte durch TRPM4b^{wt}-Kanäle

Eine erhöhte Anzahl an Ionenkanälen in der Zellmembran kann durch einen erhöhten Transport dieser Proteine zur Plasmamembran oder durch eine verringerte Endozytose in das Zellinnere zustande kommen. Sofern die erhöhte Stromdichte durch TRPM4b^{E7K}-Kanäle aus einer verringerten Endozytose-Rate resultiert, sollte eine Inhibition von Endozytose zu einer Erhöhung der Stromdichte durch TRPM4b^{wt}-Kanäle führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden HEK293-Zellen transient mit TRPM4b^{wt}- oder TRPM4b^{E7K}-Kanälen transfiziert. Die Kanäle wurden entweder alleine oder in einem 1:1-Verhältnis mit Dynamitin exprimiert. Dynamitin ist eine Untereinheit der Dynein-Motor-Komplexe, welche für Dynein-medierte Endozytose verantwortlich sind, und führt bei Überexpression zu einer Inhibition dieses Transportes (Burkhardt et al. (1997)). Transient transfizierte HEK293-Zellen wurden in der Ganz-Zell Patch-Clamp-Konfiguration untersucht (siehe 4.2.2) und die Stromdichte bei einem Membranpotential von 80 mV gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.31 zusammengefasst.

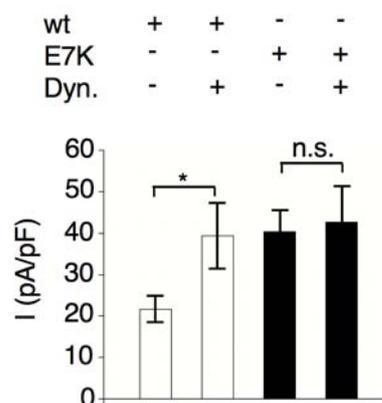


Abbildung 4.31: **Inhibition von Endozytose beeinflusst TRPM4b vermittelte Stromdichte.** Wildtyp und mutierte TRPM4b-Kanäle wurden allein oder in einem 1:1 Verhältnis mit Dynamitin in HEK293-Zellen exprimiert. Stromdichten wurden in der Ganz-Zell Patch-Clamp-Technik bei 80 mV gemessen. Stromdichten (pA/pF) sind als Mittelwerte \pm s.e.m. (n (wt) = 9, n (E7K) = 10, n (wt/Dyn) = 9, n (E7K/Dyn) = 7) angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels des ungepaarten Student's T-Test überprüft. $P < 0.05$, n.s. = nicht signifikant.

Eine Koexpression von TRPM4b^{wt}-Kanälen mit Dynamitin erhöhte die gemessene Stromdichte auf 39.3 ± 7.9 pA/pF (s.e.m., n = 9), wodurch ein vergleichbares Niveau zur von TRPM4b^{E7K}-Kanälen geleiteten Stromdichte und eine ungefähre Verdoppelung zur Stromdichte von TRPM4b^{wt}-Kanälen erreicht wurde. Die für TRPM4b^{E7K}-Kanälen gemessene Stromdichte war dagegen insensitive gegenüber einer Überexpression von Dynamitin (42.7 ± 8.7 pA/pF (s.e.m., n = 7)). Aus den erhaltenen Ergebnissen kann die Schlußfolgerung abgeleitet werden, dass die für TRPM4b^{E7K}-Kanäle beobachtete erhöhte Stromdichte auf eine verringerte Endozytose-Rate und damit auf eine erhöhte Anzahl von TRPM4b-Kanälen in der Plasmamembran zurückzuführen ist.

4.2.9 Protein Kinase A Stimulation zeigt keinen Einfluß auf TRPM4b^{wt} vermittelte Stromdichte

Für das Vorliegen einer verringerten Endozytose von TRPM4b-Kanälen wurde eine veränderte Regulation der Kanal-Lokalisierung vermutet. Diese wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch post-translationale Modifikationen des TRPM4b-Kanals, z.B. Phosphorylierung / Dephosphorylierung, beeinflusst. Da der Aminosäureaustausch Glu 7 zu Lys in unmittelbarer Nähe einer putativen Protein Kinase A - Phosphorylierungsstelle liegt, wurde vermutet, dass die beobachtete verringerte Endozytose durch eine Änderung der Phosphorylierung durch Protein Kinase A hervorgerufen ist. Eine Überprüfung dieser Hypothese erfolgte durch Ganz-Zell Patch-Clamp Experimente an mit TRPM4b^{wt} beziehungsweise TRPM4b^{E7K} transient transfizierten HEK293-Zellen. Die durch TRPM4b vermittelte Stromdichte wurde zunächst direkt nach Erreichen der Ganz-Zell Konfiguration gemessen, sowie im Anschluß nach Superfusion der Zellen mit dem Phosphodiesterase Inhibitor IBMX (10 μ M) und dem Phosphatase Inhibitor OA (1 μ M). Protein Kinase A - Aktivität wurde durch Superfusion mit 300 μ M 8-Br-cAMP, einem cAMP-Analogen, stimuliert. Durch die Applikation dieser Pharmaka sollte auf der einen Seite Protein Kinase A - Aktivität stimuliert, auf der anderen Seite die Phosphorylierung an TRPM4b-Kanälen stabilisiert werden. Eine Darstellung der unter diesen Bedingungen gemessenen Stromdichten von TRPM4b-Kanälen ist in Abbildung 4.32 angegeben.

Durch Stabilisierung einer Protein Kinase A - Phosphorylierung von TRPM4b^{wt}-Kanälen konnte keine erhöhte Stromdichte gemessen werden. Unter den genannten Meßbedingungen wurde eine Stromdichte gemessen, welches den bereits zuvor ge-

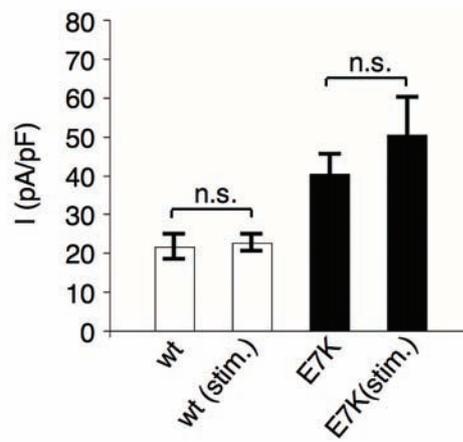


Abbildung 4.32: **Protein Kinase A - Stimulation führt nicht zu einer Erhöhung der Stromdichte von TRPM4b^{wt}-Kanälen.** TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanäle wurden in HEK293-Zellen exprimiert und in der Ganz-Zell Patch-Clamp Konfiguration untersucht. Stromdichten wurden bei einem Membranpotential von 80 mV vor und nach Applikation von 300 μ M 8-Br-cAMP, 10 μ M IBMX und 1 μ M OA gemessen. Stromdichten (pA/pF) sind als Mittelwerte \pm s.e.m. (n = 7) angegeben. n.s. = nicht signifikant.

nannten Stromdichten für TRPM4b^{wt}-Kanälen unter unstimulierten Bedingungen entspricht. Analog konnte keine erhöhte Stromdichte durch TRPM4b^{E7K}-Kanäle nach Stimulation von Protein Kinase A gemessen werden. Aufgrund des vorliegenden Ergebnisses kann eine Auswirkung der Mutation E7K auf den Protein Kinase A - Phosphorylierungsstatus ausgeschlossen werden.

4.2.10 SUMOylierung beeinflusst TRPM4b-vermittelte Stromdichte

SUMOylierung wurde in den vergangenen Jahren als ein Mechanismus publiziert, welcher die Stromdichte von verschiedenen Ionenkanälen regulieren kann (Rajan et al. (2005), Wible et al. (1998)). Für TRPM4b ist eine derartige Regulation bisher nicht beschrieben worden, daher sollte im vorliegenden Fall untersucht werden, ob die erhöhte Stromdichte und Oberflächenexpression von TRPM4b^{E7K}-Kanälen auf eine potentielle SUMOylierung oder Veränderungen der SUMOylierung im Vergleich zu TRPM4b^{wt}-Kanälen zurückzuführen ist.

Um die Auswirkungen einer potentiellen SUMOylierung von TRPM4b-Kanälen elektrophysiologisch zu untersuchen, wurden TRPM4b-Kanäle in HEK293-Zellen alleine oder zusammen mit einer SUMO-Ligase (Ubc) (Schmidt und Muller (2002)), einer SUMO-1-Protease (SENP1) (Bailey und O'Hare (2004)) oder einer inaktiven Mutante von SENP1 (SENP1-C603S) (Xu et al. (2006)) exprimiert. Transient transfizierte Zellen wurden in der Ganz-Zell Patch-Clamp-Technik untersucht und die Stromdichten bei einem Membranpotential von 80 mV gemessen (Abbildung 4.33).

Koexpression des TRPM4b^{wt}-Kanals mit SENP1 führt zu einer signifikanten Abnahme der Stromdichte auf 4.5 ± 1.0 pA/pF (s.e.m., n = 8), während Stromdichte des TRPM4b^{E7K}-Kanals durch Koexpression mit SENP1 nicht signifikant beeinflusst wurde (64.5 ± 17.5 pA/pF, s.e.m., n = 6). Eine Koexpression des TRPM4b^{wt}-Kanals mit einer inaktiven SENP1-Mutante, SENP1-C603S, führte dagegen nicht zu einer Reduktion der gemessenen Stromdichte (21.6 ± 3.6 pA/pF, s.e.m., n = 8). Eine Koexpression des TRPM4b^{wt}-Kanals mit der SUMO-Ligase Ubc9 erhöhte die Stromdichte signifikant (43.3 ± 12.7 pA/pF, s.e.m., n = 9), während für diese Meßkonfiguration keine Beeinflussung der TRPM4b^{E7K}-Stromdichte festzustellen war (69.9 ± 8.2 pA/pF, s.e.m., n = 13). Die vorliegenden Daten deuten daher auf eine Regulation der TRPM4b-Stromdichte durch SUMOylierung hin, wobei der TRPM4b^{E7K}-Kanal offensichtlich

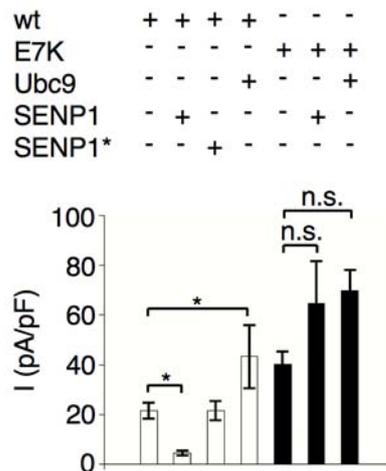


Abbildung 4.33: **SUMOylierung beeinflusst durch TRPM4b-Kanäle vermittelte Stromdichte.** HEK293-Zellen wurden wie dargestellt mit TRPM4b-Kanälen, einer SUMO-1 Protease (SENP1), enzymatisch inaktiver SENP1-C603S (SENP1*) sowie einer SUMO-Ligase (Ubc9) transient transfiziert. Nach 18-24 h wurden die TRPM4b vermittelten Stromdichten wie unter Abbildung 4.18 angegeben elektrophysiologisch charakterisiert. Dargestellt sind die normalisierten gemittelten Stromdichten (pA/pF) \pm s.e.m. (n-Werte = 6-13). Statistische Signifikanz wurde mittels des ungepaarten Student's T-Test untersucht und bezieht sich auf TRPM4b^{wt} vermittelte Stromdichte. $P < 0.05$, n.s. = nicht signifikant.

insensitiv gegen eine durch SENP1 hervorgerufene DeSUMOylierung ist.

Um die Spezifität der durch SENP1-Expression hervorgerufenen Effekte zu überprüfen, wurden in einem Kontrollexperiment HEK293-Zellen transient mit einem Expressionsplasmid für den SUMOylierungs-insensitiven KCNH2 Kv-Kanal (Wible et al. (1998)) allein oder zusammen mit einem Expressionsplasmid für SENP1 transfiziert und die Stromdichten in der Ganz-Zell Patch-Clamp-Technik gemessen. Die gemessenen Stromdichten sind in Abbildung 4.34 dargestellt.

Für die Expression von KCNH2-Kanälen in Abwesenheit von SENP1 wurde eine Stromdichte von 53.7 ± 10.6 pA/pF (s.e.m., n = 6) und in Anwesenheit von SENP1 eine von 54.8 ± 11.2 pA/pF (s.e.m., n = 7) gemessen. Es konnte diesen Ergebnissen nach kein Unterschied zwischen den beiden genannten Meßbedingungen festgestellt werden.

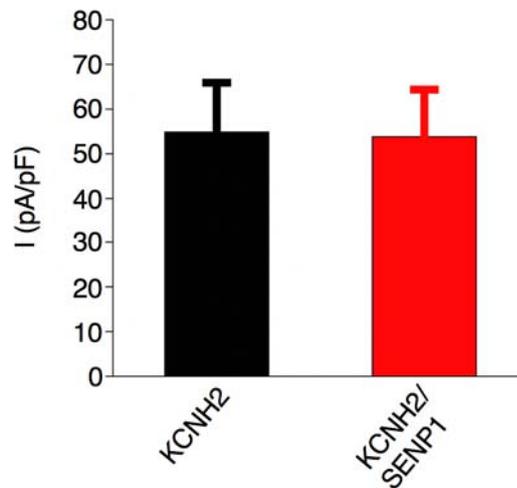


Abbildung 4.34: **KCNH2-vermittelte Stromdichte ist insensitiv gegen Koexpression mit SENP1.** Humane KCNH2-Kaliumkanäle wurden in HEK293-Zellen mit und ohne SENP1 exprimiert und die transient transfizierten Zellen 24 h nach Transfektion in der Ganz-Zell Patch-Clamp-Technik analysiert. Das Halte-Membranpotential lag bei -80 mV, Aktivierung von KCNH2-Kanälen erfolgte durch schrittweise Depolarisierungen um je 10 mV bis hin zu 60 mV. Angegebene Stromdichten wurden bei einem Membranpotential von 10 mV gemessen. Dargestellt sind die gemittelten Stromdichten (pA/pF) \pm s.e.m. KCNH2: n = 6, KCNH2/SENP1: n = 7.

Die für die Koexpression von TRPM4b^{wt}-Kanälen und SENP1 beobachtete Verringerung der durch TRPM4b^{wt}-Kanälen vermittelten Stromdichte ist demnach nicht auf einen unspezifischen Effekt der SENP1-Expression zurückzuführen.

Die erhaltenen Ergebnisse erlauben keine Rückschlüsse darüber, ob TRPM4b-Kanäle direkt SUMOyliert werden oder ob eine indirekte Wechselwirkung mit mindestens einem weiteren Protein vorliegt, welches wiederum durch SUMOylierung in seiner Aktivität oder Lokalisation reguliert wird. Zum Nachweis einer potentiellen direkten SUMOylierung von TRPM4b-Kanälen wurden mit einem FLAG-Tag versehene TRPM4b^{wt}- und TRPM4b^{E7K}-Kanäle in COS-7-Zellen exprimiert und mittels Anti-FLAG-Antikörpern immunpräzipitiert. Die erhaltenen Präzipitate wurden anschließend im Western-Blot mit Anti-SUMO-1-Antikörpern auf das Vorliegen von SUMOylierten Proteinen getestet (Abbildung 4.35 A). Parallel hierzu wurde das Experiment in identischer Art

und Weise durchgeführt, allerdings wurden TRPM4b-Kanäle hier mit SENP1 koexprimiert (Abbildung 4.35 B).

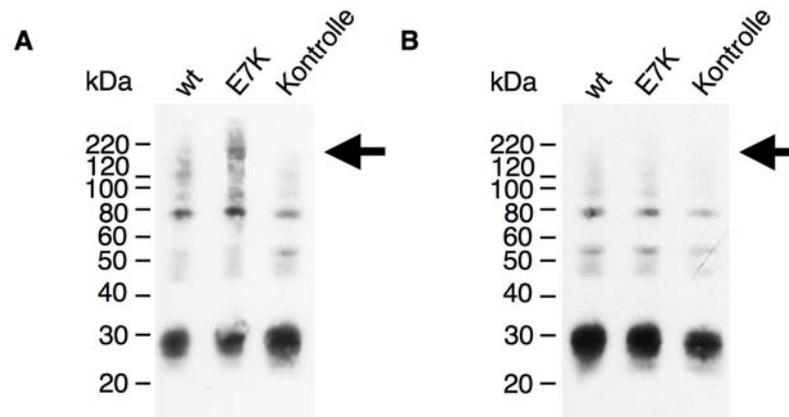


Abbildung 4.35: **SUMOylierungsstatus von TRPM4b-Kanälen.** **A:** TRPM4b-Kanäle mit einem C-terminalen FLAG-Tag wurden in COS-7-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion lysiert und das Gesamtzellsat einer Ko-Immünpräzipitation mit Anti-FLAG-Antikörpern unterzogen. Aufgereinigte Proteine werden per SDS-Gelelektrophorese getrennt und im Western Blot mit Anti-SUMO-1 -Antikörpern auf das Vorliegen SUMOylierter, FLAG-getaggtter Proteine untersucht. Als Kontrolle dienten Zellen, welche mit dem leeren Expressionsplasmid transfiziert wurden. **B:** Identisches Experiment wie in **A**, allerdings wurde in allen Ansätzen SENP1 kotransfiziert. Pfeile geben in beiden Fällen die erwartete Lokalisation von Proteinen mit dem apparenten Molekulargewicht von FLAG-TRPM4b an.

In Abbildung 4.35 A kann sowohl für die Laufspuren mit Lysat von TRPM4b^{wt}- als auch TRPM4b^{E7K}-exprimierenden COS-7-Zellen ein Signal beim für FLAG-TRPM4b erwarteten apparenten Molekulargewicht detektiert werden, nicht aber im Lysat von Zellen, welche mit dem keine TRPM4b-cDNA enthaltenden Expressionsvektor transfiziert wurden. Im Fall von TRPM4b^{E7K} ist zudem eine höhere Signalintensität zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigt eine direkte SUMOylierung von TRPM4b-Kanälen an, welche unter Umständen im Fall von TRPM4b^{E7K} verstärkt ist. Eine Koexpression mit SENP1 führt in beiden Fällen zu einer DeSUMOylierung von TRPM4b-Kanälen, welches an der Abwesenheit eines Signals für FLAG-TRPM4b festgestellt werden kann

(Abbildung 4.35 B).

Um die Auswirkung von Koexpression des TRPM4b-Kanals mit SENP1 oder Ubc9 auf die Oberflächenexpression zu untersuchen, wurde Myc-getaggtter TRPM4b-Kanal in HEK293-Zellen mit den genannten Proteinen koexprimiert und die Oberflächenexpression wie unter 3.6.7 beschrieben mittels FACS-Analyse untersucht. Das erhaltene Ergebnis ist in Abbildung 4.36 wiedergegeben.

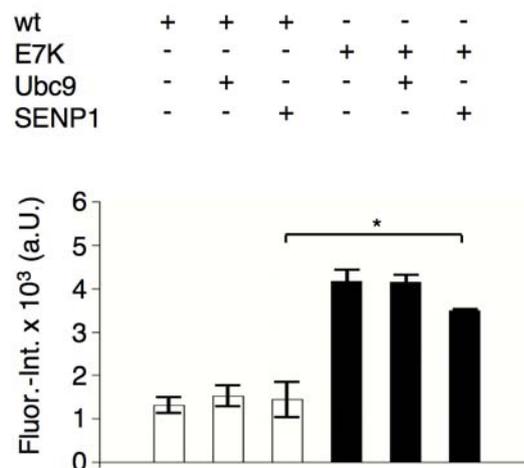


Abbildung 4.36: **Auswirkung von SUMOylierung/DeSUMOylierung auf TRPM4b-Oberflächenexpression.** Myc-getaggte TRPM4b-Kanäle wurden in HEK293-Zellen mit Ubc9 oder SENP1 koexprimiert und die Oberflächenexpression von TRPM4b-Kanälen wie unter 3.6.7 beschrieben mittels FACS-Analyse charakterisiert. Dargestellt sind gemittelte Fluoreszenzintensitäten (a.U.) \pm s.e.m. (n = 3). Statistische Signifikanz wurde mittels des ungepaarten Student's T-Test untersucht. $P < 0.05$.

Es konnte weder für eine Koexpression mit SENP1 noch für eine Koexpression mit Ubc9 für einen der beiden getesteten TRPM4b-Genotypen eine signifikante Veränderung der Oberflächenexpression festgestellt werden. Auffällig ist weiterhin, dass die Oberflächenexpression von TRPM4b^{wt}-Kanälen unter keiner der getesteten Bedingungen die basale Oberflächenexpression von TRPM4b^{E7K}-Kanälen erreichte. Da Kanäle beider Genotypen offensichtlich deSUMOyliert werden (Abbildung 4.35 B), trotzdem aber unverändert in der Zellmembran nachgewiesen werden können, während die Stromdichten sich unter diesen Bedingungen signifikant unterscheiden, muß hieraus ei-

4 Ergebnisse

ne Interaktion mit mindestens einem weiteren Protein geschlussfolgert werden, welches an der Regulation von TRPM4b-Kanalaktivität durch SUMOylierung beteiligt ist.

5 Diskussion

KCNQ1-Kaliumionenkanäle bilden zusammen mit ihrer Untereinheit KCNE1 einen Ionenkanalkomplex, welcher den langsamen, repolarisierenden Kaliumauswärtsstrom I_{Ks} im humanen Herzen vermittelt (Nerbonne (2000)). Mutationen in *KCNQ1* sind mit dem Auftreten des *long QT* (LQT) Syndroms assoziiert, welches in betroffenen Patienten zu lebensbedrohlichen Arrhythmien führen kann (Peroz et al. (2008)). Eine genauere Untersuchung der Auswirkungen vieler in Patienten identifizierter *KCNQ1*-Mutationen war bisher auf die Expression entsprechender mutierter KCNQ1-Kanäle in heterologen Expressionssystemen beschränkt, da bislang eine Identifikation eines KCNQ1-vermittelten Kaliumauswärtsstroms in primären Kardiomyozyten von adulten Mäusen nicht gelungen war. *KCNQ1*^{-/-}-Mäuse weisen allerdings eine Verlängerung des QT-Intervalls in Elektrokardiogrammen auf, welche eine physiologische Rolle eines KCNQ1-geleiteten Kaliumstroms im Ventrikel adulter Mäuse impliziert (Casimiro et al. (2001)). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es mir gelungen, einen KCNQ1-vermittelten Kaliumauswärtsstrom in ventrikulären Myozyten adulter C57Bl/6J-Mäuse nachzuweisen, welches eine Untersuchung der Regulation und physiologischen Bedeutung von KCNQ1-Ionenkanälen in der Maus als einem *in vivo* Modellsystem erlaubt.

Bisherige Untersuchungen konnten einen KCNQ1-vermittelten Kaliumauswärtsstrom in ventrikulären Myozyten von Mäusen nur in den ersten vier Tagen nach der Geburt nachweisen (Knollmann et al. (2004)). Zu diesem Zeitpunkt ist eine Expression von KCNE1 im Mausherzen nachweisbar, welche ab dem fünften Tag nach der Geburt nicht mehr detektierbar ist (Warth und Barhanin (2002)). Der zu dieser Zeit messbare KCNQ1-geleitete Ionenstrom weist alle Charakteristika des im humanen Herzen identifizierten I_{Ks} -Stroms auf, wie z.B. Aktivierungskinetik, Spannungsabhängigkeit und pharmakologische Sensitivität gegenüber I_{Ks} -Inhibitoren (Peroz et al. (2008)). Elektrophysiologische Messungen zu späteren Zeitpunkten dagegen erlaubten keinen weiteren Nachweis von KCNQ1-vermittelten Kaliumauswärtsströmen, welches in der Literatur mit einer verringerten Stromamplitude von KCNQ1 aufgrund der starken Abnahme der

KCNE1-Expression begründet wurde (Nerbonne et al. (2001)).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte in der vorliegenden Arbeit ein Nachweis eines KCNQ1-vermittelten Kaliumauswärtsstroms auch in ventrikulären Myozyten adulter Mäuse geführt werden. Dieser vermeintliche Kontrast läßt sich durch die Wahl der verwendeten Pulsprotokolle sowie der gewählten Meßbedingungen erklären. Bisherige Untersuchungen wählten für einen elektrophysiologischen Nachweis von KCNQ1-Strömen ein Haltepotential von -80 mV in der Ganz-Zell Patch-Clamp Konfiguration mit einer nachfolgenden Depolarisierung auf ein Potential von 60 mV bzw. 80 mV (Nerbonne et al. (2001)). Unter diesen Meßbedingungen kommt es zu einer starken Überlagerung von potentiellen KCNQ1-vermittelten Kaliumauswärtsströmen durch Kv2.1- und Kv4.2-vermittelte Kaliumauswärtsströme, welche eine Isolation des KCNQ1-geleiteten Stromes erschweren. Um dieses auszuschließen, wurde in diesem Fall ausgehend vom Haltepotential ein Vorpuls auf -30 mV durchgeführt, welcher zu einer Inaktivierung von Kv4.2 Kaliumionenkanälen führt. Zusätzlich wurden Kv1.5 und Kv4.2-Kaliumionenströme durch Applikation von TEA und 4-AP inhibiert. Die nachfolgende Depolarisation durch das gewählte Pulsprotokoll sollte hiernach nur noch zu einer Aktivierung von Kv2.1 und KCNQ1-Ionenkanälen führen. Innerhalb des resultierenden Kaliumauswärtsstroms wurde der KCNQ1-vermittelte Kaliumauswärtsstrom nun durch pharmakologische Inhibition mittels Linopirdine isoliert.

Bei den Messungen an Myozyten von *KCNQ1*^{-/-} - Mäusen zeigte sich, dass ein geringer Anteil der gemessenen Kaliumauswärtsströme gegenüber Linopirdine sensitiv war. Deshalb musste von einer partiell unspezifischen Inhibition mindestens eines weiteren Kaliumauswärtsstroms durch Linopirdine in ventrikulären Myozyten ausgegangen werden. Der Anteil dieses Stroms am Linopirdine-sensitiven Gesamtauswärtsstrom lag bei ca. 9 %. Aufgrund der Aktivierungskinetik sowie Spannungsabhängigkeit des Linopirdine-sensitiven Kaliumauswärtsstroms in *KCNQ1*^{-/-}-Myozyten ist ein unspezifischer Block von Kv2.1-Kanalaktivität durch Linopirdine-Applikation als wahrscheinlichste molekulare Ursache anzunehmen. Da eine Analyse der Kaliumauswärtsströme bei depolarisierten Membranpotentialen aus diesem Grund nicht als ein völlig eindeutiges Kriterium für das Vorliegen von KCNQ1-Ionenströmen genutzt werden konnte, wurde als ein weiteres Merkmal für KCNQ1-Kanalaktivität die Messung KCNQ1-charakteristischer *Tail*-Ströme bei der Deaktivierung der geöffneten Kanäle herangezogen. Durch eine Aufzeichnung dieser *Tail*-Ströme bei einem Potential von -40 mV nach erfolgter Depolarisation in Myozyten von C57Bl/6J-Mäusen, welche in

KCNQ1^{-/-}-Mäusen nicht nachgewiesen werden konnten, konnte das Vorliegen eines KCNQ1-vermittelten Kaliumauswärtsstroms in ventrikulären Myozyten von C57Bl/6J-Mäusen eindeutig nachgewiesen werden.

In der Literatur (Nerbonne et al. (2001)) erfolgte nach Depolarisation immer eine direkte Rückkehr des Membranpotentials auf ein Haltepotential von -80 mV, welches für die Messung durch K⁺-Kanäle vermittelter *Tail*-Strömen denkbar ungünstig ist. Ein weiterer Grund für eine bisher nicht erfolgreiche Detektion von KCNQ1-Strömen in Kardiomyozyten adulter Mäuse besteht wahrscheinlich in der Wahl der Ganz-Zell Patch-Clamp Konfiguration. Diese führt in der Regel zu einer schnellen Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂, das KCNQ1-Kanäle benötigen um zu öffnen (Lopes et al. (2005)). Um diese Problematik zu vermeiden, wurde im vorliegenden Fall die Perforated Patch-Clamp Konfiguration gewählt, welche PtdIns(4,5)P₂ wesentlich weniger beeinflusst als die Ganz-Zell Konfiguration.

Die physiologische Funktion von KCNQ1-Kanälen im murinen Herzen ist derzeit noch unklar. Eine Analyse von Elektrokardiogrammen von narkotisierten *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen zeigte eine Verlängerung des QT_C-Intervalls (Casimiro et al. (2001)), welches ein Maß für die Repolarisation während des ventrikulären Aktionspotentials ist. Im Einklang damit stehen die Ergebnisse der Current-Clamp-Messungen an ventrikulären Myozyten von *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen. Bestimmungen des APD90-Intervalls zeigten eine Verlängerung dieses Zeitraums in Myozyten von *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen, während die gemessenen APD50-Werte keine Änderung im Vergleich zum Wildtyp zeigten. Dies deutet auf eine Rolle von KCNQ1-Aktivität in der Endphase der Repolarisation beziehungsweise in der Kontrolle des Ruhemembranpotentials hin. Deshalb wurde von mir untersucht, ob ein Verlust von KCNQ1-Aktivität mit einer verringerten Erregbarkeit ventrikulärer Myozyten assoziiert ist. Current-Clamp Messungen, bei denen ventrikulären Myozyten von C57Bl/6J- oder *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen depolarisierende Ströme zur Generierung von Aktionspotentialen injiziert wurden, zeigten bei einer Stimulationsfrequenz von 5 Hz eine annähernd 100%ige Erfolgsrate in Myozyten von C57Bl/6J-Mäusen, während *KCNQ1*^{-/-}-Myozyten eine um ~50% reduzierte Erfolgsrate zeigten. Messungen bei höheren Stimulationsfrequenzen von 8 Hz bzw. 10 Hz zeigten auch in C57Bl/6J-Myozyten eine signifikant verringerte Erfolgsrate bei der Generierung von Aktionspotentialen, welches darauf hinweist, dass die gewählten Meßbedingungen in diesem Frequenzbereich nicht geeignet waren, um die Erregbarkeit ventrikulärer Myozyten korrekt zu erfassen. Aus diesem Grund möchte ich mich in der folgenden Dis-

kussion auf die Ergebnisse bei einer Stimulationsfrequenz von 5 Hz konzentrieren.

Die durchgeführten Messungen deuten auf eine nicht ausreichende Erholung von spannungsabhängigen Natriumkanälen aus der Inaktivierung in *KCNQ1*^{-/-}-Myozyten hin. Diese Situation kann eintreten, wenn das Membranpotential nach einem Aktionspotential nicht ausreichend stark repolarisiert wird (Bezanilla und Armstrong (1977)). Da der Anteil an nicht erfolgreich ausgebildeten Aktionspotentialen ohne zusätzliche elektrophysiologische Stimulation in Myozyten von *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen signifikant höher war als in Zellen von C57Bl/6J-Mäusen und zudem eine Verlängerung des APD90-Intervalls in Zellen von *KCNQ1*^{-/-}-Tieren gemessen wurde, ergab sich die Schlußfolgerung, dass im murinen Herzen KCNQ1-Kanalaktivität offensichtlich von Bedeutung in der Endphase der Repolarisierung des Membranpotentials beziehungsweise in der Kontrolle des Ruhemembranpotentials ist. Diese Schlussfolgerung wurde durch die Applikation hyperpolarisierender Ströme vor der Injektion depolarisierender Ströme bestärkt, welche in *KCNQ1*^{-/-}-Myozyten zu einer annähernd 100 %igen Erfolgsrate bei der Aktionspotentialgenerierung führte. Diese Beobachtung war ein weiteres Indiz für eine wesentliche Rolle von KCNQ1-Kanalaktivität im Bereich des Ruhemembranpotentials, deren Fehlen in *KCNQ1*^{-/-}-Myozyten zu einer verlangsamten Repolarisierung nach einem Aktionspotential führt.

Die Applikation von Serotonin zu Myozyten von C57Bl/6J-Mäusen führte zu einem Anstieg der KCNQ1-vermittelten Stromamplitude um ~30 %, während in *KCNQ1*^{-/-}-Myozyten unter vergleichbaren Bedingungen nur ein Anstieg von ~5 % der Amplitude an Kaliumauswärtsstrom gemessen werden konnte. In Current-Clamp Messungen zeigte die elektrophysiologische Erregung von ventrikulären Myozyten von C57Bl/6J- oder *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen unter Serotonin-Stimulation eine Steigerung der Erfolgsrate bei der Generierung von Aktionspotentialen, welche unabhängig vom Genotyp der untersuchten Zellen bei ungefähr 30 % lag. Diese Beobachtung lässt auf eine Stimulation mindestens eines weiteren Ionenkanals durch Serotonin neben KCNQ1 schließen. Da keine signifikante Verkürzung der APD50- oder APD90-Werte unter Serotonin-Stimulation beobachtet werden konnte, scheint die für die Steigerung der Erregbarkeit verantwortliche Ionenkanalaktivität im Bereich des Ruhemembranpotentials, nicht aber in der Hauptphase der Repolarisation, vorzuliegen. Diese Beobachtung schließt Kv2.1-Kanalaktivität als mögliche molekulare Ursache aus, da Strom-Spannungskurven des Kv2.1-Kanals auf eine Rolle dieses Kanals während der Hauptrepolarisierungsphase des Aktionspotentials schließen lassen (Murakoshi et al. (1997)). Eine Aktivierung im

Bereich des Ruhemembranpotentials weisen dagegen einwärts-gleichrichtende Kaliumionenkanäle wie z.B. Kir-Kanäle auf. Ebenso wie diese kann auch TRPM4b als ein potentieller Kandidat für die beobachtete Kanalaktivität gelten. Unabhängig von der molekularen Identität der gemessenen Kanalaktivität verdeutlichen die erhaltenen Messergebnisse, dass eine Stimulation kardialer Ionenkanalaktivität durch Serotonin nicht auf KCNQ1 beschränkt ist, sondern einen generelleren Signalweg zur Regulation von Kanalaktivitäten darzustellen scheint.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass der 100 %ige Verlust an KCNQ1-Aktivität zu einer durchschnittlichen Verlängerung des APD90-Intervalls in *KCNQ1*^{-/-}-Myozyten von ~13 ms führte. Dies könnte möglicherweise heissen, dass bei einer maximalen Stimulation der KCNQ1-Kanalaktivität durch Serotonin von ~30 % in C57BL/6J-Myozyten dieses rein rechnerisch zu einer Verkürzung des APD90-Intervalls von 3-4 ms führen würde. Diese Zeitspanne liegt in der Größenordnung des ermittelten Fehlerbereiches für die APD90-Bestimmung in Myozyten von C57BL/6J-Mäusen, so dass wahrscheinlich eine mögliche Verkürzung des APD90-Intervalls um 3-4 ms nach Serotonin-Stimulation im Fehlerbereich der Messungen lag und deshalb nicht nachweisbar war.

Bisherige Publikationen haben eine positive Regulation kardialer KCNQ1-Kanalaktivität vornehmlich durch β -adrenerge Stimulation beschrieben (Knollmann et al. (2004), Knollmann et al. (2007), Marx et al. (2002)). Für diese Regulation, die durch Protein Kinase A nach Aktivierung von β 1-adrenergen Rezeptoren erfolgt, ist die Anwesenheit von KCNE1 wichtig (Marx et al. (2002)). Desweiteren ist für eine erfolgreiche Phosphorylierung von KCNQ1/KCNE1-Kanälen durch Protein Kinase A auch eine Interaktion mit dem Adapterprotein Yotiao erforderlich (Marx et al. (2002), Chen et al. (2005)).

Eine Regulation kardialer KCNQ1-Ionenkanalaktivität durch Serotonin ist dagegen bisher nicht beschrieben worden. Bekannt ist nur eine Stimulation spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle durch Serotonin im humanen Atrium (Oquadid et al. (1992)). In diesem Fall erfolgt die positive Regulation der Kanalaktivität durch eine Aktivierung von 5-HT₄-Rezeptoren, welche über das stimulatorische G-Protein G_S eine Aktivierung von Protein Kinase A bewirkt. Im Gegensatz zu diesen Befunden ist die KCNQ1-Aktivierung durch Serotonin über 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt, welche an die Untereinheit G_q gekoppelt sind. Eine Aktivierung der G_q-Untereinheit führt in der Regel zu einer Aktivierung von Phospholipase C (Koch et al. (2000)) und nachfolgend

zu einer Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂. Die entsprechende Abnahme der PtdIns(4,5)P₂-Konzentration würde daher entsprechend der beschriebenen PtdIns(4,5)P₂-Abhängigkeit der KCNQ1-Aktivität (Lopes et al. (2005)) eine Abnahme der KCNQ1-Aktivität zur Folge haben. Dieses konnte durch Stimulation von G_q-gekoppelten α -adrenergen Rezeptoren durch Phenylephrine-Applikation in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden.

Unerwarteterweise führte dagegen die Aktivierung der 5-HT_{2A}-Rezeptoren mit Serotonin zu einer Stimulation der KCNQ1-Kanalaktivität. Dieser Sachverhalt könnte auf eine Aktivierung des folgenden Signalwegs hindeuten, der die Proteinkinase GRK2 involviert. Diese Proteinkinase ist mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren kolokalisiert und wird durch G_q aktiviert (DeBurman et al. (1996)). Im Falle einer Kolokalisation von 5-HT_{2A}-Rezeptoren mit GRK2 würde eine Aktivierung dieser Rezeptoren eine Inhibition der Ubiquitin-Ligase Nedd4 zur Folge haben, welches zu einer verringerten Ubiquitinierung von KCNQ1-Kanälen führen würde. Die Dichte von KCNQ1-Kanälen in der Zellmembran wird durch Nedd4-abhängige Ubiquitinierung reguliert (Jespersen et al. (2007)), so dass eine Nedd4-Inhibierung zu einer Erhöhung der Dichte an KCNQ1-Kanälen und damit zu einer Erhöhung der KCNQ1-vermittelten Stromdichte führen würde. Konsistent mit diesem Modell ist die Beobachtung, dass nach Stimulation von KCNQ1-Aktivität mit Serotonin keine schnelle Reversibilität nach dem Auswaschen des Rezeptor-Agonisten beobachtet werden kann (siehe Abbildung 4.10). KCNQ1-Kanalaktivität könnte demnach über die Kanaldichte an der Zelloberfläche moduliert werden. Dies bedarf weitergehender Untersuchungen.

Das formulierte Modell zur Modulation der KCNQ1-Kanaldichte an der Zelloberfläche steht im Einklang mit aktueller Literatur, welche eine Verringerung der Oberflächenexpression durch Endozytose von Membranproteinen durch Ubiquitinierung als Signal beschreibt (Strous und Govers (1999)). Interessanterweise deuten die für die Regulation von TRPM4b^{E7K}-Kanalaktivität erhaltenen Daten ebenfalls auf eine Modulation der Oberflächenexpression von TRPM4b^{E7K}-Kanälen hin. In diesem Fall liegt die mutmassliche molekulare Ursache für die Erhöhung der Oberflächendichte in einer SUMOylierung des TRPM4b^{E7K}-Kanals in der Zellmembran. Neuere Arbeiten zeigen, dass Ubiquitinierung und SUMOylierung eines Proteins antagonistisch wirken können (Ulrich (2005)). Im Kontext der aktuellen Literatur ist vorstellbar, dass im Fall von TRPM4b^{E7K} eine Stabilisierung der SUMOylierung des Proteins vorliegt, welche eine Ubiquitin-vermittelte Endozytose verhindert. In diesem Zusammenhang ist es

interessant, dass im Fall einer mit dem Liddle's Syndrom assoziierten Mutation des ENaC-Ionenkanals diese zu einer Störung der Ubiquitin-vermittelten Endozytose des ENaC-Kanals führt (Knight et al. (2006)).

Die Ergebnisse meiner Arbeit erlauben eine neue Signalkette zur Regulation kardialer Ionenkanalaktivität vorzuschlagen. Diese besteht in einer geregelten Endozytose (und Rezyklisierung) des Ionenkanals über ein Wechselspiel zwischen Ubiquitinierung und SUMOylierung, das über die Aktivierung / Inaktivierung von Proteinkinaseaktivitäten geregelt wird (Abbildung 5.1). Die vorgeschlagene Regulation lehnt sich an Arbeiten zur Regulation der Oberflächendichte von ROMK1-Kaliumionenkanälen durch Ubiquitinierung und Tyrosin Kinase-Aktivität an (Lang et al. (2003), Lin et al. (2005)), die beide zusammen zu einer Internalisierung des ROMK1-Kanals durch Endozytose führen. Der hier vorgeschlagene Signalweg erweitert die bisherigen Arbeiten, indem er mit SUMOylierung einen zur Ubiquitinierung bzw. Phosphorylierung antagonistischen Mechanismus einführt. Diese Signalkette kann in der Zukunft beispielsweise durch eine Analyse der Oberflächendichte von TRPM4b- und KCNQ1-Kanälen sowie der Expression dominant-negativer Nedd4- / GRK2-Mutanten weitergehend analysiert werden.

In einer der ersten elektrophysiologischen Veröffentlichungen nach der Erstbeschreibung der Patch-Clamp-Technik beschrieben Erwin Neher und Mitarbeiter 1981 die Aktivität eines Ionenkanals in Herzmuskelzellen (Colquhoun et al. (1981)). Dieser Kanal leitet einen Ca^{2+} -aktivierten, nicht-selektiven Kationen-Strom (CAN), welcher nach den publizierten Daten für die Kontrolle der zellulären Erregbarkeit mitverantwortlich ist. Obwohl die Erstbeschreibung dieser Kanalaktivität bereits über 25 Jahre zurückliegt, ist bisher keine Identifikation des molekularen Korrelats gelungen. Die für den TRPM4b-Kanal publizierten Kenndaten sind sehr ähnlich zu denen des nativen CAN-Kanals, weshalb TRPM4b seit einigen Jahren als ein Kandidat für den CAN-Kanal diskutiert wird (Nilius und Vennekens (2006)). Ein Nachweis hierfür konnte aber bisher nicht geführt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Mutation in *TRPM4* als mutmasslich verantwortlich für das Auftreten von PFHBI, einer Erkrankung des Erregungsleitungssystems im humanen Herzen (Brink et al. (1995)), identifiziert werden. Bisherige Daten zur physiologischen Funktion von TRPM4b legen eine Regulation des Ca^{2+} -Influx in elektrisch erregbaren Zellen nah (Launay et al. (2002), Nilius und Vennekens (2006)), wo ein Verlust an TRPM4b-Aktivität mit einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom korreliert (Launay et al. (2004), Vennekens et al. (2007)). In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen eine signifikante Erhöhung der TRPM4b-vermittelten Strom-

handelt und dieser für die Regulation zellulärer Erregbarkeit verantwortlich ist, ließe sich beispielsweise mittels genetisch veränderter Mausmodelle führen. Durch eine Generierung einer Knock-In-Mauslinie, welche heterozygot TRPM4b^{E7K} anstelle des endogenen TRPM4b exprimiert, ließe sich die genetische Situation in PFHBI-Patienten nachstellen und nachfolgend durch Patch-Clamp- sowie Kalzium-Imaging-Experimente an vereinzelt Zellen des Erregungsleitungssystems untersuchen, ob eine Expression von TRPM4b^{E7K} auch *in vivo* zu einer erhöhten TRPM4b-vermittelten Stromdichte mit einhergehendem verringerten Ca²⁺-Influx führt. Durch *in vivo* Ableitungen von Elektrokardiogrammen könnte an derartigen Mausmodellen dann charakterisiert werden, ob die Expression von TRPM4b^{E7K} allein ausreichend ist, um den in Patienten beschriebenen PFHBI-Phänotyp auszulösen. Das generierte Mausmodell könnte aber durch entsprechende Konstruktion des Transgens auch genutzt werden, um durch eine Verpaarung mit Mäusen, welche die Cre-Rekombinase unter einem geeigneten Promotor für das Erregungsleitungssystem exprimieren, einen gewebespezifischen *TRPM4b*-Verlust zu erreichen. Hierdurch ließe sich dann überprüfen, ob ein Verlust an TRPM4b-Aktivität gleichbedeutend mit einem Verlust an CAN-Kanalaktivität wäre, welches eine Identifikation des molekularen Korrelats des CAN-Kanals ermöglichen würde.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, durch Messungen in der *Perforated Patch-Clamp* Konfiguration einen KCNQ1-vermittelten Kaliumauswärtsstrom in ventrikulären Myozyten adulter C57Bl/6J-Mäuse nachzuweisen. Der in Myozyten von C57Bl/6J-Mäusen isolierte Kaliumauswärtsstrom wies zu heterolog exprimierten mKCNQ1-Kanälen eine vergleichbare Spannungsabhängigkeiten, Kinetik und Pharmakologie auf. In ventrikulären Myozyten von *KCNQ1*^{-/-}-Mäusen konnte ein vergleichbarer Kaliumauswärtsstrom nicht beobachtet werden. Die gemessene KCNQ1-Kanalaktivität konnte durch Applikation von Serotonin gesteigert werden, welches pharmakologisch auf eine Aktivierung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren zurückgeführt werden konnte. Untersuchungen der elektrischen Erregbarkeit von ventrikulären Myozyten im *Current Clamp* Modus zeigten eine Verringerung der Erregbarkeit von *KCNQ1*^{-/-}-Myozyten in Relation zu C57Bl/6J-Myozyten. Serotonin-Applikation führte unabhängig vom Genotyp zu einer Steigerung der Erregbarkeit um ~30 %.

Durch Sequenzierung genomischer DNA von PFHBI-Patienten einer südafrikanischen Großfamilie konnte eine Mutation in *TRPM4* identifiziert werden. Die Mutation führt zum Austausch einer Glutaminsäure-Seitenkette zu einem Lysin-Rest an Position 7 von TRPM4b. Eine Expression von TRPM4b^{E7K} in HEK293- und CHO-Zellen führte zu einer signifikant erhöhten Stromdichte gegenüber TRPM4b-exprimierenden Zellen. Diese Erhöhung von TRPM4b-Aktivität war nicht mit einer Veränderung der PtdIns(4,5)P₂-Affinität, Ca²⁺-Abhängigkeit, Inhibition durch Nukleotidtriphosphate oder Einzelkanalleitfähigkeit bzw. Offenwahrscheinlichkeit assoziiert. Stattdessen wurde eine Insensitivität gegenüber DeSUMOylierung von TRPM4b^{E7K} festgestellt, welches mit einer signifikanten Erhöhung der Oberflächenexpression von TRPM4b^{E7K} korreliert werden konnte. Die beobachtete Erhöhung der Oberflächenexpression beruht auf einer verlangsamten Internalisierung des Proteins durch Endozytose.

Die erhaltenen Ergebnissen lassen auf eine wichtige Rolle von Ubiquitinierung bzw. SUMOylierung in der Regulation kardialer Ionenkanalaktivität schließen.

7 Abstract

Perforated-patch clamp recordings from ventricular myocytes of adult C57Bl/6J-mice allowed identification of a potassium outward current, which was found to be absent in ventricular myocytes from *KCNQ1*^{-/-}-mice. The isolated current displayed similar voltage dependence, kinetics and pharmacological properties as currents recorded from mKCNQ1-channels expressed in oocytes of *Xenopus laevis*. Application of serotonin to ventricular myocytes of C57Bl/6J-mice lead to an increase in the amplitude of KCNQ1-mediated current, which could pharmacologically be linked to an activation of 5-HT_{2A}-receptors. Investigation of electrical excitability of ventricular myocytes in Current-Clamp recordings showed a decreased ability for successful generation of action potentials in *KCNQ1*^{-/-}-myocytes in relation to C57Bl/6J-myocytes. Application of serotonin lead to a genotype-independent increase in electrical excitability of ~30 %.

Sequencing of genomic DNA of PFHBI-patients from a south-african family revealed the presence of a heterozygous missense mutation in *TRPM4* of PFHBI-patients. The mutation leads to a substitution of glutamic acid to lysine at position 7 of TRPM4b. Expression of TRPM4b^{E7K} in HEK293- or COS-7-cells allowed detection of a significantly increased current density compared to TRPM4b expressing cells. The recorded increase in TRPM4b-activity was not due to changes in Ca²⁺-dependence, PtdIns(4,5)P₂-affinity, inhibition by intracellular nucleotides, single channel conductance or open probability, respectively. In contrast, the observed increase in current density was correlated with an insensitivity of TRPM4b^{E7K} protein to deSUMOylation, leading to an increased surface density of TRPM4b^{E7K}. The observed increase in surface density is linked to an attenuation of TRPM4b-protein internalization by endocytosis.

The obtained results point towards an important role of Ubiquitylation and SUMOylation, respectively, in regulation of cardiac ion channel activity.

Literaturverzeichnis

- Antzelevitch, C. (2007). Genetic basis of Brugada syndrome. *Heart Rhythm*, 4(6):756–757.
- Aulbach, F., Simm, A., Maier, S., Langenfeld, H., Walter, U., Kersting, U., and Kirstein, M. (1999). Insulin stimulates the L-type Ca²⁺ current in rat cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*, 42(1):113–120.
- Bailey, D. and O’Hare, P. (2004). Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1. *J Biol Chem*, 279(1):692–703.
- Barbuti, A. and DiFrancesco, D. (2008). Control of cardiac rate by funny channels in health and disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1123:213–223.
- Bardien-Kruger, S., Wulff, H., Arieff, Z., Brink, P., Chandy, K. G., and Corfield, V. (2002). Characterisation of the human voltage-gated potassium channel gene, KCNA7, a candidate gene for inherited cardiac disorders, and its exclusion as cause of progressive familial heart block I (PFHBI). *Eur J Hum Genet*, 10(1):36–43.
- Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., and Romey, G. (1996). K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature*, 384(6604):78–80.
- Bennett, P. B., Yazawa, K., Makita, N., and George, A. L. J. (1995). Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature*, 376(6542):683–685.
- Bennett, V. and Baines, A. J. (2001). Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev*, 81(3):1353–1392.
- Benson, D. W., Wang, D. W., Dymont, M., Knilans, T. K., Fish, F. A., Strieper, M. J., Rhodes, T. H., and George, A. L. J. (2003). Congenital sick sinus syndrome caused

- by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest*, 112(7):1019–1028.
- Bezanilla, F. and Armstrong, C. M. (1977). Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J Gen Physiol*, 70(5):549–566.
- Boucherot, A., Schreiber, R., and Kunzelmann, K. (2001). Regulation and properties of KCNQ1 (K(V)LQT1) and impact of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Membr Biol*, 182(1):39–47.
- Boussy, T., Paparella, G., de Asmundis, C., Sarkozy, A., Chierchia, G. B., Brugada, J., Brugada, R., and Brugada, P. (2008). Genetic basis of ventricular arrhythmias. *Cardiol Clin*, 26(3):335–353.
- Brink, A. J. and Torrington, M. (1977). Progressive familial heart block—two types. *S Afr Med J*, 52(2):53–59.
- Brink, P. A., Ferreira, A., Moolman, J. C., Weymar, H. W., van der Merwe, P. L., and Corfield, V. A. (1995). Gene for progressive familial heart block type I maps to chromosome 19q13. *Circulation*, 91(6):1633–1640.
- Burkhardt, J. K., Echeverri, C. J., Nilsson, T., and Vallee, R. B. (1997). Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J Cell Biol*, 139(2):469–484.
- Casimiro, M. C., Knollmann, B. C., Ebert, S. N., Vary, J. C. J., Greene, A. E., Franz, M. R., Grinberg, A., Huang, S. P., and Pfeifer, K. (2001). Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5):2526–2531.
- Chen, L., Kurokawa, J., and Kass, R. S. (2005). Phosphorylation of the A-kinase-anchoring protein Yotiao contributes to protein kinase A regulation of a heart potassium channel. *J Biol Chem*, 280(36):31347–31352.
- Chiang, C. E. and Roden, D. M. (2000). The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. *J Am Coll Cardiol*, 36(1):1–12.

- Cho, H., Lee, D., Lee, S. H., and Ho, W.-K. (2005). Receptor-induced depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibits inwardly rectifying K⁺ channels in a receptor-specific manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(12):4643–4648.
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., and Strubing, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*, 2(6):387–396.
- Colquhoun, D., Neher, E., Reuter, H., and Stevens, C. F. (1981). Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. *Nature*, 294(5843):752–754.
- Crotti, L., Celano, G., Dagradi, F., and Schwartz, P. J. (2008). Congenital long QT syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, 3:18.
- de Meeus, A., Stephan, E., Debrus, S., Jean, M. K., Loiselet, J., Weissenbach, J., Demaille, J., and Bouvagnet, P. (1995). An isolated cardiac conduction disease maps to chromosome 19q. *Circ Res*, 77(4):735–740.
- DeBurman, S. K., Ptasienski, J., Benovic, J. L., and Hosey, M. M. (1996). G protein-coupled receptor kinase GRK2 is a phospholipid-dependent enzyme that can be conditionally activated by G protein betagamma subunits. *J Biol Chem*, 271(37):22552–22562.
- Fliegert, R., Glassmeier, G., Schmid, F., Cornils, K., Genisyuerk, S., Harneit, A., Schwarz, J. R., and Guse, A. H. (2007). Modulation of Ca²⁺ entry and plasma membrane potential by human TRPM4b. *FEBS J*, 274(3):704–713.
- Fozzard, H. A. and Hanck, D. A. (1996). Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms. *Physiol Rev*, 76(3):887–926.
- Fuster, V., O'Rourke, R., Walsh, R., and Poole-Wilson, P. (2004). *Hurst's The Heart*. McGraw-Hill Professional, New York City, USA, 11th edition.
- Goldenberg, I. and Moss, A. J. (2008). Long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*, 51(24):2291–2300.

- Gregory, K. N., Ginsburg, K. S., Bodi, I., Hahn, H., Marreez, Y. M. A., Song, Q., Padmanabhan, P. A., Mitton, B. A., Waggoner, J. R., Del Monte, F., Park, W. J., Dorn, G. W. n., Bers, D. M., and Kranias, E. G. (2006). Histidine-rich Ca binding protein: a regulator of sarcoplasmic reticulum calcium sequestration and cardiac function. *J Mol Cell Cardiol*, 40(5):653–665.
- Guinamard, R., Chatelier, A., Demion, M., Potreau, D., Patri, S., Rahmati, M., and Bois, P. (2004). Functional characterization of a Ca(2+)-activated non-selective cation channel in human atrial cardiomyocytes. *J Physiol*, 558(Pt 1):75–83.
- Harteneck, C., Plant, T. D., and Schultz, G. (2000). From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci*, 23(4):159–166.
- Heidecker, B., Kasper, E. K., Wittstein, I. S., Champion, H. C., Breton, E., Russell, S. D., Kittleson, M. M., Baughman, K. L., and Hare, J. M. (2008). Transcriptomic biomarkers for individual risk assessment in new-onset heart failure. *Circulation*, 118(3):238–246.
- Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, USA, 3rd edition.
- Hong, K., Berruezo-Sanchez, A., Pongvarin, N., Oliva, A., Vatta, M., Brugada, J., Brugada, P., Towbin, J. A., Dumaine, R., Pinero-Galvez, C., Antzelevitch, C., and Brugada, R. (2004). Phenotypic characterization of a large European family with Brugada syndrome displaying a sudden unexpected death syndrome mutation in SCN5A. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 15(1):64–69.
- Hoyer, D., Hannon, J. P., and Martin, G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 71(4):533–554.
- Jervell, A. and Lange-Nielsen, F. (1957). Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J*, 54(1):59–68.
- Jespersen, T., Membrez, M., Nicolas, C. S., Pitard, B., Staub, O., Olesen, S.-P., Baro, I., and Abriel, H. (2007). The KCNQ1 potassium channel is down-regulated by ubiquitylating enzymes of the Nedd4/Nedd4-like family. *Cardiovasc Res*, 74(1):64–74.

- Kaneko, K. J., Rein, T., Guo, Z.-S., Latham, K., and DePamphilis, M. L. (2004). DNA methylation may restrict but does not determine differential gene expression at the Sgy/Tea2 locus during mouse development. *Mol Cell Biol*, 24(5):1968–1982.
- Kass, R. S. (2006). Sodium channel inactivation in heart: a novel role of the carboxy-terminal domain. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 17 Suppl 1:S21–S25.
- Kaumann, A. J. and Levy, F. O. (2006). 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther*, 111(3):674–706.
- Knight, K. K., Olson, D. R., Zhou, R., and Snyder, P. M. (2006). Liddle's syndrome mutations increase Na⁺ transport through dual effects on epithelial Na⁺ channel surface expression and proteolytic cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(8):2805–2808.
- Knollmann, B. C., Casimiro, M. C., Katchman, A. N., Sirenko, S. G., Schober, T., Rong, Q., Pfeifer, K., and Ebert, S. N. (2004). Isoproterenol exacerbates a long QT phenotype in Kcnq1-deficient neonatal mice: possible roles for human-like Kcnq1 isoform 1 and slow delayed rectifier K⁺ current. *J Pharmacol Exp Ther*, 310(1):311–318.
- Knollmann, B. C., Sirenko, S., Rong, Q., Katchman, A. N., Casimiro, M., Pfeifer, K., and Ebert, S. N. (2007). Kcnq1 contributes to an adrenergic-sensitive steady-state K⁺ current in mouse heart. *Biochem Biophys Res Commun*, 360(1):212–218.
- Koch, W. J., Lefkowitz, R. J., and Rockman, H. A. (2000). Functional consequences of altering myocardial adrenergic receptor signaling. *Annu Rev Physiol*, 62:237–260.
- Kurokawa, J., Motoike, H. K., and Kass, R. S. (2001). TEA(+)-sensitive KCNQ1 constructs reveal pore-independent access to KCNE1 in assembled I(Ks) channels. *J Gen Physiol*, 117(1):43–52.
- Kurokawa, J., Motoike, H. K., Rao, J., and Kass, R. S. (2004). Regulatory actions of the A-kinase anchoring protein Yotiao on a heart potassium channel downstream of PKA phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(46):16374–16378.
- Lang, F., Henke, G., Embark, H. M., Waldegger, S., Palmada, M., Bohmer, C., and Vallon, V. (2003). Regulation of channels by the serum and glucocorticoid-inducible

- kinase - implications for transport, excitability and cell proliferation. *Cell Physiol Biochem*, 13(1):41–50.
- Launay, P., Cheng, H., Srivatsan, S., Penner, R., Fleig, A., and Kinet, J.-P. (2004). TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science*, 306(5700):1374–1377.
- Launay, P., Fleig, A., Perraud, A. L., Scharenberg, A. M., Penner, R., and Kinet, J. P. (2002). TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell*, 109(3):397–407.
- Lee, D. H. and Goldberg, A. L. (1996). Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 271(44):27280–27284.
- Leysen, J. E., Niemegeers, C. J., Van Nueten, J. M., and Laduron, P. M. (1982). [³H]Ketanserin (R 41 468), a selective 3H-ligand for serotonin₂ receptor binding sites. Binding properties, brain distribution, and functional role. *Mol Pharmacol*, 21(2):301–314.
- Lin, D.-H., Sterling, H., Wang, Z., Babilonia, E., Yang, B., Dong, K., Hebert, S. C., Giebisch, G., and Wang, W.-H. (2005). ROMK1 channel activity is regulated by monoubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(12):4306–4311.
- Lopes, C. M. B., Rohacs, T., Czirjak, G., Balla, T., Enyedi, P., and Logothetis, D. E. (2005). Pip₂ hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain k⁺ channels. *J Physiol*, 564(Pt 1):117–129.
- Maier, S., Aulbach, F., Simm, A., Lange, V., Langenfeld, H., Behre, H., Kersting, U., Walter, U., and Kirstein, M. (1999). Stimulation of L-type Ca²⁺ current in human atrial myocytes by insulin. *Cardiovasc Res*, 44(2):390–397.
- Martin, G. R., Eglen, R. M., Hamblin, M. W., Hoyer, D., and Yocca, F. (1998). The structure and signalling properties of 5-HT receptors: an endless diversity? *Trends Pharmacol Sci*, 19(1):2–4.
- Marx, S. O., Kurokawa, J., Reiken, S., Motoike, H., D'Armiento, J., Marks, A. R., and Kass, R. S. (2002). Requirement of a macromolecular signaling complex for beta

- adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science*, 295(5554):496–499.
- McCrossan, Z. A., Lewis, A., Panaghie, G., Jordan, P. N., Christini, D. J., Lerner, D. J., and Abbott, G. W. (2003). MinK-related peptide 2 modulates Kv2.1 and Kv3.1 potassium channels in mammalian brain. *J Neurosci*, 23(22):8077–8091.
- Mohler, P. J., Schott, J.-J., Gramolini, A. O., Dilly, K. W., Guatimosim, S., duBell, W. H., Song, L.-S., Haurogne, K., Kyndt, F., Ali, M. E., Rogers, T. B., Lederer, W. J., Escande, D., Le Marec, H., and Bennett, V. (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*, 421(6923):634–639.
- Mukai, Y., Shimokawa, H., Matoba, T., Kandabashi, T., Satoh, S., Hiroki, J., Kaibuchi, K., and Takeshita, A. (2001). Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *FASEB J*, 15(6):1062–1064.
- Murakoshi, H., Shi, G., Scannevin, R. H., and Trimmer, J. S. (1997). Phosphorylation of the Kv2.1 K⁺ channel alters voltage-dependent activation. *Mol Pharmacol*, 52(5):821–828.
- Nerbonne, J. M. (2000). Molecular basis of functional voltage-gated k⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol*, 525 Pt 2:285–298.
- Nerbonne, J. M., Nichols, C. G., Schwarz, T. L., and Escande, D. (2001). Genetic manipulation of cardiac k(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? *Circ Res*, 89(11):944–956.
- Nilius, B., Mahieu, F., Prenen, J., Janssens, A., Owsianik, G., Vennekens, R., and Voets, T. (2006). The Ca²⁺-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *EMBO J*, 25(3):467–478.
- Nilius, B., Prenen, J., Tang, J., Wang, C., Owsianik, G., Janssens, A., Voets, T., and Zhu, M. X. (2005). Regulation of the Ca²⁺ sensitivity of the nonselective cation channel TRPM4. *J Biol Chem*, 280(8):6423–6433.
- Nilius, B., Prenen, J., Voets, T., and Droogmans, G. (2004). Intracellular nucleotides and polyamines inhibit the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4b. *Pflugers Arch*, 448(1):70–75.

- Nilius, B. and Vennekens, R. (2006). From cardiac cation channels to the molecular dissection of the transient receptor potential channel TRPM4. *Pflugers Arch*, 453(3):313–321.
- Ohya, S., Sergeant, G. P., Greenwood, I. A., and Horowitz, B. (2003). Molecular variants of KCNQ channels expressed in murine portal vein myocytes: a role in delayed rectifier current. *Circ Res*, 92(9):1016–1023.
- Ouadid, H., Seguin, J., Dumuis, A., Bockaert, J., and Nargeot, J. (1992). Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine₄ receptors. *Mol Pharmacol*, 41(2):346–351.
- Paine, C. T., Paine, M. L., Luo, W., Okamoto, C. T., Lyngstadaas, S. P., and Snead, M. L. (2000). A tuftelin-interacting protein (TIP39) localizes to the apical secretory pole of mouse ameloblasts. *J Biol Chem*, 275(29):22284–22292.
- Patel, S. P. and Campbell, D. L. (2005). Transient outward potassium current, 'Ito', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol*, 569(Pt 1):7–39.
- Pederson, B. A., Chen, H., Schroeder, J. M., Shou, W., DePaoli-Roach, A. A., and Roach, P. J. (2004). Abnormal cardiac development in the absence of heart glycogen. *Mol Cell Biol*, 24(16):7179–7187.
- Peroz, D., Rodriguez, N., Choveau, F., Baro, I., Merot, J., and Loussouarn, G. (2008). Kv7.1 (kcnq1) properties and channelopathies. *J Physiol*, 586(7):1785–1789.
- Priori, S. G. and Napolitano, C. (2004). Genetics of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death. *Ann N Y Acad Sci*, 1015:96–110.
- Qvigstad, E., Brattelid, T., Sjaastad, I., Andressen, K. W., Krobert, K. A., Birkeland, J. A., Sejersted, O. M., Kaumann, A. J., Skomedal, T., Osnes, J.-B., and Levy, F. O. (2005). Appearance of a ventricular 5-HT₄ receptor-mediated inotropic response to serotonin in heart failure. *Cardiovasc Res*, 65(4):869–878.
- Rajan, S., Plant, L. D., Rabin, M. L., Butler, M. H., and Goldstein, S. A. N. (2005). Sumoylation silences the plasma membrane leak K⁺ channel K2P1. *Cell*, 121(1):37–47.

- Randall, D., Burggren, W., and French, K. (1998). *Animal Physiology*. W. H. Freeman and Company, New York City, USA, 4th edition.
- Richards, R. I., Holman, K., Shen, Y., Kozman, H., Harley, H., Brook, D., and Shaw, D. (1991). Human glandular Kallikrein genes: genetic and physical mapping of the KLK1 locus using a highly polymorphic microsatellite PCR marker. *Genomics*, 11(1):77–82.
- Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Spector, P. S., and Keating, M. T. (1996a). Spectrum of HERG K⁺-channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(5):2208–2212.
- Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L., and Keating, M. T. (1996b). Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature*, 384(6604):80–83.
- Schmidt, D. and Muller, S. (2002). Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5):2872–2877.
- Schwartz, P. J., Spazzolini, C., Crotti, L., Bathen, J., Amlie, J. P., Timothy, K., Shkolnikova, M., Berul, C. I., Bitner-Glindzicz, M., Toivonen, L., Horie, M., Schulze-Bahr, E., and Denjoy, I. (2006). The Jervell and Lange-Nielsen syndrome: natural history, molecular basis, and clinical outcome. *Circulation*, 113(6):783–790.
- Segawa, D., Sjoquist, P. O., Nordlander, M., Wang, Q. D., Gonon, A., and Ryden, L. (1999). Cardiac inotropic vs. chronotropic selectivity of isradipine, nifedipine and clevidipine, a new ultrashort-acting dihydropyridine. *Eur J Pharmacol*, 380(2-3):123–128.
- Shamgar, L., Ma, L., Schmitt, N., Haitin, Y., Peretz, A., Wiener, R., Hirsch, J., Pongs, O., and Attali, B. (2006). Calmodulin is essential for cardiac IKS channel gating and assembly: impaired function in long-QT mutations. *Circ Res*, 98(8):1055–1063.
- Splawski, I., Shen, J., Timothy, K. W., Lehmann, M. H., Priori, S., Robinson, J. L., Moss, A. J., Schwartz, P. J., Towbin, J. A., Vincent, G. M., and Keating, M. T. (2000). Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation*, 102(10):1178–1185.

- Sternick, E. B., Oliva, A., Magalhaes, L. P., Gerken, L. M., Hong, K., Santana, O., Brugada, P., Brugada, J., and Brugada, R. (2006). Familial pseudo-Wolff-Parkinson-White syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 17(7):724–732.
- Strous, G. J. and Govers, R. (1999). The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci*, 112 (Pt 10):1417–1423.
- Torrington, M., Weymar, H. W., van der Merwe, P. L., and Brink, A. J. (1986). Progressive familial heart block. Part I. Extent of the disease. *S Afr Med J*, 70(6):353–355.
- Ulrich, H. D. (2005). Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest. *Trends Cell Biol*, 15(10):525–532.
- Van der Merwe, P. L., Weymar, H. W., Torrington, M., and Brink, A. J. (1988). Progressive familial heart block (type I). A follow-up study after 10 years. *S Afr Med J*, 73(5):275–276.
- Vennekens, R., Olausson, J., Meissner, M., Bloch, W., Mathar, I., Philipp, S. E., Schmitz, F., Weissgerber, P., Nilius, B., Flockerzi, V., and Freichel, M. (2007). Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4. *Nat Immunol*, 8(3):312–320.
- Vicente, M. F., Basilio, A., Cabello, A., and Pelaez, F. (2003). Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin Microbiol Infect*, 9(1):15–32.
- Voets, T. and Nilius, B. (2007). Modulation of TRPs by PIPs. *J Physiol*, 582(Pt 3):939–944.
- Wang, Q., Curran, M. E., Splawski, I., Burn, T. C., Millholland, J. M., VanRaay, T. J., Shen, J., Timothy, K. W., Vincent, G. M., de Jager, T., Schwartz, P. J., Toubin, J. A., Moss, A. J., Atkinson, D. L., Landes, G. M., Connors, T. D., and Keating, M. T. (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet*, 12(1):17–23.
- Warth, R. and Barhanin, J. (2002). The multifaceted phenotype of the knockout mouse for the *kcne1* potassium channel gene. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282(3):R639–48.

- Wible, B. A., Yang, Q., Kuryshev, Y. A., Accili, E. A., and Brown, A. M. (1998). Cloning and expression of a novel K⁺ channel regulatory protein, KChAP. *J Biol Chem*, 273(19):11745–11751.
- Xu, Z., Chau, S. F., Lam, K. H., Chan, H. Y., Ng, T. B., and Au, S. W. N. (2006). Crystal structure of the SENP1 mutant C603S-SUMO complex reveals the hydrolytic mechanism of SUMO-specific protease. *Biochem J*, 398(3):345–352.
- Yang, W. P., Levesque, P. C., Little, W. A., Conder, M. L., Shalaby, F. Y., and Blannar, M. A. (1997). KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(8):4017–4021.
- Zhang, H., Craciun, L. C., Mirshahi, T., Rohacs, T., Lopes, C. M. B., Jin, T., and Logothetis, D. E. (2003). PIP(2) activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron*, 37(6):963–975.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Erregungsleitungssystem im menschlichen Herzen	2
1.2	Rechtsschenkelblock	7
3.1	Patch-Clamp-Meßkonfigurationen	36
4.1	Detektion eines KCNQ1-geleiteten Kaliumstroms	41
4.2	Reversibilität einer Linopirdine-vermittelten Inhibition von Kalium-Auswärtsströmen	43
4.3	Vergleich mit mKCNQ1-Strömen aus heterologer Expression	44
4.4	GV-Kurven von Kaliumauswärtsströmen	45
4.5	Kaliumauswärtsströme in ventrikulären Myozyten adulter <i>KCNQ1</i> ^{-/-} -Mäuse	47
4.6	Stimulation von L-Typ-Ca ²⁺ -Strömen durch Isoproterenol-Applikation	48
4.7	Protokoll zur hormonellen Stimulation ventrikulärer Myozyten	50
4.8	Zu- oder Abnahme von Kaliumauswärtsströmen nach Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren	51
4.9	Darstellung von Kaliumauswärtsströmen in ventrikulären Myozyten nach Serotonin-Applikation	53
4.10	Amplituden-Entwicklung von KCNQ1-vermittelter Stromdichte nach Serotonin-Applikation	55
4.11	Serotonin-Applikation führt zu einer Steigerung der Erregbarkeit von ventrikulären Myozyten von C57Bl/6J-Mäusen	57
4.12	Erregbarkeit ventrikulärer Myozyten von <i>KCNQ1</i> ^{-/-} -Mäusen wird durch Serotonin-Applikation nicht auf das Niveau von C57Bl/6J-Myozyten gesteigert	58
4.13	Hyperpolarisierende Strominjektion führen zu einer Steigerung der Erregbarkeit von ventrikulären Myozyten von <i>KCNQ1</i> ^{-/-} -Mäusen	61

4.14	Identifikation des Genlokus für PFHBI	64
4.15	Kardial exprimierte Gene im Bereich des Lokus für PFHBI	65
4.16	Sequenzierung von <i>TRPM4b</i> in PFHBI-Patienten	66
4.17	Glu 7 liegt in einer hochkonservierten Region von TRPM4b	67
4.18	Expression von TRPM4b ^{wt} - und TRPM4b ^{E7K} -Kanälen in HEK293-Zellen	68
4.19	Messung der Stromdichte von TRPM4b ^{wt} - und TRPM4b ^{E7K} -Kanäle exprimierender HEK293-Zellen	69
4.20	Bestimmung der Ca ²⁺ -Abhängigkeit von TRPM4b ^{wt} - und TRPM4b ^{E7K} -Kanälen	70
4.21	Inhibition von TRPM4b ^{wt} - und TRPM4b ^{E7K} -Kanälen durch AMP-PNP-Applikation	72
4.22	Stimulation von TRPM4b-Kanälen durch PtdIns(4,5)P ₂	73
4.23	Einzelkanalmessungen von TRPM4b ^{wt} - und TRPM4b ^{E7K} -Kanälen	74
4.24	Einzelkanalleitfähigkeiten und Offenwahrscheinlichkeiten von TRPM4b ^{wt} - und TRPM4b ^{E7K} -Kanälen	75
4.25	Charakterisierung von Myc-getaggten TRPM4b-Kanälen	76
4.26	Analyse der Oberflächendichte von TRPM4b-Proteinen mittels FACS	77
4.27	Elektrophysiologische Untersuchung von FLAG-getaggten TRPM4b-Kanälen	78
4.28	Nachweis von TRPM4b-Kanälen mittels Western Blot	79
4.29	Immunhistochemische Analyse der Expression von TRPM4b-Kanälen	80
4.30	Inhibition des Proteasoms erhöht die Oberflächenexpression von TRPM4b ^{wt} -Kanälen	81
4.31	Inhibition von Endozytose beeinflusst TRPM4b vermittelte Stromdichte	82
4.32	Protein Kinase A - Stimulation führt nicht zu einer Erhöhung der Stromdichte von TRPM4b ^{wt} -Kanälen	84
4.33	SUMOylierung beeinflusst durch TRPM4b-Kanäle vermittelte Stromdichte	86
4.34	KCNH2-vermittelte Stromdichte ist insensitiv gegen Koexpression mit SENP1	87
4.35	SUMOylierungsstatus von TRPM4b-Kanälen	88
4.36	Auswirkung von SUMOylierung/DeSUMOylierung auf TRPM4b-Oberflächenexpression	89

Abbildungsverzeichnis

5.1	Modell zur Regulation der Oberflächenexpression kardialer Ionenkanäle	98
B.1	pGEM-mKCNQ1	119
B.2	pcDNA3-TRPM4b	120
B.3	pcDNA3-TRPM4b-N-FLAG	121
B.4	pcDNA3-TRPM4b-C-FLAG	122
B.5	pcDNA3-TRPM4b-Myc	123

A Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser
°C	Grad Celsius
× g	relative Erdbeschleunigung
μ	micro (10 ⁻⁶)
4-AP	4-Aminopyridin
APD	<i>action potential duration</i>
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAN	<i>calcium-activated non-selective cation-channel</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
C-Terminus	Carboxyterminus einer Proteinkette
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
DA	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
ddNTP	2',3'-Dideoxyribonukleotid-5'-Trisphosphat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-Aminoethylether)-Tetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>

A Abkürzungsverzeichnis

ENaC	<i>epithelial sodium channel</i>
<i>et al.</i>	et alii (lat. und andere Mitarbeiter)
<i>f.c.</i>	<i>final concentration</i> , Endkonzentration
g	Gramm
GΩ	Gigaohm
h	human, Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperzino)-ethansulfonsäure
TRPM4b	<i>human TRPM4b</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
ISH	<i>In situ</i> Hybridisierung
J-LN	Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom
k	kilo (10^3)
K ⁺	Kaliumionen
kb	Kilobasenpaare
KCNQ1	<i>Kv-channel of the KCNQ1-family Member 1</i>
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	kilo Dalton
Kv	<i>voltage-gated potassium channel</i>
l	Liter
LB	Luria Bertani
Luminol	5-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophthalazin-1,4-dion
m	milli (10^{-3})
mm Hg	Druck in mm Quecksilbersäule, 750 mm Hg = 1 bar
M	molar
MB	Mega-Basen
MEM	<i>minimal essential medium</i> , Minimalmedium
min	Minute
mKCNQ1	<i>murine KCNQ1</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	nano (10^{-9})
Nt	Nukleotid
N-Terminus	Aminoterminus einer Proteinkette
OA	<i>okadaic acid</i>
PBS	<i>phosphat-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung

A Abkürzungsverzeichnis

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFA	para-Formaldehyd
PFHBI	<i>progressive familial heart block type I</i>
PtdIns(4,5) ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROMK1	<i>Potassium channel, inwardly rectifying subfamily J member 1</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
R-W	Romano-Ward-Syndrom
sec	Sekunde
s.c.	subcutan
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
s.e.m.	<i>standard error of the mean</i>
sog.	sogenannte/n
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related MOdifier</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA
TEA	Tetraethylammoniumchlorid
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
TRPM4b	<i>Transient Receptor Potential Channel (Melastatin Family Member 4b)</i>
U	Unit, Enzymeinheit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

B Klonarten

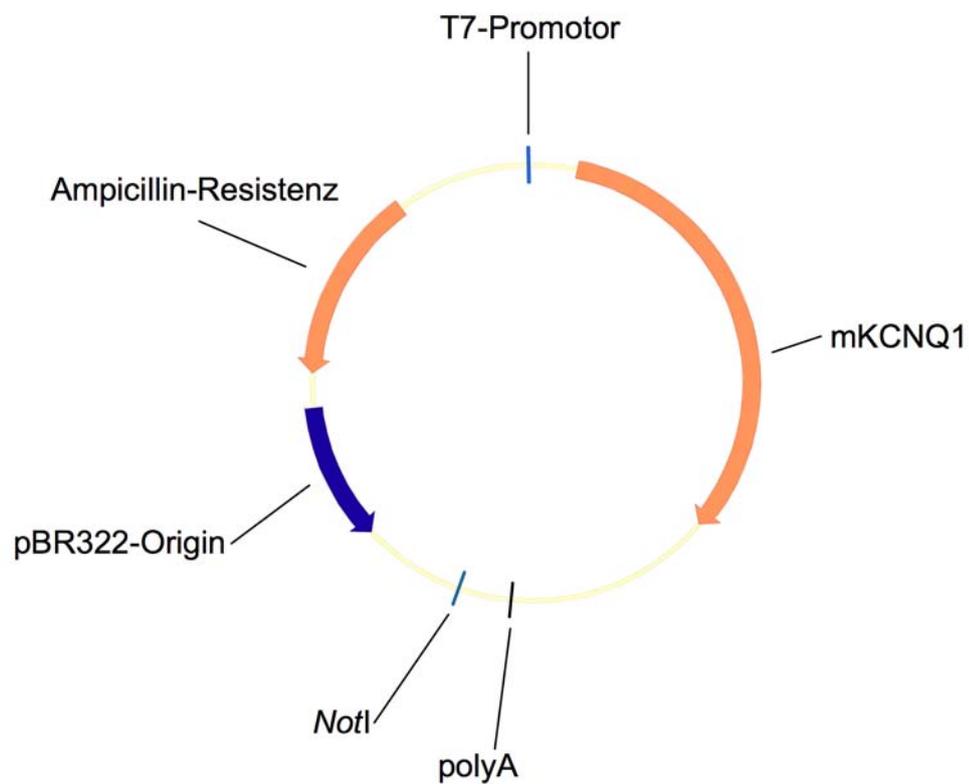


Abbildung B.1: **pGEM-mKCNQ1 (6075 bp)** Das Plasmid pGEM-mKCNQ1 diente zur Synthese von mKCNQ1-cRNA, welche nachfolgend in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert wurde. In Vorbereitung der *in vitro* Transkription wurde das Plasmid mittels *NotI* linearisiert.

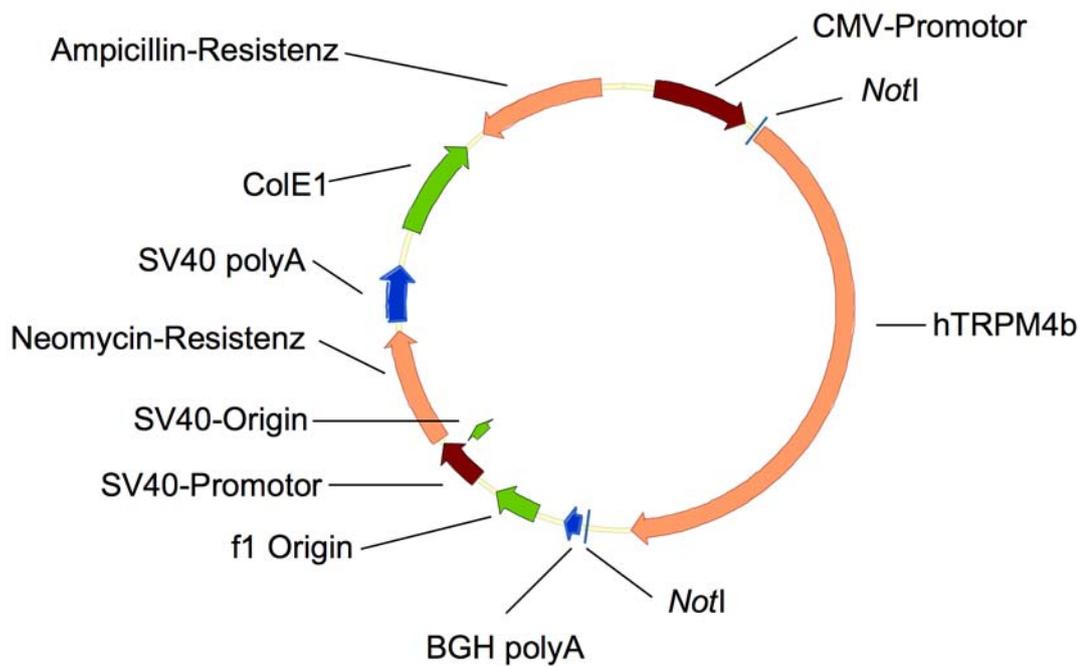


Abbildung B.2: **pcDNA3-TRPM4b (9384 bp)** Durch Behandlung mittels *NotI* wurde TRPM4b-cDNA am 5' sowie 3'-Ende restringiert. Der Vektor pcDNA3 wurde ebenfalls mit *NotI* sowie *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* behandelt und anschließend eine Ligation der TRPM4b-cDNA in den vorbereiteten Vektor durchgeführt. Die Punktmutation in der kodierenden Sequenz von TRPM4b zur Herstellung von TRPM4b-E7K wurde anschließend mittels PCR über die Oligonukleotide TRPM4b-mut-for und TRPM4b-mut-rev eingeführt.

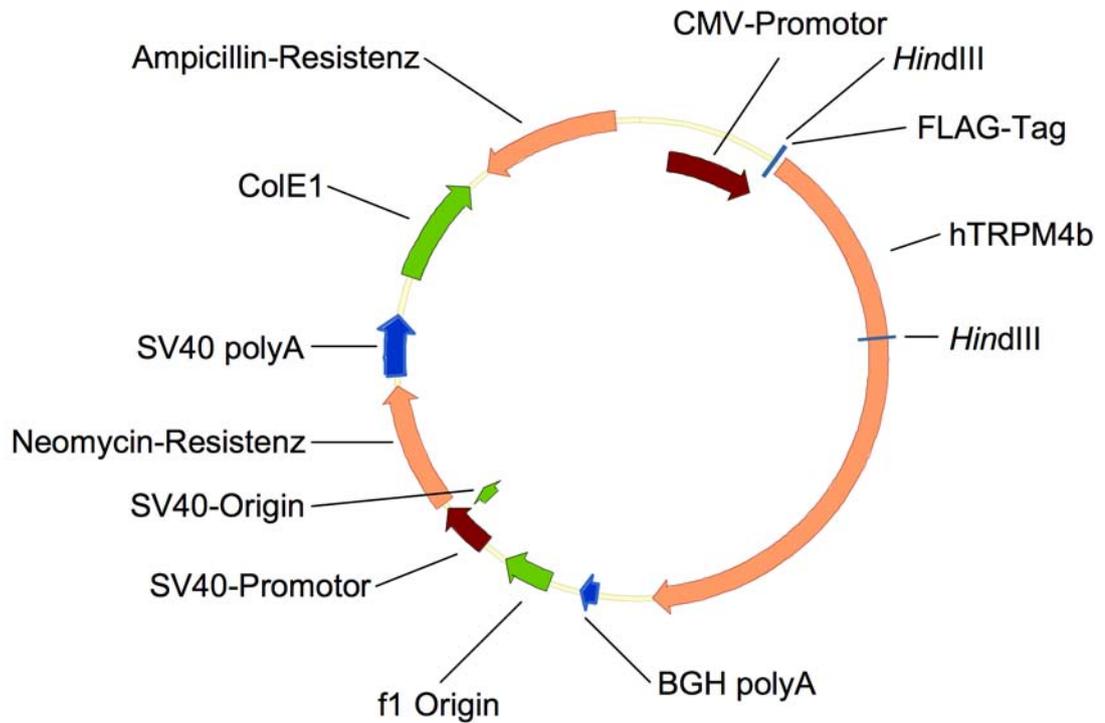


Abbildung B.3: **pcDNA3-TRPM4b-N-FLAG (9329 bp)** Das Plasmid pcDNA3-TRPM4b diente als Matrize zur Einführung eines N-Terminales FLAG-Tags in die kodierende Sequenz von TRPM4b mittels der Oligonukleotide TRPM4b-N-FLAG-for sowie TRPM4b-N-FLAG-rev. Das gewonnene PCR-Produkt wurde nachfolgend mittels *HindIII* restrigiert. Das Plasmid pcDNA3-TRPM4b wurde ebenfalls mittels *HindIII* und *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* behandelt und im Anschluß das hergestellte PCR-Fragment in den vorbereiteten Vektor ligiert. Im Falle von TRPM4b-E7K diente TRPM4b-E7K-N-FLAG-for als 5'-Oligonukleotid.

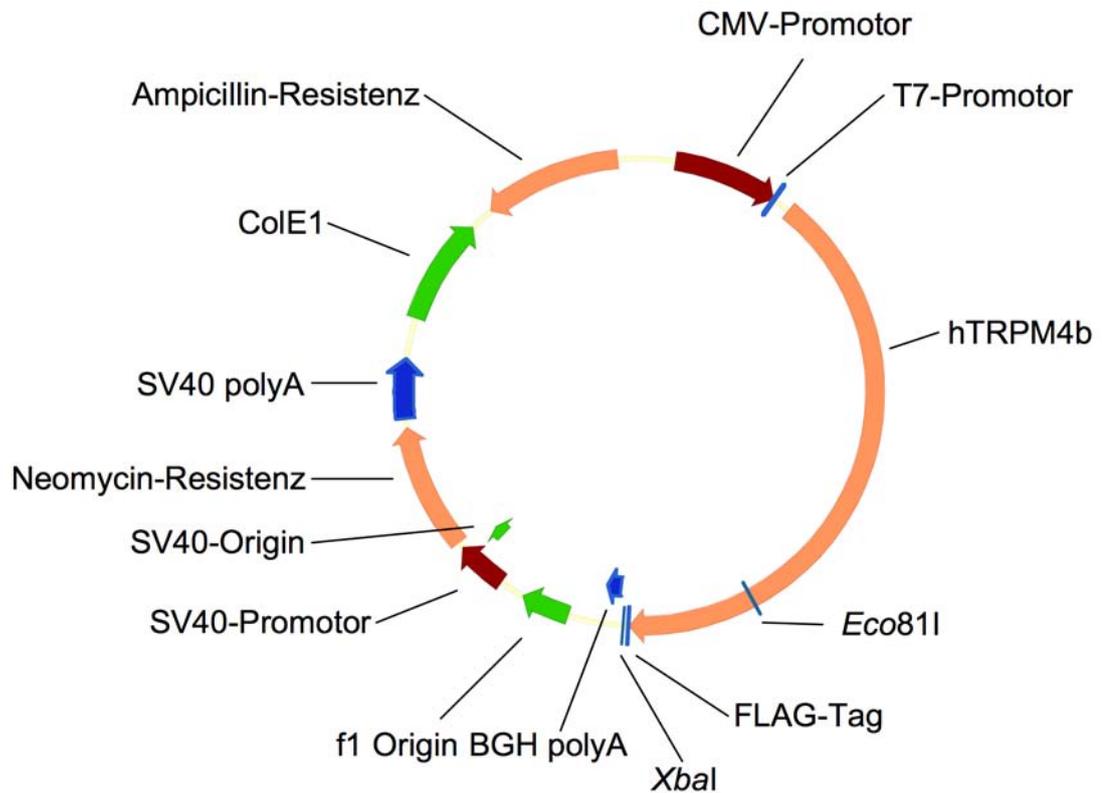


Abbildung B.4: **pcDNA3-TRPM4b-C-FLAG (9093 bp)** Das Plasmid pcDNA3-TRPM4b diente als Matrize zur Einführung eines C-Terminales FLAG-Tags in die kodierende Sequenz von TRPM4b mittels der Oligonukleotide TRPM4b-C-FLAG-for sowie TRPM4b-C-FLAG-rev. Das gewonnene PCR-Produkt wurde nachfolgend mittels *Eco81I* und *XbaI* restringiert. Die Plasmide pcDNA3-TRPM4b bzw. pcDNA3-TRPM4b-E7K wurden ebenfalls mittels *Eco81I*, *XbaI* und *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* behandelt und im Anschluß das hergestellte PCR-Fragment in die vorbereiteten Vektoren ligiert.

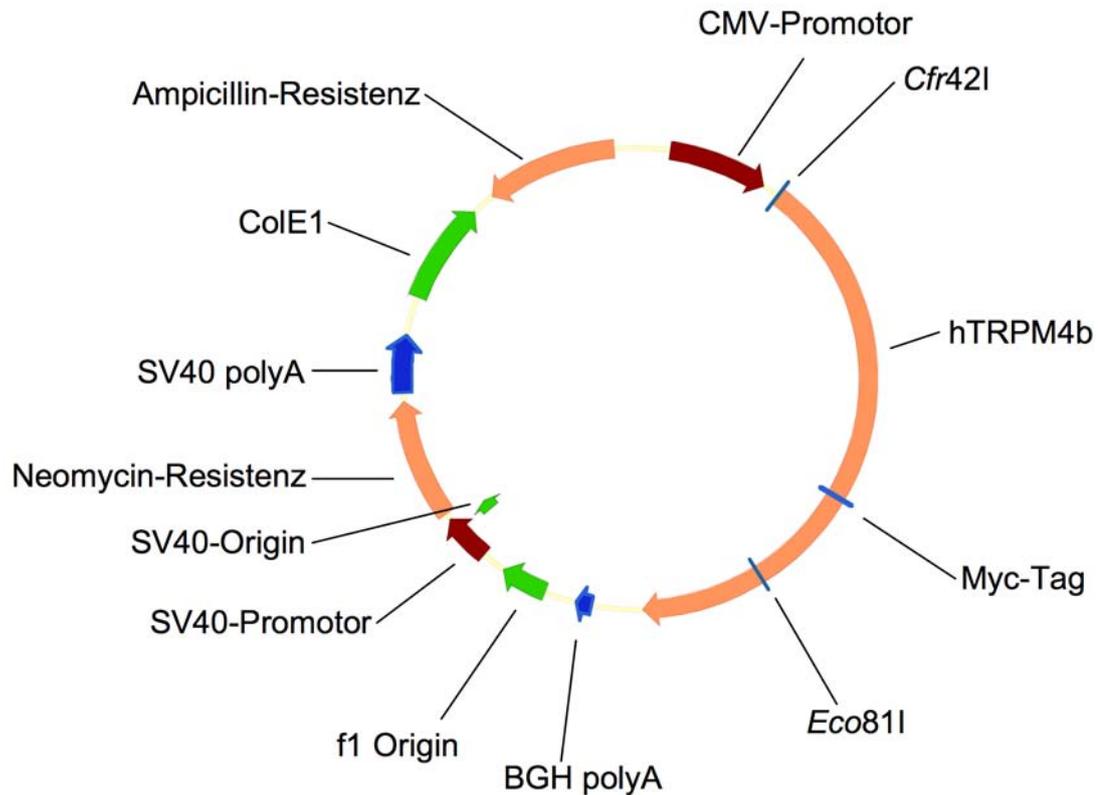


Abbildung B.5: **pcDNA3-TRPM4b-Myc (9414 bp)** Das Plasmid pcDNA3-TRPM4b diente als Matrize für eine Overlap-PCR zur Einführung eines Myc-Tags in die kodierende Sequenz von TRPM4b mittels der Oligonukleotide TRPM4b-*Cfr42I*-for, TRPM4b-*Eco81I*-rev, TRPM4b-Myc-for sowie TRPM4b-Myc-rev. Das generierte PCR-Produkt wurde nachfolgend mittels *Cfr42I* und *Eco81I* restringiert. Die Plasmide pcDNA3-TRPM4b bzw. pcDNA3-TRPM4b-E7K wurden mittels *Cfr42I*, *Eco81I* und *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* behandelt und im Anschluß das hergestellte PCR-Fragment in die vorbereiteten Vektoren ligiert.

C Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz	Beschreibung
Neo-for	5'-CGCTTCCTCGTGCTTTACG-3'	<i>KCNQ1</i> ^{-/-} -Genotypisierung
KO-for	5'-CCAGGAGTGGGTGGTTCTAC-3'	<i>KCNQ1</i> ^{-/-} -Genotypisierung
KO-rev	5'-GCCAGCACTAAAGATCTTGC-3'	<i>KCNQ1</i> ^{-/-} -Genotypisierung
TRPM4b-mut-for	5'-GCCGGAGAAGAAGCAGAGCTG GATCC-3'	Generierung von TRPM4b-E7K
TRPM4b-mut-rev	5'-GGATCCAGCTCTGCTTCTTCTC CGGC-3'	Generierung von TRPM4b-E7K
TRPM4b-N-FLAG-for	5'-GGTAAAGCTTCAGCATGGATTA CAAGGACGACGATGACAAGGTG GTGCCGGAGAAGGAGCAGCGC-3'	TRPM4b-wt-N-FLAG
TRPM4b-E7K-N-FLAG-for	5'-GGTAAAGCTTCAGCATGGATT ACAAGGACGACGATGACAAGGT GGTGCCGGAGAAGAAGCAGAGC-3'	TRPM4b-E7K-N-FLAG
TRPM4b-N-FLAG-rev	5'-ACTCAGGCCGGTCATTCAGC AGG-3'	TRPM4b-wt/E7K-N-FLAG
TRPM4b-C-FLAG-for	5'-TCTTCCTCGGCGTGGCTGG-3'	TRPM4b-wt/E7K-C-FLAG
TRPM4b-C-FLAG-rev	5'-TCAGTCTAGAGGGCTCACTTGT CATCGTCGTCCTTGTAATCGTC TTTGGACCCAGGCAGGTCAGG-3'	TRPM4b-wt/E7K-C-FLAG
TRPM4b- <i>Cfr42I</i> -for	5'-CCAAGGGCTCGTTCCTGCG AG-3'	TRPM4b-wt/E7K-Myc
TRPM4b- <i>Eco81</i> -rev	5'-GGATACTTGGGAAGTCACTGTC CCGTG-3'	TRPM4b-wt/E7K-Myc
TRPM4b-Myc-for	5'-GAACAGAACTGATTAGCGAAG AAGATCTGGAGTTTGACATGGAT AGTGTCATTAATGG-3'	TRPM4b-wt/E7K-Myc
TRPM4b-Myc-rev	5'-CAGATCTTCTTCGCTAATCAGT TTCTGTTCTAGCTCCTCCCGTGT GGGCTCC-3'	TRPM4b-wt/E7K-Myc

Fortsetzung auf der nächsten Seite

C Oligonukleotide

Tabelle C.1 – Fortsetzung

Oligonukleotid	Sequenz	Beschreibung
TRPM4b-1	5'-TTTCCTCCGGCTCTCTGACCG-3'	TRPM4b-Sequenzierung
TRPM4b-2	5'-ACTCGGCCTTCTTCCTGGTGG-3'	TRPM4b-Sequenzierung
TRPM4b-3	5'-GGATGGGTCTGAGGAATTCG-3'	TRPM4b-Sequenzierung
TRPM4b-4	5'-TGTGCTGAGGATGCTGCTGG-3'	TRPM4b-Sequenzierung
TRPM4b-5	5'-AGTGCTATCGCAGCAGTGAGG-3'	TRPM4b-Sequenzierung
TRPM4b-6	5'-CTGTTCCCTGCTGCTTTTCTGC-3'	TRPM4b-Sequenzierung
TRPM4b-7	5'-ATCGTGAGCAAGATGATGAAGG-3'	TRPM4b-Sequenzierung
TRPM4b-8	5'-CATTCGGCAAAGTACAGGGC-3'	TRPM4b-Sequenzierung
TRPM4b-9	5'-ACGAACAGCGCCTGAAAGTGC-3'	TRPM4b-Sequenzierung
TRPM4b-10	5'-TAATACGACTCACTACTAGGG-3'	TRPM4b-Sequenzierung

D Gefahrstoffliste

Tabelle D.1: Gefahrstoffliste

Gefahrstoff	Gefahrenklasse	R-Sätze	S-Sätze
4-AP	T+,N	28-36/37/38-51/53	26-36/37/39-45-60-61
AMP-PNP			22-24/25
Bromphenolblau			22-24/25
<i>p</i> -Coumarsäure	Xi	36/37/38	26-36
CaCl ₂	Xi	36	22-24
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
CsOH	C	22-35	26-36/37/39-45
DMSO	Xi	36/37/38	23-26-36
DTT	Xn	22-36/37/38	26-36
EDTA	Xi	36-52/53	26-61
EGTA			22-24/25
Ethanol	F	11	7-16
Ethidiumbromid	T+	22-26-36/37/38-68	26-28-36/37-45
HCl (36,5-38,0 %)	C	34-37	26-36/37/39-45
HCl (1 M)	Xi	36/37/38	26
HEPES	Xi	36/37/38	26-36
H ₂ O ₂	Xn	22-41	26-39
KCl			22-24/25
K ₂ HPO ₄			22-24/25
KOH (Pellets)	C	22-35	26-36/37/39-45
Luminol	Xi	36/37/38	26-36/37
β -Mercaptoethanol	T,N	20/22-24-34-51/53	26-36/37/39-45-61
Methanol	F,T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
NaOH (Pellets)	C	35	26-37/39-45
Nifedipine	Xn	22	26-36
NP 40	Xi	37-41	26-39
Penicillin G	Xn	42/43	22-36/37-45
Phenol	T,C	23/24/25-34-48/20/2122-68	24/25-26-28-36/37/39-45

Fortsetzung auf der nächsten Seite

D Gefahrstoffliste

Tabelle D.1 – Fortsetzung

Gefahrstoff	Gefahrenklasse	R-Sätze	S-Sätze
SDS	F,Xn	11-21/22-36/37/38	26-36/37
Streptomycin	Xn	22	
TEA	Xn	22-36/37/38	26-36
Triton X-100	Xn,N	22-41-51/53	26-36/39-61

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Olaf Pongs gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des interessanten Themas, seine engagierte Betreuung während der gesamten Dauer meiner Promotion, seine ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft in allen Fragen sowie für das stete Interesse am Gelingen dieser Arbeit.

Für die Bereitschaft, diese Arbeit als externe Promotion zu betreuen, danke ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn.

Ich danke Susanne Conrad und Andreas Süllau für die umsichtige Betreuung meiner Mäuse in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Neurale Signalverarbeitung danke ich für ihre immer vorhandene Hilfe bei experimentellen Problemen sowie für die tolle Arbeitsatmosphäre, die das Arbeiten zu allen Zeiten immer wieder mit Spaß und Freude erfüllt hat.

Den Mitgliedern der DFG Forschergruppe 604 am UKE bin ich zu Dank für ihre Diskussionsbereitschaft sowie ihre hilfreichen Anmerkungen zu meinen Forschungsergebnissen verpflichtet.

Bedanken möchte ich mich vor allem auch bei meinen Eltern für ihre große Unterstützung während der gesamten Promotion.

Zu guter Letzt danke ich all meinen Freunden, die sich während der gesamten Zeit der Doktorarbeit immer wieder geduldig meiner Laborsorgen angenommen haben!