Molekulare Korrelate repolarisierender K⁺-Ströme in Mäusemyozyten und ihre pathophysiologische Umstrukturierung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Chemie, Fakultät für

Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Kamila Szlachta

Hamburg 2010

1. Gutachterin: Prof. Dr. D. Dartsch

2. Gutachter: PD Dr. R. Bähring

Datum der Disputation: 25.06.2010

	Inha	altsverzeichnis	1
	Abs	tract	9
	Einl	eitung	. 11
4.	1.	Ionenströme während des Herzaktionspotentials	. 11
4.2	2.	Kaliumselektive Kanäle	. 12
4.3	3.	Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv-Kanäle)	. 14
4.4	4.	Die Kv4-Unterfamilie	. 17
4.	5.	Akzessorische Untereinheiten von Kv4-Kanälen	. 18
	4.5.	1. KChIPs	. 18
	4.5.	2. DPPs	. 20
4.0	6.	Kardiale Pathologien	. 21
4.	7.	Zielsetzung	. 22
	Ma	terial	. 23
5.	1.	Verbrauchsmaterial	. 23
5.2	2.	Chemikalien	. 24
5.3	3.	Geräte	. 26
5.4	4.	Kits	. 27
5.	5.	Enzyme	. 28
5.0	6.	Allgemeine Puffer	. 28
	5.6.	1. Puffer für RNA-Isolierung	. 28
	5.6.	2. Puffer für Agarosegele	. 28
	4. 4. 4. 4. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5. 5.	Zus Abs Einl 4.1. 4.2. 4.3. 4.4. 4.5. 4.5. 4.6. 4.7. Ma 5.1. 5.2. 5.3. 5.4. 5.5. 5.6. 5.6. 5.6.	Zusammenfassung

5.6	5.5. Puffer für Protein-Isolation	. 29
5.6	5.6. Puffer für Gelelektrophorese	. 29
5.6	5.7. Puffer für Western Blot	. 29
5.6	5.8. Lösungen für die Isolation von Myozyten	. 30
5.6	5.9. Lösungen für die Immunfluoreszenz	. 30
5.6	5.10. Lösungen für die Elektrophysiologie	. 30
5.7.	Nährmedien	. 31
5.7	7.1. Medien für Bakterienkultur	. 31
5.7	7.2. CHO-Medium	. 31
5.7	7.3. Myozyten-Medium	. 31
5.8.	Sonstige Reagenzien	. 31
5.9.	Bakterienstämme	. 32
5.10.	Zellinien	. 32
5.11.	Antikörper	. 32
5.1	1.1. Primärantikörper für Westernblot	. 32
5.1	1.2. Sekundärantikörper für Westernblot	. 32
5.1	1.3. Primärantikörper für Immunfluoreszenz	. 33
5.1	1.4. Sekundärantikörper für Immunofluoreszenz	. 33
5.1	L1.5. Reagenzien für Fluoreszenzfärbung	. 33
5.12.	Primer	. 33
5.1	L2.1. qRT-PCR	. 33
5.13.	Größenstandards	. 34
5.14.	Vektoren	. 34
5.15.	Klone	. 34
5.1	L5.1. cDNA Klone	. 34
5.1	L5.2. BAC-Klone	. 35

	5.16.	Computerprogramme	35
6.	Me	ethoden	37
	6.1.	Molekularbiologische Methoden	37
	6.1	1. Herstellung kompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)	37
	6.1	2. Transformation von Bakterien	37
	6.1	3. Isolation von DNA aus Bakterienkultur	37
	6	5.1.3.1. Isolation von DNA im kleinem Maßstab (Minipräp)	37
	6	5.1.3.2. Isolation von DNA im großen Maßstab	38
	6.1	.4. DNA-Quantifizierung	38
	6.1	5. Agarose-Gelelektrophorese	38
	6.1	6. Sequenzierung	38
	6.1	.7. DNA-Modifikationen	39
	6	5.1.7.1. Restriktionshydrolyse	39
	6	.1.7.2. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	39
	6	.1.7.3. Ligation von DNA-Fragmenten	39
	6	.1.7.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
	6.1	.8. In-vitro-Mutagenese	40
	6.1	.9. RNA-Aufreinigung	41
	6.1	10. Quantifizierung und Qualitätskontrolle von RNA	42
	6.1	.11. Reverse Transkription	42
	6.1	.12. Quantitative PCR (Cyber Green)	43
	6.1	.13. Quantitative PCR (Taqman)	44
	6.1	.14. <i>In-vitro</i> Transkription	45
	6.2.	Proteinbiochemische Methoden	46
	6.2	.1. Herstellung von Proteinlysaten	46
	6.2	2. Herstellung von Polyacrylamid-Gelen	46
	6.2	.3. Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)	47

6.2.4. Semi-Dry Western Blot	47
6.2.5. Immunologischer Nachweis	47
6.3. Zellbiologische Arbeiten	48
6.3.1. Routinehaltung von immortalisierten Zellen	48
6.3.2. Transfektion von immortalisierten Zellen	48
6.3.3. Präparation und Injektion von Xenopus-Oozyten	48
6.3.4. Isolation von Kardiomyozyten aus der Maus	49
6.3.5. Kultivierung von Kardiomyozyten	49
6.4. Angiotensin II Behandlung	50
6.5. Immunzytochemische Färbung	50
6.5.1. Aktin-Färbung	50
6.5.2. Färbung mit Di-8-Anneps	51
6.6. Elektrophysiologie	51
6.6.1. Patch-Clamp-Messung	51
6.6.2. Ausstattung des Patch-Clamp Messtandes	53
6.6.3. Datenerfassung	53
6.6.4. Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	53
6.6.4.1. Ausstattung des Messplatzes	54
6.6.5. Verwendete Stimmulationsprotokolle und Auswertung	54
6.6.5.1. Testpuls	54
6.6.5.2. Erholung von der Inaktivierung (Recovery)	55
6.7. Tierhaltung	55
6.8. Statistik	56
7. Ergebnisse	57
7.1. Molekulare Korrelate repolarisierender Kaliumströme im normal hypertrophierten Mäuseherzen	
7.1.1. mRNA-Expression von Jonenkanälen im Epikard des linken Ventrikels	57

	7.1.2. Subzelluläre Lokalisation von Kv4.2 und KChIP2 in Myozyten	58	
	7.1.3. Ang II-Modell der linksventrikulären Herzhypertrophie	60	
	7.1.3.1. Hypertrophieparameter	. 60	
	7.1.3.2. Hämodynamische Parameter und Reninwerte	61	
	7.1.3.3. K ⁺ -Ströme in normalen und hypertrophierten linksventrikulä Mäusemyozyten		
	7.1.3.4. Modulation der Gen- und Proteinexpression molekularer Stromkomponenten im Ang II Hypertrophiemodell		
7.	.2. Bindungsdefizienz von Kv4.2-Kanälen für akzessorische Untereinheiten	. 70	
	7.2.1. KChIP-Bindungsdefizienz	.70	
	7.2.2. DPP-Bindungsdefizienz	.73	
7.	.3. Der potentielle I _{to} -Aktivator NS5806	. 75	
	7.3.1. Wirkung von NS5806 auf Kaliumkanäle in <i>Xenopus</i> -Oozyten	.76	
	7.3.2. Wirkung von NS5806 auf K ⁺ -Ströme in linksventrikulären Myozyten von Wildt Mäusen	• •	
	7.3.3. Wirkung von NS5806 auf K ⁺ -Ströme in linksventrikulären Myozyten von KChI Knockout Mäusen		
	7.3.4. Wirkung von NS5806 auf die subzelluläre Expression von Kv4.2 in lin ventrikulären Mäusemyozyten		
8.	Diskussion	. 97	
8.	.1. Ionenkanal-Remodelling in Herzhypertrophiemodellen	. 97	
8.	.2. Physiologische Rolle der akzessorischen β-Untereinheiten von Kv4-Kanälen 1	100	
8.	.3. Pharmakologische Beeinflussung von kardialen Ionenkanälen 1	L04	
9.	Literaturverzeichnis	L11	
10.	Abkürzungsverzeichnis1	L21	
11.	Tabellen	125	
12.	Gefahrstoffe	L27	
13.	13. Plasmidkarten		
14.	Eidesstattliche Versicherung	l31	

15.	Danksagung	. 132
16.	Lebenslauf	. 133
17.	Publikationen	. 134

2. Zusammenfassung

In erregbaren Membranen kontrollieren spannungsgesteuerte K⁺ (Kv)-Kanäle die Entstehung und den zeitlichen Verlauf von Aktionspotentialen. Dabei spielen schnell aktivierende und inaktivierende A-Typ-Kanäle der Kv4-Unterfamilie eine wichtige Rolle. Im Herzen vermitteln sie die schnelle Komponente eines transienten Auswärtsstroms (Ito). Native Kv4-Kanalkomplexe setzen sich aus Kv4-α-Untereinheiten und akzessorischen β-Untereinheiten, den Kv-Kanal-Interagierenden Proteinen (KChIPs) und den Dipeptidyl-Aminopeptidase-verwandten (DPPs) zusammen. Diese β-Untereinheiten Proteinen sind in der Lage elektrophysiologischen Eigenschaften und die funktionelle Oberflächenexpression von Kv4-Kanälen zu modifizieren. In der vorliegenden Arbeit sollten die molekularen Kontrollmechanismen nativer Kv4-vermittelter A-Typ-Ströme in ventrikulären Mäusemyozyten unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen untersucht werden.

Basierend auf früheren Interaktionsstudien von Kv4.2 und KChIP2 sollte ein Kv4.2A14K Knock-in Mausmodell für eine KChIP2-Bindungsdefizienz generiert werden. Ein derartiges Mausmodell erlaubt die Untersuchung einer Interaktion *in vivo*, ohne Überexpressionsartefakte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Targetingvektor für das Knock-in Mausmodell erstellt, das zukünftig in embryonale Stammzellen eingebracht werden kann. Die molekularen Determinanten einer Interaktion von Kv4.2 und DPP konnten nicht endgültig aufgeklärt werden. Es wurde eine Mutation gefunden (Kv4.2A249F), bei der die Potentierung der Stromdichte durch DPP stark vermindert war. Diese Aminosäureposition könnte bei der Interaktion eine Rolle spielen.

Ein erfolgreiches Hypertrophiemodell wurde mittels 14-tägiger Angiotensin II Behandlung induziert. In hypertrophierten Kardiomyozyten des linken Epikards war, im Gegensatz zu früherern Befunden in anderen Modellen, die I_{to}-Amplitude im Vergleich zur Kontrolle nicht niedriger. Während die Proteinexpression von Kv4.2 und KChIP2 in diesem Zusammenhang ebenfalls nicht niedriger war, wurde eine geringere mRNA-Expression von Kv4.2 bei unveränderter KChIP2 mRNA-Expression beobachtet. Diese Ergebnisse legen eine Regulation der physiologischen I_{to}-Dichte in kardialen Mäusemyozyten durch KChIP2 nahe. Diese These

Zusammenfassung

wurde durch die geringe I_{to} -Dichte in KChIP2-Knockout Mäusen bekräftigt. Allerdings scheint KChIP2 für die Ausbildung von funktionellem I_{to} nicht essentiell zu sein.

Weiterhin sollte eine mögliche Modulation des Kv4.2-vermittelten I_{to} in murinen Kardiomyozyten durch die in Hundemyozyten als I_{to}-Aktivator charakterisierte Substanz NS5806 untersucht werden. In linksventrikulären Mäusemyozyten bewirkte NS5806 eine Reduktion der Gesamtkaliumstrom-Amplitude und führte zu keiner Potentierung der I_{to}-Amplitude. Die Kinetik der I_{to}-Inaktivierung sowie der Erholung von der Inaktivierung wurden durch NS5806 stark modifiziert. Allerdings waren die Effekte von NS5806 auf den I_{to} und weitere Stromkomponenten sehr heterogen und sind daher mit äußerster Vorsicht zu bewerten.

3. Abstract

In excitable membranes the generation and the time course of action potentials are controlled by voltage-dependent K^+ (Kv) channels. In this process rapidly activating and inactivating A-type potassium channels belonging to the Kv4 subfamily play a central role. In the heart they mediate the fast component of a transient outward current (I_{to}). Native Kv4-channel-complexes consist of Kv4- α -subunits and accessory β -subunits, Kv-channel-interacting proteins (KChIPs) and the dipetidyl-aminopeptidase-related proteins (DPPs). These β -subunits are able to modify the electrophysiological properties and the functional surface expression of Kv4-chanels. In this thesis the molecular control mechanism of native Kv4-mediated A-type-currents in murine ventricular myocytes under physiological and pathophysiological conditions were investigated.

Based on former interaction studies of Kv4.2 and KChIP2 a Kv4.2A14K knock-in mouse model for a loss of KChIP2 binding should be generated. Such a model permits the investigation of an interaction *in vivo* and without artefacts of protein overexpression. The targeting vector for the knock-in model was cloned in this work. In the future it can be introduced into embryonic stem cells. The molecular determinants of an interacting between Kv4.2 and DPP could not be clarified. One mutation was found (Kv4.2A249F), in which the potentiation of the current-density by DPP was strongly reduced. This amino acid may play a role in the interaction.

A successful hypertrophy model was induced via 14 days of Angiotensin II treatment. In hypertrophied cardiomyocytes of the left epicard the I_{to}-amplitude was not diminished, contrary to what is described for other models. While the protein expression of Kv.2 and KChIP2 was not diminished as well in this context, a lower mRNA-expression of Kv4.2 together with an unchanged KChIP2 mRNA-expression were observed. These results suggest that the physiological I_{to}-density in cardiac myocytes of mice is regulated by KChIP2. This assumption corroborated by a low I_{to}-density in KChIP2-Knockout mice. However, KChIP2 seems to be not absolutely essential for the generation of functional I_{to}.

A possible modulation of the Kv4.2-mediated I_{to} should be analysed in murine cardiomyocytes by the substance NS5806, which was characterized as an I_{to} -activator in

Abstract

canine myocytes. In left ventricular myocytes NS5806 caused a reduction of the K^+ -current-amplitude but did not cause a potentiation of the I_{to} -amplitude. The kinetics of inactivation and recovery were strongly modified by NS5806.

However, the effects of NS5806 on the I_{to} and other current components were very heterogeneous and have to be interpreted with great caution.

4. Einleitung

Ionenkanäle sind membrandurchspannende, porenbildende Proteinkomplexe, die weitestgehend selektiv den Durchgang geladener anorganischer Ionen durch die Zellmembran ermöglichen. Der Transport findet entlang des Konzentrationsgradienten, sowie unter dem Einfluss des Membranpotentials statt (elektrochemischer Gradient). Somit sind sie elementar an der Steuerung der elektrischen Erregbarkeit einer Zelle beteiligt und grundlegend in viele biologische Prozesse, wie die neuronale Signaltransduktion, die Osmoregulation, die Skelettmuskelkontraktion und die Erregung des Myokards, involviert. Entsprechend ihrer Selektivität für bestimmte Ionen wird unter anderem zwischen Kalium-, Natrium-, Calcium- und Chloridkanälen unterschieden, die jeweils verschiedene Öffnungs- und Schließmuster aufweisen.

4.1. Ionenströme während des Herzaktionspotentials

Eine räumlich und zeitlich genau abgestimmte Kopplung zwischen Erregung und Kontraktion des Myokards ist essentiell für die physiologische Pumpfunktion des Herzens. Entstehung und Zeitverlauf der kardialen Erregung werden durch eine Änderung des Membranpotentials repräsentiert. Die Membranpotentialänderungen während jedes einzelnen Kontraktionszyklus werden durch zahlreiche Ionenströme geregelt.

Das Aktionspotential von Herzmuskelzellen im Arbeitsmyokard kann in fünf Phasen eingeteilt werden (Abb. 1A): Es beginnt, ausgehend vom Ruhemembranpotential, mit einer raschen Depolarisation, gefolgt von einer Umpolarisation über den Nullwert hinaus (Phase 0). Dieser schnelle Aufstrich (*Overshoot*) dauert nur wenige Millisekunden und wird durch einströmende Na⁺-Ionen (I_{Na}) verursacht. In der anschließenden initialen Phase der Repolarisation (Phase 1) kommt es zur Aktivierung des transienten Auswärtsstroms (I_{to}). Die Phase 2 des Herzaktionspotentials ist im humanen Herzen durch ein anhaltendes Plateau gekennzeichnet. In dieser Zeit wird die Repolarisation verzögert und das Membranpotential bleibt nahezu konstant. Im Herzen der Maus ist das Plateau wesentlich schwächer ausgeprägt und die Phase 2 viel kürzer als im humanen Herzen (Abb. 1B).

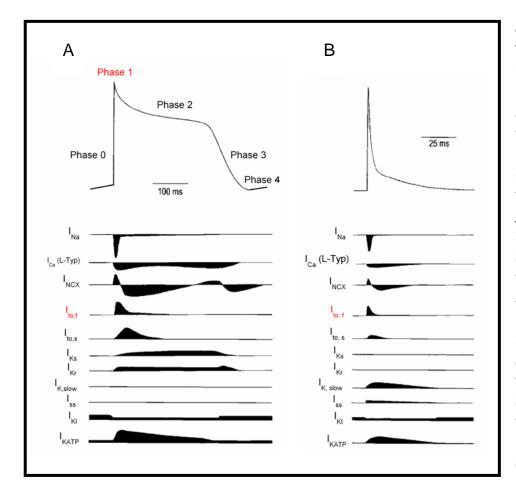


Abbildung 1: Aktionspotential im humanen und murinen Herzen.

Aktionspotential im humanen Herzen. Unterhalb des Aktionspotentials sind die der jeweiligen Phase zugeordneten Stromkomponenten dargestellt. B: Aktionspotential im murinen Herzen und die das Aktionspotential vermittelnden Stromkomponen-(modifiziert nach Nerbonne et al., 2001).

Im Herzen der Maus ist das Plateau wesentlich schwächer ausgeprägt und die Phase 2 viel kürzer als im humanen Herzen (Abb. 1B). Die Phase 2 ist prominent im Ventrikelmyokard und wird durch einen länger anhaltenden Ca^{2+} -Einstrom ($I_{Ca,L}$) vermittelt. Diesem Calciumeinstrom wirkt der Kaliumauswärtsstrom I_K (Phase 3) entgegen. I_K besteht aus mehreren unterschiedlichen Stromkomponenten, dem sehr schnell (ultra rapid) aktivierendem I_{Kur} , dem schnell (rapid) aktivierendem I_{Kr} und dem langsam (slow) aktivierendem I_{Ks} . Phase 4 wird als Ruhephase hauptsächlich durch den einwärts rektifizierenden Kaliumstrom I_{K1} verursacht (Nerbonne *et al.*, 2001).

4.2. Kaliumselektive Kanäle

Kaliumselektive Kanäle stellen die größte Gruppe unter den Ionenkanälen dar. Sie sind ubiquitär in allen Organismen zu finden, so in Archae, Bakterien (Derst und Karschin, 1998; Jiang et al., 2002; Schrempf et al., 1995), Pflanzen (Lebaudy et al., 2007) und im Tierreich (Tempel et al., 1987; Pongs et al., 1988). Diese Variationsbreite kommt durch die große

Vielfalt an Kaliumkanalgenen zustande, die zudem durch alternatives Spleißen in diversen Modifikationen auftreten können. Die einfachsten Formen der kaliumselektiven Kanäle bestehen aus α -Untereinheiten mit lediglich zwei Transmembrandomänen (TM), die über eine den Selktivitätsfilter tragende Porenschleife miteinander verbunden sind (z.B einwärts rektifizierende Kir-Kanälen und prokaryotische Kanäle wie KcsA, Doyle et~al., 1998 und MthK, Jiang et~al., 2002). Diese Kanäle sind insbesondere für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials wichtig. Eine weitere Gruppe kaliumselektiver Kanäle verfügt über α -Untereinheiten mit vier Transmembrandomänen und zwei Porenschleifen. Zu dieser Gruppe zählen die so genannten "Leckkanäle" (Goldstein et~al., 1998; Abb. 2B), welche konstitutiv geöffnet sind und das Ruhemembranpotential in der Nähe des K⁺-Gleichgewichtspotentials halten. Die meisten Kaliumkanäle gehören zur Strukturklasse der 6-Transmembrandomänen-1-Poren-Kanäle. Vier solcher α -Untereinheiten bilden einen funktionsfähigen Kanal.

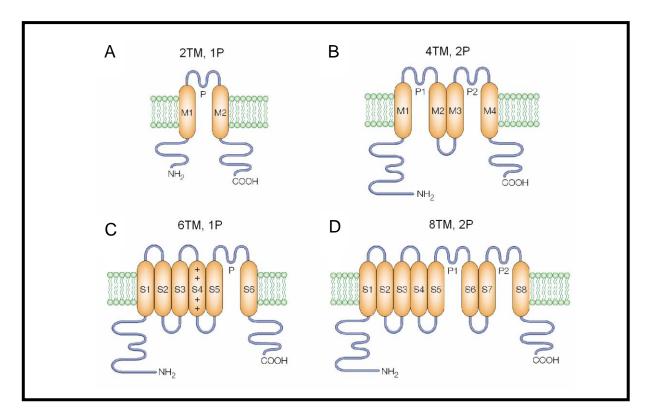


Abbildung 2: Toplogische Darstellung der vier Hauptklassen von Kaliumkanälen.

A: α -Untereinheit der einfachsten Form von Kaliumkanälen, bestehend aus zwei Transmembrandomänen und einer Porenschleife. B: α -Untereinheit von Kaliumkanälen mit vier Transmembrandomänen und zwei Porenschleife. C: Kv-Kanäle bestehen aus vier α -Untereinheiten mit jeweils sechs Transmembrandomänen und einer Porenschleife. D: Acht Transmembran-/Zweiporen-Kanäle assemblieren im funktionsfähigen Kanal zu Dimeren. (Choe, 2002).

Das Charakteristikum dieser Kanäle ist die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung bzw. Inaktivierung, weshalb diese Kanäle als Kv-Kanäle bezeichnet werden.

Eine andere Gruppe von K⁺-Kanälen verfügt über α -Untereinheiten mit acht Transmembrandomänen, die im funktionsfähigen Kanal als Dimere vorliegen (Abb. 2D). Diese Klasse von Kaliumkanälen wurde bisher nur in Pilzen nachgewiesen (Ketchum *et al.*, 1995; Roberts *et at.*, 2003).

Allen Kaliumkanälen gemein ist die Aminosäuresequenz TXGYG, die den Selektivitätsfilter bildet und als Kaliumkanal-Signatur-Sequenz bezeichnet wird. Eine Ausnahme hiervon bilden die K_{2P} -Kanäle, bei denen das Tyrosin teilweise durch ein Phenylalanin oder ein Leucin ersetzt ist.

4.3. Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv-Kanäle)

Das Öffnungsverhalten von Kaliumkanälen wird durch verschiedene Stimuli verändert. So aktivieren spannungsgesteuerte Kaliumkanäle bei Änderung des Membranpotentials.

Kv-Kanäle stellen die größte Gruppe innerhalb der kaliumselektiven Ionenkanäle dar. Ihre Unterteilung in unterschiedliche Subklassen beruht auf Sequenzhomologie-Basis und erfolgt in 12 Unterklassen (Kv1-Kv12; Gutman *et al.*, 2005; Abb. 3).

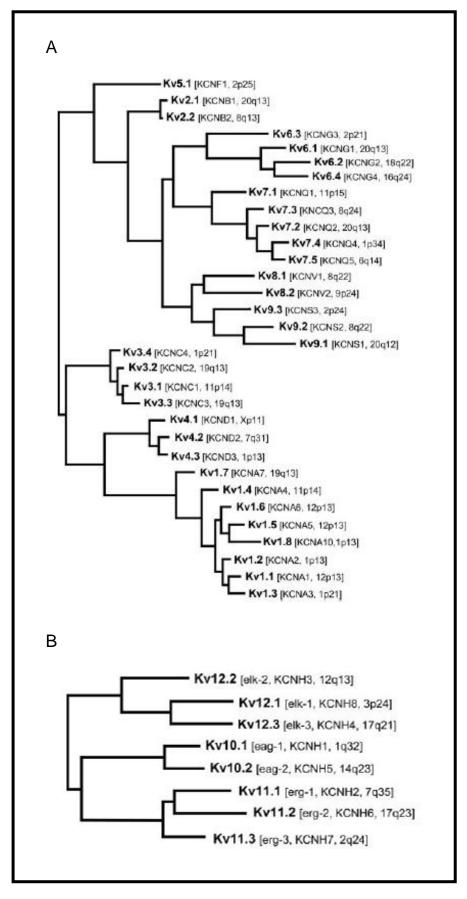


Abbildung 3: Phylogenetischer Baum für Kv-Kanäle.

Die Einteilung der Kv-Kanäle in zwei Gruppen basiert auf analogen Aminosäuresequenzen des hydrophoben Kerns dieser Proteine. A: Phylogenetischer Baum für die Kv1-9 Familie. B: Phylogenetischer Baum für die Kv10-12 Familie (Gutman et al., 2005).

Die erste Charakterisierung von Kv-Kanälen erfolgte durch die Klonierung des *Shaker*-Kanals aus *Drosophila melanogaster*. Der *Shaker*-Kanal (Kv1; Abb. 3A) wurde zuerst in der gleichnamigen übererregbaren *Drosophila* Mutante entdeckt (Tempel *et al.*, 1987; Kamb *et al.*, 1988; *Pongs et al.*, 1988). Es wurden weitere Gene in *Drosophila* gefunden, die hohe Sequenzhomologien zu dem *Shaker*-Kanal aufweisen. Diese beinhalten die Unterklassen *Shab* (Kv2; Abb. 3A), *Shaw* (Kv3; Abb. 3A) und *Shal* (Kv4; Abb. 3A). Humane sowie murine Kv-Kanäle weisen bis zu 75% Sequenzhomologie zu den *Drosophila* Kanälen auf (Salkoff *et al.*, 1992).

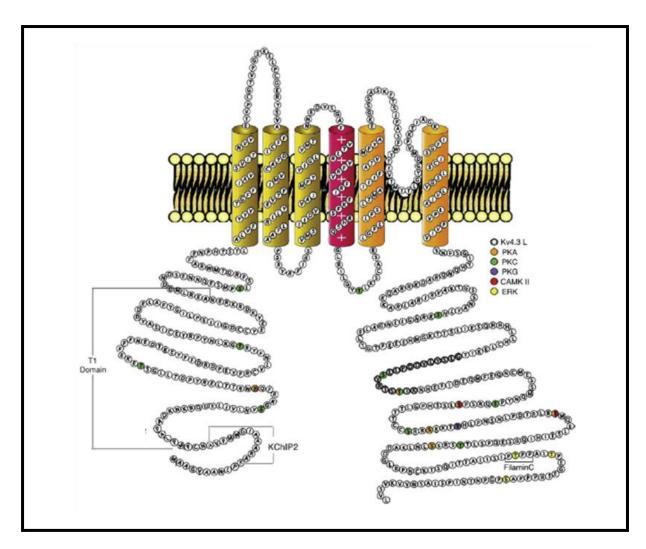


Abbildung 4: Membrantopologie und Aminosäuresequenz des humanen Kv4.3-Kanals.

Topologische Darstellung einer α-Untereinheit des humanen Kv4.3-Kanals (siehe Abb. 3A) mit Aminosäuresequenz. Zusätzlich sind die Tetramerisierungsdomäne, die KChIP2-Bindungsdomäne und die Filamin C Bindungsdomäne abgebildet. Die farbigen Markierungen zeigen potentielle Phosphorylierungsstellen der Proteinkinasen (PK) PKA, PKC, PKG, CamKII und ERK (modifiziert nach Niwa *et al.*, 2009).

Die α -Untereinheiten von Kv-Kanälen lagern sich zu Homo- oder Heterotetrameren zusammen. Die Domäne S4 enthält zahlreiche positiv geladene Arginine oder Lysine und fungiert als Spannungssensor. Die eigentliche Pore wird aus den Segmenten S5 und S6 gebildet. Die Porenschleife bildet den Selektivitätsfilter.

Bei vielen Kanälen der Kv-Unterfamilie (Kv1-4) wird die Tetramerisierung durch eine Nterminale Tetramerisierungsdomäne (T1) vermittelt. Dagegen befindet sich bei Kanälen der Kv7-Unterfamilie (KCNQ; Abb. 3A) die Tetramerisierungsdomäne im C-Terminus (Schmitt *et al.*, 2000; Maljevic *et al.*, 2003; Schwake *et al.*, 2003).

4.4. Die Kv4-Unterfamilie

Kv4-Kanäle zeichnen sich durch die Vermittlung eines bei Membrandepolarisation schnell aktivierenden und schnell inaktivierenden Auswärtsstroms, sowie durch eine schnelle Erholung von der Inaktivierung aus. Der durch sie vermittelte Strom wird als transient oder auch als A-Typ-Strom bezeichnet. Innerhalb der Kv4-Kanalfamilie sind bisher drei Mitglieder beschrieben: Kv4.1, Kv4.2 und Kv4.3, wobei Kv4.3 in zwei unterschiedlichen Spleißvarianten auftritt (Kv4.3S und Kv4.3L) (Pak *et al.*, 1991; Serodio *et al.*, 1996; Isbrandt *et al*, 2000). Eine physiologische Relevanz von Kv4-Kanälen wurde im Gehirn und im Herzen beschrieben.

In Neuronen vermitteln Kv4-Kanäle den unterschwelligen A-Typ-Strom I_{SA}. Die Kanäle weisen hier eine somatodendritische Verteilung auf, wobei die durch die Kv4-Kanäle vermittelte Dichte des Stroms mit Entfernung vom Soma zunimmt.

Im Herzen sind Kv4-Kanäle für die Vermittlung der schnellen Komponente des transienten Auswärtsstroms I_{to} (*transient outward*; Abb. 1: I_{to,f}) verantwortlich, welcher die initiale Phase der Repolarisation während des Herzaktionspotentials einleitet (Xu *et at*, 1999; Brahmajothi *et al*, 1999). Kv4-Kanäle werden in unterschiedlichen Herzarealen in unterschiedlichem Maße exprimiert und tragen somit zur regionalen Heterogenität der Aktionspotentiale bei. Im Ventrikel des Menschen und des Hundes liegt eine erhöhte I_{to}-Dichte in Epikard und Midmyokard vor und unterliegt der "Spike und Dome" Morphologie des epikardialen Aktionspotentials (Litovsky *et al*, 1988; Liu *et al*, 1993; Abb. 1A).

4.5. Akzessorische Untereinheiten von Kv4-Kanälen

Sowohl die elektrophysiologischen Eigenschaften als auch die Oberflächenexpression von Kv4-Kanälen werden massiv von anderen mit ihnen assemblierenden Proteinen bestimmt. Dabei sind zwei Hauptgruppen akzessorischer β-Untereinheiten von Kv4-Kanälen bekannt. Hierbei handelt es sich um die Kv-Kanal-Interagierenden Proteine (KChIPs) und die Dipeptidyl-Aminopeptidase-verwandten Proteine (DPPs).

4.5.1. KChIPs

Bei den KChIPs handelt es sich um kleine Ca²⁺ bindende zytoplasmatische Proteine, die der Familie der Neuronalen Calcium Sensoren (NCS) angehören. Mit insgesamt vier Gengruppen und 16 Isoformen bilden sie die am breitesten gefächerte Gruppe innerhalb der NCS-Familie (Burgoyne *et al.*, 2007). Die Expression aller vier Mitglieder konnte in unterschiedlichen humanen und murinen Hirnarealen nachgewiesen werden (Pruunsild *et al.*, 2005). Dagegen ist die Expression im humanen bzw. murinen Herzen auf die Isoformen KChIP2a, c und KChIP3b beschränkt (Pruunsild *et al.*, 2005). Der C-Terminus ist innerhalb der Isoformen bis zu 70% konserviert, während grundlegende Unterschiede zwischen den einzelnen Isoformen im N-Terminus liegen.

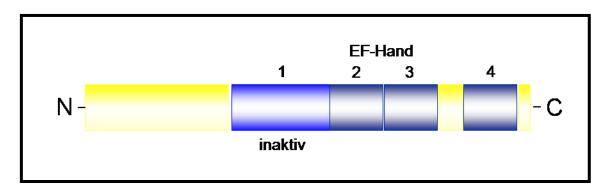


Abbildung 5: Schematischer Aufbau einer KChIP-Untereinheit.

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung einer KChIP-Untereinheit. Drei der vier EF-Hände sind aktiv und binden Ca²⁺ (2-4), eine ist degeneriert (1). DerC-Terminus ist konserviert, während Sequenzunterschied zwischen den unterschiedlichen Spleißvarianten im N-Terminus vorliegen.

KChIPs verfügen über vier C-terminal gelegene EF-Hand Motive, von denen drei funktionell sind und Calcium binden können (An *et al.*, 2000; Burgoyne and Weiss, 2001).

Für KChIP2 wurden zahlreiche Effekte auf Kv4-Kanäle beschrieben. So konnte in heterologen Expressionssystemen gezeigt werden, dass KChIP2 die Oberflächenexpression von Kv4-Kanälen erhöhen (An et al., 2000; Bähring et al., 2001). Der genaue Mechanismus der Modulationen ist bislang nicht bekannt. Vermutungen zufolge bindet KChIP2 an den N-Terminus von Kv-Kanälen und maskiert somit ein Retentionssignal, was zur Freisetzung von Kanälen aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und demTransport zur Plasmamembran führt (Bähring et al., 2001; Shibata et al., 2003). Jedoch konnte ein derartiges Retentionssignal im N-Terminus von Kv4-Kanälen bisher nicht identifiziert werden. Neben Veränderungen in der Oberflächenexpression von Kv4-Kanälen moduliert KChIP2 die elektrophysiologischen Eigenschaften von Kv4-Kanälen. Durch die Interaktion des Kanals mit KChIP2 wird die A-Typ-Stromdichte stark erhöht, die Inaktivierung verlangsamt und die Erholung von der Inaktivierung schneller (Bähring et al., 2001). Weiterhin führt die durch KChIP2 verursachte Verschiebung der Inaktivierung zu positiveren Werten zu einer Vergrößerung des Aktivierungsfensters des Kanals (Bähring et al., 2001). Darüberhinaus korreliert im humanen Herzen der beobachtete Ito-Gradient (Epi>Endo) nicht mit einem Gradienten in der mRNA-Expression von Kv4.3, sondern von KChIP2 (Rosati et al., 2001).

Für die meisten anderen KChIP-Isoformen konnten vergleichbare Effekte auf Kv4-Kanäle nachgewiesen werden. Ausnahmen hiervon bilden die beiden Isoformen KChIP2e und KChIP4a. KChIP2e inhibiert die Kv4-Oberflächenexpression, senkt die Stromdichte, beschleunigt die Inaktivierung und verlangsamt die Erholung von der Inaktivierung (Decher *et al.*, 2004). KChIP4a führt zu einem annähernden Verlust der schnellen Inaktivierung von Kv4-Kanälen. Dieser Effekt ist einer so genannten K⁺-Kanal-Inaktivierungs-Suppressions (KIS)-Domäne im N-Terminus dieser Isoform zuzuschreiben (Morohashi *et al.*, 2002; Holmqvist *et al.*, 2002).

Die Bindung von KChIPs führt zur Bildung eines oktameren Kanalkomplexes aus jeweils 4 α - und β -Untereinheiten (Kim *et al.*, 2004; Pioletti *et al.*, 2006). KChIPs weisen eine hydrophobe Tasche auf mit der sie am N-Terminus von Kv4-Kanälen binden (Kim *et al.*, 2004). Für diese Interaktion spielt der Bereich der Aminosäuren 11-23 des N-Terminus von Kv4-Kanälen, sowie Bereiche der T1-Domäne eine zentrale Rolle (Callsen *et al.*, 2005).

Es wurde weiterhin postuliert, dass KChIPs die Tetramerisierung von Kv4-Kanälen stabilisieren (Shibata *et al.*, 2003). Anhand von Kristallstruktur-Analysen konnte diese Vermutungen verstärkt werden (Pioletti *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

4.5.2. <u>DPPs</u>

Die Einordnung der DPPs erfolgte aufgrund hoher Sequenzhomologie zur Dipeptidyl-Aminopeptidase IV (CD26), welche eine Rolle beim Abbau von Zytokinen und Hormonen spielt. Es sind zwei Mitglieder dieser Proteinfamilie bekannt, die mit Kv4-Kanälen interagieren: DPPx (DPP6) und DPPy (DPP10) (Nadal *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2003; Radicke *et al.*, 2005; Jerng *et al.*, 2004; Zagha *et al.*, 2005). Sie kommen in unterschiedlichen Spleißvarianten vor. Im Gegensatz zu CD26 fehlt DPPx und DPPy jegliche enzymatische Aktivität.

Bei DPPx und DPPy handelt es sich um integrale Membranproteine, bestehend aus einer Transmembrandomäne (TM1), einer kurzen zytoplasmatischen N-terminalen Domäne und einem langen glykosylierten extrazellulären C-Terminus. Beide Proteine weisen eine 51%ige Sequenzhomologie auf. Diese tritt vorwiegend in der extrazellulären und der Transmembrandomäne auf, wohingegen Unterschiede zwischen den Spleißvarianten in der N-terminalen Domäne auftreten (Zagha *et al.*, 2005).

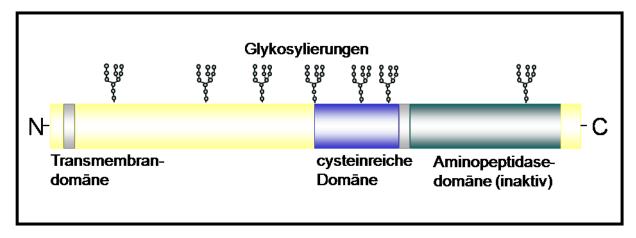


Abbildung 6: Schematischer Aufbau einer DPPx-Untereinheit.

Schematische Darstellung einer DPPx-Untereinheit. Der konservierte extrazelluläre Teil enthält eine inaktive Aminopeptidase-Domäne und eine cysteinreiche Domäne sowie mehrere Glykosylierungsstellen. Unterschiede zwischen den verschiedenen Spleißvarianten wie auch zwischen DPPx und DPPy treten in der kurzen N-terminalen Domäne auf.

Die Co-Expression von DPPx und DPPy erhöht die Oberflächenexpression von Kv4-Kanälen und führt zu einem Anstieg der Stromamplitude (Nadal *et al.*, 2003; Zagha *et al.*, 2005). Weiterhin wird die Kinetik der Kanäle moduliert. So wird die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Inaktivierung zu negativeren Potentialen verschoben und die Rate der

Aktivierung, Inaktivierung und die Erholung von der Inaktivierung beschleunigt (Nadal *et al.*, 2003; Radicke *et al.*, 2005; Amarillo *et al.*, 2008). Während eine Vielzahl von Spleißvarianten von DPPx und DPPy im Gehirn gefunden werden konnten (Nadal *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2003; Jerng *et al.*, 2007), ist im humanen Herzen bisher nur die Expression der kurzen Isoform von DPPx beschrieben (Radicke *et al.*, 2005). Kürzlich konnte die Expression von DPPx auch im Hundeherzen nachgewiesen werden (Calloe *et al.*, 2010).

Während die Modulation von Kv4-vermittelten Strömen durch DPPx und DPPy gut untersucht ist, existiert wenig Verständnis bezüglich der strukturellen Determinanten. Befunde aus Co-Immunopräzipitationen von Kv4.3 und DPPy weisen darauf hin, dass der Bereich des S1- und S2-Segments des Kanals kritisch für eine Interaktion sein könnte (Ren et al., 2005).

4.6. Kardiale Pathologien

Eine merkliche Abnahme der I_{to}-Dichte und eine ausgeprägte Modulation in der Repolarisation des Aktionspotentials wurde bei einer Vielzahl von Herzerkrankungen nachgewiesen (Beukelmann *et al.*, 1993; Kääb *et al.*, 1996). So wurde in Kardiomyozyten von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz eine wesentlich geringere I_{to}-Dichte als in gesunden humanen Kardiomyozyten nachgewiesen (Beukelmann et al., 1993). Bei vielfältigen Untersuchungen an Kardiomyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern, das mit einer Verkürzung der Herzaktionspotentialdauer einhergeht, wurde eine verminderte I_{to}-Dichte beobachtet (Van Wagoner *et al.*, 1997; Bosch *et al.*, 1999; Workmann *et al.*, 2001).

Offensichtlich besteht auch ein Zusammenhang zwischen Herzhypertrophie und dem I_{to}. Der Begriff Herzhypertrophie bezeichnet den Anstieg der Herzmasse aufgrund einer Zunahme der Zellgröße, vermittelt durch den Einfluss diverser Stressfaktoren.

In den meisten Studien, die sich mit Herzhypertrophie beschäftigen, konnte eine Verlängerung des Herzaktionspotentials und eine verminderte I_{to}-Dichte (Potreau *et al.*, 1995; Meszaros *et al.*, 1996; Kaprielian *et al.*, 1999; Hart *et al.*, 2003), sowie eine geringere mRNA Expression von Kv4.2 und Kv4.3 (Takimoto *et al.*, 1997; Kaprielian *et al.*, 1999) beobachtet werden. Es existieren jedoch auch Studien, bei denen keine verminderte I_{to}-Dichte nachgewiesen werden konnte (Marionneau *et al.*, 2008).

Ein anderes Krankheitsbild, das in Zusammenhang mit einer Umstrukturierung von Kv4.3 und des Kv4.3-vermittelten I_{to} beschrieben wird, ist das Brugada Syndrom. Diese angeborene Kardiomyopathie wird den Ionenkanalerkrankungen zugerechnet und ist auf Mutationen in unterschiedlichen Ionenkanälen, zumeist aber den Natriumkanälen zurückzuführen. Bei dieser Erkrankung können aufgrund einer veränderten Repolarisation plötzliche Herzrhythmusstörungen wie ventrikuläre Tachykardien und Kammerflimmern auftreten, die zum Tode führen können. So weisen Patienten mit einer Mutation in KCNE3, einer inhibitorischen Untereinheit von Kv4-Kanälen, eine verstärkte Aktivierung des I_{to} und die Entwicklung des Brugada Syndroms auf (Lundby and Olesen, 2006; Delpón *et al.*, 2008).

4.7. Zielsetzung

Ein Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung molekularer Strukturdeterminanten der Interaktion von Kv4.2 mit akzessorischen Untereinheiten. Zur Klärung der Folgen einer KChIP2-Bindungsdefizienz sollte ein Knock-in Mausmodell etabliert werden. Kv4.2-Strukturdeterminanten für die Interaktion mit DPPs sollten anhand modifizierte Kanal-Untereinheiten gefunden werden.

Ein weiteres Ziel sollte die Aufklärung molekularer Kontrollmechanismen des I_{to} in ventrikulären Mäusemyozyten unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen sein. Hierzu sollte mittels Angiotensin II eine Herzhypertrophie induziert werden. Weiterhin sollte eine mögliche I_{to}-Modulation durch den potentiellen I_{to}-Aktivator NS5806 untersucht werden.

5. Material

5.1. Verbrauchsmaterial

Bechergläser (Schott, Deutschland)

Deckgläschen 12 mm ø (Karl Hecht, Deutschland)

• Einwegpipette 25 ml (Becton Dickinson, USA)

• Einwegpipette 10 ml (Becton Dickinson, USA)

• Einwegpipette 5 ml (Becton Dickinson, USA)

• Einwegpipette 1 ml (Becton Dickinson, USA)

Filme Hyperfilm™ ECL (Amersham Biosciences, USA)

Hypercassette (Amersham Biosciences, USA)

• Kapillare GB 150-8P (Science Products, Deutschland)

Kapillare, 0,15 mm ø (Word Precision Instruments, USA)

Kulturschalen 94 mm ø (Greiner, Deutschland)

Kulturschalen 35 mm ø (Thermo Fisher Scientific, Deutschland)

Kulturplatten 4 Well (Thermo Fisher Scientific, Deutschland)

• Light Cycler Kapillare (Roche, Deutschland)

Objektträger (Marienfeld, Deutschland)

Osmotische Minipumpen (Alza Corporation, USA)

Pipette 1000 μl (Gilson, USA)

Pipette 200 μl (Gilson, USA)

Pipette 10 μl (Gilson, USA)

Pipette 1 μl (Gilson, USA)

Pipettenspitzen 1000 μl (Sarstedt, USA)

Pipettenspitzen 200 μl (Sarstedt, USA)

Pipettenspitzen 10 μl (Sarstedt, USA)

Präparierbesteck (FST, Deutschland)

PVDF-Membran (Millipore, USA)

Reaktionsgefäß 2 ml (Eppendorf, Deutschland)

Material

•	Reaktionsgefäß 1,5 ml	(Sarstedt, USA)
•	Reaktionsgefäß 0,5 ml	(Applied Biosystems, USA)
•	RNasefreie Pipettenspitzen 1000 μ l	(Biozym, Deutschland)
•	RNasefreie Pipettenspitzen 200 μl	(Biozym, Deutschland)
•	RNasefreie Pipettenspitzen 20 μl	(Biozym, Deutschland)
•	RNasefreie Pipettenspitzen 10 μl	(Biozym, Deutschland)
•	Sterilfilter 0,22 μm	(Millipore, USA)
•	Sterilfilter 500 ml (ZAPCAPS)	(Whatman, USA)

5.2. Chemikalien

•	Agarose	(Invitrogen, Kanada)
•	Ammoniumperoxidisulfat	(Fluka, USA)
•	Ampicillin Natriumsalz	(Sigma-Aldrich, USA)
•	Antikörperlösung 1, 2	(Calbiochem, Deutschland)
•	Aqua-Phenol	(Roth, Deutschland)
•	Aqua-Phenol/C/I	(Roth, Deutschland)
•	Calciumchlorid Dihydrat	(J.T. Baker, Niederlande)
•	CAPS	(Sigma-Aldrich, USA)
•	Chloroform	(Merck, Deutschland)
•	Di-Natriumhydrogenphosphat	(Roth, Deutschland)
•	DMSO	(Sigma-Aldrich, USA)
•	Dodecylsulfat Natriumsalz	(Serva, Deutschland)
•	ECL Western Blotting Detection	(Amersham, USA)
	System	(c.c, cc,
•	EDTA Di-Natriumsalz Dihydrat	(Roth, Deutschland)
•	Eisessig	(Merck, Deutschland)
•	Entwicklerlösung	(Kodak, USA)
•	Ethanol	(Merck, Deutschland)
•	Ethidiumbromid	(Sigma-Aldrich, USA)
•	Fixierer	(Kodak, USA)
•	TAICICI	(Rodak, OSA)

d)

(Roth, Deutschland)

• 2-Propanol (Riedel-de-Haën, Deutschland) (Biorad, Deutschland) Proteinassay Rubidiumchlorid (Sigma-Aldrich, USA) Salzsäure, 1 M (Merck, Deutschland) Taurin (Sigma-Aldrich, USA) Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) Trizmabase (Sigma-Aldrich, USA) Tween 20 (Serva, Deutschland)

5.3. Geräte

Xylencyanol

(HEKA Elektronik, Deutschland) AD/DA Wandler ITC 16 AD/DA Wandler LIH-1600 (HEKA Elektronik, Deutschland) Analysenwaage (Sartorius, Deutschland) Autoklav (Systec GmbH, Deutschland) (Zeiss, Deutschland) Binokular Bioanalyzer System 2100 (Agilent Technologies, USA) Biofuge (Heraeus, Deutschland) Brutschränke (Heraeus, Deutschland) **DMZ-Universal Puller** (Zeitz-Instruments, Deutschland) Eismaschine (Scotsman, Deutschland) (Sartorius, Deutschland) Feinwaage

Gefrierschrank -20°C (Heraeus, Deutschland) Gefrierschrank -80°C (Heraeus, Deutschland) Gelelektrophorese-Apparatur (Biorad, Deutschland) Grobwaage Kern 440-33 (Kern, Deutschland) Homogenisator (IKA, Deutschland) Konvokales Mikroskop (Zeiss, Deutschland) Kühlschrank (Liebherr, Deutschland) Magnetrührer (IKA, Deutschland)

Mikromanipulator (Eppendorf, Deutschland)
 Mikromanipulator (Märzhäuser, Deutschland)
 Mikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Deutschland)

• Nanoject II Injektor (Drummond, USA)

• Ofen (Heraeus, Deutschland)

• Patch-Clamp-Verstärker: (HEKA Elektronik, Deutschland)

EPC9

• PCR System *GeneAmp 9700* (Applied Biosystems, USA)

• Photometer 3000 (Pharmacia Biotech, Deutschland)

(Nova Analytics, USA)

Pipettenziehgerät (DMZ-Puller, Deutschland)

Pipettenziehgerät *P97* (Sutter Instruments, USA)

• Pumpe *Minipuls 3* (Gilson, USA)

Pumpe Minipuls 2 (Gilson, USA)

• Schwenktisch *Polymax 1040* (Heidolph, Deutschland)

• Tischzentrifuge *5417C* (Eppendorf, Deutschland)

• Thermoblock (Biometra, Deutschland)

• Thermoschüttler *GFL 3031* (GFL, Deutschland)

• UV-Transluminator *Tl1* (Biometra, Deutschland)

• Vakuumzentrifuge 5301 (Eppendorf, Deutschland)

• Vortex (Eppendorf, Deutschland)

• Wasserbad *DESAGA FRIGESTAT* (Desage, Deutschland)

Werkbank *Hera safe* (Heraeus, Deutschland)

• Wide MINI-SVB Cell GT (BioRad, Deutschland)

Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp- (npi electronic, Tamm)

Verstärker TURBO TEC 10 CX

pH-Meter pH 526

5.4. Kits

• QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Deutschland)

QIAquick Spin Miniprep Kit (Qiagen, Deutschland)

Material

QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, Deutschland)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Deutschland)

• DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen Deutschland)

• RNA Nano 6000 LabChip Kit (Agilent Technologies, USA)

RiboMAX Large Scale RNA (Promega, USA)

Production System-T7

• QuantiTect Sybr Green PCR Kit (Qiagen, Deutschland)

5.5. Enzyme

T4 DNA Ligase (Invitrogen, Kanada)

Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Kanada)

Liberase Blendzyme 3 bzw. (Roche, Deutschland)

Liberase TM Research Grade

Restriktionsenzyme (Fermentas, Deutschland)

• Turbo Pfu DNA Polymerase (Stratagene, USA)

Phire Hot Start DNA Polymerase (Finnzymes, USA)

5.6. Allgemeine Puffer

5.6.1. Puffer für RNA-Isolierung

GTC-Lösung 250 g/l Guanidinthiocyanat, 293 ml RNasefreies H₂O/l, 17,6 ml

Natriumcitrat/l, 26,5 ml 10% Sarcosyl/l

RNasefreies H₂O 500 µl DEPC/500 ml H₂O

Natriumcitrat 0,75 M Natriumcitrat, pH 7

Sarcosyl 10% 10 g N-laurosylsarcosin Natriumsalz/100 ml

Natriumacetat 2 M 41,02 g/250 ml, mit ca. 75 ml Eisessig auf pH 4,8-5,2

5.6.2. Puffer für Agarosegele

TAE, 50x Tris, 100 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH 8)/l, 57,1 ml Eisessig

Material

Beladungspuffer 50% Glycerin, 60 mM EDTA, 0,025% Xylencyanol, 0,2% Orange

G

5.6.3. Lösungen für *In-vitro-*Transkription

Grb-Puffer, 10x 191 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 5 mM EDTA, pH 7

Lösung 1 100 μl Formamid, 32,4 μl Formaldehyd (36,5%), 20 μl Grb-

Puffer 10x

5.6.4. Lösungen für die Herstellung kompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)

RF1-Lösung 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, pH 5,8 mit

Eisessig

RF2-Lösung 10 mM RbCl, 10 mM MOPS, 75 mM CaCl2, 15% Glycerin, pH 6,8

mit NaOH

5.6.5. Puffer für Protein-Isolation

Ripa 150 mM NaCl, 0,5% Na-Deoxycholat, 20 mM Na₂HPO₄, 1%

Triton X-100, 0,1 % SDS

+ 10 μl/ml Proteinaseinhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich,

USA)

5.6.6. Puffer für Gelelektrophorese

Puffer A 75 mM Tris Base, 1ml SDS 10%/100 ml, pH 8,8

Puffer B 25 mM Tris Base, 1 ml SDS/100 ml, pH 6,8

SDS-Laufpuffer, 10x 250 mM Tris Base, 1,9 M Glycin, 35 mM SDS

Beladungspuffer NuPage LDS 4x (Invitrogen, Kanada), 0,4 M DTT

5.6.7. Puffer für Western Blot

Tris/CAPS Puffer, 5x Tris Base, CAPS

Anoden-Puffer 20 ml 5x Tris/CAPS, 15 ml Methanol, 65 ml H₂O

Kathoden-Puffer 20 ml 5x Tris/CAPS, 1 ml 10% SDS, 79 ml H₂O

TBS 50 mM Tris Base, 150 mM NaCl, pH 7,5

TBS-T TBS, 0,5% Tween 20

5.6.8. Lösungen für die Isolation von Myozyten

Perfusionspuffer-Stock 113 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 0,6 mM KH₂PO₄, 0,6 mM

(1 Woche bei 4°C) Na₂HPO₄-2H₂O, 1,2 mM MgSO₄-7 H₂O, 12 mM NaHCO₃, 10 mM

KHCO₃, 10 mM HEPES, 30 mM Taurin, pH 7,4 mit NaOH

Perfusionspuffer, frisch Zugabe von 5,55 mM Glucose direkt vor Gebrauch

Verdauungspuffer 0,0125 mM CaCl₂, 0,1 mM Blendzyme 3 bzw Liberase TM

Research Grade in Perfusionspuffer

Stop-Lösung 1 10 mM FCS, 0,0125 mM CaCl₂ in Perfusionspuffer

Stop-Lösung 2 5 mM FCS, 0,0125 mM CaCl₂ in Perfusionspuffer

5.6.9. <u>Lösungen für die Immunfluoreszenz</u>

Waschlösung PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄-7 H₂O, 1,8

mM KH₂PO₄, pH 7,4

Fixier-/Blocklösung 0,25% Triton X, 2% BSA in PBS

Lösung für Antikörper 1% BSA in PBS

5.6.10. Lösungen für die Elektrophysiologie

ec6 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES,

10 mM Sucrose, pH 7,4 mit NaOH

ec21 138 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0,33 mM NaH₂PO₄,

10 mM HEPES, 10 mM Glucose, pH 7,3 mit NaOH

ic6 125 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 18 mM Sucrose,

pH 7,2 mit KOH

ic23 120 mM L-Glutamat, 10 mM KCL, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 10 mM

HEPES, pH 7,2 mit KOH

OR1 75 mM NaCl, 2 mM KCL, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES,

50 μg/μl Gentamicin, pH 7,5

OR2 82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,5

ND96 91 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM NaOH,

5 mM HEPES, pH 7,4

5.7. Nährmedien

5.7.1. Medien für Bakterienkultur

Die Medien für die Bakterienkulturen wurden autoklaviert und bei Bedarf mit Antibiotika versetzt.

LB-Medium 171 mM NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,4

LB-Platten 3,5 g/100 ml LB-Agar (Lennox)

5.7.2. CHO-Medium

MEM Alpha Medium (Gibco, Deutschland)

+ 5% Fetales Kälberserum (PAA, Deutschland)

+ 1% Penicillin-Streptomycin-Gluatmin (Gibco, Deutschland)

OPTI-MEM I (Gibco, Deutschland)

5.7.3. Myozyten-Medium

Plattierungsmedium MEM + Hank's + Glutamin (Gibco, Deutschland)

+ 5% Fetales Kälberserum (PAA, Deutschland)

+ 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamin (Gibco, Deutsch-

land)

Kulturmedium: MEM + Hank's + Glutamin (Gibco Deutschland)

+ 1% Bovines Serum Albumin (Merck, Deutschland)

+ 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamin (Gibco, Deutsch-

land)

Laminin 20 µg/ml PBS (Invitrogen, Kanada)

5.8. Sonstige Reagenzien

Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Kanada)

NS5806 Stockkonzentration 20 mg/ml DMSO

Zur Verfügung gestellt von der Firma NeuroSearch A/S, Dänemark.

5.9. Bakterienstämme

Escherichia coli XL1-Blue recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, re1A1,

lac[F`proAB lac1qZ∆M15Tn10Tet`]

(Bullock et al., 1987)

Escherichia coli DH10B F'mcrA, Δ (mrr-hsdMRS-mcrBC), ϕ 80dlacZ Δ M15,

 \triangle lacX74, deoR, recA1, araD139, \triangle (ara, leu)

7697 galU, galK λ rpsL endA1 nupG

5.10. Zellinien

CHO Dehydrofulat-Reduktase-defiziente Hamster-Zellinie

(DSMZ Nr. ACC 126) aus Cricetulus griseus.

5.11. Antikörper

5.11.1. Primärantikörper für Westernblot

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
anti-Kv4.2 (Kaninchen)	Upstate	1:1000
anti-Kv1.4 (Kaninchen)	Chemicon	1:1000
anti-Kv4.3 (Kaninchen)	Alomone Labs	1:300
anti-Kv1.5 (Kaninchen)	Alomone Labs	1:200
anti-Kv2.1 (Kaninchen)	NeuroMab	1:500
anti-Pan-KChIP (Maus)	NeuroMab	1:500
anti-Aktin (Kaninchen)	Sigma Aldrich	1:250

5.11.2. Sekundärantikörper für Westernblot

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Donkey-Anti-Rabbit IgG-HRP	Jackson Lab	1:32.00
Donkey-Anti-Mouse IgG-HRP	Jackson Lab	1:5.000

5.11.3. Primärantikörper für Immunfluoreszenz

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
anti-Kv4.2 (Kaninchen)	Upstate	1:200
anti-KChIP2 (Kaninchen)	Dianova	1:100

5.11.4. <u>Sekundärantikörper für Immunofluoreszenz</u>

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
anti-Kaninchen Cy3 (Esel)	Jackson Lab	1:700
Anti-Kaninchen Cy2 (Esel)	Jackson Lab	1:200

5.11.5. Reagenzien für Fluoreszenzfärbung

Reagenz	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor [®] 568 Phalloidin	Invitrogen	1:60
Di-8-Anneps	Biotium	1:1.000

5.12. Primer

Die Konzentration der Primerstocklösungen betrug 100 ng/μl.

5.12.1. <u>qRT-PCR</u>

Primer	Sequenz
L32_FW	5`-CGGGATGGAGCTGCTGA-3`
L32_RW	5`-GGAATTCGCCAGCTGTGCTCTTTC-3
Kv4.2_FW	5`- GGCACAGAAGCCAGG -3`
Kv4.2_RW	5`- ATCCTCCGAGGACTGCAG -3`
Kv4.3_FW	5`- GACTACACTGGGATATGGAGACA -3`
Kv4.3_RW	5`- GCGGGCCTTCTTTGTG-3`
Kv1.4_FW	5`- CTTGCTGGGAATGGTGAAGTG -3`
Kv1.4_RW	5`- GTGGTAGACGCAGTTCCAGC -3`
KChIP2_FW	5`- CGAAGGAGAAATGCTCGAC -3`
KChIP2_RW	5`- CTGTCCATCTTCTGGAAGAAGC -3`
Kv1.5_FW	5`- CCGTCATCGTCTCCAATTTT -3`
Kv1.5_RW	5'- CTCTGGATGCCTTTC -3'
Kv2.1_FW	5`- GCCGCCAAGATCCTGGC -3`
Kv2.1_RW	5`- GCGATGCACAGCCTCC -3`
Nav1.5_FW	5`- GTGCGGTGAGACTCCCG -3`
Nav1.5RW	5`- GACGCAGCCTTCAGTGAAG -3`
Renin_FW	5`-CGGGATCCGTGCAGCCGCCTCTACCTTGCTTGT-3`
Renin_RW	5`-GGAATTCGCAGCTCGGTGACCTCTCCAAAGG-3`

Firma Invitrogen (Kanada) oder Firma Eurofins MWG Operon (Deutschland).

5.13. Größenstandards

• 100 bp DNA Marker (Invitrogen, Kanada)

1 kb DNA Marker (Promega, USA)

Page Ruler Prestained (Fermentas, Deutschland)

Protein ladder

Prestained SDS ladder (Biorad, Deutschland)

• RNA 6000 ladder (Ambion, USA)

5.14. Vektoren

pCDNA 3 Epxressionsvektor f
ür heterologe Expression in S
äugerzellen

(Invitrogen, Kanada).

pGEM HEJuel
 RNA-Transkriptionsvektor; trägt die untranslatierten Regionen

des ß-Globin-Gens aus Xenopus laevis, sowie eine Polyadenylie-

rungssequenz.

pBluescript II SK(-)
 Klonierungsvektor (Stratagene, USA).

pGEM-T
 Klonierungsvektor f
 ür PCR-Produkte (Promega, USA).

pKO-Scrambler
 Klonierungsvektor, trägt negativen Selektionsmarker Diphteria-

toxin (Geschenk aus der Abteilung Pongs, ZMNH).

pACN
 Vektor trägt loxP flankierte Neomycin-Kassette und selbstsplei-

ßende Cre-Kassette. (Bunting et al, 1999).

5.15. Klone

5.15.1. <u>cDNA Klone</u>

EGFP Diente als Transfektionskontrolle (BD Biosciences, Deutsch-

land).

Kv4.2
 Klon der humanen Kv4.2-α-Untereinheit (AH009258, Zhu et al.,

	1999).
• Kv1.4	Klon der humanen Kv1.4- $lpha$ -Untereinheit (Geschenk aus der
	Abteilung Pongs, ZMNH).
• Kv1.5	Klon der humanen Kv1.5-α-Untereinheit (Geschenk aus der
	Abteilung Pongs, ZMNH).
• DPPx	Kurze Spleißvariante von DPPx (NM_001936; Wada et al.,
	1992).
• DPPy	Spleißvariante von DPPy (human; NM_020868).
KChIP2c	Spleißvariante der akzessorischen ß-Untereinheit KChIP2
	(human; NM_173191, Bähring et al., 2001).
Kv4.2wt-HA	In diesen Klon der humanen Kv4.2- $lpha$ -Untereinheit wurde ein
	Hämagglutinin-Epitop (zwischen Aminosäure 216 und 217)
	Kloniert (Callsen et al., 2005).

5.15.2. <u>BAC-Klone</u>

•	CH29-24J	Genomische DNA-Sequenz Mus musculus Chromosom 6;
		21053266-21271121. (BACPAC Resources, USA).
•	CH29-608	Genomische DNA-Sequenz Mus musculus Chromosom 6;
		21163438-21327628. (BACPAC Resources, USA).

5.16. Computerprogramme

•	AxoGraphX	(AxoGraph Scientific, Australien)
•	Excel	(Microsoft, USA)
•	GraphPad Prism 5	(GraphPad Software, Inc.; USA)
•	Image J	(NIH, USA)
•	KaleidaGraph	(Synergy Software, USA)
•	Photopaint	(Microsoft, USA)
•	Pulse	(HEKA Elektronik, Deutschland)
•	PulseFit	(HEKA Elektronik, Deutschland)
•	Vector NTI	(Invitrogen, Kanada)

Material

Windoxs XP (Microsoft, USA)
 und Vista

• Zen 2009 (Zeiss, Deutschland)

6. Methoden

6.1. Molekularbiologische Methoden

6.1.1. <u>Herstellung kompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)</u>

Mit einer Einzellkolonie des Bakterienstammes *Escherichia coli* XL1-Blue wurden 3 ml antibiotikafreies LB-Medium angeimpft und über Nacht auf einem Schüttler (37°C, 270 Upm) inkubiert. Mit 1 ml dieser Übernachtkultur wurden 50 ml frisches LB-Medium angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,5-0,7 bei 600 nm (OD₆₀₀) wachsen gelassen. Anschließend wurde die Bakterienkultur auf Eis abgekühlt und für 15 Minuten zentrifugiert (4°C, 4.000 Upm). Das Zellpellet wurde in 18 ml RF1-Lösung resuspendiert und nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erneut zentrifugiert (4°C, 4.000 Upm). Nach Resuspension des Zellpellets in 4 ml RF2-Lösung, wurde die Zellsuspension in jeweils 200 μl aliquotiert. Die Zellen-Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

6.1.2. <u>Transformation von Bakterien</u>

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Je 100 μ l Zellsuspension wurden mit dem Transformationsansatz gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der DNA in die Zellen, wurden diese für 90 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Anschließend wurde der Ansatz kurz auf Eis abgekühlt und 400 μ l vorgewärmtes (37°C) LB-Medium hinzugefügt. Nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C wurden 100-200 μ l der Zellsuspension auf antibiotikahaltigen LB Platten ausgestrichen. Diese wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

6.1.3. Isolation von DNA aus Bakterienkultur

6.1.3.1. <u>Isolation von DNA im kleinem Maßstab (Minipräp)</u>

Zur Gewinnung der DNA wurden jeweils 3 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht im Schüttler (37°C, 270 Upm) inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (5 min, 5.000 g). Die anschließende Aufreinigung wurde

mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* durchgeführt und erfolgte nach Angabe des Herstellers. Für die Elution der DNA im letzten Aufreinigungsschritt wurden 50 μ l demineralisiertes H_2O eingesetzt.

6.1.3.2. <u>Isolation von DNA im großen Maßstab</u>

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA (ca. 100 μg) wurden 100 ml Bakterienkulturen verwendet. Diese wurden für 10 Minuten abzentrifugiert (4°C, 5.000 g). Die anschließende Isolation von DNA wurde mit dem *QIAGEN Plasmid Midi Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die DNA bei -20°C gelagert.

6.1.4. DNA-Quantifizierung

Die Ausbeute an präparierter DNA wurde photometrisch bestimmt. In einer Küvette wurde die Extinktion der DNA bei 260 nm, 280 nm und 320 nm gegen eine Wasserkontrolle gemessen.

$$c(E_{260}\text{-}E_{280})\cdot 0.05 \ \mu g/\mu I$$

c = Konzentration, E = Extinktion.

6.1.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Detektion von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten erfolgte mittels Gelelektrophorese. Hierzu wurden 1-2%ige Agarose-Gele in TAE Puffer gegossen, welcher ebenfalls als Laufpuffer diente. Die Proben wurden zuvor mit 5x DNA- Laufpuffer versetzt. Zum Nachweis der DNA enthielten die Gele $0.5~\mu g/ml$ Ethidiumbromid. Als Größenstandard wurde ein DNA-Marker aufgetragen.

6.1.6. Sequenzierung

Für die Sequenzierung der DNA-Proben wurde das *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* verwendet. Für die Sequenzierungs-PCR wurden 500-1.000 ng Template-DNA, 15 pmol Sequenzierungs-Primer, 2 μ l BigDye-Reaktionsmix und 6 μ l Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 20 μ l eingesetzt.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Denaturierung	94°C	5 min	1
Denaturierung	94°C	10 s)
Hybridisierung	50°C	5 s	> 25
Elongation	60°C	4 min	J
Elongation	60°C	7 min	1

Der PCR-Ansatz wurde anschließend über *Spin Dye-Ex* Säulen nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Die Sequenzierung der Proben wurde mit dem *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* von der Sequenziereinheit am Universitätsklinikum Eppendorf durchgeführt.

6.1.7. <u>DNA-Modifikationen</u>

6.1.7.1. Restriktionshydrolyse

Für die Restriktion von Plasmid-DNA wurden die benötigte Menge an DNA (1-5μg), Enzym (0,1-10 Units) und der entsprechende Puffer eingesetzt. Die Reaktion erfolgte für 2-3 Stunden nach Herstellerangaben. Anschließend wurde der Restriktionsansatz bei 65°C hitzeinaktiviert und daraufhin über das *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt. Bei Verdau mit mehreren Enzymen wurden die Reaktionsbedingungen entweder entsprechend angepasst oder der Verdau sequentiell durchgeführt.

6.1.7.2. <u>Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten</u>

Erfolgte die Restriktion mit nur einem Enzym wurde das Plasmid dephosphoryliert, um eine Ligation des Plasmids ohne Insertaufnahme zu verhindern. Dabei wurden terminale Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase entfernt. DNA-Fragmente mit überhängenden (sticky) Enden wurden hierzu für 15 Minuten bei 37°C, solche mit glatten (blunt) Enden für 60 Minuten bei 50°C inkubiert.

6.1.7.3. <u>Ligation von DNA-Fragmenten</u>

Das einzufügende DNA-Fragment wurde im 2-5-fachen Überschuss mit dem entsprechenden Plasmid, dem entsprechenden Reaktionspuffer und 0,5-1 Units T4 Ligase in einem Reaktions-

volumen von 20 μ l inkubiert. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurde die Ligase für 10 Minuten bei 65°C hitzeinaktiviert und der Reaktionsansatz in einer Transformation eingesetzt.

6.1.7.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR fand in dieser Arbeit eine Vielzahl von Anwendungen. Je nach Ziel des Experiments wurden unterschiedliche Polymerasen mit verschieden hoher Korrekturlesefunktion eingesetz. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 25 μ l bzw. 50 μ l nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Reaktionsansatz:

20-50 ng Template-DNA

1 mM dNTP's

25 pM Primer FW

25 pM Primer RW

1,5-2,5 mM MgCl₂

2,5 bzw. 5 μl 10x PCR-Puffer

1,25-2,5 Units *Pfu-Turbo*-Polymerase bzw. 0,5-1 Units *Platinum-Taq*-Polymerase

Für die PCR-Reaktion wurde folgendes Programm verwendet:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	94°C	5 min	1
Denaturierung	94°C	30 s	
Hybridisierung	50-60°C	30 s	> 25
Elongation	72°C	1 min/kb	J
Elongation	72°	7 min	1

Dieses war abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments.

6.1.8. *In-vitro-*Mutagenese

Das Einfügen von Punktmutationen erfolgte mit Hilfe der Overlap-PCR. Hierfür wurden Primer entworfen, welche die Mutation trugen, aber in der zur Mutation umgebenden

Sequenz komplementär waren. Zudem wurden zwei Primer konstruiert, die die zu mutierende Sequenz flankierten. Die zu mutierende Teilsequenz wurde in zwei hintereinander folgenden PCR-Reaktionen hergestellt. Im ersten Schritt wurden jeweils ein mutierter und der korrespondierende flankierende Primer eingesetzt, um PCR-Fragmente zu erhalten, die die Mutation tragen und im Mutationsbereich überlappend sind. In einer weiteren PCR-Reaktion wurden diese beiden Fragmente eingesetzt, um miteinander zu hybridisieren. Dieses verlängerte PCR-Fragment konnte für eine anschließende Klonierung in den entsprechenden Vektor eingesetzt werden.

6.1.9. RNA-Aufreinigung

Die Extraktion von RNA aus Gewebe erfolgte nach dem Säure-Guanidin-Phenol-Chloroform Protokoll von *Chomczynski* und *Sacchi* (Chomczynski und Sacchi, 2006). Alle Schritte wurden dabei entweder auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Die Glasgefäße wurden zuvor bei 200°C ausgebacken, um RNasen zu inaktivieren.

Tiefgefrorenes bzw. frisch isoliertes Gewebe wurde in 4 ml Guanidin-Lösung + Mercaptoethanol (360 μ l Mercaptoethanol/50ml) aufgenommen und mit Hilfe eines Homogenisators zerkleinert. Anschließend wurde 1 Volumenanteil Phenol hinzugefügt und alles gevortext. Nach Zugabe von $^2/_{10}$ Volumenanteilen Chloroform wurde der Reaktionsansatz für 15 Minuten auf Eis belassen. Nachdem dieser für 20 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert worden war, wurde die obere Phase abgenommen und mit 1 Volumenanteil Isopropanol gefällt. Die Fällung erfolgte für mindestens 1 Stunde bis über Nacht. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 400 μ l Guanidin-Lösung gelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine zweite Fällung mit 40 μ l Na-Acetat und 400 μ l 100%igem Ethanol. Diese erfolgte ebenfalls für mindestens 1 Stunde bis über Nacht. Nachdem die RNA für 20 Minuten bei 10.000 g abzentrifugiert worden war, wurde das RNA-Pellet mit 500 μ l 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde für einige Minuten in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet und anschließend in 30-100 μ l DEPC-H₂O aufgenommen. Die langfristige Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

6.1.10. Quantifizierung und Qualitätskontrolle von RNA

Bei RNA, die für eine Quantitative PCR mittels Taqman eingesetzt wurde, erfolgte eine Vermessung am 2100 Bioanalyzer System mit Hilfe des RNA 6000 Nano LabChip Kit. Bei diesem System erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung der Proben in einer Kapillare und die Detektion der Banden mittels Laser. Als Referenz dient ein RNA-Standard (RNA 6000 Ladder), über den das Computer-Programm Größe und Konzentration der RNA-Proben berechnet. Die Reinheit der Proben kann dem virtuellen Gel entnommen werden. Eine Degradation wird anhand "verschmierter" Banden sichtbar. Für die weiteren Versuche wurden die Proben mit der höchsten Reinheit ausgewählt.

6.1.11. Reverse Transkription

In einigen Versuchsansätzen wurden Standardreihen der entsprechenden Primer mit Kontrollmaterial durchgeführt. Eine Standardreihe war dann nötig, wenn die Daten der anschließend folgenden Quantitativen PCR nicht auf ein Housekeeping-Gen, sondern auf eingesetzte Gesamt-RNA-Menge normiert werden sollten. Hierfür wurde linksventrikuläres Herzgewebe aus einer unbehandelten C57BL/6 wt Maus verwendet. Es wurden RNA-Mengen im Bereich von 0,001-1 µg eingesetzt. Für die einzelnen Proben wurden Mengen im Bereich von 0,01-1 µg in Einzelstrang-DNA umgeschrieben. Um Kontaminationen mit genomischer DNA zu überprüfen, wurde von jeder Probe ein Versuchsansatz ohne Reverse Transkriptase zugesetzt (-RT). Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Reaktionsansatz:

X μl RNA

1 μ l pdT (0,5 μ g/ μ l)

Auf 10 μl mit DEPC-H₂O

5 min 65°C, dann auf Eis

Zugabe RT-Mix:

1 μl dNTP (10 mM)

4 μl 1st Strand Puffer (5x)

 $1 \mu I RT (200 U/\mu I)$

0,5 μl RNasin

3,5 μl H₂O

1h 37°C

2 min 94°C

6.1.12. Quantitative PCR (Cyber Green)

Jeweils 2 μl der umgeschriebenen cDNA wurden für die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 μl durchgeführt.

Reaktionsansatz:

10 μl Cyber Green (2x)

1 μl Primer FW (10 pmol)

1 μl Primer RW (10 pmol)

6 μl H₂O

2 μl cDNA

PCR-Pogramm:

Schritt	Dauer	Temperatur	Rampe	Zyklen
Aktivierung von HotStarTaq	15 min	95°C	20°C/s	1
Denaturierung	15 s	95°C	20°C/s	7
Anlagerung	20 s	55°C	20°C/s	\rightarrow 45
Verlängerung	25 s	72°C	20°C/s 2°C/s	J
Abkühlung				1

Die Auswertung erfolgte nach der Delta Ct-Methode. Hierzu wurde der Ct-Wert jeder Probe bestimmt. Von den ermittelten Ct-Werten der untersuchten Probe wurden die zugehörigen L32 Ct-Werte abgezogen. Bei L32 handelt es sich um ein nicht reguliertes, konstitutiv exprimiertes Gen (Housekeeping-Gen). Es eignet sich somit für die Normierung der eingesetzten cDNA Menge. Die relative Expression wurde durch die Formel 2^{-ΔCt} berechnet,

die die Expression in der Einheit fold induction (x-fache Induktion) angibt. Der erhaltene Wert wurde mit dem Faktor 100 multipliziert (Livak und Schmittgen, 2001; Soltysinska *et al.*, 2009).

Zur Überprüfung der Effizienz von Primern in einer Quantitativen PCR wurde die eingesetzte Menge an RNA als Auswertungsparameter herangezogen. Die Werte der mRNA-Expression der jeweiligen Probe wurden auf diese normiert. Der erhaltene Wert wurde mit dem Faktor 100 multipliziert.

6.1.13. Quantitative PCR (Tagman)

Jeweils 5 μl der umgeschriebenen cDNA wurden für die PCR-Reaktion eingesetz. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 μl durchgeführt.

Reaktionsansatz:

10 μl Gene Expression Master Mix (2x)

1 μl Sonden/Primer Mix

 $4 \mu l H_2O$

5 μl cDNA

PCR-Reaktion:

Schritt	Dauer	Temperatur	Rampe	Zyklen
Aktivierung von HotStarTaq	15 min	95°C	20°C/s	1
Denaturierung	15 s	95°C	20°C/s 2°C/s	٦
Verlängerung	25 s	72°C	2°C/s	} 40
Abkühlung				1

Für die Auswertung wurde die mRNA-Expression der jeweiligen Probe gegen die eingesetzte RNA-Menge normiert. Anschließend erfolgte die Normierung der mRNA-Expression der behandelten Probe gegen die mRNA-Expression der Kontrolle.

6.1.14. *In-vitro* Transkription

Zur Synthese von cRNA wurde der Vektor pGem HE Juel mit entsprechend insertierten Kanalkonstrukt bzw. KChIP2c verwendet. 2 μ g Plasmid wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym *Not* I linearisiert. Der Verdau wurde bei 37°C durchgeführt und erfolgte für mehrere Stunden oder über Nacht. Die vollständige Linearisierung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Das linearisierte Plasmid wurde durch Ausfällen aufgereinigt. Hierzu wurde der Restriktionsansatz auf 50 μ l aufgefüllt und mit 2,5 μ l 0,5 M EDTA, 5 μ l 3 M Na-Acetat und 100 μ l Ethanol versetzt. Dieser wurde für mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert, bevor er für 20 Minuten bei 14.000 Upm und 4°C zentrifugiert wurde. Das DNA-Pellet wurde mit 500 μ l 70%igem Ethanol gewaschen, für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde in 34 μ l H₂O gelöst. Die daraufhin folgende Synthese der cRNA wurde mit dem *RiboMaxTM Large Scale RNA Production System* durchgeführt. Folgender Reaktionsansatz wurde hierbei für 3-4 Stunden bei 37°C inkubiert:

Reaktionsansatz:

 μ l T7 5x Transkriptionspuffer μ l rNTPs (25 mM) μ l linearisierte DNA μ l Ribo m⁷G Cap Analog (40 mM) μ l T7 Enzym Mix μ l H₂O

Im Anschluss wurde die eingesetzte Plasmid-DNA durch 15 minütige Inkubation mit RQ1 RNasefreier DNase verdaut. Die synthetisierte cRNA wurde mittels Phenol-Chloroform Extraktion aufgereinigt. Dazu wurde diese zuerst in zwei aufeinander folgenden Schritten mit 1 Volumenanteil Phenol/C/I extrahiert und einem dritten Schritt mit einem Volumenanteil Chloroform. Dazwischen erfolgten Zentrifugationschritte für eine Minute bei 14.000 Upm nach denen die obere Phase jeweils abgenommen worden war. Anschließend wurde die cRNA mit $^1/_{10}$ Volumenanteil 3 M Na-Acetat und 2 $^1/_2$ Volumenanteilen Ethanol gefällt. Das Pellet wurde mit 500 μ l 70%igem Ethanol gewaschen, 10 Minuten bei 14.000 Upm

zentrifugiert und in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -80°C.

6.2. Proteinbiochemische Methoden

6.2.1. <u>Herstellung von Proteinlysaten</u>

Alle Schritte der Herstellung von Proteinlysaten wurden entweder auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Tiefgefrorenes oder frisch isoliertes Gewebe wurde in $^1/_{10}$ Volumen Ripa Puffer + Proteaseinhibitoren aufgenommen und mit einem Pistill homogenisiert. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde das Gewebelysat für 30 Minuten bei 8.000 g zentrifugiert, um Zellbestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C weggefroren. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mittels BioRad Protein Assay nach Herstellerangaben durchgeführt.

6.2.2. <u>Herstellung von Polyacrylamid-Gelen</u>

Je nach Größe des untersuchten Proteins wurden 8-12%ige Trenngele gegossen. Die Sammelgele waren standardgemäß 4%ig. Das Gießen der Gele erfolgte nach folgendem Rezept:

Trenngel:

Substanz	8%	10%	12%
Liqui-Gel	1,2 ml	1,5 ml	2,25 ml
Puffer A	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
H₂O	3,3 ml	3,0 ml	2,25 ml
APS 10%	45 μl	45 μl	45 μl
TEMED	7 μl	7 μl	7 μl

Sammelgel:

Substanz	4%
Liqui-Gel	0,5 ml
Puffer B	1,25 ml
H₂O	3,3 ml
APS 10%	25 μΙ
TEMED	10 μΙ

6.2.3. <u>Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)</u>

Eine bestimmte Menge (40-100 μ g) der zuvor gewonnenen Proteinlysate wurde mit $^{1}/_{4}$ Volumen Beladungpuffer versetzt und zur Denaturierung für 10 Minuten bei 72°C erhitzt. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden die Taschen des zuvor angefertigten Gels mit jeweils der gleichen Menge an Proteinlysat beladen. Als Referenz wurde ein Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 90 Minuten bei 30 mA/Gel durchgeführt.

6.2.4. Semi-Dry Western Blot

Zur Detektion spezifischer Proteine mittels Antikörper wurde ein Western Blot durchgeführt. Dazu werden die Proteine von dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran übertragen. Zunächst wurde die Membran mittels Methanol aktiviert und anschließend in Kathodenpuffer äquilibriert. Die Äquilibration des Gels erfolgte in Anodenpuffer. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei 50 mA/Gel für 90 Minuten.

6.2.5. Immunologischer Nachweis

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran für 45 Minuten in TBS mit 5% Magermilch inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Wipptisch. Nach viermaligem Waschen für je 10 Minuten mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde. Anschließend folgten erneut vier Waschschritte mit TBS-T, bevor die Membran für 5 Minuten mit ECL-Detektionslösung inkubiert wurde. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Belichtung von Röntgenfilmen unterschiedlicher Expositionszeit und anschließender Entwicklung. Zur Analyse wurden die Filme eingescannt und mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet.

Die erwarteten Größen der detektierten Proteine betrugen: Kv4.2 ca. 72 kDa, Kv4.3 ca. 72 kDa, KChIP2 ca. 26 kDa, Kv1.4 ca. 96 kDa, Kv1.5 ca. 70 kDa, Kv2.1 ca. 100 kDa, Aktin ca. 42 kDa.

6.3. Zellbiologische Arbeiten

6.3.1. Routinehaltung von immortalisierten Zellen

Alle Arbeiten mit CHO-Zellen fanden stets unter sterilen Bedingungen statt. Das Kultivieren fand in 25 cm² Kulturflaschen statt. Als Medium diente MEM Alpha Medium, das mit 10% FCS und 1% PSG angereichert wurde. Die Inkubation der Zellen fand in einem Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C statt. Die Zellen wurden drei mal pro Woche gesplittet. Hierfür wurden die Zellen zunächst zum Ablösen nach Abnahme des Kulturmediums mit 2 ml Trypsin/EDTA Lösung für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 3 ml Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und zentrifugiert (2 min, 1.200 Upm). Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Für die weiterführende Kultur wurden die Zellen in einer Dichte von 2-6 x 10⁴ in 10 ml frischem Medium ausplattiert. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen neu passagiert.

6.3.2. Transfektion von immortalisierten Zellen

CHO-Zellen wurden mittels Lipofektion transfiziert. Hierfür wurden 2 ml Zellsuspension in der gewünschten Dichte ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die Transfektion wurde 0,1 µg DNA der Kanaluntereinheit, 1 µg DPP-DNA und 0,5 µg EGFP-DNA eingesetzt. Die DNA wurde mit 100 µl OPTI-MEM I gemischt. Weiterhin wurden 2,5 µl *Lipofectamine 2000* mit 100 µl OPTI-MEM I gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden beide Ansätze zusammengeführt und für weitere 30 min inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium der Zellen gegen 800 ml 37°C warmes OPTI-MEM I ausgetauscht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Reaktionsansatz tropfenweise zu den Zellen zugegeben. Diese wurden für weitere 5 Stunden im Brutschrank inkubiert, bevor das Transfektionsmedium gegen Kulturmedium ausgetauscht wurde. Am darauf folgenden Tag konnten die Zellen für elektrophysiologische Messungen eingesetzt werden.

6.3.3. Präparation und Injektion von Xenopus-Oozyten

Nach chirurgischer Entnahme (durgeführt von Peter Bassalay) der Oozyten aus *Xenopus-laevis-*Fröschen wurden diese in Ca²⁺-freier Oozyten-Ringer-Lösung mit Kollagenase A (1,3

mg/ml) für 2-4 Stunden auf einem Schwenktisch bei RT inkubiert. Die daraufhin selektierten Oozyten wurden in Gentamycin-Lösung überführt und über Nacht bei 18°C gehalten. Am folgenden Tag wurden die Oozyten in Ca²⁺-freier Lösung mit 50 nl cRNA-Lösung injiziert. Für die Injektion wurden 0,5-1 ng cRNA/Oozyte der jeweiligen Kanaluntereinheiten bzw. KChIP2c eingesetzt.

6.3.4. Isolation von Kardiomyozyten aus der Maus

Für die Gewinnung von dissoziierten Myozyten wurden 8-12 Wochen alte C57BL/6 Mäuse verwendet. Diese wurden unter Isofluran-Narkose dekapitiert und das Herz herauspräpariert. Die Aorta wurde anschließend kanüliert und über die Kanüle an einer Langendorff-Apparatur befestigt. Zuerst wurde das Herz für 3 Minuten mit Ca²⁺-freiem Perfusionspuffer gespült, bevor der Verdau mit Blendzyme-Enzym gestartet wurde. Nach 10 minütigem Verdau wurde von dem Herzen, je nach Verwendungszweck, gesamtes linksventrikuläres (für die Immunzytochemie) oder linksventrikuläres epikardiales (für die Elektrophysiologie) Gewebe entnommen. Dieses wurde mittels zweier Pinzetten in der Verdaulösung in kleine Stücke zerteilt. Das Stoppen des Verdaus erfolgte durch Zugabe von Stopplösung 1. Die Zellen wurden daraufhin für 2 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet mit 2-4 ml Stopplösung 2 resuspendiert. Anschließend folgte in mehreren Schritten die Zuführung von Ca²⁺ bis zu einer Endkonzentration von 1 mM. Die Zellen wurden daraufhin direkt für elektrophysiologische Experimente verwendet oder weiter kultiviert.

6.3.5. <u>Kultivierung von Kardiomyozyten</u>

Um für die Kultivierung von Kardiomyozyten eine ausreichend hohe Zelldichte zu gewährleisten, wurde gesamtes linksventrikuläres Gewebe genommen. Die frisch isolierten Myozyten wurden erneut zentrifugiert und anschließend in Plattierungsmedium aufgenommen. Das Ausplattieren erfolgte mit einer Konfluenz von 60-80% auf Laminin beschichteten Deckgläschen. Nach einer Stunde wurde das Plattierungsmedium gegen Kultiviermedium ausgewechselt. In diesem konnten die Myozyten bis zu einem Tag gehalten werden.

6.4. Angiotensin II Behandlung

C57BL/6 Mäuse wurden mit einem Gemisch aus Ketamin (100 µg/g Körpergewicht) und Xylazine-HCL (4 µg/g Körpergewicht) intraperitoneal anästhesiert. Nach Eintritt der Betäubung wurden osmotische Minipumpen mit Angiotensin II- im folgenden durch Ang II abgekürzt- (gelöst in 0,5 M NaCl/1 mM Essigsäure) oder Kontrolllösung (0,5 M NaCl/1 mM Essigsäure) befüllt und subcutan implantiert. Die Ang II bzw. Sham (Kontrolle) Behandlungen wurde für eine Dauer von 14 Tagen durchgeführt.

Bei der Datenauswertung wurde das Ausmaß der durch Ang II verursachten Herzhypertrophie auf die mRNA- und Proteinexpression durch einen Hypertrophiefaktor einberechnet. Dieser betrug 1,3 und ensprach der Zunahme des relativen Herzgewichts (Herzgewicht/Körpergewicht). Diese Berechnung beruht auf der Annahme, dass die mRNA- und Proteinexpression bezogen auf das Zellvolumen bei Zunahme der Zellgröße konstant bleibt.

6.5. Immunzytochemische Färbung

Die zu färbenden Myozyten wurden nach einmaligem Waschen mit PBS für 12 Minuten mit 4% Paraformaldehyd (in PBS) fixiert. Anschließend folgten drei Waschschritte mit PBS für jeweils fünf Minuten. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 Minuten mit Permeabilisierungs-/Blocklösung behandelt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Zellen wurden dreimal gewaschen und nachfolgend für 1 Stunde mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Sowohl die Inkubation des Sekundärantikörpers, als auch alle darauf folgenden Arbeitsschritte wurden im Dunklen durchgeführt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Flouromount G auf Objektträgern eingedeckelt.

6.5.1. Aktin-Färbung

Sollte zusätzlich zur Kanal- bzw. KChIP2-Färbung eine Aktin-Färbung durchgeführt werden wurden die Myozyten in einem weiteren Färbungsschritt, der auf die Inkubation mit dem Sekundärantikörper folgte, mit Phalloidin inkubiert. Dazu wurden die Zellen zunächst

dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 15 Minuten mit Phalloidin inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und ebenfalls auf Objektträgern eingedeckelt.

6.5.2. Färbung mit Di-8-Anneps

Die Zellmembranen wurden mit Hilfe des Naphthylstyrylfarbstoffes Di-8-Anneps angefärbt. Die Inkubation mit Di-8-Anneps erfolgte im Anschluss an die Inkubation mit dem Sekundärantikörper und fand für 10 Minuten statt.

6.6. Elektrophysiologie

Alle elektrophysiologischen Messungen wurden bei Raumtemperatur (20-25°C) durchgeführt.

Für die Programmierung der Protokolle wurde das Programm PULSE verwendet. Die Auswertung der Daten fand mit PULSE FIT und KaleidaGraph statt.

6.6.1. Patch-Clamp-Messung

Mit der Patch-Clamp Methode lässt sich der Strom durch die Ionenkanäle in der Zellmembran darstellen (Abb. 7). Hierfür ist es notwendig zwischen der mit Elektrolytlösung gefüllten Pipette und der Zellmembran einen engen Kontakt, den so genannten *seal*, herzustellen. Je enger der *seal* ist, desto besser werden Leckströme verhindert. Im Idealfall sollte der Kontakt einen hochohmigen Widerstand im Bereich mehrerer GΩ betragen (*gigaseal*). Nach Bildung eines *seals* liegt die *cell-attached*-Konfiguration vor. Wird ein Unterdruck angelegt, kann das Membranstück innerhalb der Öffnung durchbrochen werden ohne den *seal* zu beeinträchtigen. In der nun vorliegenden *whole-cell*-Konfiguration ist es möglich Ionenströme in der gesamten Zellmembran zu erfassen.

Mit der Patch-Clamp Technik kann das Membranpotential U_m auf einen konstanten Wert U_{soll} geklemmt werden. Um dieses Potential halten zu können, ist es notwendig einen Kompensationsstrom zu injizieren. Diese Stromkomponente entspricht dem Ionenstrom, der zur Differenz zwischen Membranpotential und vorgegebenen Potential führt. Der

Kompensationsstrom wird über einen Strom-Spannungswandler erzeugt. Dieser besteht aus einem Operationsverstärker (OPA), der die beiden Eingangssignale U_m und U_{soll} verrechnet und eine Spannung erzeugt, die proportional zur Differenz der Eingangssignale ist, aber um entsteht ein vielfaches verstärkt. Es ein Spannungsabfall über dem Rückkopplungswiderstand Rf, der zur Injektion von Strom in die Zelle führt. Gemessen wird eine Spannungsdifferenz zwischen V_{soll} und der Ausgangsspannung am OPA, die dem Kontrollstrom proportional ist. Über einen entsprechenden Kalibrierungsfaktor kann der Kontrollstrom berechnet werden.

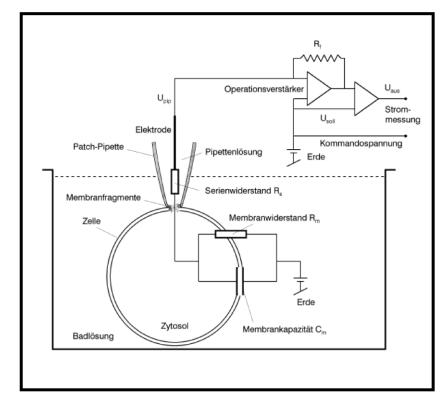


Abbildung 7: Vereinfachtes Schaltbild einer Patch-Clamp-Ableitung.

R_f: Rückkopplungswiderstand

R_s: Serienwiderstand,

R_m: Membranwiderstand,

C_m: Membrankapazität;

U_{pip}: Pipettenspannung,

U_{soll}: Kommando-Spannung,

U_{aus}: Ausgangsspannung; (Numberger und Draghun,

1996).

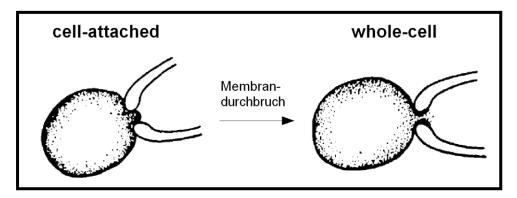


Abbildung 8: Patchkonfigurationen.

Abbgebildet sind die cell-attached- und die whole-cell-Konfiguration.

6.6.2. <u>Ausstattung des Patch-Clamp Messtandes</u>

Voraussetzung für den Erfolg der hochempfindlichen Patch-Clamp Messung ist ein erschütterungsfreier Messplatz. Daher ist die Messapparatur auf einem schwingungsfreien Messplatz gelagert. Um das Hintergrundrauschen und evtl. 50 Hz Wechselstrom-Schwingungen bei den Messungen zu minimieren, wird der Messtand durch einen Faraday-Käfig gegenüber äußeren elektromagnetischen Feldern abgeschirmt.

Das langsame und gerichtete Steuern der Patchpipette wurde über einen Mikromanipulator geregelt. Visualisiert wurde über ein inverses Mikroskop mit bis zu 400-facher Vergrößerung und Phasenkontrastoptik. Mit einer Hg-UV Lampe konnte, das als Transfektiosmarker eingesetzte, EGFP in den Zellen detektiert werden. Die Versuche wurden in 35 mm Zellkultur-Schalen durchgeführt, welche direkt auf dem Objekttisch des Mikroskops eingesetzt wurden. Die Superfusion der Zellen mit Messlösung erfolgte über eine *Minipuls 3* Pumpe. Die Absaugung erfolgte mittels einer Vakuumpumpe.

Zur Herstellung von Patchpipetten wurden Kapillaren aus Borosilikatglas mit Hilfe eines Pipettenziehgeräts ausgezogen, so dass eine Öffnung von ca. 1 μ m Durchmesser entstand. Im Versuch eingesetzt wurden Pipetten, die in Messlösung einen Widerstand von 2-3 $M\Omega$ hatten. Die Pipette wurde in einen am Vorverstärker befestigten Pipettenhalter eingesetzt. Ein chlorierter Draht in dem Pipettenhalter stellte die Verbindung zwischen Pipettenlösung und Verstärker her. Als Badelektrode diente ein Ag/AgCl-Pellet.

6.6.3. Datenerfassung

Die vom OPA gemessenen Signale wurden an den Hauptverstärker *EPC9* weitergeleitet. Die Steuerung des Verstärkers und die Digitalisierung der gemessenen Signale erfolgte über einen *ITC16* AD/DA-Wandler. Die Aufnahmefrequenz der Digitalisierung betrug 1-20 kHz. Zur Datenerfassung und Steuerung des Verstärkers wurde die Software Pulse eingesetzt Kapazitive Ströme sowie Serienwiderstände wurden durch den Verstärker kompensiert.

6.6.4. Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Zur Untersuchung der in Oozyten exprimierten Kanäle wurde die Methode der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme angewandt. Dabei wird das Elektroden Potential mittels zweier intrazellulärer Elektroden kontrolliert. Die Spannungselektrode misst das Membranpotential, während die Stromelektrode Strom injiziert, um das gewünschte Membranpotential aufrecht zu erhalten.

6.6.4.1. Ausstattung des Messplatzes

Die Messapparatur war auf einer Metallplatte aufgestellt. Die Elektrodenhalter waren an einem mechanischen Mikromanipulator befestigt. Der optischen Kontrolle diente ein Binokular. Die Superfusion der Oozyten mit Messlösung erfolgte über Schwerkraft. Die Messpipetten wurden aus Borosilikatglas mit einem vertikalen Pipettenziehgerät gezogen und die Spitze anschließend vorsichtig abgebrochen. Befüllt wurden die Elektroden mit 3 M KCl-Lösung. Der Kontakt zur Pipettenlösung wurde durch chlorierte Silberdrähte hergestellt. Als Badelektrode diente ein Ag/AgCl-Pellet.

6.6.5. Verwendete Stimmulationsprotokolle und Auswertung

Für die Untersuchung des Schaltverhaltens von Kanälen wurden verschiedene Protokolle angewendet.

6.6.5.1. Testpuls

Zur Bestimmung des funktionellen Expressionslevels wurden Testpulse ausgelöst. Hierbei wird von einem negativen Potential, welches in etwa dem Ruhemembranpotential entspricht, auf +40 mV gepulst, was zur Aktivierung der Kanäle führt.

In Kardiomyozyten sowie in Oozyten wurden Kaliumkanäle durch Pulsen von einem Haltepotential von -80 mV auf +40 mV aktiviert. Um den Kv4.2-vermittelten I_{to} von den gesamten Kaliumströmen zu isolieren wurde im Anschluss ein zweites Protokoll durchgeführt, in welchem der Kv4.2-vermittelte I_{to} durch einen 100 ms langen Vorpuls auf -40 mV inaktiviert wurde. Die Subtraktion der mit diesen beiden Protokollen erhaltenen Stromkurven ergibt den Zeitverlauf für den Kv4.2-vermittelten I_{to} (siehe Abb. 14).

Zur Bestimmung des Expressionslevels wurde die maximale Amplitude der Stromantwort auf den Testpuls herangezogen. Weiterhin wurde die Stromdichte berechnet. Dazu wurde die maximale Amplitude auf die Ganzzellkapazität bezogen. Bei Versuchen in Oozyten wurde lediglich die Stromamplitude zur Auswertung verwendet.

6.6.5.2. <u>Erholung von der Inaktivierung (Recovery)</u>

Die Erholung aus der Inaktivierung ist der Vorgang, bei dem inaktivierte Kanäle in einen aktivierbaren Zustand übergehen. Um den Aspekt der Zeitkonstante zu erfassen wurde folgendes Protokoll angewendet: Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde ein Spannungssprung auf +40 mV ausgelöst und von diesem wurde wieder auf das Haltepotential zurückgegangen. Es folgte ein zweiter Puls auf +40 mV. Der Zeitabstand zwischen diesen beiden Pulsen wurde jeweils verdoppelt und lag im Bereich zwischen 10 und 2.560 ms bei Messungen in Kardiomyozyten bzw. zwischen 10 und 34.560 ms bei Messungen in Oozyten.

Für die Auswertung wurde die maximale Stromstärke des zweiten Pulses auf die maximale Stromstärke des vorangegangenen Kontrollpulses normiert und gegen die Zwischenpulsdauer t aufgetragen. Die Beziehung kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

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

In: Testpuls

I_{max}: Kontrollpuls

t: Zwischenpulsdauer

 τ_{rec} : Zeitkonstante für die Erholung von der Inaktivierung

6.7. Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten 8-12 Wochen alte C57BL/6 Mäuse der Firma Charles River sowie der Zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf. Die Versorgung der Tiere erfolgte über das Fachpersonal der Zentralen Versuchstierhaltung. Die Haltung der Versuchstiere ist durch das Gesetz zum Europäischen Übereinkommen vom 18. März 1986 sowie die EU-Richtlinien EWG geregelt. Sie erfolgte Tiergerecht unter standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 25°C und einem Hell-Dunkel-Zyklus von jeweils 12 Stunden. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und wurden mit Trockenpellets (V1536-000 sniffR/M-H, Sniff, Deutschland) gefüttert.

Methoden

Die Haltung von *Xenopus laevis* erfolgte unter standartisierten Bedingungen bei einer Wassertemperatur von 20-22°C und einem Hell-Dunkel-Zyklus von jeweils 12 Stunden.

6.8. Statistik

Alle statistischen Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem t-Test nach Student ermittelt.

Die Wahrscheinlichkeit des Fehlers erster Art wurde mit α = 0,01 angenommen, als Signifikanzniveau wurde entsprechend ein p = 0,01 festgelegt.

7. Ergebnisse

7.1. Molekulare Korrelate repolarisierender Kaliumströme im normalen und hypertrophierten Mäuseherzen

7.1.1. mRNA-Expression von Ionenkanälen im Epikard des linken Ventrikels

Um Aussagen über die Rolle molekularer Korrelate repolarisierender Kaliumströme im Mäuseventrikel treffen zu können, sollte mittels Quantitativer PCR ein Überblick über deren Expressionrate gewonnen werden.

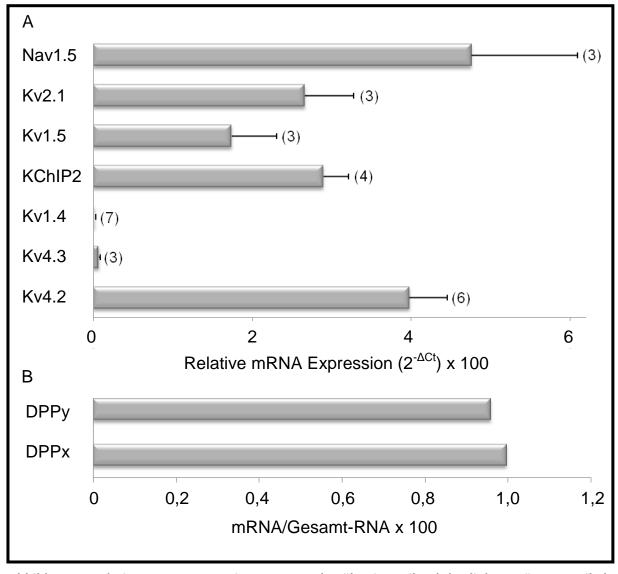


Abbildung 9: Relative mRNA-Expression von Ionenkanälen im Epikard des linken Mäuseventrikels sowie mRNA Expression von DPPs im Gehirn.

A: Aufgezeigt ist die relative mRNA Expression von Kaliumkanälen, KChIP2 sowie dem Natriumkanal Nav1.5 im Epikard des linken Mäuseventrikels. Die Normierung der Expression erfolgte gegen das Housekeeping-Gen L32. Die Anzahl der Versuche ist neben den Balken angegeben. B: Die mRNA Expression von DPPs im Gehirn diente als PCR Kontrolle. Die mRNA Expression wurde gegen die eingesetzte Gesamt-RNA normiert (n=1).

Hierzu wurde RNA aus epikardialem Gewebe des linken Mäuseventrikels isoliert, da in diesem Herzgewebe die höchste Ito-Dichte nachgewiesen wurde. Die Expression der unterschiedlichen Kaliumkanalkomponeten wurde gegen L32 normiert (siehe Kapitel 6.1.12). Abbildung 9 zeigt eine Expression von Kv4.2 und KChIP2 in einem ungefähren Verhältnis von 1:0,75. Die Expression von Kv1.4, der molekularen Komponente, die die langsame Komponente des I_{to} vermittelt, war wesentlich schwächer und betrug nur etwa $^{1}/_{250}$ der Expression von Kv4.2. Kv1.5 wurde etwa 50% geringer exprimiert als Kv4.2. Die Expression von Kv2.1 entsprach in etwa derjenigen von KChIP2. Nav1.5 ist die molekulare Komponente des Natriumkanals im Herzen der Maus und wurde in ungefähr dem gleichen Maße exprimiert wie Kv4.2. Kv4.3 ist die molekulare Komponente, die die schnelle Komponente des I_{to} z.B. beim Menschen und beim Hund vermittelt. In der Maus war die Expression von Kv4.3 nur geringfügig ausgeprägt und betrug ca. $^{1}/_{40}$ der Expression von Kv4.2. Es konnte in den vorliegenden Experimenten keine Expression der akzessorischen Untereinheiten DPPx und DPPy im Mäuseventrikel gemessen werden. Als Positiv-Kontrolle wurde die Expression von DPPx und DPPy im Maushirn untersucht. Im Gehirn konnten beide Formen von DPP nachgewiesen werden (Abb. 9B).

7.1.2. Subzelluläre Lokalisation von Kv4.2 und KChIP2 in Myozyten

Zur Aufklärung der subzellulären Lokalisation von Kv4.2 bzw. KChIP2 wurden linksventrikuläre Myozyten immunzytochemisch untersucht. Auf diese Weise sollte das Maß der Oberflächenlokalisation von Kv4.2 geklärt werden. Weiterhin sollte überprüft werden, ob die subzelluläre Lokalisation von KChIP2 der von Kv4.2 entspricht oder KChIP2 in komplett anderen Zellkompartimenten lokalisiert ist.

Für die Lokalisation von Kv4.2 existieren widersprüchliche Ergebnisse. Unterschiedliche Studien in Rattenmyozyten belegen eine Lokalisation an T-Tubuli (Takeuchi *et al.*, 2000) und an der Oberflächenmembran (Barry *et al.*, 1995).

Zur Darstellung der Zellmembran und der T-Tubuli wurden die Zellen zusätzlich mit dem Farbstoff Di-8-Anneps angefärbt, einem sich in der Zellmembran verankernden Farbstoff.

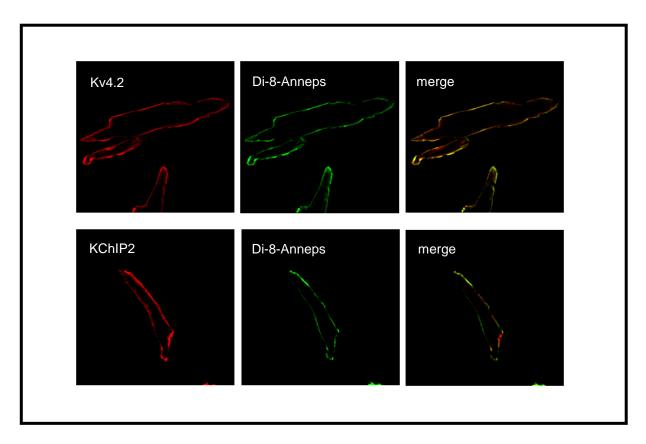


Abbildung 10: Lokalisation von Kv4.2 und KChIP2 in linksventrikulären Mäusemyozyten.

Immunzytochemische Fluoreszenzfärbungen von Kv4.2 und KChIP2. Die Abbildungen zeigen Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung.

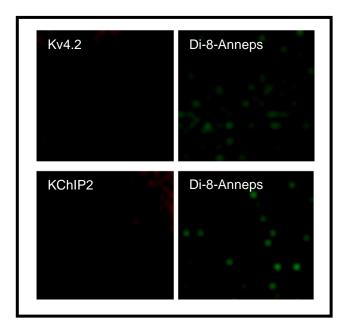


Abbildung 11: Vergrößerung der in Abbildung 10 gezeigten Myozyten.

Die in Abbbildung 10 dargestellten Färbungen von Kv4.2, KChIP2 und Di-8-Anneps wurden auf 245% vergrößert, um mit Di-8-Anneps angefärbten Zellkompartimente, bei denen es sich vermutlich um T-Tubuli handelt, sichtbar zu machen. Die sich jeweils entsprechenden Zellabschnitte sind abgebildet.

Die Färbung mit Di-8-Anneps ist äußerst schwach. Möglicherweise angefärbte T-Tubuli sind somit in Abbildung 10 nicht zu erkennen. Aus diesem Grund wurde ein auf 245% vergrößerter Abschnitt der Zelle exemplarisch dargestellt (Abb. 11).

Die Zellmembran konnte mittels Di-8-Anneps erfolgreich angefärbt werden. Die Färbung von Kv4.2 zeigt, dass der Kanal an der Zellmembran lokalisiert war (Abb. 10). Dies wird besonders in der Überlagerung (overlay) der Färbung von Kv4.2 und Di-8-Anneps sichtbar. Wie Abbildung 10 zeigt, war KChIP2 ebenso wie Kv4.2 an der Zelloberfläche lokalisiert. Die Oberflächenlokalisation des cytoplysmatischen Proteins KChIP2 ist ein weiterer Aspekt, der auf eine Interaktion mit Kv4.2 hinweist. Eine Doppelfärbung konnte aufgrund des Fehlens miteinander kombinierbarer Antikörper nicht durchgeführt werden.

7.1.3. Ang II-Modell der linksventrikulären Herzhypertrophie

In unterschiedlichen Modellen linksventrikulärer Hypertrophie wird eine verminderte I_{to}-Dichte beobachtet (Potreau *et al.*, 1995; Meszaros *et al.*, 1996; Kaprielian *et al.*, 1999; Hart *et al.*, 2003; Nattel *et al.*, 2007). Diese kann zu einer veränderten Kopplung zwischen Herzerregung und Kontraktion beitragen. *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass Ang II, welches eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie spielt, die mRNA-Expression von Kv4.3 reduziert (Zhang *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2006). In diesem Mausmodell sollten mittels 14-tägiger Applikation von Ang II über osmotische Minipumpen die Effekte von Ang II auf den Kv4.2-vermittelten I_{to} *in vivo* untersucht werden.

7.1.3.1. <u>Hypertrophieparameter</u>

Bei einer Hypertrophie kommt es zu einer Organgewichtszunahme, die durch eine Volumenzunahme der Zellen bei konstanter Zellzahl bedingt ist.

Um in dem Ang II-Modell den Nachweis zu erbringen, dass es zu einer Herzhypertrophie gekommen ist, wurde das Herzgewicht jedes entnommenen Herzens bestimmt und auf das Gewicht der jeweiligen Maus bezogen. Weiterhin wurden bei den elektrophysiologischen Messungen die Zellkapazitäten bestimmt. Diese sind ein direktes Maß für die Zellgröße.

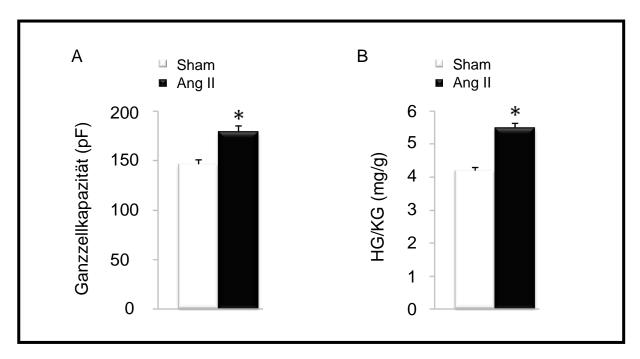


Abbildung 12: Hypertrophieparameter.

Dargestellt sind die Ganzzellkapazität, repräsentativ für die Zellgröße, (A; Sham, n=23; Ang II, n=27) und das relative Herzgewicht (B; HG/KG; Sham, n=10; Ang II, n=10) ± Ang II. Die Behandlung mit Ang II führte zu einer signifikanten (*) Zunahme beider Parameter (p≤0,01), was eine Hypertrophie bestätigt.

Die Behandlung mit Ang II führte zu einer Zunahme der Zellkapazität um 22,6% (Abb. 12A). Die Zunahme der Zellgröße korrelierte mit der Zunahme der Ratio von Herzgewicht zu Körpergewicht (Abb. 12B).

7.1.3.2. <u>Hämodynamische Parameter und Reninwerte</u>

Die wichtigsten Ursachen für die Ausbildung einer Hypertrophie sind eine vermehrte Druckoder Volumenbelastung. Ang II wirkt primär vasokonstriktorisch, was zu einer Erhöhung des
Blutdrucks führt. Die Erhöhung des Blutdrucks führt zur Inhibierung der Freisetzung von
Renin.

Um in dem hier untersuchten Mausmodell die Wirkung von Ang II auf Renin zu analysieren, wurde die Renin mRNA-Expression in der Niere mittels Quantitativer PCR überprüft.

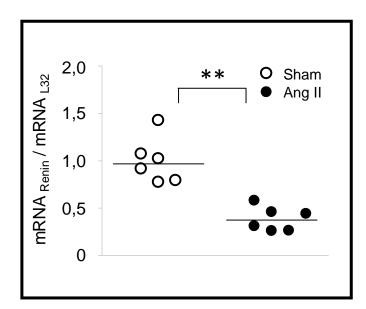


Abbildung 13: Renin mRNA-Expression in der Niere.

Die Abbildung zeigt die auf L32 normierte Renin mRNA-Expression in der Niere mit und ohne Applikation von Ang II. Signifikanz (**, $p \le 0,001$).

Die mRNA-Expression von Renin war nach 14 Tagen Behandlung mit Ang II um etwa 50% niedriger als bei Sham-Behandlung (Abb. 13).

Die Ermittlung des mittleren arteriellen Blutdrucks wurde telemetrisch über den gesamten Zeitraum der Ang II-Behandlung durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Zur Kontrolle wurden die Blutdrücke drei Tage lang vor Behandlung mit Ang II gemessen. Während dieser drei Tage waren die mittleren arteriellen Blutdrücke konstant bei einem Wert von 112 mm Hg (n=4). Eine 14-tägige Applikation von Ang II führte zu einem Blutdruckanstieg auf 149 mm Hg, welches einem Anstieg von 33% entspricht (Die Blutdruckdaten wurden von Diane Goltz erhoben; Tozakidou *et al.*, 2009).

7.1.3.3. K⁺-Ströme in normalen und hypertrophierten linksventrikulären Mäusemyozyten

Kaliumströme wurden mit Hilfe der Patch-Clamp Technik gemesen. Zusätzlich zu den Gesamtkaliumströmen wurde der Kv4.2-vermittelte I_{to} anhand eines Subtraktinsprotokolls ermittelt (siehe Kapitel 6.6.5.1). Zur Charakterisierung der Ströme wurden die maximale Stromamplitude und die Stromdichte (maximale Stromamplitude normiert auf die Zellkapazität) ausgewertet. Alle in dieser Arbeit gezeigten elektrophysiologischen Daten sind übersichtshalber in Kapitel 11 (Tabellen) noch einmal aufgelistet.

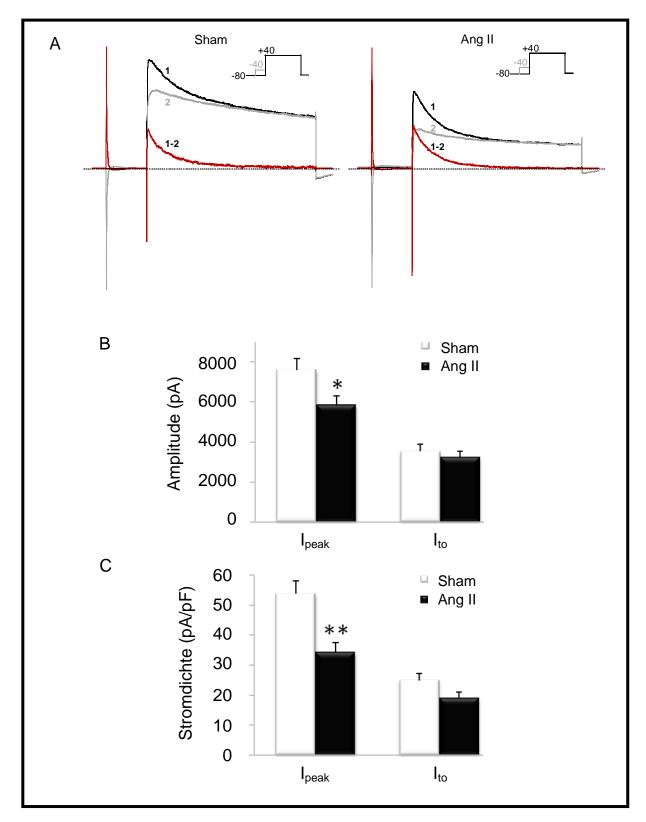


Abbildung 14: Kaliumströme in Mäusemyozyten vor und nach Ang II-Behandlung.

Patch-Clamp Messungen linksventrikulärer epikardialer Mäusemyozyten nach Sham (n=23) und Ang II (n=27) Behandlung. A: Subtraktionsprotokoll und repräsentative Stromspuren von Kaliumströmen in linksventikulären epikardialen Mäusemyozyten. B: Stromamplituden von Gesamtkaliumstrom und I_{to} . C: Stromdichten von Gesamtkaliumstrom und I_{to} . Signifikanz (*, p≤0,01 und **, p≤0,001).

Die maximale Amplitude des Gesamtkaliumstroms war im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sham) nach Applikation von Ang II signifikant niedriger (Kontrolle: 7606 ± 571 pA, n=23; Ang II: 5837 ± 477 pA, n=27; Abb. 14B). Die maximale I_{to}-Amplitude war nach Ang II-Behandlung im Vergleich zur Sham-Behandlung unverändert (Abb. 14B).

Die Stromdichte war nach Ang II-Behandlung hoch signifikant vermindert (Sham: 53,8 \pm 4,4 pA/pF, n=23; Ang II: 34,2 \pm 3,4 pA/pF, n= 27; Abb. 14C). Die I_{to}-Stromdichte war nach Ang II-Behandlung ebenfalls niedriger (Kontrolle 25 \pm 2,2 pA/pF, n= 23; Ang II: 19,0 \pm 2,0 pA/pF, n=27; Abb. 14C). Die stärkere Abnahme der Stromdichte im Vergleich zur Stromamplitude korrelierte mit der Zunahme der Zellgröße nach Ang II-Behandlung. Die Normierung der maximalen Stromamplitude gegen die Zellkapazität (Stromdichte), wurde durch die Zunahme der Zellgröße direkt beeinflusst (Die elektrophysiologischen Daten wurden von Magdalini Tozakidou erhoben; Tozakidou *et al.*, 2009).

7.1.3.4. <u>Modulation der Gen- und Proteinexpression molekularer K⁺-Stromkomponenten im Ang II Hypertrophiemodell</u>

Zur Überprüfung der Wirkung von Ang II auf molekulare Komponeten, die den I_{to} vermitteln, wurden die mRNA- und die Proteinexpression der entsprechenden Komponenten untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von Kv4.2 im Epikard des linken Ventrikels bei Ang II behandelten Mäusen etwa 25% der mRNA-Expression im Sham behandelten Tier entsprach. Die mRNA-Expression von KChIP2 war nach Behandlung mit Ang II hingegen nur um ca. ¹/₄ niedriger als in der Kontrolle. Der mRNA-Level von Kv1.4 war im Epikard des linken Ventrikels nach Gabe von Ang II im Vergleich zur Kontrolle um ca. das 5-fache höher. Die Expression im Ang II behandelten Tier wurde an den Hypertrophiefaktor 1,3 angeglichen (siehe Kapitel 6.4). Wurde die mRNA-Expression an diesen Wert angeglichen, ergab sich für Kv4.2 eine Zunahme von ca. 50%, der Level der Expression von KChIP2 blieb in etwa konstant und der Wert für die Kv1.4 Expression war nach Ang II-Behandlung etwa um den Faktor 8 erhöht (Daten von Diane Goltz; Tozakidou *et al.*, 2009).

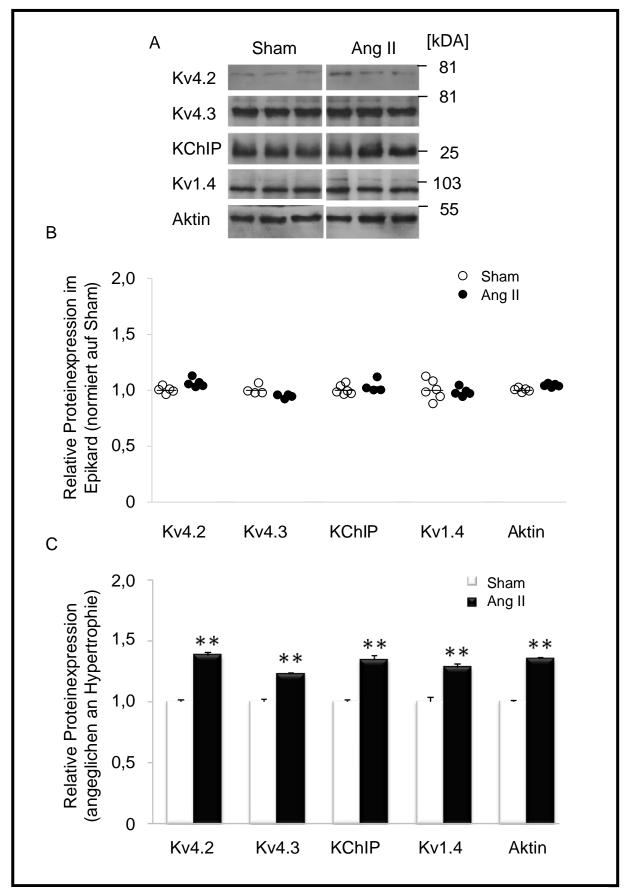


Abbildung 15: Proteinexpression molekularer I_{to} -Komponenten nach Ang II-Behandlung.

A: Repräsentative Western Blots molekularer I_{to} -Komponenten im Epikard des linken Mäuseventrikels \pm Ang II. B: Proteinexpression molekularer I_{to} -Komponenten einzelner Tiere. C: Proteinexpression molekularer I_{to} -Komponenten angeglichen an die Hypertrophie. Signifikanz (**, p \le 0,001).

Wie in Abbildung 15A zu sehen ist, war die Proteinexpression von Kv4.2, Kv4.3, KChIP, Kv1.4 und Aktin im Hypertrophiemodell im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Wurde die Proteinexpression an den Hypertrophiefaktor angeglichen, entsprach der Anstieg des Wertes für die Proteinexpression von Kv4.2, Kv4.3, KChIP, Kv1.4 und Aktin dem Hypertrophiefaktor von 1,3.

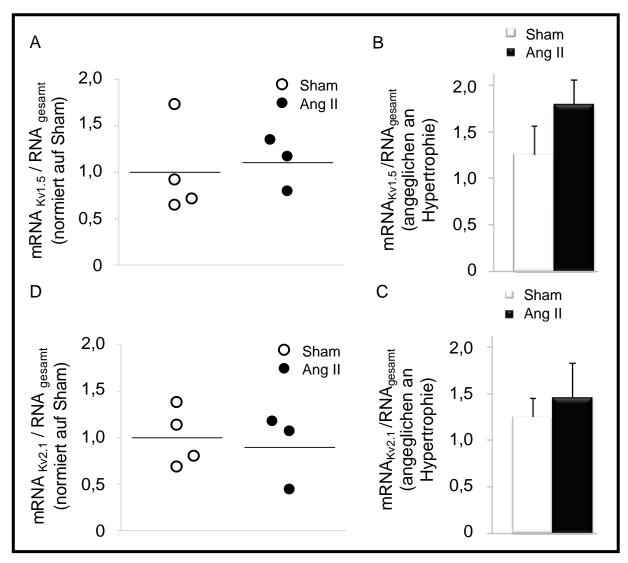


Abbildung 16: mRNA Expression von Kv1.5 und Kv2.1 im Epikard des linken Mäuseventrikels nach Sham- und Ang II-Behandlung.

mRNA Expression von Kv1.5 bzw Kv2.1 im Epikard des linken Mäuseventrikels normiert auf die Gesamt-RNA. A, B: Kv1.5 mRNA- bzw. Kv2.1 mRNA-Expression einzelner Tiere ± Ang II. C, D: mRNA-Expression von Kv1.5 und Kv2.1 angeglichen an die Hypertrophie (Faktor 1,3).

In kardialen Mäusemyozyten besteht der repolarisierende Kaliumstrom neben dem I_{to} aus der nicht inaktivierenden Stromkomponente I_{ss}, welche durch die Kaliumkanäle Kv2.1 und Kv1.5 vermittelt wird. In Abbildung 14 ist zu sehen, dass der I_{ss} in linksventrikulären epikardialen Mäusemyozyten von Ang II behandelten Mäusen geringer ist als bei Shambehandelten. Aus diesen Gründen wurde die mRNA- und Proteinexpression von Kv2.1 und Kv1.5 untersucht.

Die Ergebnisse zeigen eine leichte erhöhte Kv1.5 mRNA-Expression nach Ang II-Behandlung (Abb. 16A). Der mRNA-Level von Kv2.1 war bei Hypertrophie schwach erniedrigt (Abb. 16B). Das Angleichen der mRNA-Expression an den Hypertrophiefaktor führte zu einer Zunahme beider Werte.

Die Proteinexpression von Kv2.1 und Kv1.5 ist bei Hypertrophie um ca ¹/₃ geringer als bei Sham Behandlung (Abb. 17B). Nach Angleichen der Werte für die Proteinexpression von Kv2.1 und Kv1.5 an den Hypertrophiefaktor war keine Abnahme in der Proteinexpression beider Proteine nach Ang II-Behandlung im Vergleich zur Sham-Behandlung mehr vorhanden (Abb. 17C).

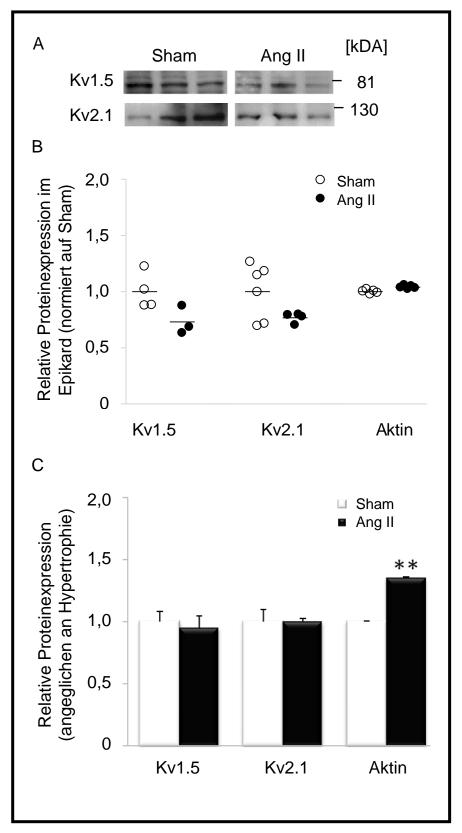


Abbildung 17: Proteinexpression molekularer I_{ss}-Komponenten im Epikard des linken Mäuseventrikels vor und nach Ang II-Applikation.

A: Repräsentative Western Blots molekularer I_{ss}-Komponenten im Epikard des linken Mäuseventrikels ± Ang II. B: Proteinexpression molekularer I_{ss}-Komponenten von einzelnen Mäusen. C: Proteinexpression angeglichen an die Hypertrophie. Signifikanz (**, p≤0,001).

Da sich weder die I_{to}-Amplitude noch die Kv4.2-Proteinexpression durch Ang II vermindert darstellten , sollte eine Korrelation zur Oberflächenexpression von Kv4.2 untersucht werden. Daher wurden Sham und Ang II behandelte linksventrikuläre murine Myozyten immunzytochemisch untersucht.

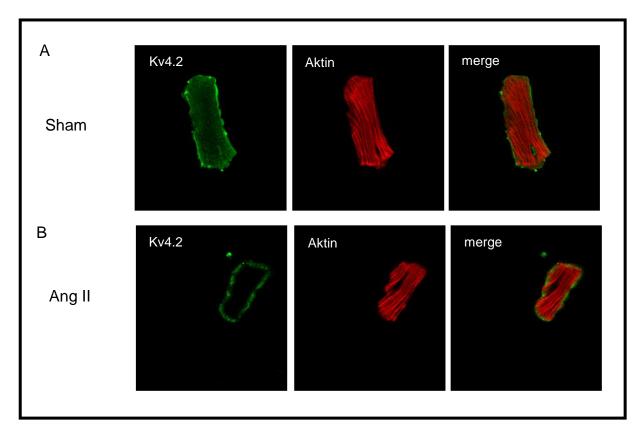


Abbildung 18: Einfluss von AngII auf die Oberflächenlokalisation von Kv4.2 in linksventrikulären Mäusemyozyten.

Immunzytochemische Fluoreszenzfärbungen von Kv4.2 und Aktin nach Sham- und Ang II-Behandlung in 40-facher Vergrößerung. A: Färbung von Kv4.2 und Aktin nach Sham-Behandlung. B: Färbung von Kv4.2 und Aktin nach Ang II-Behandlung.

Kv4.2 war in linksventrikulären Mäusemyozyten unter Kontrollbedingungen größtenteils in der Zellmembran lokalisiert. Jedoch ließ sich Kv4.2 zusätzlich im Zytoplasma detektieren (Abb. 18A). In Kardiomyozyten von Ang II behandelten Mäusen war immer noch eine deutliche Lokalisation von Kv4.2 an der Zelloberfläche zu beobachten (Abb. 18B). Anhand der Aktin-Färbung ist das Zytoskelett der Zelle zu erkennen. Nach Ang II-Behandlung sind keine Veränderungen in der Morphologie von Aktin im Vergleich zur Kontrolle (Sham) zu erkennen (Abb. 18 A+B).

7.2. Bindungsdefizienz von Kv4.2-Kanälen für akzessorische Untereinheiten

7.2.1. KChIP-Bindungsdefizienz

Die Aminosäure 14 im N-Terminus von Kv4.2 scheint essentiell für die Bindung von KChIP2 zu sein. Zur Vermeidung von Artefakten, die bei Überexpressions-Experimenten auftreten, wurde die Mutation A14K gewählt, um ein Knock-in Mausmodell der KChIP2-Bindungsdefizienz zu generieren. Hierzu war es erforderlich einen Targetingvektor zu erstellen. Dieser sollte dazu dienen die mutierte Sequenz über homologe Rekombination in das Genom muriner embryonaler Stammzellen zu integrieren. Die homolog rekombinierten embryonalen Stammzellen können anschließend in Embryonen des Blastozysten-Stadiums eingebracht werden. Die Klonierung des Targetingvektors ist im folgenden dargestellt.

Genomische KCND2-DNA (Genname von Kv4.2) wurde aus den BAC-Klonen CH29-608B und CH29-24J gewonnen. Als Vektor-Hintergrund für das Einbringen in embryonale Stammzellen wurde der PKO-Scrambler gewählt. Dieser enthält das Diphteria-Toxin Fragment, welches als negativer Selektionsmarker dient. Bei Insertion von Vektor-Hintergrund in das Genom, führt die Expression von Diphteria-Toxin zu einem Absterben der Zellen.

Um entsprechende Schnittstellen in der benötigten KCND2-Sequenz zu erhalten, die eine Klonierung in den PKO-Scrambler ermöglichen, wurde zunächst ein 4254 bp großes KCND2-Fragment aus dem BAC-Klon CH29-608B mittels der Restriktionsenzyme *Apa*I und *Eco*RV herausgeschnitten. Dieses Fragment enthält das Exon 1 sowie 5` und 3` gelegene Intronsequenzen. Diese homologen Sequenzen sind für eine erfolgreiche Insertion fremder Gensequenzen in das Genom embryonaler Stammzellen erforderlich. Das Fragment wurde anschließend in den Blueskript-Vektor pBSK- kloniert (Abb. 19).

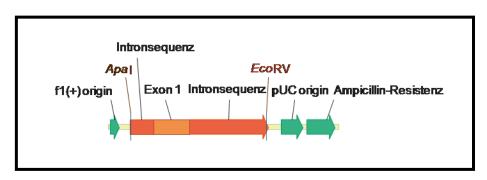


Abbildung 19: mKv4.2 in pBSK-.

Abgebildet ist die murine Kv4.2-Gensequenz in Blueskript pBSK-. Nachfolgend wurde das Stück genomische DNA über die Restriktionsenzyme *Kp*nI und *Sac*II aus dem Blueskript-Vektor in den PKO-Scrambler kloniert (Abb. 20). Anschließend wurde die Mutaion A14K mittels Overlap-PCR eingebracht.

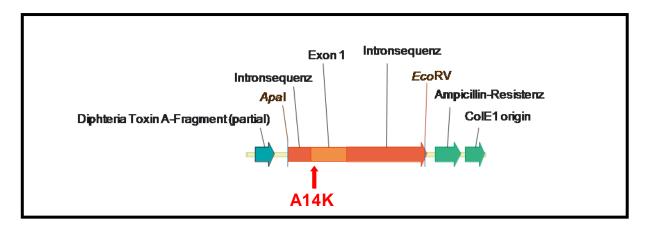


Abbildung 20: mKv4.2 in PKO-Scrambler.

Dargestellt ist die murine Kv4.2-Gensequenz in dem Vektor PKO-Scrambler. In Exon 1 wurde die Mutation A14K eingebracht.

Um die Chancen einer homologen Rekombination zu erhöhen wurde der 3`-Homologiearm verlängert. Hierfür wurde ein 8051 bp großes PCR-Produkt aus dem BAC-Klon CH29-124J hergestellt und dieses in den Vektor pGEM-T kloniert (Abb. 21A).

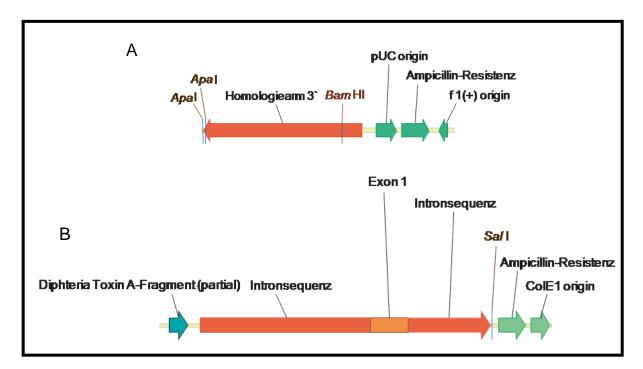


Abbildung 21: Verlängerung des 3'Homologiearms.

A: 3`-Homologiearm in Klonierungsvektor pGEM-T. B: Ligation des Homologiearms an die Kv4.2 Sequenz in PKO-Scrambler.

Bei pGEM-T handelt es sich um einen Vektor mit 3'überhängenden Adenosinen, wodurch eine direkte Klonierung von PCR-Produkten möglich ist.

Aus diesem konnte der 3'Homologiearm mit Hilfe der Restriktionsenzyme BamHI und ApaI herausgeschnitten werden und über die Restriktionsschnittstellen Bg/II und ApaI an das 3'-Ende der bereits in den PKO-Scrambler klonierten genomischen KCND2-Sequenz gesetzt werden (Abb 21B). Die komplementären Schnittstellen Bg/II und BamHI wurden dadurch zerstört.

Für die Selektion homolog rekombinierter embryonaler Stammzellen ist ein positiver Selektionsmarker nötig. In der Regel wird hierfür das Neomycin-Resistenzgen (Neo-Kassette) verwendet, das entweder durch loxP- oder FRT-sites flankiert ist. Die Selektion erfolgt mit dem Antibiotikum Geniticin (G418). Die Selektion überleben nur Zellen, welche die Neo-Kassette insertiert haben. Die loxP- oder FRT-sites ermöglichen es, bei Bedarf die Neo-Kassette durch Cre- bzw. FLP-Rekombinase wieder aus dem Genom zu entfernen.

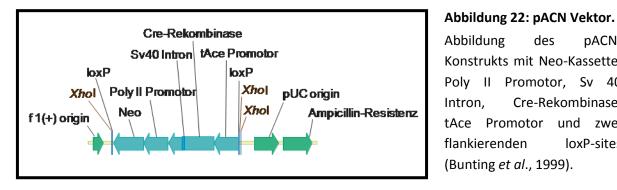


Abbildung des pACN-Konstrukts mit Neo-Kassette, Poly II Promotor, Sv 40 Cre-Rekombinase, Intron, tAce Promotor und zwei

loxP-sites

In diesem Ansatz fand das Konstrukt pACN Verwendung (Abb. 22). Dieses enthält eine sich selbst spleißenden Neo-Kassette. Während der Spermatogenese ist der tACE-Promotor aktiv und führt zur Expresssion der Cre-Rekombinase. Über die flankierenden loxP-sites wird das gesamte Konstrukt durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten, es bleibt lediglich eine loxP-site erhalten.

Das Einbringen des pACN-Konstrukts erfolgte in die 5'-Intronsequenz (Abb. 23) des bisher klonierten Targetingvektors, über eine dafür eingebrachte Xhol-site.

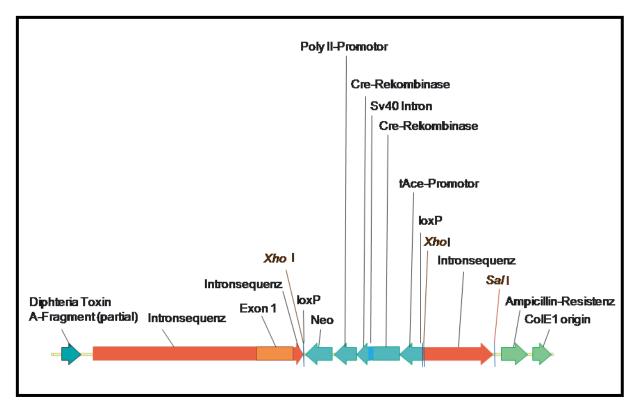


Abbildung 23: Targetingvektor.

Die Abbildung zeigt den Targetingvektor für das Einbringen in embryonale Stammzellen. Der Targetingvektor enthällt die genomische KCND2-Sequenz sowie eine als positiver Selektionsmarker fungierende Neo-Kassette.

Abbildung 23 zeigt das endgültige Konstrukt der Klonierung. Der Targetingvektor kann mit Hilfe des Restriktionsenzyms *Sal*I linearisiert werden und nach Phenol-Chloroform Extraktion in murine embryonale Stammzellen eingebracht werden. Dieses konnte im Rahmen der Arbeit nicht durchgeführt werden.

7.2.2. DPP-Bindungsdefizienz

Für Kv4.2 sind bisher keine Mutationen beschrieben, die eine DPPx- oder DPPy-Bindungsdefizienz aufweisen. Allerdings sind für Kv4.3 zwei Mutationen in der zweiten Transmembrandomäne publiziert, die auf eine Bindungsdefizienz von DPPy an diesen Kanal hinweisen (Ren *et al.*, 2005). Für Kv4.2 wurden bereits in einer früheren Doktorarbeit zwei Konstrukte (Kv4.2A235V-HA und Kv4.2I239W-HA) kloniert, die an homologer Position mutiert waren (Sven Hartmann). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei weitere Konstrukte generiert, die im zweiten Transmembransegment eine Mutation tragen (Kv4.2C231I-HA und Kv4.2A249F-HA). Weiterhin wurde die C-terminale Deletionsmutante

Kv4.2-587Δ untersucht. Bei dieser Mutation führt der Einbau eines Stoppkodons zu einer Deletion des C-Terminus. Singh *et al.* konnten zeigen, dass eine an Temporallappen-Epilepsie leidende Patientin diese Mutation trägt (Singh *et al.*, 2006). Da die Interaktion von Kv4.2 mit DPPx und DPPy insbesondere eine Rolle im Gehirn spielt, besteht die Möglichkeit, dass eine gestörte Interaktion dieser Deletionsmutante mit DPPx oder DPPy einen Einfluss auf das Krankheitsbild hat.

Zur Klärung einer möglichen DPP-Bindungsdefizienz der zuvor beschriebenen Kv4.2-Mutanten, wurden diese entweder allein oder zusammen mit DPPx bzw. DPPy in CHO-Zellen überexprimiert. Die Charakterisierung der Kv4.2-vermittelten Ströme erfolgte anhand der Stromdichte und ist in Abbildung 24 dargestellt.

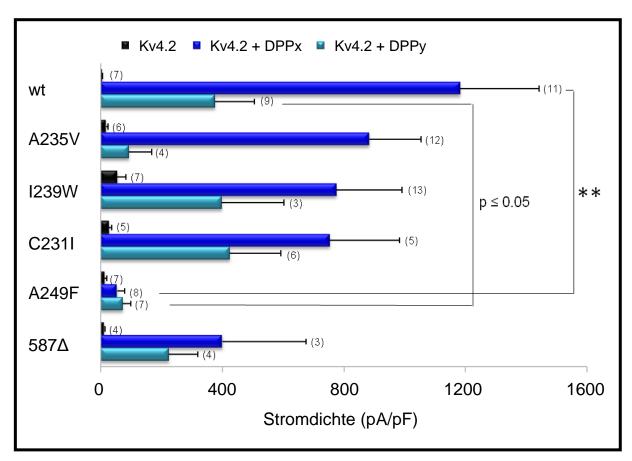


Abbildung 24: Stromdichten von humanen Kv4.2-Mutanten in CHO-Zellen.

Dargestellt sind die Stromdichten nach Expression der humanen Kv4.2-Mutanten allein, sowie mit DPPx bzw DPPy in CHO-Zellen. Es wurde 0,1 μ g Kv4.2 cDNA mit einem 10-fachen Überschuss an akzessorischer Untereinheit eingesetzt. Die Anzahl der gemessenen CHO-Zelle ist hinter den Balken angegeben. Signifikanz (**, p<0,001).

Alle Kv4.2-Mutanten zeigten bei Expression ohne akzessorische Untereinheiten leicht erhöhte Stromdichten im Vergleich zum Wildtyp-Kanal (wt). Die Co-Expression des wt-Kanals mit DPPx bzw. DPPy wirkte sich sehr stark auf die Stromdichte aus. So war diese durch DPPx um den Faktor 223 und durch DPPy um den Faktor 71 erhöht. Eine Potentierung der Stromdichte durch DPPx bzw. DPPy wurde ebenfalls bei den Mutanten A235V, 1239W und C231I beobachtet (DPPx: Faktor 14-49; DPPy: Faktor 5-15). Mit Ausnahme der Mutante A249F wurde bei den Kv4.2-Mutanten wie auch beim wt-Kanal die Stromdichte stärker durch DPPx als durch DPPy erhöht. Außerdem fiel bei der Mutante A249F der Effekt der Potentierung der Stromdichte durch DPPx im Vergleich zum wt signifikant geringer aus (wt: $1183 \pm 259 \text{ pA/pF}$, n=11; A249F: $54,5 \pm 26,2 \text{ pA/pF}$, n=8). Auch der Effekt der Potentierung der Stromdichte durch DPPy war bei der Mutante A249F im Vergleich zum Wildtyp geringer (wt: $377 \pm 130 \text{ pA/pF}$, n=9; A249F: $74,1 \pm 26,8 \text{ pA/pF}$, n=7). Die Stromdichte der Deletionsmutante 587Δ betrug in Anwesenheit von DPPx $400 \pm 276 \text{ pA/pF}$. Dies entspricht einer um den Faktor $^{1}/_{3}$ geringeren Potentierung der Stromdichte durch DPPx als beim wt-Kanal.

7.3. Der potentielle I_{to}-Aktivator NS5806

Bei NS5806 handelt es sich um die chemisch synthetisierte Substanz Diphenylurea 1(3, 5-Bis Trifluormethyl-Phenyl)-3-[2, 4-Dibromo-6-(1H-Tetrazol-5-yl)-Phenyl]-Urea (NeuroSearch, Dänemark). Diese ist kürzlich als I_{to}-Aktivator in Hundemyozyten charaktrisiert worden (Calloe *et al.*, 2009).

Abbildung 25: Strukturformel von NS5806.

Dargestellt ist die Strukturformel des potentiellen I_{to} -Aktivators NS5806. Hierbei handelte es sich um die Substanz Diphenylurea 1(3,5-Bis-Trifluormethyl-Phenyl)-3-[2, 4 Dibromo-6-(1H-Tetrazol-5yl)-Phenyl]-Urea.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine mögliche Modulation des Kv4.2-vermittelten I_{to} durch NS5806 in linksventrikulären Mäusemyozyten analysiert werden. Ferner sollte die Spezifität der Substanz untersucht werden.

7.3.1. Wirkung von NS5806 auf Kaliumkanäle in Xenopus-Oozyten

Wie bereits gezeigt sind Kv4.2, Kv1.5 und KChIP2 entscheidende molekulare Korrelate repolarisierender Kaliumströme (Abb. 9). Ob Kv1.4 eine Rolle im Mäuseventrikel spielt, ist bisher nicht geklärt. Allerdings ist dessen Untersuchung aufgrund der Fähigkeit von Kv1.4, die langsame Komponente des I_{to} zu vermitteln, interessant. Um die Expression dieser Stromkomponenten und deren Beeinflussung durch NS5806 im einzelnen zu untersuchen, eignen sich heterologe Expressionsysteme. In dieser Versuchsreihe wurden Oozyten gewählt, da diese ein stabiles System darstellen und sich somit für pharmakologische Studien besonders eignen.

Hierzu wurde cRNA humaner Untereinheiten in definierter Menge injiziert (je 50nl pro Oozyte: 1 ng Kv4.2; 1 ng Kv4.2 + 1 ng KChIP2; 0,5 ng Kv1.5; 0,5 ng Kv1.4) und die Oozytenströme nach 48 Stunden mittels Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik gemessen. Die Charakterisierung der Ströme erfolgte anhand der folgenden Parameter: Amplitude, Inaktivierungskinetik und Erholung von der Inaktivierung.

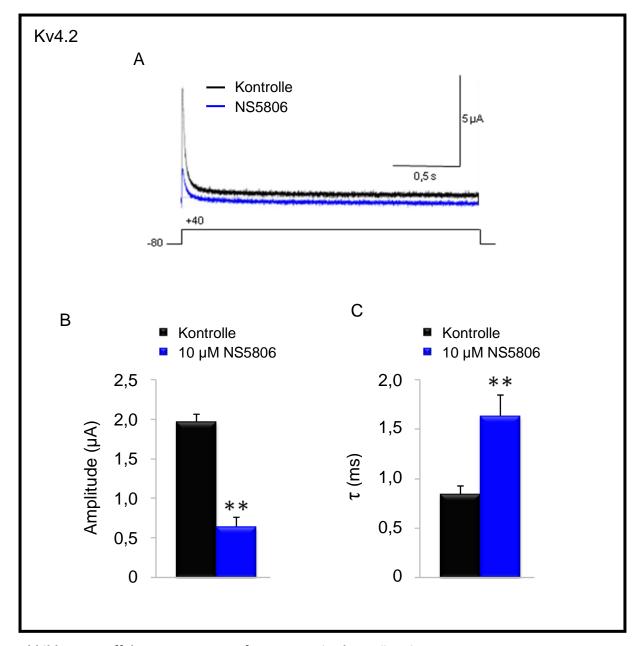


Abbildung 26: Effekte von NS5806 auf Kv4.2-vermittelte Ströme in Oozyten.

Voltage-Clamp Messungen von Kv4.2-vermittelten Strömen in Oozyten vor und nach Applikation von NS5806. Ströme wurden durch einen Spannungssprung von -80 mV auf +40 mV aktiviert. A: Repräsentative Stromkurven von Kv4.2-vermittelten Strömen. B: Kv4.2-Stromamplitude (n=8). C: Kinetik der Inaktivierung von Kv4.2 (n=8). Signifikanz (**, p≤0,001).

Die Applikation von NS5806 bewirkte eine hoch signifikanten Abnahme der Amplitude des Kv4.2-vermittelten Stroms (Kontrolle: 1,9 \pm 0,1 μ A; NS5806: 0,6 \pm 0,1 μ A; n=8; Abb. 26B). NS5806 führte weiterhin zu einer hoch signifikanten Verlangsamung der Inaktivierung ($\tau_{Kontrolle}$: 33,5 \pm 3,6 ms; τ_{NS5806} : 65,2 \pm 8,7 ms; n=8; Abb. 26C).

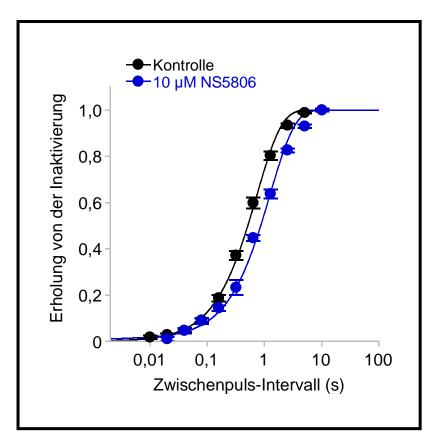


Abbildung 27: Effekte von NS5806 auf dieErholung von der Inaktivierung von Kv4.2 in Oozyten.

Semi-logarithmische Darstellung der Erholung von der Inaktivierung für Kv4.2 in Oozyten bei -80 mV \pm NS5806. Charakteristisch ist eine langsame Zeitkonstante τ ($\tau_{\text{Kontrolle}}$: 739 \pm 25,7 ms vs. τ_{NS5806} : 1263 \pm 78,2 ms; n=8).

Weiterhin beeinflusste NS5806 die Erholung von der Inaktivierung (Abb. 27). Diese war in Bezug auf die Kontrolle ($\tau_{Kontrolle} = 739 \pm 25,7$ ms) um den Faktor 2 verlangsamt ($\tau_{NS5806} = 1263 \pm 78,2$ ms).

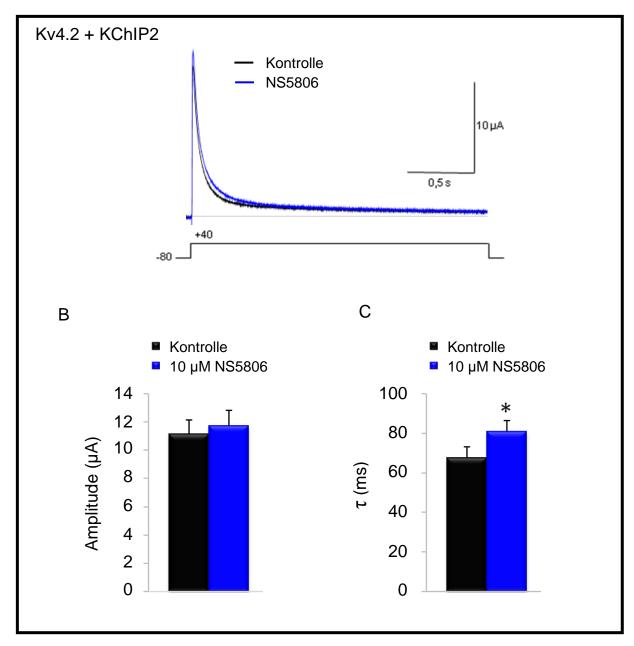


Abbildung 28: Effekte von NS5806 auf Kv4.2 + KChIP2-vermittelte Ströme in Oozyten.

Elektrophysiologische Charakterisierung der Wirkung von NS5806 auf Kv4.2 + KChIP2-vermittelte Ströme in Oozyten. Aktiviert wurden die Ströme durch einen Spannungssprung von -80 mV auf +40 mV. A: Repräsentative Stromspuren des durch Kv4.2 + KChIP2-vermittelten Stroms . B: Stromamplitude von Kv4.2 + KChIP2 (n=11). C: Inaktivierungskinetik von Kv4.2 + KChIP2 (n=11). Signifikanz (*, p≤0,01).

Im Vergleich zur Expression von Kv4.2 allein, ist bei Co-Expression von Kv4.2 mit KChIP2 ein Unterschied in der Wirkung von NS5806 auf den Strom zu sehen. (Abb. 28). Es kam zu einem Anstieg der Amplitude um 0,6 μ A (Kontrolle: 11,1 \pm 1,0 μ A; NS5806: 11,7 \pm 1,1 μ A; n= 11). Die Inaktivierung wurde durch NS5806 ebenfalls verlangsamt. Die Wirkung von NS5806 auf die Inaktivierung des durch Co-Expression von Kv4.2 und KChIP2-vermittelten Stroms war

jedoch geringer als auf den durch Kv4.2 allein vermittelten Strom ($\tau_{Kontrolle}$: 67,5 ± 5,6 ms; τ_{NS5806} : 80,8 ± 5,8 ms; n= 11; Abb. 28C).

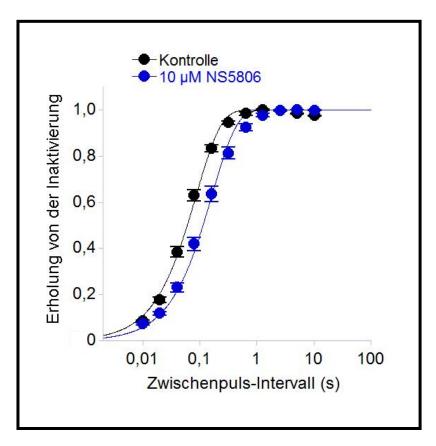


Abbildung 29: Effekte von NS5806 auf die Erholung von der Inaktivierung für Kv4.2 + KChIP2 in Oozyten.

Erholung von der Inaktivierung für den durch Co-Expression von Kv4.2 und KChIP2-vermittelten Strom in Oozyten bei -80 mV \pm NS5806. Die Kinetik ist charakterisiert durch eine schnelle Zeitkonstante ($\tau_{Kontrolle}$: 86,5 \pm 3,1 ms; τ_{NS5806} : 164 \pm 7,4 ms; n= 11).

Die Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2 wurde bei Co-Expression mit KChIP2 durch NS5806 im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 2 verlangsamt ($\tau_{Kontrolle}$: 86,5 ± 3,1 ms; τ_{NS5806} : 164 ± 7,4 ms; n=11; Abb. 29). Dies entspricht dem Effekt auf die Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2 allein.

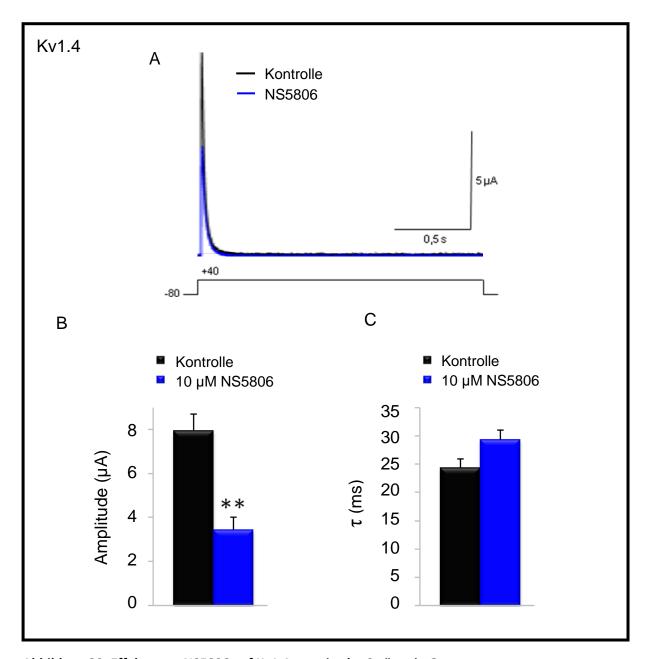


Abbildung 30: Effekte von NS5806 auf Kv1.4-vermittelte Ströme in Oozyten.

Kv1.4-vermittelte Ströme in Oozyten unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von NS5806. Die Aktivierung der Ströme erfolgte durch einen Spannungssprung von -80 mV auf +40 mV. A: Repräsentative Stromkurven Kv1.4-vermittelter Ströme. B: Kv1.4-Stromamplitude (n=9). C: Kinetik der Inaktivierung von Kv1.4 (n=9). Signifikanz (**, p≤0,001).

In Abbildung 30A, B ist ein starker inhibitorischer Effekt von NS5806 auf Kv1.4 zu erkennen. Es kommt durch NS5806 zu einem erheblichen Abfall der Amplitude von 7,9 \pm 0,8 μ A (n=6) unter Kontrollbedingungen auf 3,4 \pm 0,6 μ A (n=6). Die Inaktivierung von Kv1.4 wird dagegen nur geringfügig beeinflusst ($\tau_{Kontrolle}$: 24,3 \pm 1,7 ms; τ_{NS5806} : 29,3 \pm 1,8 ms; n=9; Abb. 30C).

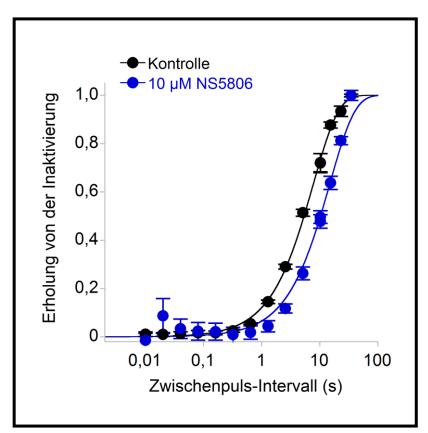


Abbildung 31: Effekte von NS5806 auf die Erholung von der Inaktivierung für Kv1.4 in Oozyten.

Kinetik der Erholung von der Inaktivierung für Kv1.4 bei -80 mV \pm NS5806. Die Erholung verläuft 1-fach exponentiell und ist durch eine langsame Kinetik gekennzeichnet ($\tau_{\text{Kontrolle}}$: 7704 \pm 175 ms; τ_{NS5806} : 14782 \pm 889 ms; n=9).

Die Erholung von der Inaktivierung verläuft für Kv1.4 (Abb. 31) wesentlich langsamer als für Kv4.2. Die Zeitkonstante τ für die Erholung von der Inaktivierung betrug unter Kontrollbedingungen 7704 \pm 175 ms (n=9). Ähnlich wie für Kv4.2 wird die Erholung von Kv1.4 durch NS5806 um ca. 50 % verlangsamt (14782 \pm 889 ms; n=9).

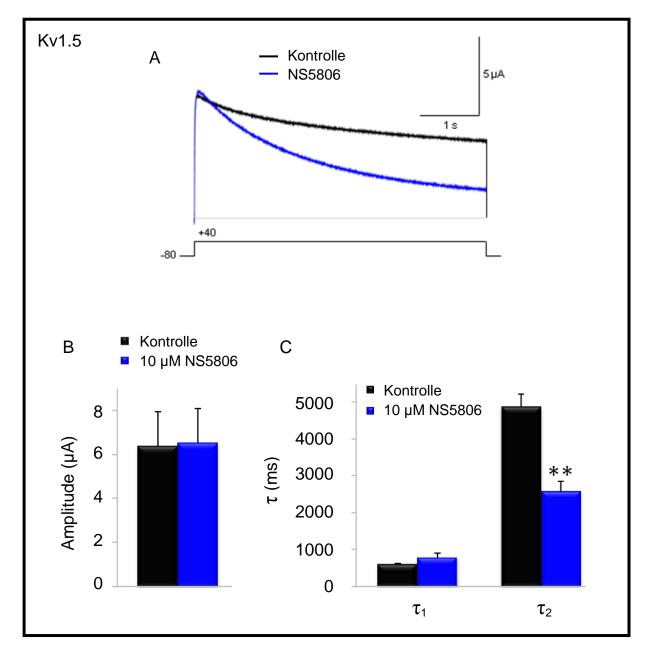


Abbildung 32: Effekte von NS5806 auf Kv1.5-vermittelte Ströme in Oozyten.

Durch einen Spannungssprung von -80 mV auf +40 mV wurden Kv1.5-vermittelte Ströme aktiviert. A: Repräsentative Stromspuren Kv1.5-vermittelter Ströme. B: Stromamplitude von Kv1.5 (n=6). C: Die Inaktivierungskinetik von Kv1.5 wird beschrieben durch die zwei Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 ($\tau_{1,Kontrolle}$: 615 ± 18,6 ms; $\tau_{1,NS5806}$: 779 ± 134 ms und $\tau_{2,Kontrolle}$: 4858 ± 351 ms; $\tau_{2,NS5806}$: 2560 ± 283 ms; n=6). Signifikanz (**, p≤0,001).

Kv1.5 inaktiviert nicht vollständig. Der am Ende des Testpulses noch vorhandene Strom wird hier als Steady-state-Strom bezeichnet. Wie in Abbildung 32A zu sehen ist bewirkte NS5806 eine starke Veränderung im Verlauf der Stromkurve. Der Abfall des Stroms verlief steiler, (Kontrolle: τ_1 : 615 ± 18,6, τ_2 : 4858 ± 351 ms; NS5806: τ_1 : 779 ± 134 ms, τ_2 : 2560 ± 283 ms; Abb. 32A+C) was in einer starken Reduktion des Steady-state-Stroms resultierte. Dagegen

hatte NS5806 keinen Einfluss auf die Maximalstrom-Amplitude (Kontrolle: 6,4 \pm 1,6 μ A; NS5806: 6,5 \pm 1,6 μ A; n=6) (Abb. 32B). Die Inaktivierung wird durch zwei Zeitkonstanten dargestellt. Die erste Zeitkonstante (τ_1) wurde durch NS5806 nicht signifikant moduliert (τ_1 , kontrolle: 615 \pm 18,6 ms; τ_1 , NS5806: 779 \pm 134 ms; n=6). Die zweite Zeitkonstante (τ_2) wurde dagegen von NS5806 hochsignifikant moduliert. Der Wert für τ_2 betrug unter Kontrollbedingungen 4858 \pm 351 ms (n=6). Durch die Applikation von NS5806 wurde τ_2 ca. auf die Hälfte reduziert (Abb. 32C).

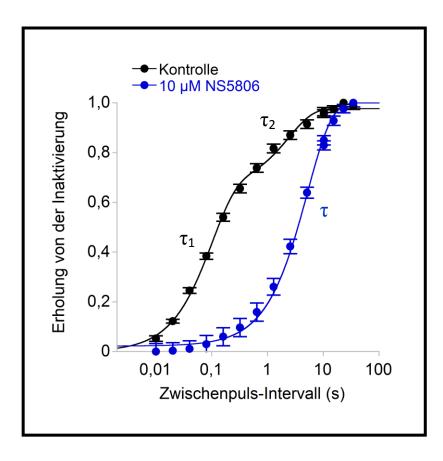


Abbildung 33: Effekte von NS5806 auf die Erholung von der Inaktivierung von Kv1.5 in Oozyten.

Erholung von Kv1.5 von der Inaktivierung bei -80 mV in Oozyten \pm NS5806. Unter Kontrollbedingungen verläuft die Erholung 2-fach exponentiell. NS5806 führte zu einem 1-fach exponentiellen Verlauf der Erholung ($\tau_{1\text{-Kontrolle}}$: 98,3 \pm 9,9 ms; $\tau_{2\text{-Kontrolle}}$: 2412 \pm 430 ms, τ_{NS5806} : 5209 \pm 175 ms; n=6).

Die Erholung von der Inaktivierung setzt sich unter Kontrollbedingungen aus zwei Zeitkonstanten zusammen. Die Werte für τ_1 und τ_2 betrugen 98,3 ± 9,9 ms und 2411 ± 430 ms (n=6). NS5806 führte zu einem Verlust der doppelt exponentiellen Kinetik (Abb. 33). Die Erholung ließ sich durch eine langsame Zeitkonstante beschreiben. Diese war allerdings mit einem Wert von 5209 ± 175 ms (n=6) ca. doppelt so hoch wie die zweite Zeitkonstante (τ_2) unter Kontrollbedingungen.

7.3.2. <u>Wirkung von NS5806 auf K⁺-Ströme in linksventrikulären Myozyten von</u> Wildtyp-Mäusen

Im folgenden sollte überprüft werden inwiefern die in Hundemyozyten beschriebenen Effekte von NS5806 (Calloe et~al., 2009) auf den Kv4.2-vermittelten I_{to} in murinen Myozyten übertragbar sind. Dazu wurden Gesamtkaliumströme gemessen und der Kv4.2-vermittelte I_{to} in linksventrikulären epikardialen Mäusemyozyten isoliert.

Die Ströme wurden zunächst unter Superfusion der Zelle mit Kontrolllösung (EC23; siehe Methoden) gemessen. Die selbe Zelle wurde im Anschluss mit NS5806 superfundiert.

Es wurden die Amplitude und die Inaktivierung der Gesamtkaliumströme gemessen (Abb. 34). Im Gegensatz zu der beschriebenen I_{to} -Potentierung in Hundemyozyten (Calloe et al., 2009) führte die Applikation von 10 μ M NS5806 bei Mäusemyozyten zu einer Reduktion der Gesamtkaliumstrom-Amplitude von einem Kontrollwert von 11222 \pm 571 pA auf 8266 \pm 1059 pA (n=9; Abb. 34B).

Die Charakterisierung der Inaktivierung des gesamten Kaliumstroms erfolgt oft durch zwei Exponentialfunktionen (Brunet *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung der Inaktivierung anhand von drei Exponentialfunktionen, was den zeitlichen Verlauf der Stromantwort besser beschreibt. Daraus ergeben sich die drei Zeitkonstanten τ_1 (schnelle Komponente), τ_2 (mittlere Komponente) und τ_3 (langsame Komponente; Abb. 34C).

NS5806 führte zu keiner Modifizierung der ersten (τ_1) und zweiten Zeitkonstante (τ_2) der Inaktivierung. Dagegen wurde die dritte Zeitkonstante (τ_3) langsamer (Abb 34C).

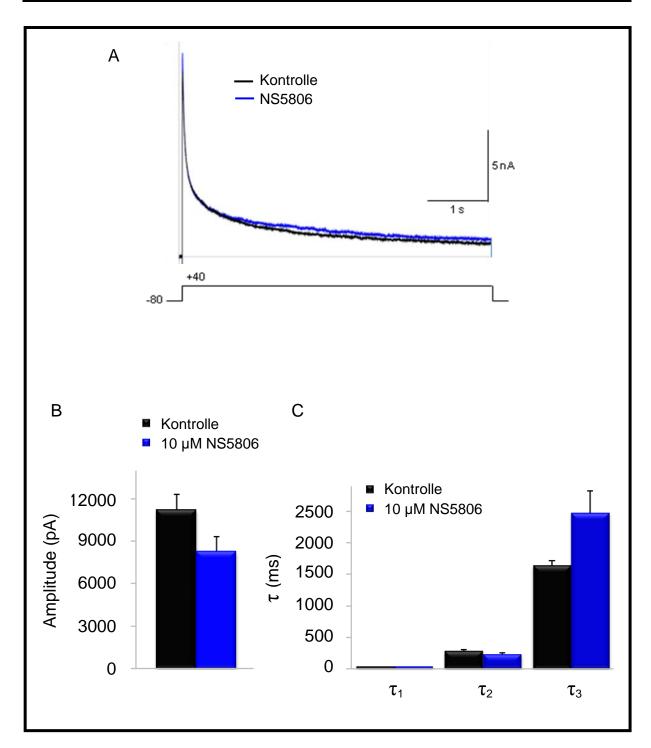


Abbildung 34: Repolarisierende Kaliumströme in Mäusemyozyten vor und nach NS5806-Applikation.

Isolierte linksventrikulare epikardiale Mäusemyozyten wurden zunächst mit Kontrollösung EC23 (n=9) und anschließend mit Lösung EC23 + 10μ M NS5806 superfundiert. A: Repräsentative Stromkurven von Kaliumströmen in linksventrikulären Mäusemyozyten \pm NS5806. B: Stromamplitude repolarisierender Kaliumströme (n=9). C: Inaktivierungskinetik repolarisierender Kaliumströme (n=9).

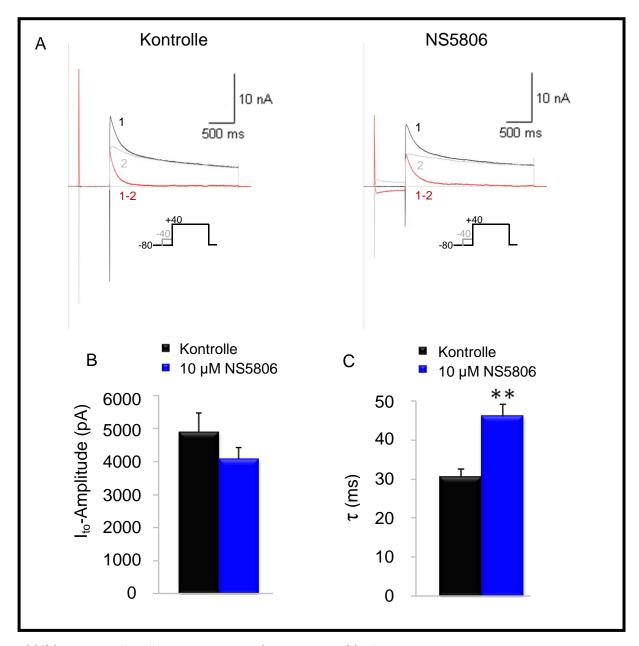


Abbildung 35: Ito in Mäusemyozyten nach NS5806 Applikation.

Durch das Subtraktionsprotokoll ermittelter I_{to} in linksventrikulären epikardialen Mäusemyozyten unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von $10\mu M$ NS5806. A: Subtraktionsprotokoll und repräsentative I_{to} -Stromspuren. B: I_{to} -Stromamplitude (n=7). C: I_{to} -Inaktivierungskinetik (n=7). Signifikanz (**, p≤0,001).

Die I_{to} -Amplitude wurde durch NS5806 reduziert (Kontrolle: 4900 \pm 572 pA; NS5806: 4071 \pm 352 pA; n=7; Abb. 35B).

Die Kinetik der I_{to} -Inaktivierung wird durch eine Exponentialfunktion dargestellt. Hieraus ergibt sich die Zeitkonstante τ der I_{to} -Inaktivierung. Diese betrug unter Kontrollbedingungen 36,3 \pm 2,2 ms (n=7; Abb. 35C). Nach Applikation von NS5806 hatte die Zeitkonstante τ einen Wert von 46,0 \pm 3,0 ms (n=7). NS5806 führte folglich zu einer Verlangsamung der I_{to} -

Inaktivierung. Anhand der Stromkurven ist zu erkennen, dass NS5806 zur Potentierung einer Stromkomponente führte; die unter Kontrollbedingungen nicht sichtbar war (Abb. 35A). Außerdem scheint die I_{Na}-Amplitude durch NS580 erniedrigt zu sein (Abb. 35A).

Zur Klärung, ob es trotz abnehmender I_{to} -Amplitude zu einer I_{to} -Potentierung durch NS5806 kommt, wurde die I_{to} -Ladung (Abb. 36) ermittelt. Diese wird durch das Integral der Fläche unter der Stromkurve dargestellt.

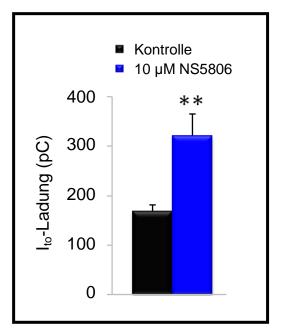


Abbildung 36: Wirkung von NS5806 auf die I_{to}-Ladung in linksventrikulären Mäusemyozyten.

Dargestellt ist die I_{to} -Ladung in linksventrikulären epikardialen Mäusemyozyten \pm NS5806 (n=7). Signifikanz (**, p \leq 0,001).

NS5806 führte zu einem Anstieg der Ladung von einem Kontrollwert von 168 \pm 12,9 pC (n=7) auf einen Wert von 321 \pm 44,6 pC (n=7; Abb. 36).

Ein weiterer sensibler Parameter für die Kanalkinetik ist die Erholung von der Inaktivierung. Wie in Abbildung 37 zu sehen ist, setzt sich diese in linksventrikulären epikardialen Mäusemyozyten aus einer langsamen und einer schnellen Zeitkonstante zusammen. Die schnelle Zeitkonstante ist Kv4.2 vermittelt. Ob die langsame Zeitkonstante ebenfalls durch Kv4.2 vermittelt wird ist bisher nicht bekannt.

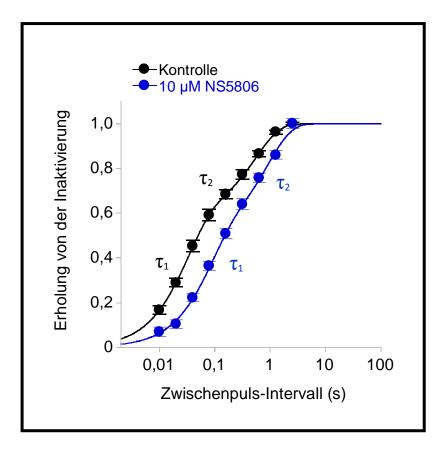


Abbildung 37: Effekte von NS5806 auf die Erholung von der Inaktivierung in linksventrikulären Mäusemyozyten.

Semi-logarithmische Darstellung der Erholung von der Inaktivierung bei -80 mV in linksventrikulären epikardialen Mäusemyozyten \pm NS5806. Die Erholung wird durch zwei Zeitkonstanten beschrieben ($\tau_{1,Kontrolle}$: 31,1 31 \pm 0,7 ms vs. $\tau_{2,NS5806}$: 79,7 \pm 9,0 ms und $\tau_{2,Kontrolle}$: 546 \pm 15,5 ms vs. $\tau_{2,NS5806}$: 899 \pm 104; n=9).

Abbildung 37 zeigt, dass beide Zeitkonstanten durch NS5806 erheblich langsamer wurden ($\tau_{1,Kontrolle}$: 31,3 ± 0,7 ms vs. $\tau_{1,NS5806}$: 79,7 ± 9,0 ms und $\tau_{2,Kontrolle}$: 546 ± 15,5 ms vs. $\tau_{2,NS5806}$: 899 ± 104 ms; n=9). Insbesondere die schnelle Zeitkonstante wurde beeinträchtigt. NS5806 führte zu einer fast dreifachen Verlangsamung von τ_{1} .

7.3.3. <u>Wirkung von NS5806 auf K⁺-Ströme in linksventrikulären Myozyten von KChIP2-Knockout Mäusen</u>

In ektrophysiologischen Messungen an Myozyten von KChIP2-Knockout (KChIP2-KO) Mäusen wurde nahezu kein Kv4.2-vermittelter I_{to} gemessen (Kuo *et al.*, 2001). Dieser Befund sollte im folgenden noch einmal überprüft werden. Weiterhin sollte ein möglicher Effekt von NS5806 auf Kaliumströme in Kardiomyozyten von KChIP2-KO Mäusen, die sich vermutlich im Vergleich zur wt Kontrolle modifiziert darstellen, untersucht werden.

Hierfür wurden linksventrikuläre epikardiale Myozyten von KChIP2-KO Mäusen isoliert und Kaliumströme anhand der zuvor beschriebenen Protokolle ermittelt. Zur Prüfung möglicher Unterschiede zwischen Kaliumströmen in Kardiomyozyten von wt und KChIP2-KO Mäusen wurden die unter Kontrollbedingungen erhobenen Daten miteinander verglichen.

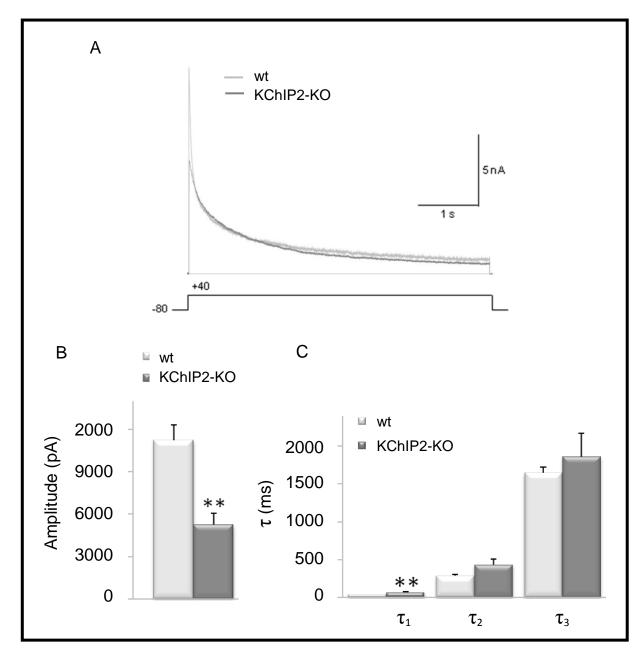


Abbildung 38: Vergleich von Kaliumströmen in linksventrikulären epikardialen Myozyten von wt und KChIP-KO Mäusen unter Kontrollbedingungen.

Kaliumströme in linksventrikulären epikardialen Myozyten von wt und KChIP2-KO Mäusen wurden zum Vergleich gegenüber gestellt. A: Repräsentetive Stromspuren von Kaliumströmen in Myozyten von wt und KChIP2-KO Mäusen. B: Kaliumstrom-Amplitude in Myozyten von wt (n=9) und KChIP2-KO Mäusen (n=7). C: Inaktivierungskinetik von Kaliumströmen in Myozyten von wt und KChIP2-KO Mäusen. Signifikanz (**, p≤0,001).

Die Gesamtkaliumstrom-Amplitude in ventrikulären Myozyten von KChIP2-KO Mäusen war unter Kontrollbedingungen wesentlich niedriger als bei wt Mäusen (wt: 11222 ± 571 pA, n=9; KChIP2-KO: 5240 ± 801 pA, n=7; Abb. 38B). Zudem unterschieden sich die Inaktivierungskinetiken der Kaliumströme. Am stärksten wiechen die ersten Zeitkonstanten

voneinander ab. In KChIP2-KO Mäusen war τ_1 um den Faktor 2 langsamer als in wt Mäusen (Abb. 38B). Eine tendenzielle Verlangsamung war jedoch auch für die zweite und die dritte Zeitkonstante gegeben.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob die geringere Stromamplitude in Myozyten von KChIP2-KO Mäusen im Vergleich zu wt Mäusen auf einen Verlust des durch Kv4.2-vermittelten I_{to} zurückzuführen ist.

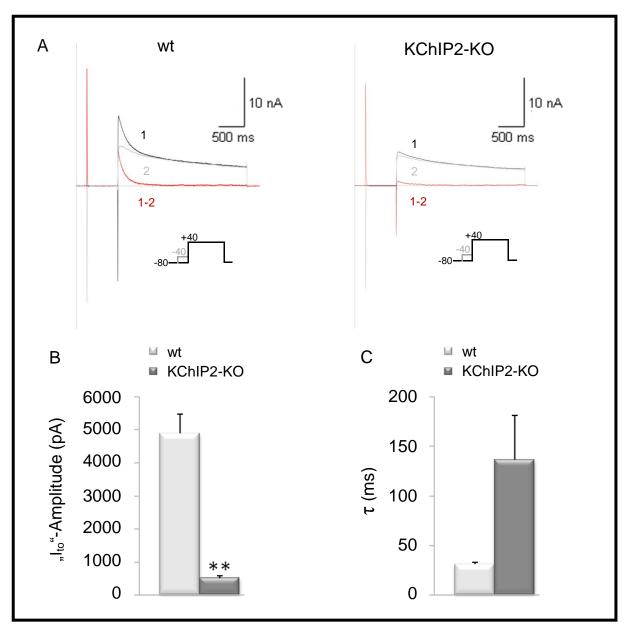


Abbildung 39: Vergleich von "Ito" in linksventrikulären epikardialen Myozyten von wt und KChIP2-KO Mäusen unter Kontrollbedingungen.

Zum Vergleich wurden die durch Subtraktionprotokoll ermittelten " I_{to} "-Ströme in linksventrikulären epikardialen Myozyten von wt und KChIP2-KO Mäusen gegenübergestellt. A: Repräsentative " I_{to} "-Stromspuren und Subtraktionsprotokoll. B: " I_{to} "-Amplitude (n=7). C: " I_{to} "-Inaktivierungskinetik (n=7). Signifikanz (**, p \leq 0,001).

Wie anhand der in Abbildung 39A gezeigten Stromkurven zu sehen ist, waren die Ströme in Myozyten von KChIP2-KO Mäusen, die mittels Vorpuls-Protokoll (2) gemessen wurden nicht identisch mit den Strömen, die anhand des Protokolls ohne Vorpuls gemessen wurden (1). Die Subtraktion beider Stromkomponenten (1-2) zeigte, dass noch ein geringfügiger Reststrom vorhanden war. Auch wenn sich die Auswertung aufgrund der geringen Größe des Stroms äußerst schwierig gestaltete, wurden die Amplitude und die Inaktivierungskinetik bestimmt, um eine Vergleichsmöglichkeit zu wt Mäusen zu haben. Die Amplitude des durch Subtraktionsprotokolls ermittelten Stroms in Myozyten von KChIP2-KO Mäusen war signifikant niedriger als der I_{to} in Myozyten von wt Mäusen (KChIP2-KO: 507 \pm 74,7 nA, n=7; wt: 4900 \pm 572 nA, n=7; Abb 39B). Die Inaktivierungskinetik dieser Reststromkomponente gestaltete sich innerhalb der einzelnen Zellen sehr variabel. Im Vergleich zur Inaktivierungskinetik in Myozyten von wt Mäusen war sie um den Faktor 4 verlangsamt (wt: 30,6 \pm 2,0 ms, n=7; KChIP2-KO: 137 \pm 44,4 ms, n=7; Abb. 39C).

Ein weiterer Unterschied konnte in der Kinetik der Erholung von der Inaktivierung beobachtet werden (Abb. 40).

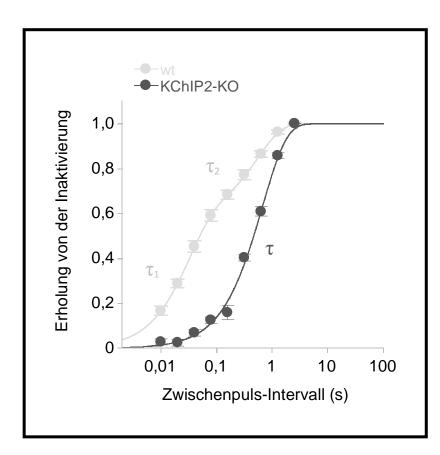


Abbildung 40: Vergleich der Erholung von der Inaktivierung in linksventrikulären Myozyten von wt und KChIP2-KO Mäusen unter Kontrollbedingungen.

Erholung von der Inaktivierung -80 mV in linksventrikulären Myozyten von wt vs KChIP2-KO Mäusen Kontrollbedingungen. Der Verlauf der Erholung ist Myozyten von wt Mäusen Exponetialfunkdurch zwei tionen, dagegen in Myozyten von KChIP2-KO Mäusen nur durch eine Exponentialfunktion charakterisiert ($\tau_{1,wt}$: 36,1 ± 2,0 ms, $\tau_{2,wt}$: 546 ± 15,5 ms, n=9 vs. $\tau_{KChIP2-KO}$: 670 ± 33,7 ms, n=7).

Während in Myozyten von wt Mäusen die Kinetik der Erholung durch zwei Exponentialfunktionen dargestellt wird, ist der Verlauf der Erholung in Myozyten von KChIP2-KO Mäusen einfach exponentiell. Der Wert für τ in Myozyten von KChIP2-KO Mäusen liegt im Bereich des τ_2 -Wertes der wt-Kontrolle. Der Verlust der schnellen Komponente war zu erwarten, da diese Stromkomponente durch KChIP2-modulierte Kv4.2-Kanäle vermittelt wird.

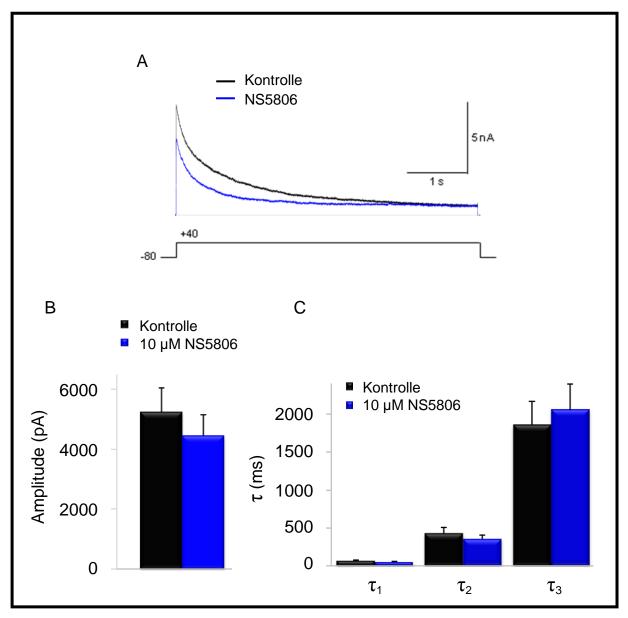


Abbildung 41: Wirkung von NS5806 auf repolarisierende Kaliumströme in Myozyten von KChIP2-KO Mäusen.

Elektrophysiologische Charakterisierung von repolarisierenden Kaliumströmen in linksventrikulären epikardialen Myozyten von KChIP2-KO Mäusen unter Kontrollbedingungen und nach Superfusion von NS5806. A: Repräsentative Stromspuren von repolarisierenden Kaliumströmen in KChIP2-KO Mäusen. B: Stromamplitude von repolarisierenden Kaliumströmen in KChIP2-KO Mäusen (n=7). C: Kinetik der Inaktivierung von repolarisierenden Kaliumströmen in KChIP2-KO Mäusen (n=7).

Weiterhin sollte der Effekt von NS5806 auf Kaliumströme in Kardiomyozyten von KChIP2-KO Mäusen untersucht werden.

NS5806 führte zu einer leichten Reduktion der Amplitude (Kontrolle: 5240 ± 801 pA und NS5806: 4450 ± 699 pA; n=7; Abb. 41B). Die drei Zeitkonstanten der Inaktivierung wurden durch NS5806 nicht signifikant moduliert (Abb. 41C).

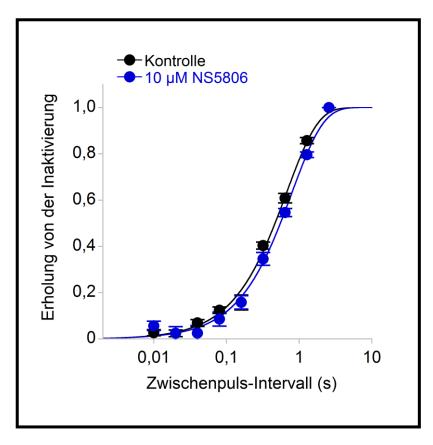


Abbildung 42: Effekte von NS5806 auf die Erholung von der Inaktivierung in Myozyten von KChIP2-KO Mäusen.

Erholung von der Inaktivierung bei -80 mV in linksventrikulären Myozyten von KChIP2-KO Mäusen \pm NS5806. Der Verlauf der Erholung ist durch eine Exponetialfunktion charakterisiert ($\tau_{Kontrolle}$: 670 \pm 33,7 ms; τ_{NS5806} : 794 \pm 41,9 ms; n=6).

NS5806 führte auch zu keiner signifikanten Modulation der Zeitkonstante für die Erholung von der Inaktivierung. ($\tau_{Kontrolle}$: 670 ± 33,7 ms; τ_{NS5806} : 794 ± 41,9 ms; n=6; Abb. 42). Die Effekte von NS5806 auf die Kinetik von Kaliumströmen waren in Myozyten von KChIP2-KO Mäusen wesentlich schwächer ausgeprägt als in Myozyten von wt Mäusen.

Trotz der geringen Amplitude der anhand des Subtraktionsprotokolls isolierten Ströme (Abb. 39A) sollte überprüft werden, ob eine maßgebende Modulation des Stroms durch NS5806 verursacht wird.

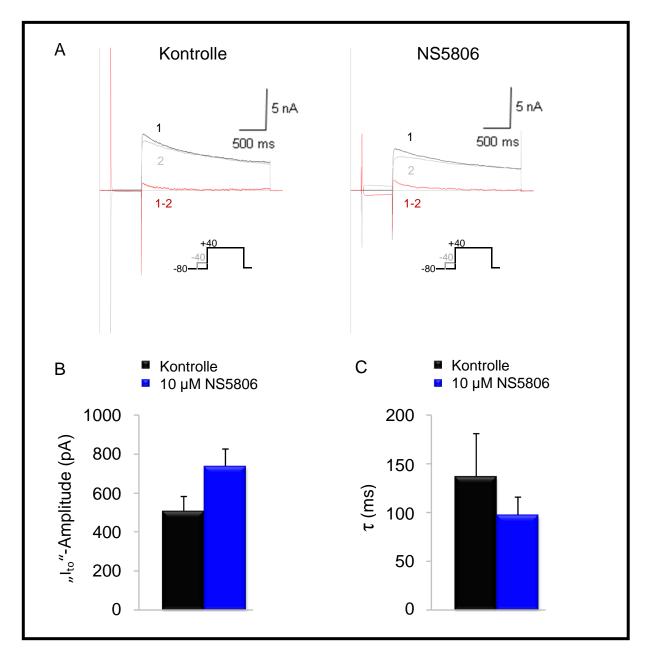


Abbildung 43: Effekte von NS5806 auf isolierte Ströme in linksventrikulären epikardialen Myozyten von KChIP2-KO Mäusen.

Isolation von vermeintlichen I_{to}-Strömen in linksventrikulären epikardialen Myozyten von KChIP2-KO Mäusen vor und nach Applikation von NS5806 (n=7). A: Repräsentative Stromkurven und Subtraktionsprotokoll. B: "I_{to}" Amplitude (n=7). C: "I_{to}"-Inaktivierungskinetik (n=7).

Die Amplitude der anhand des Subtraktionsprotokolls isolierten Stromkomponente (" I_{to} ") wurde durch NS5806 erhöht (Abb. 43B). Der τ -Wert der Inaktivierungkinetik wurde erniedrigt (Abb. 43C). Wie schon in Myozyten von wt Mäusen beobachtet wurde, führte NS5806 auch in Myozyten von KChIP2-KO Mäusen zur Potentierung einer Stromkomponente, die unter Kontrollbedingungen nicht zu sehen war.

7.3.4. Wirkung von NS5806 auf die subzelluläre Expression von Kv4.2 in linksventrikulären Mäusemyozyten

Um den Effekt von NS5806 auf die Oberflächenexpression von Kv4.2 zu untersuchen, wurden linksventrikuläre Mäusemyozyten für 20 Stunden mit Zellkulturmedium inkubiert, welches NS5806 in einer Konzentration von 10 µM enthielt.

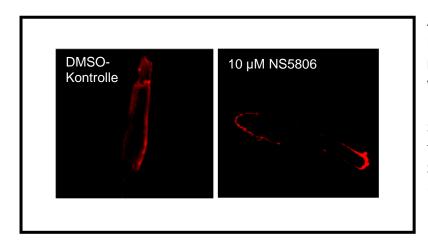


Abbildung 44: Einfluss von NS5806 auf die Oberflächenexpression von Kv4.2 in linksventrikulären Myozyten.

Dargestellt sind die immunzytochemischen Fluoreszenzfärbungen von Kv4.2 nach 20 Stunden Inkubation mit DMSO (Kontrolle) bzw. 10 µM NS5806.

Da NS5806 in DMSO-gelöster Form vorliegt, wurden Zellen zur Kontrolle mit der selben Konzentration an DMSO inkubiert, um einen Effekt von DMSO auszuschließen. In der immunozytochemischen Fluoreszenzfärbung (Abb. 44) ist kein Einfluss von DMSO auf die Oberflächenlokalisation von Kv4.2 zu erkennen. Eine 20-stündige Inkubation mit NS5806 scheint zu einer leichten Abnahme der Oberflächenexpression von Kv4.2 zu führen, eine Quantifizierung wurde jedoch nicht vorgenommen.

8. Diskussion

In dieser Arbeit konnte die Rolle von KChIP2 für eine physiologische Expression der Kv4.2-α-Untereinheit im Herzen bestärkt werden. Eine konstante Expression der KChIP2 mRNA-Expression bei reduzierter Kv4.2 mRNA-Expression im hypertrophierten Mäuseherzen legt die Regulation einer physiologischen I_{to}-Dichte im Mäuseherzen durch KChIP2 nahe. Die geringe I_{to}-Amplitude in KChIP2-KO Mäusen bekräftig die These, dass KChIP2 im Mäuseherzen für die Ausbildung einer physiologischen I_{to}-Dichte erforderlich ist. Es zeigt aber auch, dass im Mäuseherzen für die Ausbildung von funktionsfähigem, Kv4.2-vermittelten I_{to} KChIP2 nicht essentiell ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass im Herzen von wt Mäusen neben Kv4.2-KChIP2-Kanalkomplexen, auch Kv4.2-Kanalkomplexe ohne KChIP2 existieren.

Durch NS5806 wurde insbesondere die Kinetik der I_{to}-Inaktivierung und der Erholung von der Inaktivierung beeinflusst. Allerdings waren die Ergebnisse sehr heterogen und sind mit äußerster Vorsicht zu betrachten

8.1. Ionenkanal-Remodelling in Herzhypertrophiemodellen

Es existieren unterschiedliche Modelle der Herzhypertrophie, in denen der Zusammenhang beobachteten Umstrukturierung von Kv4.2-Kanälen der und der induzierten Herzhypertrophie untersucht wurde. Bei einer in Ratten durch Koronararterien-Ligation verursachten Herzhypertrophie wurde eine signifikant niedrigere Dichte des Ito und der einwärts rektifizierenden Ströme beobachtet (Kaprielian et al., 1999). Die geringere Ito-Dichte korrelierte mit einer schwächeren mRNA-Expression von Kv4.2 und Kv4.3 sowie einer schwächeren Kv4.2 Proteinexpression. In einem weiteren Modell wurde eine Hypertrophie bei Ratten durch Implantierung eines Deoxycorticosterone-Acetat-Pellets (DOCA) induziert (Capuano et al., 2002). Wie im zuvor beschriebenen Hypertrophiemodell wurde auch hier eine niedrigerer mRNA-Expression von Kv4.2 und Kv4.3 beschrieben, ferner war die mRNA-Expression von Kv2.1 geringer. Allerdings ist ein mittels transverser Aortenkonstriktion (TAK) induziertes Hypertrophiemodell in der Maus beschrieben bei dem es zu keiner Modulation der I_{to}-Dichte kommt (Marionneau et al., 2008).

Eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer Hypertrophie spielt Ang II. Im Tiermodell und bei humanen Patienten führt die Aktivierung des Renin-Angiotensin Systems über ein physiologisches Maß hinweg zur Entwicklung links ventrikulärer Hypertrophien, während eine Inhibierung des Renin-Angiotensin Systems einen Rückgang links ventrikulärer Hypertrophien bewirkt (Schmieder *et al.*, 2007, Billet *et al.*, 2008). Zudem beeinflusst Ang II die zelluläre I_{to}-Dichte in direkter Weise. Die Inkubation kultivierter Hundemyozyten mit Ang II führt zu einer Reduktion der I_{to}-Dichte (Yu *et al.*, 2000). Die mRNA- und Proteinexpression von Kv4.3 wird in kultivierten Rattenmyozyten durch Ang II über die Aktivierung des Angiotensin-Typ I Rezeptors durch Destabilisierung der 3`untranslatierten Region (UTR) reduziert (Zhang et al., 2001; Zhou *et al.*, 2006). Dagegen sind die 3`UTRs von Kv4.2 und Kv1.5 insensitiv gegenüber Ang II (Zhou *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mausmodell für eine linksventrikuläre Hypertrophie mittels Applikation von Ang II beschrieben (siehe Kapitel 7.1.3). Der entscheidende Punkt dieser Studie ist die geringfügige Beeinflussung des Kv4.2-vermittelten Ito durch Ang II, trotz stark reduzierter Kv4.2-Transkription. Während Ang II keinen Einfluss auf die Ito-Amplitude hatte, war die Ito-Dichte signifikant niedriger (7.1.3.4). Diese geringere Ito-Dichte ist auf die Zunahme der Zellkapazität zurückzuführen und stellt vermutlich keine direkte Veränderung des Kv4.2-vermittelten Ito dar. Vergleichbare Ergebnisse wurden in dem TAK-Mausmodell beschrieben, bei dem das Ang II-System nicht in Betracht gezogen wurde (Marionneau et al, 2008). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Ang II die Ito-Dichte nicht direkt, sondern indirekt durch die Induktion einer linksventrikulären Hypertrophie beeinflusst. Dagegen war die mRNA-Expression von Kv4.2 nach Ang II Behandlung wesentlich niedriger als nach Sham Behandlung, während die Expression von KChIP2 nicht beeinflusst war (7.1.3.5; Tozakidou et al., 2008). Ob die Modulation der mRNA-Expression bei Hypertrophie auf einen direkten Effekt von Ang II zurückzuführen ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Bisher wurde keine Sensitivität von Kv4.2 gegenüber Ang II beschrieben (Zhou et al., 2006). Vielmehr ist zu vermuten, dass die mRNA-Expression von Kv4.2 durch die induzierte Hypertrophie direkt beeinflusst wird. Ein möglicher Mechanismus führt über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in T-Lymphozyten (NFAT) und von Calcineurin. So kann die in Ca²⁺-Konzentration hypertrophierten Myozyten erhöhte zur Aktivierung des NFAT/Calcineurin-Signalweges führen. Diese wiederum kann zu einer geringeren mRNA-Expression von Kv4.2 und Kv4.3 führen (Rossow et al., 2004; Rossow et al., 2006). Eine erniedrigte mRNA-Expression von Kv4.2 wurde in unterschiedlichen Herzhypertrophiemodellen nachgewiesen (Kaprielian *et al.*, 1999; Capuano *et al.*, 2002).

Eine zentrale Rolle bei der Erhaltung einer physiologischen Ito-Dichte bei Hypertrophie spielt KChIP2. Da die I_{to}-Amplitude trotz veminderter Kv4.2 mRNA-Expression keine Veränderungen nach Ang II Gabe aufwies, liegt die Vermutung einer Regulation der funktionellen Ito-Dichte durch KChIP2 nahe. So ist bekannt, dass die Co-Expression von Kv4.2 und KChIP2 eine Dosis-abhängige Zunahme der Kv4.2 Expression erzeugt, die auf eine Stabilisierung durch KChIP2 zurückzuführen ist (Shibata et al., 2003). Weiterhin wird im humanen Herzen der vom Endokard zum Epikard hin ansteigende Ito-Gradient auf einen Gradienten in der KChIP2 mRNA-Expression bei konstanter Kv4.3 mRNA-Expression zurückgeführt (Rosati et al., 2001; Zicha et al., 2004). Die Hypothese wird durch die Daten eines anderen mittels Aortenstenose induzierten Herzhypertrophiemodells in der Maus gestützt (Jin et al., 2010). In diesem Modell führt die Induktion der Hypertrophie zu einer verminderten I_{to}-Dichte. Einer Aortenstenose unterzogene Mäuse, bei denen die Überexpression von KChIP2 mittels Adenovirusinjektion direkt im Tier induziert wurde, bildeten dagegen keine Hypertrophie aus. Die Reduktion der Ito-Dichte war bei diesen Mäusen nicht nur aufgehoben, sondern lag über dem Wert der Kontrolltiere. Die höhere I_{to}-Dichte korrelierte mit einer verstärkten Proteinexpression von KChIP2 und Kv4.2 im Vergleich zum hypertrophierten Tier bzw. der Kontrolle. (Jin *et al.*, 2010).

Eine 8-fach höhere mRNA Expression von Kv1.4 durch Ang II hatte keinen Einfluss auf die Ito-Amplitude. Dies steht vermutlich in Zusammenhang mit der geringen Expression von Kv1.4, die im Epikard um etwa den Faktor 250 geringer ist als die Expression von Kv4.2 (7.1.1). Der Anstieg der Proteinexpression molekularer Ito-Komponenten im Epikard des linken Ventrikels stützt die funktionellen Daten, ebenso wie die Oberflächenlokalisation von Kv4.2. Bei Hypertrophie konnte größtenteils eine Lokalisation von Kv4.2 an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Kontrolle (Sham) konnte in Myozyten des hypertrophierten Herzens kein großer Unterschied in der Oberflächenexpression von Kv4.2 beobachtet werden. Allerdings wurde insbesondere in Myozyten von Sham behandelten Mäusen zytoplasmatisches Protein angefärbt. Dagegen konnte in unbehandelten kardialen Mäusemyozyten kein Kv4.2 im Zytoplasma detektiert werden (7.2.1). Unregelmäßigkeiten sind vermutlich auf die Anwendung verschiedener Antikörper zurückzuführen. Die Färbung von Kv4.2 mit Cy3 ist wesentlich schwächer als die Cy2Färbung. Es ist zu vermuten, dass ein geringes Maß an neu synthetisiertem oder sich im Transport befindlichem Kv4.2- und KChIP2- Protein kontinuierlich im Zytoplasma vorzufinden ist.

Die geringere Gesamtkaliumstrom-Amplitude war auf eine geringere Amplitude von nicht oder langsam inaktivierenden Kaliumstromkomponenten zurückzuführen. Abgesehen vom Kv4.2 tragen in ventrikulären Mäusemyozyten die beiden Kanäle Kv1.5 und Kv2.1 noch signifikant zum Gesamtkaliumstrom bei. Die mRNA-Expression beider Kanäle war im hypertrophierten Mäuseherzen erhöht (Kapitel 7.1.3.4). Dagegen war die Proteinexpression von Kv1.5 und Kv2.1 konstant (Kapitel 7.1.3.4). Eine quantitativ vergleichbare geringere Gesamtkaliumstrom-Amplitude wurde im Modell der TAK induzierten Hypertrophie beschrieben (Marionneau et al., 2008). Die geringere Kaliumstrom-Amplitude ist im TAK-Modell auf eine geringere Amplitude der langsam inaktivierenden Stromkomponente I_{K,slow} zurückzuführen, während die Amplitude der nicht inaktivierenden Stromkomponente Iss erhöht war. Die molekulare Basis der erniedrigten Strom-Amplitude im TAK-Modell bleibt weiterhin unklar, da die Expression der Kanäle Kv1.5 und Kv2.1 ansteigt. Anzumerken ist hierbei die unterschiedliche Bezeichnung der Stromkomponenten in beiden Modellen. So werden in der vorliegenden Arbeit, im Gegensatz Marionnneau et al., die nicht und die langsam inaktivierenden Stromkomponenten in der Stromkomponente I_{ss} zusammengefasst. Die Umstrukturierung weiterer Kaliumkanäle ist in dem hier angewandten Ang II-Modell wie auch im TAK-Modell vermutlich Ursache für den niedrigeren Gesamtkaliumstrom. Um welche Kanäle es sich hierbei handelt ist jedoch nicht geklärt. Spekulationen zu Folge spielt, der zu den 2-Porendomänen-Kaliumkanälen zugehörige, TASK1 eine Rolle an der Vermittlung des I_{ss} in Rattenmyozyten (Putzke et al., 2007). Bei Marionneau et al. korreliert eine erhöhte Iss-Amplitude mit einer erhöhten Oberflächenexpression von TASK1.

8.2. Physiologische Rolle der akzessorischen β -Untereinheiten von Kv4-Kanälen

Kv4-Kanäle setzen sich *in vivo* meist aus heteromultimeren Kanalkomplexen zusammen. Diese bestehen aus porenbildenden Kv4- und den akzessorischen Untereinheiten KChIPs bzw. DPPs . Die Eigenschaften Kv4-vermittelter Ströme werden massgeblich durch KChIPs und DPPs beeinflusst. Beide führen zu einer Zunahme der Stromdichte und zu einer

Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung. Weiterhin verlangsamen KChIPs die Inaktivierung und verschieben die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu positiveren Werten (An et al., 2000; Bähring et al., 2001). Dagegen beschleunigen DPPs die Inaktivierung und verschieben die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wie auch der Inaktivierung in negative Richtung (Nadal et al., 2003; Jerng et al., 2004). Abgesehen von der Modulation des Schaltverhaltens führt die Co-Expression beider akzessorischen Untereinheiten zu einer subzellulären Umverteilung der Kv4-Kanäle von perinukleären Regionen zur Plasmamembran (An et al., 2000; Bähring et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand von immunzytochemischen Färbungen eine Lokalisation beider Proteine in bzw. an der Zelloberfläche gezeigt werden (7.1.2). Der Nachweis einer Lokalisation von Kv4.2 und KChIP2 an T-Tubuli wurde in der vorliegenden Arbeit nicht erbracht. Die Färbung der T-Tubuli erscheint nur äußerst schwach und müßte für zukünftigen Experimente weiter optimiert werden. Da keine geeigneten Antikörper für eine Doppelfärbung zur Verfügung standen, konnte eine Co-Lokalisation von Kv4.2 und KChIP2 nicht nachgewiesen werden. Daher kann nur spekuliert werden, dass eine Lokalisation des zytoplasmatischen Proteins KChIP2 an der Zellmembran auf eine Interaktion mit Kv4.2 zurückzuführen ist. Zur Verifizierung dieser Hypothese wäre die Suche geeigneter Antikörper mittels derer die Co-Lokalisation beider Proteine dargestellt werden kann ein Ansatzpunkt für weitere Studien.

Im Herzen ist die Interaktion von Kv-Kanälen mit KChIP2 von zentraler Bedeutung, während die Rolle von DPPs im Herzen noch nicht aufgeklärt ist. So ähneln die durch Co-Expression von Kv4.2 und KChIP2 vermittelten Ströme sehr dem nativen I_{to} in ventrikulären Myozyten. Eine physiologische Relevanz dieser Interaktion bei der Vermittlung der initialen Phase des Herzaktionspotentials ist durchaus denkbar. Durch eine schnelle Erholung von der Inaktivierung wird eine rechtzeitige Verfügbarkeit des Kanals für folgende Aktionspotentiale gewährleistet. Diese ist insbesondere im Mäuseherzen zur Aufrechterhaltung der hohen Herzfrequenz von Bedeutung. Ferner wird durch eine verstärkte Oberflächenexpression dafür gesorgt, dass ausreichend Kanal für die Einleitung der Repolarisation vorhanden ist. Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten die physiologische Bedeutung der Interaktion zu untersuchen. Ein Ansatz ist die Untersuchung des Kv4.2-vermittelten I_{to} in KChIP2-KO Mäusen (Kuo *et al.*, 2001). Befunden von Kuo *et al* zufolge ist bei homozygoten KChIP2-KO

Mäusen, die ein längeres Herzaktionspotential und eine erhöhte Anfälligkeit für induzierte

Herzarrhythmien aufweisen, offensichtlich kein Kv4.2-vermittelter Ito messbar. Die am häufigsten verbreitete Methode zur Untersuchung von Proteininteraktionen oder Proteineigenschaften ist die heterologe Expression in entsprechenden Zelllinien oder primär kultivierten Zellen. Mittels dieser Methode wurden anhand von Kv4.2-Mutanten detaillierte Nachweise über die molekularen Determinanten der Interaktion von Kv4.2 und KChIP2 erbracht. So zeigten in vitro Co-Immunopräzipitationen, dass eine Deletion der ersten 20 Aminosäuren im Kv4.2-N-Terminus zu einem Verlust der Interaktion von Kv4.2 mit KChIP2 führt (Bähring et al., 2001). In weiteren Interaktionsstudien konnten einzelne Aminosäuren identifiziert werden, deren Mutation zu einer Aufhebung der KChIP2-Interaktion führt (Callsen et al., 2005). Dabei zeigte die Mutante Kv4.2A14K einen Verlust aller charakteristischen KChIP2 Effekte. In Co-Immunopräzipitations-Experimenten wurde nur ein schwaches Signal im Westen Blot detektiert. Das Problem an heterologen Expressionssystemen ist die Überexpression des zu untersuchenden Proteins. Eine Überexpression bewirkt oft eine "Überladung" der Zelle mit dem Protein. Hierdurch kann die Interaktion in unterschiedlicher Weise beeinflusst werden. So besteht die Möglichkeit, dass aufgrund eines sterischen Effekts bestimmte Positionen im Kanal schwerer zugänglich werden. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte sein, dass mehr Kanal ohne "Hilfe" von KChIP2 zur Plasmamembran gelangt. Zur Vermeidung dieser Überexpressionsartifakte wurde die Mutante Kv4.2A14K ausgewählt um im Rahmen der vorliegenden Arbeit einen Targetingvektor zur Herstellung einer Knock-in Maus zu generieren (siehe Kapitel 7.2.1). Dieser wurde so konstruiert, dass eine knapp 10.000 bp große zur Sequenz muriner embryonaler Stammzellen homologe KCND2-Sequenz vorhanden war. In Exon 1 wurde die Mutation A14K eingebracht. Als positiver Selektionsmarker wurde eine sich selbst spleißende Neo-Kassette gewählt. Dadurch wird eine Verpaarung der Knock-in Mäuse mit Cre-Mäusen zur Entfernung der Neo-Kassette überflüssig. Der Targetingvektor wurde vollständig kloniert, jedoch ist die Generierung der Knock-in Mauslinie aufgrund von Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgt.

Das gleiche Vorgehen wäre auch für DPPs denkbar. Allerdings ist über die strukturellen Determinanten der Interaktion von Kv4-Kanälen und DPPs bisher nur wenig bekannt. Für Kv4.3 wurden zwei Punktmutanten beschrieben, bei denen die DPPy-Interaktion scheinbar beeinträchtigt ist (Ren *et al.*, 2005). Die Bindung findet hierbei über einen Bereich im S1-S2 Segment des Kanals statt (Ren *et al.*, 2005). Zur Klärung der Interaktionsstellen von DPPs an

den Kv4.2-Kanal, wurden in einer früheren Arbeit an analoger Stelle Punktmutationen (A235V, I239W) eingeführt (Doktorarbeit, Sven Hartmann). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei weitere, im Bereich des S2-Segments mutierte, Kv4.2-Konstrukte (C231I, A249F) generiert (Kapitel 7.2.2). Die Stromdichten der untersuchten Punktmutanten in CHO-Zellen waren im Vergleich zum wt-Kanal schwach erhöht, was vermutlich auf die leichte Varianz der Größe von CHO-Zellen zurückzuführen ist. Die Mutanten A235V und I239W zeigten keine Bindungsbeeinträchtigung gegenüber DPPx oder DPPy. Obwohl die Mutationen in einen Bereich eingebracht wurden, der zwischen Kv4.2 und Kv4.3 homolog ist, können die Ergebnisse der eingeschränkten Kv4.3-Bindung (Ren et al., 2005) nicht auf den Kv4.2-Kanal übertragen werden. Eine Mutation der Aminosäure 231 von Cystein zu Isoleucin wurde gewählt, da diese Aminosäure zwar homolog im Kv4.3-Kanal ist, im Kv1.4-Kanal jedoch ein Isoleucin auftritt. Da für den Kanal Kv1.4 gezeigt ist, dass er nicht mit DPPy interagiert (Ren et al., 2005) wurde dieser als Bezugspunkt gewählt. Die beschriebenen Sequenzunterschiede zwischen den beiden Kanälen könnten möglicherweise für eine DPP-Bindung verantwortlich sein. Die Mutante C231I zeigte keinen DPP-Bindungsverlust. Die Mutante A249F wurde ebenfalls wegen des Sequenzunterschieds zwischen Kv4.2- und Kv1.4-Kanal gewählt. Anders als bei den zuvor beschriebenen Mutanten liegt hier zusätzlich ein Sequenzunterschied im Kv4.3-Kanal vor. Eine starke Inhibierung des DPPx-Effekts bei der Mutante A249F läßt vermuten, dass diese Aminosäure an einer Interaktion beteiligt ist. Da es durch Co-Expression des Kanals mit DPPx dennoch zu einer leichten Erhöhung der Stromdichte kam, besteht die Möglichkeit, dass für eine vollständige Interaktion mehrere Bindungsstellen benötigt werden.

DPPs werden in hohem Maß im Gehirn exprimiert (Nadal et~al., 2003; Ren et~al., 2005). Dort sind sie gemeinsam mit KChIPs und Kv4.2 α -Untereinheiten an der Ausbildung eines funktionellen I_{SA}-Kanalkomplexes beteiligt. Eine verminderte I_{SA}-Stromdichte konnte mit Epilepsie in Zusammenhang gebracht werden (Singh et~al., 2005). Bei einer an Temporallapen-Epilepsie leidenden Patientin wurde die Mutation Kv4.2-587 Δ gefunden, die in einer 44 Aminosäure langen Deletion des C-Terminus resultiert (Singh et~al., 2005). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten heterologen Expressionstudien der C-terminalen Mutante in Abwesenheit akzessorischer Untereinheiten zeigten keine verminderte Stromdichte im Vergleich zum wt, sie erschien vielmehr leicht erhöht. Die inhibierte Potentierung der Stromdichte durch DPPx bei der Mutante 587 Δ könnte unter Umständen

ein Hinweis auf eine Beteiligung des C-Terminus bei der Kv4.2/DPPx Interaktion sein. Bisher wurde keine Rolle des C-Terminus für eine Interaktion zwischen DPPx und Kv4.2 beschrieben. Dagegen konnte für eine Vielzahl anderer Proteine eine Interaktion mit Kv4.2 über den C-Terminus gezeigt werden. So wird eine intraneuronale Verteilung von Kv4.2 durch Kif17 über eine C-terminale Interaktion vermittelt (Chu *et al.*, 2006). Hierbei konnte die Bindungsstelle auf die letzten 30 Aminosäuren eingegrenzt werden (LL-Motiv; Chu *et al.*, 2006). Der deletierte C-Terminus beinhaltet weiterhin Interaktionsstellen für die cytoskeletalen Proteine Filamin (Petrecca *et al.*, 2000) und PSD-95 (Wong *et al.*, 2002).

8.3. Pharmakologische Beeinflussung von kardialen Ionenkanälen

NS5806 wurde zum ersten Mal als I_{to}-Aktivator in Hundemyozyten beschrieben (Calloe *et al.*, 2009). Ein Ziel dieser Arbeit war es den Effekt von NS5806 auf den Kv4.2-vermittelten I_{to} in murinen Myozyten zu untersuchen. Bei spezifischer Aktivierung des I_{to} durch NS5806 wäre somit eine Substanz verfügbar mittels derer in folgenden Experimenten Effekte einer erhöhten I_{to}-Aktivierung auf die Zellphysiologie untersucht werden könnten.

Mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Technik sollte hierzu die Wirkung von NS5806 auf in Oozyten exprimierte Kaliumkanäle, die als molekulare Korrelete repolarisierender Kaliumströme bekannt sind, untersucht werden (Kapitel 7.3.1). Bei Expression von Kv4.2 in Abwesenheit von KChIP2 führte NS5806 zu einer hoch signifikanten Abnahme der Stromamplitude, während es bei Co-Expression von Kv4.2 und KChIP2 zu einer schwachen Zunahme der Amplitude kam. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der beobachtete Effekt von NS5806 auf den Kv4.2-vermittelten I_{to} in Bezug zur KChIP2 Expression steht. Ein Zusammenhang zwischen der Co-Expression von KChIP2 und der Potentierung des Ito durch NS5806 konnte bereits für den Kv4.3 erbracht werden (Calloe et al, 2010). Die Expression von Kv4.3 und KChIP2 in verschiedenen Ratios führte zu einem Unterschied in der Wirkung von NS5806. Auf den durch Kv4.3-vermittelten Ito wurde in Abwesenheit von KChIP2 kein signifikanter Effekt von NS5806 beobachtet. Ein Anstieg der Amplitude durch NS5806 konnte lediglich auf den durch Co-Expression von Kv4.3 und KChIP2 vermittelten Strom beobachtet werden. Eine Sättigung wurde bei Expression einer im physiologisch relevanten Bereich liegenden Ratio von Kv4.3 zu KChIP2 erreicht $\binom{1}{2}$ -1-fache Konzentration an KChIP2). Warum es bei Expression von Kv4.2 allein zu einer hoch

signifikanten Inhibierung durch NS5806 kommt ist unklar. Möglicherweise beruht dieser Effekt auf einer unterschiedlichen Wirkungsweise von NS5806 auf Kv4.2 und Kv4.3.

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin ein Effekt von NS5806 auf die Stromkinetik nachgewiesen werden. Sowohl bei Expression von Kv4.2 allein als auch bei Co-Expression mit KChIP2 kam es durch NS5806 zu einer verlangsamten Inaktivierung und Erholung von der Inaktivierung . Eine Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung durch NS5806 konnte auch für Kv4.3 sowohl bei Co-Expression von KChIP2 als auch ohne gezeigt werden (Calloe *et al.*, 2010). Eine schnellere Erholung von der Inaktivierung durch NS5806 in Hundemyozyten (Calloe *et al.*, 2009) zeigt, dass Daten basierend auf einer heterologen Überexpression nicht vollständig auf native Daten übertragbar sind. Weiterhin sind diese Befunde schwer in Einklang zu bringen mit dem postulierten Mechanismus einer KChIP2 abhängigen Modulation des Kv4-vermittelten I_{to}.

Eine über die auf Kv4-Kanälen hinausreichende Wirkung von NS5806 wurde anhand der Kaliumkanälen Kv1.4 und Kv1.5 untersucht. Obwohl eine Beteiligung von Kv1.4 am Gesamtkaliumstrom in ventrikulären Myozytene bisher nicht bewiesen werden konnte, wurde Kv1.4 aufgrund seiner Eigenschaft, die langsame Komponente des I_{to} zu vermitteln (Patel and Campbell, 2005), in die Untersuchung einbezogen. Die starke Reduktion der Stromamplitude zeigt einen inhibitorischen Effekt von NS5806 auf Kv1.4. Ein lediglich geringfügiger Effekt auf die Inaktivierung und eine Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung bestätigten dieses Ergebnis. Kv1.5 ist dagegen als eine der molekularen Komponenten, die den Gesamtkaliumstrom in murinen Myozyten vermitteln, beschrieben (Brouillette *et al.*, 2004). Die Applikation von NS5806 rief einen starken Effekt auf die Kinetik des Kv1.5 hervor. Während Kv1.5 unter Kontrollbedingungen nur geringfügig inaktivierte, wurde die Inaktivierung durch NS5806 erheblich gesteigert. Die Kinetik der Erholung von der Inaktivierung wurde ebenfalls massiv beeinflusst. NS5806 führte zu einem Verlust der 2-fach exponentiell verlaufenden Erholung von der Inaktivierung.

Die Wirkung von NS5806 auf native Ströme wurde mit Hilfe der Patch-Clamp Technik an linksventrikulären epikardialen Mäusemyozyten durchgeführt (Kapitel 7.3.2). Hier führte NS5806 zu einer Reduktion der Gesamtkaliumstrom-Amplitude. Neben dem Effekt der I_{to}-Potentierung durch NS5806 konnte in Hundemyozyten die Inhibition anderer Ionenströme wie dem I_{Na}, dem I_{Ca,L} und dem I_{Kr} nachgewiesen werden (Calloe *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin ein inhibitorischer Effekt von NS5806 auf den Kv1.4-

vermittelten Strom in Oozyten gezeigt werden. Die Reduktion der Amplitude ist möglicherweise auf eine Wirkung von NS5806 auf diverse Kanäle zurückzuführen. Welche Kanäle genau in kardialen Mäusemyozyten durch NS5806 beeinflusst werden, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden, da sich die Gesamtkaliumströme aus mehreren Komponenten zusammensetzen. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich der Kv4.2vermittelte I_{to} als Einzelstromkomponente betrachtet. Anders als in Hundemyozyten führte NS5806 in murinen Myozyten zu keiner I_{to}-Amplituden Erhöhung. Die Amplitude erschien eher etwas reduziert. Somit trägt die Abnahme der I_{to}-Amplitude zwar zur Abnahme der Gesamtkaliumstrom-Amplitude bei, erklärt diese aber nicht vollständig. Diese Ergebnisse könnten möglicherweise für eine Beteiligung von Kv1.4 am Gesamtkaliumstrom in ventrikulären Myozyten sprechen, da in Oozyten ein inhibitorischer Effekt von NS5806 auf den durch Kv1.4-vermittelten I_{to} nachgewiesen werden konnte. Denkbar wäre aber auch ein Effekt von NS5806 auf den durch Kv1.5-vermittelten Strom. Zwar führte NS5806 in Oozyten zu keiner Reduktion der Kv1.5-vermittelten Stromamplitude, bewirkte aber eine Modulation der Kinetik des Steady-state-Stroms. Diese Ergebnisse zeigen, dass NS5806 eine Wirkung auf den Kv1.5-vermittelten Strom ausüben kann. Die I_{to}-Inaktivierung war in murinen Myozyten ähnlich wie in Hundemyozyten verlangsamt. Es ist davon auszugehen, dass die verlangsamte Inaktivierungskinetik für die erhöhte I_{to}-Ladung verantwortlich ist. Eine Erhöhung der I_{to}-Ladung sagt aus, dass die maximalen Ito-Amplitude zwar reduziert ist, der Stromsfluss über die Zeit gesehen aber erhöht ist. Die signifikante Erhöhung der Ito-Ladung spricht für einen deutlichen Effekt von NS5806 auf die Inaktivierungskinetik. Eine erhöhte Stromamplitude wäre zu erwarten, wenn NS5806 die Anzahl der Kanäle in der Membran erhöhen, deren Einzelkanalleitfähigkeit oder deren Offenwahrscheinlichkeit bei +40 mV verändern würde. Da keine Zunahme der I_{to}-Amplitude in murinen Kardiomyozyten beobachtet wurde, ist eine Beeinflussung der beschriebenen Parameter als Erklärung für die Wirkungsweise von NS5806 eher unwahrscheinlich. Über den Wirkungsmechanismus kann lediglich spekuliert werden. Die starke Modulation der Ito-Stromkinetik durch NS5806 weist auf einen "Gating-Modifier" hin. Für Kv4-Kanäle sind eine Reihe von Toxinen beschrieben, die als "Gating-Modifier" wirken. So bindet beispielsweise Phrixotoxin 1 aus Phrixotrichus auratus im Geschlossen-Kanal-Zustand von Kv4-Kanälen auf extrazellulärer Seite nahe der Segmente S3 und S4 und verschiebt die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung zu positiveren Potentialen (Swartz and MacKinnon, 1997; Sanguinetti et al., 1997; Ebbinghaus et al., 2004; Chagot et al., 2004). Stromatoxin 1 aus *S. calceata* wirkt ebenfalls als "Gating-Modifier" bei Kv4.2 und Kv2.1-Kanälen, hat aber keinen Einfluss auf Kv4.3 (Escoubas et al., 2002). Mit Stromatoxin 1 ist ein Beispiel für eine unterschiedliche Modulation von Kv4.2 und Kv4.3 durch ein Toxin gegeben. Andere Substanzen dagegen wirken als Porenblocker. Ein Beispiel hierfür ist 4-Aminopyridin, das in Abhängigkeit von der Dosis eine Vielfalt von Kanälen inhibiert (Kirsch und Drewe, 1993; Brouillette et al., 2004). 4-Aminopyridin kann von der Außenseite als auch von der Innenseite den Ionenfluss beeinflussen.

Weiterhin wurde die Kinetik der Erholung von der Inaktivierung durch NS5806 moduliert. Diese setzt sich in ventrikulären Mäusemyozyten aus einer langsamen und einer schnellen Zeitkonstante zusammen. Die schnelle Komponente ist auf KChIP2-interagierende Kv4.2-Kanäle zurückzuführen. Der Ursprung der langsamen Zeitkonstante konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Denkbar ist, dass die langsame Zeitkonstante durch Kv4.2-Kanälen vermittelt wird, die keine Interaktion mit KChIP2 aufweisen. So konnte in HEK 293 Zellen ein τ von ca. 300 ms für die Erholung von Kv4.2 von der Inaktivierung ermittelt werden (Bähring et al., 2001; Callsen et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde bei Expression von Kv4.2 in Oozyten ein τ für die Erholung von der Inaktivierung von annährend 800 ms ermittelt. Zwar weichen die Werte in den unterschiedlichen Expressionsystem stark von einander ab, dennoch liegt das zweite au der Erholung von der Inaktivierung in ventrikulären Mäusemyozyten mit knapp 600 ms genau in diesem Bereich. Während die Erholung von der Inaktivierung in Hundemyozyten durch NS5806 beschleunigt wurde, führte es in murinen Myozyten zu einer Verlangsamung beider Zeitkonstanten. Diskrepanzen zwischen beiden Modellen sind nicht auszuschließen, da zwei unterschiedliche Systeme betrachtet wurden. Einerseits ist der I_{to} in Hundemyozyten Kv4.3- und in murinen Myozyten Kv4.2-vermittelt. Andererseits existiert ein Unterschied im Expressionsprofil von Kaliumkanälen und akzessorischen Untereinheiten im Hunde- und im Mäuseherzen. So konnte in Hundemyozyten der Nachweis einer DPPx-Expression erbracht werden (Calloe et al., 2010), während es bisher keinen Beweis für eine DPPx-Expression im Mäuseherzen gibt. Da ein DPPx abhängiger Effekt von NS5806 auf den Kv4.2- bzw. Kv4.3-vermittelten Strom im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachtet wurde, kann darüber keine konkrete Aussage getroffen werden. In ventrikulären Hundemyozyten wird weiterhin ein geringer Beitrag von Kv1.4 zum Ito postuliert (Akar et al., 2004). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit ein starker inhibitorischer Effekt auf den Kv1.4-vermittelten Strom in Oozyten nachgewiesen werden. Ein weiterer Aspekt ist die Korrelation des NS5806-Effekts mit dem regionalen I_{to}-Gradienten (Epikard > Endokard). Eine I_{to}-Potentierung in Hundemyozyten wurde insbesondere im Epikard beobachtet, während der Effekt im Endokard wesentlich schwächer ausfiel (Calloe *et al.*, 2009). Die Trennung des Epikards vom restlichen Ventrikel gestaltet sich beim Mäuseherzen aufgrund der geringen Organgröße äußerst schwierig. Die Isolation und Messung einiger nicht epikardialer Myozyten kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Bemerkenswert ist die in der vorliegenden Studie beobachtete Potentierung einer Stromkomponente, die unter Kontrollbedingungen nicht sichtbar war (siehe Abb. 35A und 43A). Einen Erklärungsansatz hierfür bietet die Möglichkeit der Verschiebung der Spannungsabhängigkeit von Kv2.1 oder Kv1.5 durch NS5806, so dass eine signifikante Anzahl an Kanälen während des Vorpulses aktiviert wurden. Weiterhin scheint die I_{Na}-Amplitude durch NS5806 erniedrigt zu sein (Abb. 35A und 43A). Ein inhibitorischer Effekt auf den I_{Na} wurde bereits in Hundemyozyten festgestellt (Calloe *et al.*, 2009).

Weiterhin sollte ein möglicher Effekt von NS5806 auf Kaliumströme in ventrikulären Kardiomyozyten von KChIP2-KO Mäusen untersucht werden (Kapitel 7.3.3). In Kardiomyozyten von KChIP2-KO Mäusen konnte offensichtlich kein Kv4.2-vermittelter I_{to} gemessen werden (Kuo *et al.*, 2001; Thomsen *et al.*, 2009). Zum besseren Verständnis wurden die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Kontrolldaten aus Myozyten von wt Mäusen denen von KChIP2-KO Mäusen gegenübergestellt. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Befunden, konnten in der vorliegenden Arbeit Restströme mittels Subtraktionsprotokoll ermittelt werden. Trotz Unterschieden in der Inaktivierungskinetik der Restströme im Vergeich zum Kv4.2-vermittelten I_{to} in Myozyten von wt Mäusen ist davon auszugehen, dass es sich um Kv4.2-vermittelten I_{to} handelt. Zumindestens wurde die Isolation anderer Stromkomponenten mit Hilfe der angewandten Methode bisher nicht beschrieben.

Im Vergleich zu Gesamtkaliumströmen in wt Myozyten wiesen Gesamtkaliumströme in KChIP2-KO Myozyten eine erheblich niedrigere Amplitude auf. Die niedrige Amplitude ist auf den geringen Kv4.2-vermittelten I_{to} zurückzuführen. In der Literatur ist im Gegensatz hierzu keine Reduktion der Gesamtkaliumströme beschrieben (Thomsen *et al.*, 2009). Für KChIP2-KO Mäuse wird eine erhöhte Expression von Kv1.5, aufgrund des fehlenden inhibitorischen Einflusses von KChIP2 auf den Kanal, beschrieben. Die Erhöhung der Kv1.5 Expression und des durch Kv1.5 vermittelten Stroms gleicht eine Abnahme der Amplitude durch Verlust des

Kv4.2-vermittelten I_{to} aus (Thomsen et al., 2009). Die Unregelmäßigkeiten zwischen den vorliegenden Daten und denen von Thomsen et al. beruhen vermutlich auf den unterschiedlichen Messverfahren. Für die vorliegenden Daten wurde ein Subtraktionsprotokoll zur Ermittlung des Kv4.2-vermittelten Ito angewandt. Bei Thomsen et al. wurde ein 400 ms lang dauerndes Depolarisationsprotokoll durchgeführt. Die schnell inaktivierende Komponente des maximalen Auswärtstrom wurde als Kv4.2-vermittelter Ito definiert (Thomsen et al., 2009). Die gegensätzlichen Resultate zeigen, dass sich das Ausschalten von einem Gen sehr unterschiedlich auf die Expression anderer Gene auswirken kann. Die Ergebnisse zeigen jedoch auch wieder einen Zusammenhang zwischen der Expression von KChIP2 und dem Kv4.2-vermittelten Ito auf. So war nicht nur die Ito-Amplitude in KChIP2-KO Mäusen drastisch niedriger, sondern auch die schnelle Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung ausgeschaltet. Andererseits verstärken die Ergebnisse die Vermutung, dass in der Zellmembran von Mäusemyozyten nicht mit KChIP2 interagierende Kv4.2-Kanäle vorliegen, die in der Lage sind eine Komponente des Ito zu vermitteln. Im Vordergrund sollte allerdings die Klärung der Effekte von NS5806 in Myozyten von KChIP2-KO Mäusen stehen. Diese waren weit weniger stark ausgeprägt als in wt Myozyten. So wurde weder die Gesamtkaliumstrom-Amplitude, noch die Stromkinetik sonderlich durch NS5806 moduliert. Allerdings kam es durch NS5806 in Myozyten von KChIP2-KO Mäusen im Gegensatz zu denen von wt Mäusen zu einer Potentierung der "Ito"-Amplitude. Dieser Befund bestärkt die Annahme, dass es sich bei dem mittels Subtraktionsprotokoll ermittelten Strom tatsächlich um Kv4.2-vermittelten I_{to} handelt. So wurde in der Literatur und in der vorliegenden Arbeit eher ein inhibitorischer Effekt auf alle weiteren untersuchten Stromkomponenten beobachtet. Außerdem ist dies ein weiterer Befund, der eine KChIP2 abhängige Ito-Modulation durch NS5806 eher ausschließt. Aufgrund der Heterogenität aller betrachteten Daten ist es jedoch nicht möglich eine endgültige Aussage zu treffen. Bei den in Oozyten gezeigten Ergebnissen wurden sowohl in der Literatur als auch in den vorliegenden Ergebnissen die humanen α - und β - Untereinheiten untersucht. Es wurden somit drei unterschiedliche Systeme betrachtet.

Bisher konnte ein potentierender Effekt von NS5806 nur auf den durch Kv4-Kanäle vermittelten Strom nachgewiesen werden. Bei der kurzen Applikation von NS5806 in elektrophysiologischen Experimenten ist ein Effekt auf die Proteinexpression des Kanals nicht zu erwarten. Zur Überprüfung der Wirkung von NS5806 auf die Proteinexpression von

Kv4.2 wurden linksventrikuläre Mäusemyozyten über einen Zeitraum von 20 Stunden der Inkubation mit der Substanz ausgesetzt. Die Färbung linksventrikulärer Myozyten, die mit NS5806 behandelt wurden, könnte auf eine Abnahme des Proteins hinweisen. Bei immunzytochemischen Färbungen Aussagen über eine veränderte Proteinexpression zu treffen, gestaltet sich jedoch äußerst schwierig. Für ein eindeutiges Ergebnis wäre die Durchführung einer quantifizierenden Methode notwendig. An dieser Stelle kann lediglich spekuliert werden, dass eine kontinuierliche Einwirkung von NS5806 auf Kv4.2 unter Umständen zu einem Ausbau des Proteins aus der Zellmembran führt.

Die Daten zeigen, dass die Wirkung von NS5806 als Ito- Aktivator mit äußerster Vorsicht zu betrachten ist. Die Substanz ruft vielfältige und heterogene Effekte hervor. Über den Einfluss von NS5806 auf den humanen Organismus kann anhand dieser Ergebnisse allerdings keine Aussage getroffen werden. Die bisherigen Daten zeigen, dass NS5806 auf kardiale Myozyten zweier Organismen unterschiedliche Effekte hervorruft. Weiterhin stimmen die in heterologen Expressionssystem erhobenen Daten nicht vollständig mit den nativen Daten überein. Aufgrund dieser Widersprüchlichkeit wäre ein weiterer möglicher Schritt die Untersuchung der Wirkung von NS5806 auf Ströme in humanen Myozyten. Der Zugang zu gesunden humanen Myozyten ist jedoch äußerst schwierig. Meist sind nur humane Kardiomyozyten zugänglich, die aus Biopsien von kranken Patienten gewonnen wurden. Da im kranken Herzen eine vom gesunden Herzen abweichende Expression von Proteinen zu erwarten ist, eignen sich vorbelastete Myozyten für solche Studien nicht. Die Anwendung als Therapeutikum wäre problematisch, da zusätzlich zu den vielfältigen Effekten von NS5806 die Ausbildung eines Brugada ähnlichen Syndroms in Hundemyozyten beobachtet werden konnte (Calloe et al., 2009). Ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Ito-Dichte und der Ausbildung des Brugada Syndroms konnte bereits an Patienten mit einer Mutation in dem KCNE3-Gen, einer inhibitorischen Untereinheit von Kv4-Kanälen, erbracht werden (Lundby and Olesen, 2006; Delpón et al., 2008). So führt eine über dem physiologischen Level liegende Ito-Dichte zu einer Akzentuierung der "Spike and Dome" Morphologie bis hin zu einem Verlust der Plateau-Phase des Herzaktionspotentials, welche einen Herzstillstand bewirkt. Bei Mäusen ist aufgrund der hohen Ito-Dichte und der sehr geringen Plateau-Phase unter physiologischen Bedingungen, die notwendig für eine hohe Herzfrequenz sind, die Ausbildung eines Brugada ähnlichen Syndroms eher von untergeordneter Rolle.

9. Literaturverzeichnis

- Akar FG, Wu RC, Deschenes I, Armoundas AA, Piacentino III V, Houser SR and Tomaselli GF,

 Phenotypic differences in transient outward K⁺ current of human and canine
 ventricular myocytes: insights into molecular composition of ventricular I_{to}. Am. J.

 Physiol. Heart Circ. Physiol. (2004); 286 (2): 602-9.
- Amarillo Y, De Santiago-Castillo JA, Dougherty K, Maffie J, Kwon E, Covarrubias M and Rudy B, Ternary Kv4.2 channels recapitulate voltage-dependent inactivation kinetics of A-type K⁺ channels in cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* (2008); 586 (8): 2093-106.
- An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS and Rhodes KJ, Modulation of A-type potassium channel by a family of calcium sensors. *Nature* (2000); 403 (6769): 553-6.
- Bähring R, Dannenberg J, Peters HC, Leicher T, Pongs O and Isbrandt D, Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *J. Biol. Chem.* (2001b); 276 (26): 23888-94.
- **Barry DM, Trimmer JS, Merlie JP, Nerbonne JM,** Differential expression of voltage-gated K⁺ channel subunits in adult rat heart. *Circ. Res.* (1995): 77 (2): 361-9.
- **Beuckelmann DJ, Nabauer M and Erdmann E,** Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ. Res.* (1993); 73(2):379-85.
- **Billet S, Aguilar F, Clauser E,** Role of Angiotensin II AT₁ receptor activation in cardiovascular diseases. *Kidney Int* (2008); 74 (11): 1379-84.
- Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Christian Mewis and Kühlkamp V, Ionic mechanism of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* (1999); 44 (1): 121-31.
- **Strauss HC,** Distinct transient outward potassium current (I_{to}) phenotypes and distribution of fast-inactivating potassium channel alpha subunits in ferret left ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* (1999); 113 (4): 581-600.

- **Brouilette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C.,** Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J. Physiol.* (2004); 559 (Pt 3): 777-98.
- Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, Yamada KA, Nerbonne JM, Heterogeneous expression of repolarizing , voltage-gated K⁺ currents in adult mouse ventricles. *J. Physiol.* (2004); 559 (Pt 1): 103-20.
- **Bunting M, Bernstein KE, Greer JM, Capecchi MR, Thomas KR,** Targeting genes for self-excision in the germ line. *Genes Dev.* (1999); 13 (12): 1524-8.
- **Burgoyne RD and Weiss JL,** The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem. J.* (2001); 353 (Pt 1): 1-12.
- Calloe K, Cordeiro JM, Di Diego JM, Hansen RS, Grunnet M, Olesen SP and Antzelevitch C, A transient outward potassium current activator recapitulates the electrocardiographic manifestations of Brugada syndrome. *Cardiovasc. Res.* (2009); 81 (4): 686-94.
- Calloe K, Soltysinska E, Jespersen T, Lundby A, Antzelevitch C, Olesen SP and Cordeiro JM,

 Differential effects of the transient outward K⁺ current activator NS5806 in the canine
 left ventricle. *J. Mol. Cell Cardiol*. (2010); 48 (1): 191-200.
- Callsen B, Isbrandt D, Sauter K, Hartmann LS, PongsO and Bähring R, Contribution of N- and C-terminal channel domains to Kv channel interacting proteins in a mammalian cell line. *J. Physiol.* (2005); 568 (Pt 2): 397-412.
- Capuano V, Ruchon Y, Antoine S, Sant MC, Renaud JF, Ventricular hypertrophy induced by mineralcorticoid treatment or aortic stenosis differentially regulates the expression of cardiac K⁺ channels in the rat. *Mol. Cell Biochem.* (2002); 237 (1-2): 1-10.
- Chagot B, Escoubas P, Villegas E, Bernard C, Ferrat G, Corzo G, Lazdunski M and Darbon H,
 Solution structure of Phrixotoxin 1, a specific peptide inhibitor of Kv4 potassium
 channels from the venomof the theraphosid spider *Phrixotrichus auratus.Protein Sci.*(2004); 13 (5): 1197-208.
- **Chomczynski P and Sacchi N,** The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years old. *Nat. Protoc.* (2006); 1 (2): 581-5.
- Choe Senyon, Potassium channel structures. Nature Rev Neurosci. (2002); 3 (2): 115-21.
- Chu PJ, Rivera JF and Arnold DB, A Role for Kif 17 in transport of Kv4.2. *J. Biol. Chem.* (2006); 281 (1): 365-73.

- **Decher N, Gonzales T, Steinmeyer K and Sanguinetti MC,** Novel KChIP2 isoform increase functional diversity of transient outward potassium currents. *J. Physiol.* (2004); 557 (Pt 3): 761-72.
- Delpón E, Cordeiro JM, Núñez L, Bloch PE, Thomsen, Guerchicoff A, Pollevick GD, Wu Y, Kanters JK, Larsen CT, Burashnikov E, Christiansen M and Antzelevitch C, Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada Syndrome. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* (2008); 1 (3): 209-18.
- **Derst C und Karschin A**, Evolutionary link between prokaryotic and eukaryotic K⁺ channels. *J. Exp. Biol.* (1998); 201 (Pt 20): 2791-9.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT and MacKinnon R, The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* (1998); 280 (5360): 69-77.
- Ebbinghaus J, Legros C, Nolting A, Guette C, Celerier ML Pongs O and Bähring R, Modulation of Kv4.2 channels by a peptide isolated from the venom of the giant birdeating tarantula *Theraphosa leblondi.Toxicon* (2004); 43 (8): 923-32.
- Escoubas P, Diochot S, Ce´ Le´ Rier ML, Nakajima T, and Lazdunski M, Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies. Mol. Pharmacol. (2002); 62 (1): 48-57.
- Goldstein SA, Wang KW, Ilan N and Pausch MH, Sequence and function of the two P domain potassium channels: implication of an emerging superfamily. *J. Mol. Med.* (1998); 76 (1): 13-20.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, MacKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W and Wang X, International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationship of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* (2005); 57 (4): 473-508.
- **Hanahan D,** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* (1983); 166 (4): 557-80.
- **Heinemann SH, Rettig J, Graack HR and Pongs O,** Functional characterization of Kv channel β-subunits from brain. *J. Physiol.* (1996); 493 (Pt 3): 625-33.
- Holmqvist MH, Cao J, Hernandez-Pineda R, Jacobson MD, Carroll KI, Sung MA, Betty M, Ge
 P, Gilbride KJ, Brown ME, Jurman ME, Lawson D, Silos-Santiago I, Yu Xie,
 Covarrubias M, Rhodes KJ, Distefano PS and An WF, Elimination of fast inactivation

- in Kv4 A-type potassium channels by an auxiliary subunit domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2002); 99 (2): 1035-40.
- Isbrandt D, Leicher T, Waldschütz R, Zhu X, Luhmann U, Michel U, Sauter K and Pongs O, Genes structures and expression profiles of three human KCND (Kv4) potassium channels mediating A-type currents I_{TO} and I_{SA}. *Genomics* (2000); 64 (2): 144-54.
- **Jerng HH, Qian Y and Pfaffinger PJ,** Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys. J.* (2004); 87 (4): 2380-96.
- Jerng HH, Lauver AD and Pfaffinger PJ, DPP10 splice variants are localized in distinct neuronal populations and act to differentially regulate the inactivation properties of Kv4-based ion channels. *Moll. Cell. Neurosci.* (2007); 35 (4): 604-24.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT and MacKinnon, Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* (2002); 427 (6888): 515-22.
- Jin H, Hadri L, Palomeque J, Morel C, Karakikes I, Kaprielian R, Hajjar R and Lebeche D, KChIP2 attenuates cardiac hypertrophy through regulation of I_{to} and intracellular calcium signaling. *J. Mol. Cell Cardiol*. (2010); [Epub ahead of print].
- Kääb S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, Marban E, Tomaselli GF, Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ. Res.* (1996); 78 (2): 262-73.
- **Kamb A, Tseng-Crank J and Tanouye MA,** Multiple products of the *Drosophila Shaker* gene may contribute to potassium channel diversity. *Neuron* (1988); 1 (5): 421-30.
- Kaprielian R, Wickenden AD, Kassiri Z, Parker TG, Liu PP and Backx PH, Relationship between K⁺ channel down-regulation and [Ca²⁺]_i in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J. Physiol.* (1999); 517 (Pt 1): 229-45.
- **Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK and Goldstein SA,** A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* (1995); 376 (6542): 690-95.
- Kim LA, Furst J, Butler MH, Xu S, Grigorieff N and Goldstein SAN, Ito channels are octomeric complexes with four subunits of each Kv4.2 and K+ channel-interacting protein 2. *J. Biol. Chem.* (2004); 279 (7): 5549-54.

- Kim LA, Furst J, Gutierrez D, Butler MH, Xu S, Goldstein SAN and N Grigorieff, Three-Dimensional Structure of I_{to}: Kv4.2-KChIP2 ion channels by electron microscopy at 21A° resolution. *Neuron* (2004b); 41 (4): 5549-54.
- **Kirsch GE and Drewe JA,** Gating-dependent mechanism of 4-aminopyridin block in two related potassium channels. *J. Gen. Physiol.* (1993); 102 (5): 797-816.
- Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJC, Lin JLC, Hoshijima M,. Nguyěň -Traň VTB, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J Jr., Giles WR and Chien KR, A Defect in the Kv channel-interacting protein 2 KChIP2) gene leads to a complete loss of I_{to} and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* (2001); 107 (6): 801-13.
- **Lebaudy A, Véry AA and Sentenac H,** K⁺ channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS Lett.* (2007); 581 (12): 2357-66.
- **Litovsky SH and Antzelevitch C,** Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ. Res.* (1988); 62 (1): 116-26.
- **Liu DW, Gintant GA and Antzelevitch C,** Ionic bases for electrophysiological distinctions among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. *Circ. Res* (1993); 72(3):671-87.
- **Lundby A and Olesen SP,** KCNE3 is an inhibitory subunit of the Kv4.3 potassium channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2006); 346 (3): 958-67.
- **Livak KJ and Schmittgen TD,** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* (2001); 25 (4): 402-8.
- Maljevic S, Lerche C, Seebohm G, Alekov AK, Busch AE and Lerche H, C-terminal interaction of KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels. *J. Physiol.* (2003); 548 (Pt 2): 353-60.
- Marionneau C, Brunet S, Flagg TP, Pilgram TK, Demolombe S and Nerbonne JM, Distinct cellular and molecular mechanisms underlie functional remodeling of repolarizing K⁺ currents with left ventricular hypertrophy. *Circ. Res.* (2008); 102 (11): 1406-15.
- **Mészáros J, Ryder KO, Hart G,** Transient outward current in catecholamine-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Am. J. Physiol.* (1996); 271 (Pt 2): 2360-7.
- Morohash Y, Hatano N, Ohya S, Takikawa R, Watabiki T, Takasugi N, Imaizumi Y, Tomita T, and Iwatsubo T, Molecular cloning and characterization of CALP/KChIP4, a novel EF-hand protein interacting with Presenilin 2 and voltage-gated potassium channel subunit Kv4. *J. Biol. Chem.* (2002); 277 (17): 14965-75.

- Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Ma Y, Mo W,. Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA and Bernardo Rudy, The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-Type K+ channels. *Neuron* (2003); 37 (3): 449-61.
- Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL and Escande D, Genetic manipulation of cardiac K⁺ channel function in mice: What Have We learned, and where do we go from here? *Circ. Res.* (2001); 89 (11): 944-56.
- **Niwa N and Nerbonne JM,** Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (I_{to}) expression and regulation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2009); 48 (1): 12-25.
- **Numberger M and Draguhn,** *Patch-Clamp-Technik*, Labor im Fokus. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. (1996).
- Pak MD, Baker K, Covarrubias M, Butler, Ratcliffe A and Salkoff L, mShal, a subfamily of Atype channel cloned from mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991); 88 (10): 4386-90.
- **Patel SP and Campbell DL,** Transient outward potassium current, 'I_{to}', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J. Physiol.* (2005); 569 (Pt 1): 7-39.
- Petrecca K, Miller DM and Shrier A, Localization and enhanced current density of the Kv4.2 potassium channel by interaction with the actin-binding protein filamin. *J. Neurosci*. (2000); 20 (23): 8736-44.
- Pioletti M, Findeisen F, Hura GL and Minor DL Jr., Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2006); 13 (11): 987-95.
- Pongs O, Kecskemethy N, Müller R, Krah-Jentgens I, Baumann A, Kiltz HH, Canal I, Llamazares S and Ferrus A, *Shaker* encondes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* (1988); 7 (4): 1087-96.
- **Potreau D, Gomez JP, Fares N,** Depressed transient outward current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart. *Cardiovasc. Res.* (1995); 30 (3): 440-8.
- **Pruunsild P and Timmusk T,** Structure, alternative splicing, and expression of the human and mouse KCNIP gene family. *Genomics* (1995); 86 (5): 581-93.

- Putzke C, Wemhöner K, Sachse FB, Rinné S, Schlichthörl G, Li XT, Jaé L, Eckhardt I, Wischmeyer E, Wulf H, Preisig-Müller R, Daut J and Decher N, The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. *Cardiovasc. Res.* (2007); 75 (1): 59-68.
- QI SY, Riviere PJ, Trojnar J, Junien JL and Akinsanya KO, Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases. *Biochem. J.* (2003); 373 (Pt 1): 179-89.
- Radicke S, Cotella D, Graf EM, Ravens U and Wettwer E, Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative ß-subunit of human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3. *J. Physiol.* (2005); 565 (Pt 3): 751-6.
- Ren X, Hayashi Y, Yoshimura N and Takimoto K, Transmembrane interaction mediates complex formation between peptidase homologues and Kv4 channels. *Mol. Cell Neurosci.* (2005); 29 (2): 320-32.
- **Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Dolly JO and Pongs O,** Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels. *Nature* (1994); 369 (6478): 289-94.
- **Roberts SK,** TOK homologue in Neuospora crassa: first cloning and functional characterization of an ion channel in filamentous fungus. *Elkaryot. Cell* (2003); 2 (1): 181-90.
- Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE and McKinnon D, Regulation of KChIP2 potassium channel b subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J. Physiol.* (2001); 533 (Pt 1): 119-25.
- Rosati B, Grau F, Rodriguez S, Li H,.Nerbonne JM and McKinnon D, Concordant expression of KChIP2 mRNA, protein and transient outward current throughout the canine ventricle. *J. Physiol.* (2003); 548 (Pt 3): 815-22.
- Rossow CF, Minami E, Chase EG, Murray CE and Santana LF, NFATc3-induced reductions in voltage-gated K⁺ currents after myocardial infarction. *Circ. Res.* (2004); 94 (10): 1340-50.
- **Rossow CF, Dilly KW and Santana LF,** Differential Calcineurin/NFATc3 activity contributes to the I_{to} transmural gradient in the mouse heart. *Circ. Res.* (2006); 98 (10): 1306-13.
- Salkoff L, Baker K, Butler A, Covarrubias M, PAK MD, Wei A, An essential `set` of K⁺ channels conserved in flies, mice and humans. *Trends Neurosci* (1992); 15(5):161-6.

- Sanguinetti MC, Johnson JH, Hammerland LG, PR Kelbaugh, Volkmann RA, Saccomano NA and Mueller AL, Heteropodatoxins: Peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. *Mol. Pharmacol.* (1997); 51 (3): 491-8.
- Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP and Schmidt BM, Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet* (2007); 369 (9568): 1208-19.
- Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B and Pongs O, A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J.* (2000); 19 (3): 332-40.
- Schrempf H, Schmidt O, Kümmerlen R, Hinnah S, Müller D, Betzler M, Steinkamp T, and Wagner R, A procaryotic ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* (1995); 14 (21): 5170-8.
- Schröter KH, Ruppersberg JP, Wunder F, Rettig J, Stocker M and Pongs O, Cloning and functional expression of a TEA-sensitive A-type potassium channel from rat brain. FEBS Lett. (1991); 278 (2): 211-6.
- **Schwake M, Jentsch TJ and Friedrich T,** A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly. *EMBO Rep.* (2003); 4 (1): 76-81.
- Shibata R, Misonou H, Campomanes CR, Anderson AE, Schrader LA, Doliveira LC, Carroll KI, JD Sweatt, Rhodes KJ and Trimmer JS, Fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J. Biol. Chem.* (2003); 278 (38): 36445-54.
- Singh B, Ogiwara I, Kaneda M, Tokonami N, Mazaki E, Baba K, Matsuda K, Inoue Y and Yamakawa K, A Kv4.2 truncation mutation in a patient with temporal lobe epilepsy. Neurobiol. Dis. (2006); 24 (2):2 45-53.
- **Sokolova O, Kolmakova-Partensky L and Grigorieff N,** Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel an 2.5 nm resolution. *Structure* (2001); 9 (3): 215-20.
- Soltysinska E, Olesen SP, Christ T, WettwerE, Varró A, Grunnet M and Jespersen T,

 Transmural expression of ion channels and transporters in human and end-stage
 failing hearts. *Pflugers Arch.* (2009); 459 (1): 11-23.
- Stühmer W, Ruppersberg JP, Schröter KH, Sakmann B, Stocker M, Giese GP, Perschke A, Baumann A and Pongs O, Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J.* (1989); 8 (11): 3235-44.

- **Swartz KJ and MacKinnon R,** An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a chilean tarantula. *Neuron* (1995); 15 (4): 941-9.
- **Takagishi Y, Yasui K, and Severs NJ,** Species-specific difference in distribution of voltage-gated L-type Ca²⁺ channels of cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* (2000); 279 (6): 1963-9.
- **Takeuchi S, Takagishi Y, Yasui K, Murata Y, Toyama J, Kodama I,** Voltage-gated K⁺ channel, Kv4.2, localizes predominantly to the transverse-axial tubular system of the rat myocyte. *J. Mol. Cell Cardiol.* (2000); 32 (7): 1361-9.
- **Takimoto K, Li D, Hershman KM, Li P, Jackson EK, Levitan ES,** Decreased expression of Kv4.2 and novel Kv4.3 K⁺ channel subunit mRNA in ventricles of renovascular hypertensive rats. *Circ. Res.* (1997); 81 (4): 533-9.
- Tempel BL, Papazian DM, Schwarz TL, Jan YN and Jan LY, Sequence of a probable potassium channel component encoded *Shaker* locus of *Drosophila*. *Science* (1987); 237 (4816): 770-5.
- Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM, Outward K⁺current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ. Res.* (1997); 80 (6): 772-81.
- Thomsen MB, Sosunov EA, Anyukhovsky EP, Özgen N, Boyden PA and Rosen MR, Deleting the accessory subunit KChIP2 results in loss of I_{to,f} and increased I_{K,slow} that maintains normal action potential configuration. *Heart Rhythm*. (2009); 6 (3):3 70-7.
- Vega-Saenz de Mira E, Moreno H, Fruhling D, Kentros C and Rudy B, Cloning of ShIII (Shaw-like) cDNAs encoding a novel high-voltage-activating, TEA-sensitive, type-A K⁺ channel. *Proc. Biol. Sci. USA* (1992); 89 (1): 197-201.
- Wada K, Yokotani N, Hunter C, Dol K, Wenthold RJ and Shimasaki S, Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992); 89 (1): 197-201.
- Wang H, Yan Y, Liu Q, Huang Y, Shen Y, Chen L, Chen Y, Yang Q, Hao Q, Wang KW and Chai J, Structural basis for modulation of Kv4 K⁺ channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat. Neurosci.* (2007); 10 (1): 32-9.
- Wong W, Newell EW, Jugloff DGM, Jones OT and Schlichter LC, Cell Surface Targeting and clustering interactions between heterologously expressed PSD-95 and the *Shal* voltage-gated potassium channel, Kv4.2. *J. Biol. Chem.* (2002); 277 (23): 20423-30.

- **Workman AJ, Kaneb KA, Rankina AC,** The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* (2001); 52 (2): 226-35.
- **Xu H, Guo W and Nerbonne JM,** Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* (1999); 113 (5): 116-26.
- Yu H, Gao J, Wang H, Wymore R, Steinberg S, McKinnon D, Rosen MR and Cohen IS, Effects of the renin-angiotensin system on the current I_{to} in epicardial and endocardial ventricular myocytes from the canine heart, *Circ. Res.* (2000); 86 (10): 1062-8.
- Zagha E, Ozaita A, Chang SY, Nadal MS, Lin U, Saganich MJ, McCormack T, Akinsanya KO, Qi SY and Rudy B, DPP10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels. *J. Biol. Chem.* (2005); 280 (19): 18853-61.
- **Zhang TT, Takimoto K, Stewart AFR, Zhu C and Levitan ES,** Independent regulation of cardiac Kv4.3 potassium channel expression by Angiotensin II and Phenylephrine. *Circ. Res.* (2001); 88 (5): 476-82.
- **Zhou C, Ziegler C, Birder LA, Stewart AFR and Levitan ES,** Angiotensin II and stretch activate NADPH oxidase to destabilize cardiac Kv4.3 channel mRNA. *Circ. Res.* (2006); 98 (8): 1040-7.
- **Zhu XR, Netzer R, Böhlke K, Liu Q and Pongs,** Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K⁺ current. *Receptors Channels* (1999); 6 (5): 387-400.
- Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, Nattel S, Transmural expression of transient outward current subunits in normal and failing canine and human hearts. J. Physiol. (2004); 561 (Pt 3): 735-48.

10. Abkürzungsverzeichnis

<u>A</u>

Ang II Angiotensin II

APS Ammoniumperoxidisulfat

<u>B</u>

bp Basenpaare

BSA Bovine Serum Albumine (Rinderserum-Albumin)

<u>C</u>

ca. circa

Ca Calcium

CAPS (3[cyclohexylamino]-1-Propan Sulfonsäure

cDNA complementary Desoxyribonucleic Acid (komplementäre Desoxyribo-

nukleinsäure, DNS)

CHO Chinese Hamster Ovary (Eierstöcke des Chinesischen Hamsters)

Cl Chlor

cRNA complementary Ribonucleic Acid (komplementäre Ribonukleinsäure,

RNS)

Ct cycle threshold (Zyklus-Grenzwert)

<u>D</u>

DEPC Diethylpyrocarbonat

DNA Desoxoribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)

dNTP Desoxyribonuleosidtriphosphat

DMSO Dimethylsulfoxid

DPP Dipeptidyl-Aminopeptidase

DTT Dithiotheitol

<u>E</u>

ec extra cellular (extrazellulär)

ECL enhanced chemoluminescence (verstärkte Chemolumineszenz)

EDTA Ethylendiamintetraacetat

EGFP Enhanced Green Fluorescent Protein (verbessertes grün fluorezieren-

Abkürzungsverzeichnis

des Protein) ER Endoplasmatisches Retikulum <u>F</u> **FCS** Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum) FW forward (vorwärts) <u>G</u> °C **Grad Celsius** Gramm g gravity (Schwerkraft, universelle Konstante) g GTC Guanidinthiocyanat <u>H</u> HA Hämagglutinin 4-(2-Hydroxyethyl-)Piperazin-1-Ethansulfonat **HEPES** H_2O Wasser HRP Horseradish Peroxidase (Merrettich Peroxidase) Ī intra cellular (intrazellulär) ic Immunglobulin der Klasse G IgG J <u>K</u> Κ Kalium kb Kilobasen **KChIP** K⁺-Channel-Interacting Protein (Kaliumkanal-interagierendes Protein) kDA Kilodalton Streptomyces-lividans-K+-Kanal KcsA inward rectifying K⁺ channel (Kalium-Einwärtsgleichrichter-Kanal) Kir KO Knockout L ı Liter

12

Lysogeny Broth

Molarität

LB

<u>M</u>

Μ

Abkürzungsverzeichnis

mA Milliampere (Ampere x 10⁻³)

MEM Minimum Essential Medium

mg Milligramm (Gramm x 10⁻³)

Mg Magnesium
min Minute(n)

ml Milliliter (Liter x 10⁻³)

mM Millimolar (Mol x 10⁻³)

MOPS 3-(N-Morpholino)-Propan Sulfonsäure

mRNA messenger RNA (Boten-RNA)

MthK *Methanobacterium-thermoautotrophicum*-K⁺-Kanal

<u>N</u>

Na Natrium

nA Nanoampere (Ampere x 10⁻⁹)

NCS Neuronal Calciumsensor (Neuronaler Calciumsensor)

ng Nanogramm (Gramm x 10^{-9}) nM Nanomolar (Gramm x 10^{-9})

<u>O</u>

OD₆₀₀ Optische Dichte bei 600 nm

OPA operationsverstärker

OR Oozyten Ringer

ORF Open Reading Frame (offene Leserahmen)

<u>P</u>

PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)

PCR Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kattenreaktion)

PSG Penicilln-Streptomycin-Glutamin

PVDF Polyvinylidendifluorid

Q

<u>R</u>

Rb Rubidium

RNA Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)

RT Raumtemperatur

Abkürzungsverzeichnis

RT-PCR Reverse Transkriptase-PCR

RW revers

<u>S</u>

S Transmembrandomäne

SDS Sodium-dodecyl-sulfat

SEM Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)

SR Sakroplasmatisches Retikulum

<u>T</u>

TAE Tris-Acetat-EDTA

TAK Transverse Aortenkonstriktion

TEMED Tetramethylendiamin

TBS Tris gepufferte Salzlösung

TM Transmembrandomäne

to transient outward (transient auswärts)

Tris Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

T-Tubuli Transversale Tubuli

Tween 20 Polyoxyethylensorbitanmonolaurate

<u>U</u>

 μ A Mikroampere (Ampere x 10^{-6})

μg Mikrogramm (Gramm x 10⁻⁶)

Upm Umdrehung pro Minute

UTR Untranslated Region (untranslatierte Region)

<u>V</u>

<u>W</u>

wt wildtyp

<u>X</u>

<u>Y</u>

<u>Z</u>

11. Tabellen

Ströme in			
Mäusemyozyten			
• •	Vantralla	Dharmakalagia (NSEQOC (Ang II)	
Amplitude I _{peak}	Kontrolle	Pharmakologie (NS5806/Ang II)	
wt KChIP2-KO	11222 ± 571 pA	8266 ± 1059 pA	
	5240 ± 801 pA	4450 ± 699 pA	
Ang II	7606 ± 571 pA	5837, ± 477 pA	
Stromdichte I _{peak}			
wt	_	_	
KChIP2-KO		— 24.2.1.2.4.5.4.5.	
Ang II	53,8 ± 4,4 pA/pF	34,2 ± 3,4 pA/pF	
Amplitude I _{to}	4000 + 570 - 4	4074 : 252 4	
wt	4900 ± 572 pA	4071 ± 352 pA	
KChIP2-KO	507 ± 74,8 pA	738 ± 86,5 pA	
Ang II	3535 ± 371 pA	3231 ± 297 pA	
Stromdichte I _{to}			
wt	_	_	
KChIP2-KO	-	_	
Ang II	25,0 ± 2,2 pA/pF	19,0 ± 2,0 pA/pF	
τ ₁ (Inaktivierung)			
wt	36,3 ± 2,2 ms	34,6 ± 2,7 ms	
KChIP2-KO	66,7 ± 4,4 ms	50,4 ± 10,5 ms	
Ang II	_	_	
τ ₂ (Inaktivierung)			
wt	281 ± 18,8 ms	233 ± 23,4 ms	
KChIP2-KO	429 ± 73,4 ms	354 ± 51,3 ms	
Ang II	_	-	
$ au_3$ (Inaktvierung)			
wt	1640 ± 78,4 ms	2477 ± 357 ms	
KChIP2-KO	1854 ± 308 ms	2051 ± 339 ms	
Ang II	_	_	
τ I _{to} (Inaktivierung)			
wt	36,0 ± 2,0 ms	46,0 ± 3,0 ms	
KChIP2-KO	137 ± 44,4 ms	97,1 ± 18,7 ms	
Ang II	_	_	
τ ₁ (Erholung von Inaktivierung)			
wt	31,1 ± 0,7 ms	79,9 ± 9,0 ms	
KChIP2-KO	670 ± 33,7 ms	794 ± 41,9 ms	
Ang II	_	_	
τ ₂ (Erholung von Inaktivierung)			
wt	546 ± 15,5 ms	899 ± 104 ms	
KChIP2-KO	_	_	
Ang II	_	_	
-			

Ströme in Oozyten							
Amplitude	Kontrolle	Pharmakologie (NS5806)					
Kv4.2	1,9 ± 0.1 μA	0,6 ± 0.1 μA					
Kv4.2 + KChIP2	11,1 ± 1,0 μA	11,7 ± 1,1 μA					
Kv1.4	7,9 ± 0,8 μA	3,4 ± 0,6 μA					
Kv1.5	6,4 ± 1,6 μA	6,5 ± 1,6 μA					
$ au_1$ (Inaktivierung)	τ_1 (Inaktivierung)						
Kv4.2	33,5 ± 3,6 ms	65,2 ± 8,7 ms					
Kv4.2 + KChIP2	67,5 ± 5,6 ms	80,8 ± 5,8 ms					
Kv1.4	24,3 ± 1,7 ms	29,3 ± 1,8 ms					
Kv1.5	615 ± 18,6 ms	779 ± 134 ms					
τ ₂ (Inaktivierung)							
Kv4.2	_	_					
Kv4.2 + KChIP2	_	_					
Kv1.4	_	_					
Kv1.5	4858 ± 351 ms 2560 ± 283 ms						
τ ₁ (Erholung von Inaktivierung)							
Kv4.2	739 ± 25,7 ms	1263 ± 78,2 ms					
Kv4.2 + KChIP2	86,5 ± 3,1 ms	164 ± 7,4 ms					
Kv1.4	7704 ± 175 ms 14782 ± 889 ms						
Kv1.5	98,3 ±9,9 ms —						
τ ₂ (Erholung von Inaktivierung)							
Kv4.2	_	_					
Kv4.2 + KChIP2	_	_					
Kv1.4	_	_					
Kv1.5	2412 ±430 ms	5209 ± 175 ms					

Kv4.2-Mutanten in CHO-Zellen				
Stromdichten	pA/pF			
Kv4.2wt	5,3 ± 1,6			
Kv4.2A235V	18,3 ± 7,4			
Kv4.2I239W	55,4 ± 28,4			
Kv4.2C231I	28,0 ± 9,6			
Kv4.2A249F	13,6 ± 6,6			
Kv4.2Δ587	12,3 ± 2,9			
Kv4.2wt + DPPx	1183 ± 259			
Kv4.2A235V + DPPx	884 ± 170			
Kv4.2I239W + DPPx	775 ± 216			
Kv4.2C231I + DPPx	754 ± 230			
Kv4.2A249F + DPPx	54,5 ± 26,2			
Kv4.2Δ587 + DPPx	401 ± 276			
Kv4.2wt + DPPy	377 ± 130			
Kv4.2A235V + DPPy	93,2 ±75,0			
Kv4.2I239W + DPPy	399 ± 204			
Kv4.2C231I + DPPy	425 ± 168			
Kv4.2A249F + DPPy	74,1 ± 26,8			
Kv4.2Δ587 + DPPy	224 ± 95,3			

12. Gefahrstoffe

Stoffbezeichnung	Symbol	Gefahrenmerkmal (R-Sätze)	Sicherheitsratschläge (S-Sätze)
Ammoniumperoxidisulfat	O, Xn	8-22-36/37/38-42/43	22-24-26-37
Ampicillin Natriumsalz	Xi	42/43	22-36/37-45
Aqua-Phenol;	T, C	23/24/25-48/20/21/22-34-	24/25-26-28-36/37/39-
Aqua-Phenol/C/I		68	45
Calciumchlorid Dihydrat	Xi	36	22-24
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
DMSO	Xi	36/37/38	23/26/36
Dosecylsulfat Natriumsalz	Xn, F	11-20/21/22-36/37/38	26-28a-36
Eisessig	С	10-35	23-26-45
Ethanol	F	11	2-7-16
Ethidiumbromid	T	23-68	36/37-45
Formamid	Т	61	53-45
Formaldehydlösung 36,5%	Т	23/24/25-34-40-43	26-36/37/39-45
Guanidinthiocyanat	Xn	20/21/22-32-52/53	13-61
Mangan(II)chlorid	Xn, N	22-51/53	
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
Natriumhydroxid, 1M	С	35	26-37/39-45
N,N,N-Tetramethylendiamin		11-21/22-23-34	16-26-36/37/39-45
2-Propanol	F, Xi	11-36-67	7-16-24/25-26
Salzsäure, 1M	Xi	36/37/38	26-45
Taurin	Xi	36/37/38	26-36
Triton X-100	Xn, N	22-41-51/53	26-36/39-61
Trizmabase	Xi	36	26
Xylencyanol	Xi	36	26-36

13. Plasmidkarten

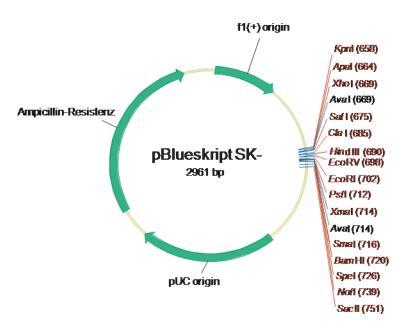


Abbildung 45: Klonierungsvektor pBlueskript SK- (pBSK-).

Plasmidkarte des Klonierungsvektors pBlueskript SK-.

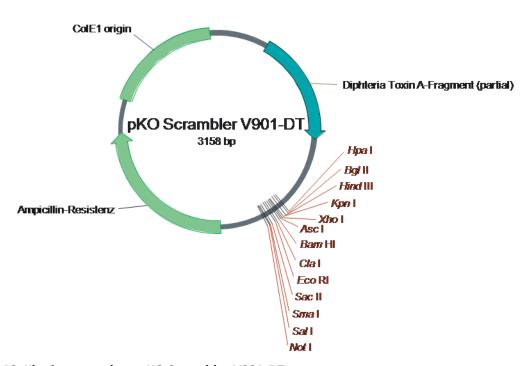


Abbildung 46: Klonierungsvektor pKO Scrambler V901-DT.

Plasmidkarte des Klonierungsvektors pKO Scrambler V901-DT. Der Vektor enthält das Gen für das Diphteria Toxin A-Fragment.

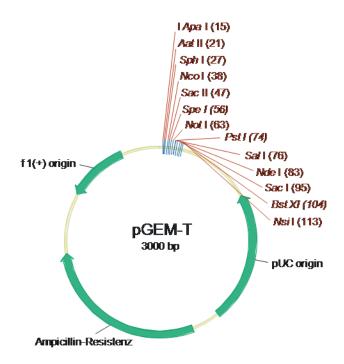


Abbildung 47: Klonierungsvektor pGEM-T.

Plasmidkarte des Klonierungsvektors pGEM-T. Der Vektor verfügt über 3`-Adenosin Überhänge, die eine direkte Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor erlauben.

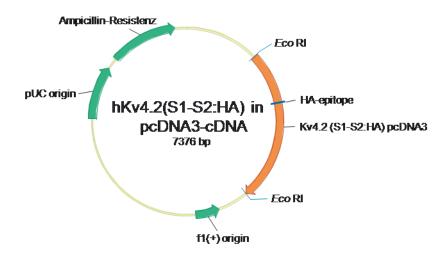


Abbildung 48: hKv4.2 in pcDNA3.

cDNA-Sequenz des humanen Kv4.2-Kanals in dem Vektor pcDNA3. Der Kanal enthält in der ersten extrazellulären Schleife ein HA-Epitop. Der Vektor ermöglicht die Expression des Konstrukts in Säugerzellen.

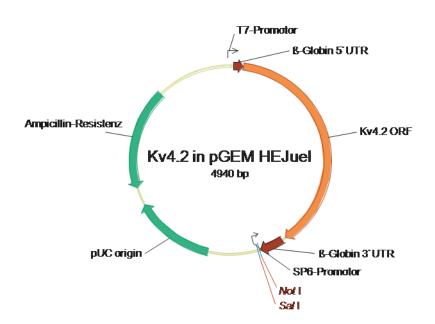


Abbildung 49: hKv4.2 in pGEM HEJuel.

cDNA-Sequenz des humanen Kv4.2-Kanals in dem Vektor pGEM HEJuel. Das Gen wurde zwischen die $\textit{Xenopus laevis}\ \beta$ -Globin UTR Sequenzen in den Vektor einkloniert. Dies ermöglicht die Expression des Konstrukts in Xenopus Oozyten.

14. Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre an Eides statt, dass mir die Promotionsordnung der Chemischen Fakultät der Universität Hamburg bekannt ist und ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

"Molekulare Korrelate repolarisierender K⁺-Ströme in Mäusemyozyten und ihre pathophysiologische Umstrukturierung"

im Zentrum für Experimentelle Medizin am Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf unter Leitung von Herrn PD Robert Bähring und Betreuung von Frau Prof. Dr. Dorothee Dartsch aus dem Department Chemie ohne fremde Hilfe durchgeführt habe. Bei der Abfassung der Dissertation wurden keine anderen als die aufgeführten Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät mit Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt habe.

15. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Heimo Ehmke danke ich für die Bereitstellung des hervorragenden Arbeitsplatzes in dem Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf.

Ich möchte mich ebenfalls sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. Dorothee Dartsch für das große Interesse an meiner Arbeit und die bereitwillige Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Bei Herrn PD Dr. Robert Bähring bedanke ich mich für das interessante Dissertationsthema und die fundierte Einführung in die Elektrophysiologie.

Magdalini Tozakidou danke ich für die gute Kooperation und Ihre andauernde Bereitschaft zur Diskussion.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Kollegen des Institutes. So hatten Prof. Dr. Christiane Bauer, Dr. Günther Glassmeier und Dr. Alexander Schwoerer stets eine gute Kritik parat. Dr. Helga Vitzthum führte mich in die Real-time PCR ein und war immer Bereit mir ihr Wissen hinsichtlich molekularbiologischer Fragestellungen mitzuteilen. Peter Bassalay half mir bei Computerproblemen, an denen ich andernfalls verzweifelt wäre. Telse Kock half mir immer wieder mit Laborutensilien aus. Dr. Anika Seniuk, Jessica Wollberg, Marisa Jellinek, Christiane Martens, Vera Junkereit und Maria Römer sorgten durch ihre unkomplizierte und freundliche Art für ein angenehmes Arbeitsklima.

Meinen Eltern danke ich für ihre langjährige Unterstützung und ihr Vertrauen.

Meinem Partner Dr. Philipp Klug möchte ich für seine Geduld und Aufmunterung danken, die mich bei Rückschlägen nicht verzweifeln liesen.

16. Lebenslauf

Wissenschaftlicher Werdegang

WS 2000 bis SS 2005 Ruhr-Universität Bochum,

Studium der Chemie, Fakultät für Chemie.

Diplomarbeit

"Untersuchungen zum Tan Protein aus *Drosophila melanogaster*", Fakultät für Chemie der Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Biochemie II, AG Molekulare Zellbiochemie, Prof. Dr. Bernhard Hovemann.

2005 Abschluss des Studiums als Diplom-Chemikerin.

07-2006 – 02-2007 GKSS, Forschungszentrum in der Helmholtz- Gemeinschaft,

Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Küstenforschung, Abteilung für Operationelle Systeme, Leiter Prof. Dr. Andreas

Prange.

03-2007 – 06-2010 Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE),

Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysio-

logie, Leiter Prof. Dr. Heimo Ehmke.

Berufliche Weiterbildung

WS 2007 – SS 2009 Universität Hamburg,

Molekularbiologisches Aufbaustudium am Zentrum für

Molekulare Neurobiologie (ZMNH).

17. Publikationen

<u>Publikationen</u>

Wagner S, Heseding C, Szlachta K, True JR, Prinz H, Hovemann BT; *Drosophila* photoreceptors express cysteine peptidase tan. *J Comp Neurol*. 2007 Feb 1; 500 (4):601-11.

Tozakidou M, Goltz D, Hagenström T, Budack MK, Vitzthum H, Szlachta K, Bähring R, Ehmke H; Molecular and functional remodeling of I(to) by Angiotensin II in the mouse left ventricle. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Jan; 48 (1):140-51. Epub 2009 Sep 8.

Mewe M, Mauerhöfer M, Wulfsen I, Szlachta K, Zhou XB, Schwarz JR and Bauer CK, Modulation of cardiac ERG1 K⁺ channels by cGMP signaling. *J Moll Cell Cardiol*. 2010 Feb 24; [Epub ahead of print].

Kongressbeiträge

Szlachta K; Die Rolle von transienten K⁺Leitfähigkeiten in ventrikulären Myozyten. Vortrag auf dem XIII. Treffen der Ostseephysiologen in Rostock (2008).