

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie
Zentrum für Experimentelle Medizin
Martinistraße 52
20246 Hamburg

Direktor:
Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

Funktion von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen in Gegenwart des lysosomalen Proteins CLN3

Dissertation

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

vorgelegt von:

Anja Carolin Seifert
aus Hamburg

Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 06.11.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Robert Bähring

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. Stephan Storch

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Kaliumkanäle	2
2.2	Kv4-Kanäle und ihre akzessorischen Untereinheiten	5
2.3	Lysosomales Protein CLN3	9
3	Material und Methoden	13
3.1	Molekularbiologie	13
3.1.1	Verwendete Klone.....	13
3.1.2	Herstellung von DNA	14
3.2	Zellkultur	15
3.2.1	Verwendete Zelllinien.....	15
3.2.2	Lösungen und Medien.....	16
3.2.3	Zellhaltung	16
3.2.4	Transiente Transfektion	17
3.3	Elektrophysiologie	18
3.3.1	Die Patch-Clamp-Technik.....	18
3.3.2	Ausstattung des Messplatzes.....	20
3.3.2.1	Messstand.....	20
3.3.2.2	Patchpipetten und Elektroden	21
3.3.2.3	Verstärker und Datenerfassung.....	22
3.3.3	Elektrolytlösungen	22
3.3.4	Durchführung der Patch-Clamp-Messungen	24
3.3.5	Kompensation von Kapazitäten und Serienwiderstand.....	25
3.3.6	Leckstrom und endogene Ströme.....	26
3.3.7	Protokolle	27
3.3.7.1	Rechteckpuls-Protokoll.....	27
3.3.7.2	Recovery-Protokoll	28
3.3.7.3	Steady-State-Inaktivierungs-Protokoll	29
3.3.7.4	IV-Aktivierungs-Protokoll	29
3.3.8	Datenauswertung.....	30
3.3.8.1	Stromdichte	30
3.3.8.2	Makroskopische Inaktivierung.....	31
3.3.8.3	Erholung von der Inaktivierung (Recovery)	31
3.3.8.4	Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung (Steady-State-Inaktivierung).....	32
3.3.8.5	Spannungsabhängigkeit der Aktivierung	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Modulation von Kv4.2-Kanälen durch KChIP3 (Kontrolle)	34
4.1.1	Stromdichte	34
4.1.2	Makroskopische Inaktivierung.....	35
4.1.3	Erholung von der Inaktivierung	36
4.1.4	Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung	38
4.1.5	Spannungsabhängigkeit der Aktivierung	39

4.2	Direkte Effekte einer CLN3wt-Coexpression auf das Schaltverhalten von Kv4.2-Kanälen	40
4.2.1	Stromdichte	40
4.2.2	Makroskopische Inaktivierung.....	41
4.2.3	Erholung von der Inaktivierung	42
4.2.4	Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung.....	43
4.2.5	Spannungsabhängigkeit der Aktivierung	43
4.3	Effekte von CLN3 auf die KChIP3-vermittelte Kv4.2-Kanalmodulation ..	44
4.3.1	Transiente Coexpression von Kv4.2, KChIP3 und CLN3wt in HEK293-Zellen	44
4.3.1.1	Abhängigkeit des CLN3wt-Effekts vom Messzeitpunkt	44
4.3.1.1.1	Stromdichte	45
4.3.1.1.2	Makroskopische Inaktivierung.....	46
4.3.1.1.3	Erholung von der Inaktivierung	48
4.3.1.1.4	Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung.....	51
4.3.1.1.5	Spannungsabhängigkeit der Aktivierung	52
4.3.1.2	Abhängigkeit der CLN3wt-Effekte von der zytoplasmatischen Calciumkonzentration	54
4.3.1.2.1	Stromdichte	55
4.3.1.2.2	Makroskopische Inaktivierung.....	56
4.3.1.2.3	Erholung von der Inaktivierung	59
4.3.1.2.4	Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung.....	61
4.3.1.2.5	Spannungsabhängigkeit der Aktivierung	62
4.3.2	Transiente Coexpression von KChIP3 und CLN3wt in einer stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie	64
4.3.2.1	Stromdichte	65
4.3.2.2	Makroskopische Inaktivierung.....	66
4.3.2.3	Erholung von der Inaktivierung	69
4.3.2.4	Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung.....	70
4.3.2.5	Spannungsabhängigkeit der Aktivierung	72
4.3.3	Effekte von CLN3-Mutanten bei transakter Coexpression von Kv4.2 und KChIP3 in HEK293-Zellen.....	74
4.3.3.1	Stromdichte	74
4.3.3.2	Makroskopische Inaktivierung.....	75
4.3.3.3	Erholung von der Inaktivierung	76
4.3.3.4	Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung.....	78
4.3.3.5	Spannungsabhängigkeit der Aktivierung	79
5	Diskussion	82
5.1	KChIP3/Calsenilin/DREAM als neuronaler Calciumsensor.....	82
5.2	CLN3-Effekt auf die Stromeigenschaften von Kv4.2-Kanälen	88
5.3	Schlussfolgerungen für einen möglichen Zusammenhang mit JNCL.....	93
5.3.1	Pathologische Veränderungen in Assoziation mit Kv4.2-Kanälen.....	94
5.3.2	Pathologien in Verbindung mit KChIP3	95
5.3.3	Besondere Rolle der Neuronen in JNCL.....	97
6	Zusammenfassung.....	101
7	Summary	102

8	Abkürzungsverzeichnis.....	103
9	Literaturverzeichnis.....	106
10	Abbildungsverzeichnis	117
11	Tabellenverzeichnis	120
12	Danksagung	121
13	Lebenslauf.....	122
14	Eidesstattliche Versicherung.....	123

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

In Neuronen des Zentralen Nervensystems (ZNS) vermitteln die spannungsgesteuerten Kv4.2-Kanäle einen somatodendritischen A-Typ-Strom (I_{SA}), der bei der Kontrolle der dendritischen Erregung eine zentrale Rolle spielt. Verschiedene Kv-Kanal-Interagierende Proteine (KChIPs) können sich als akzessorische β -Untereinheiten an Kv4.2-Kanäle anlagern und deren Membranexpression und Stromeigenschaften beeinflussen. Dabei stellt KChIP3 eine Besonderheit dar: Es kann nicht nur mit Kv4.2-Kanälen Komplexe bilden, sondern interagiert auch mit dem Ca^{2+} -Signaling-Protein Presenilin und fungiert im Zellkern als DNA-Transkriptionsrepressor. Darüber hinaus wurden kürzlich Interaktionen von KChIP3 mit dem lysosomalen Protein Ceroid Lipofuscinosi, Neuronal, 3 (CLN3) entdeckt (Chang et al. 2007). CLN3 findet sich als Transmembranprotein in Lysosomen. Seine Funktion ist noch weitestgehend unbekannt, jedoch werden bestimmte Mutationen im CLN3-Gen für das Auftreten der Juvenilen Neuronalen Ceroidlipofuszinose (JNCL) verantwortlich gemacht; JNCL ist eine neuropädiatrische Erkrankung, bei der es zum Absterben von Neuronen des ZNS kommt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob die Interaktion von CLN3 mit der akzessorischen β -Untereinheit KChIP3 die Funktion von Kv4.2-Kanälen indirekt beeinflussen kann und ob gegebenenfalls Mutationen im CLN3-Protein oder die intrazelluläre Calciumkonzentration Auswirkungen auf die CLN3-Effekte haben. Hierzu wurden nach heterologer Coexpression der entsprechenden Proteine in HEK293-Zellen Experimente mit der Patch-Clamp-Technik durchgeführt.

2 Einleitung

2.1 Kaliumkanäle

Unter den Ionenkanälen stellen die kaliumselektiven Kanäle mit einer Reihe unterschiedlicher Eigenschaften und Funktionen die vermutlich größte Gruppe dar, wie Nukleotidsequenzanalysen zeigen (Coetzee et al. 1999; Birnbaum et al. 2004). Kaliumkanäle spielen in vielen physiologischen Prozessen eine Rolle, wie bei der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials, der Signaltransduktion, Zellproliferation und der Kaliumhomöostase. Man findet sie in den Geweben sämtlicher Organismen, z. B. in Pflanzen, Bakterien und Tieren. Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle werden Kv-Kanäle (*voltage dependent*) genannt. Als erster Kv-Kanal wurde der *Shaker*-Kanal in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Drei weitere Gene, die in ihrer Sequenz dem *Shaker*-Kanal sehr ähnlich sind, wurden ebenfalls in der Fruchtfliege gefunden: *Shab*, *Shaw* und *Shal*. Inzwischen unterscheidet man anhand der Aminosäuresequenzen zwölf Untergruppen (Abbildung 2.1) (Gutman et al. 2005).

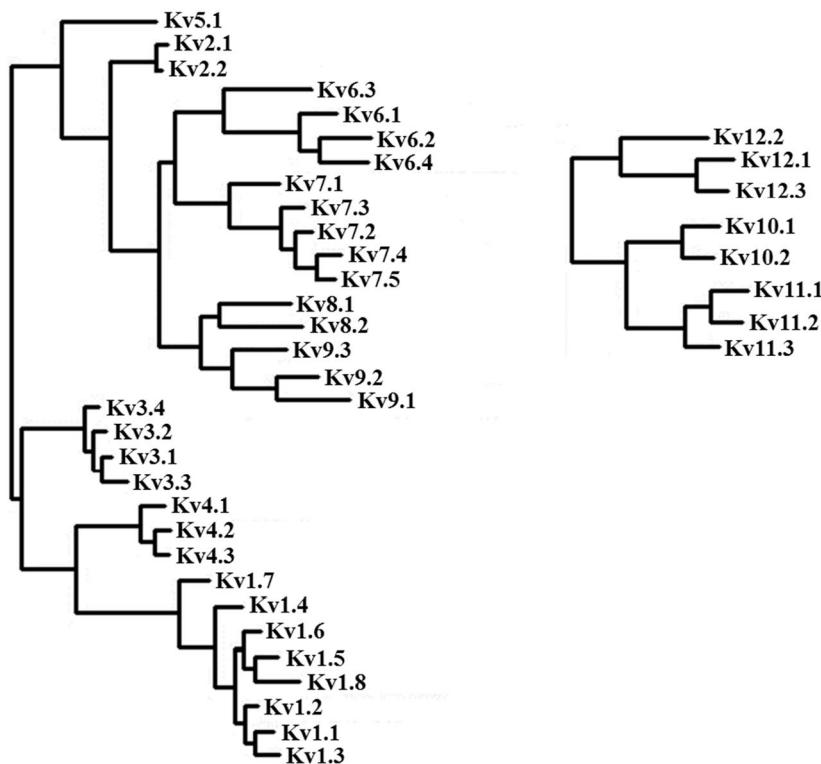


Abbildung 2.1: Phylogenetischer Baum für Kv-Kanäle (modifiziert nach Gutman et al. 2005)

Aufgebaut sind die Kv-Kanäle aus vier α -Untereinheiten (Abbildung 2.2 A). Eine α -Untereinheit besteht aus sechs Membran-durchspannenden α -helikalen Segmenten (S1 bis S6) und den im Zytosol liegenden Domänen der Amino(N)- und Carboxy(C)-Termini (Abbildung 2.2 B) (Tempel et al. 1987). Während die Transmembranregionen stark konserviert sind, unterscheiden sich die Kv-Untergruppen im Wesentlichen durch ihre Proteintermini (Birnbaum et al. 2004). Es ist möglich, dass sich verschiedene α -Untereinheiten derselben Kv-Familie zusammenlagern (Isacoff et al. 1990; Covarrubias et al. 1991).

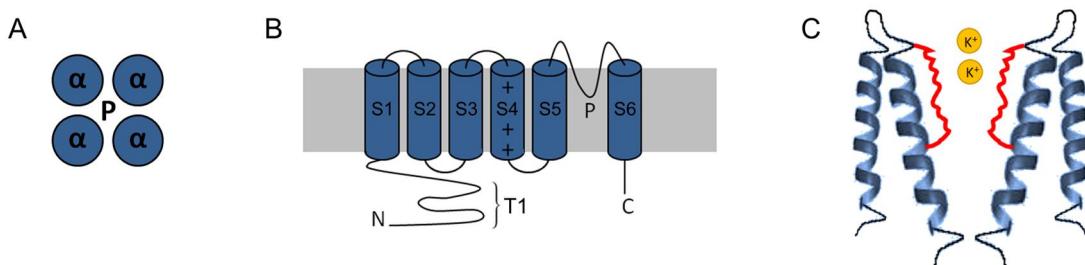


Abbildung 2.2: Aufbau von Kaliumkanälen

A: Kv-Kanäle setzen sich aus vier α -Untereinheiten zusammen und bilden eine zentrale Pore (P). **B:** Die α -Untereinheit eines Kv-Kanals besitzt sechs Transmembrandomänen (S1 bis S6). Sowohl N- als auch C-Terminus liegen intrazellulär. Am N-Terminus befindet sich die Tetramerisierungsdomäne (T1). **C:** Kristallstruktur von zwei α -Untereinheiten eines Kaliumkanals am Beispiel des Streptomyces-lividans-Kaliumkanals (modifiziert nach Doyle et al. 1998). Die Poren-formende Domäne besteht aus der inneren und äußeren Helix (blau) sowie dem Selektivitätsfilter (rot).

Für die Zusammenlagerung der α -Untereinheiten Kv1 bis 4 ist die Tetramerisierungsdomäne (T1) verantwortlich (Abbildung 2.2 B). Sie liegt intrazellulär am N-Terminus unmittelbar vor der ersten Transmembrandomäne S1 (Birnbaum et al. 2004). Die vier T1-Domänen eines Kanals ergeben zusammen eine Struktur, die einer hängenden Gondel (*hanging gondola*) gleicht (Kobertz et al. 2000). Diese Domäne ist auch für die Bindung von zytosplasmatischen β -Untereinheiten von Bedeutung. Die α -Untereinheiten ordnen sich symmetrisch an und bilden in ihrem Zentrum eine Pore (Abbildung 2.2 C). Die vier zusammengelagerten Poreschleifen, die sich zwischen den Segmenten S5 und S6 befinden, bezeichnet man als P-Domäne. Sie enthalten die Aminosäuresequenz TXGYGD, die als Selektivitätsfilter dient (Li et al. 1992; Doyle et al. 1998; Birnbaum et al. 2004). Als Spannungssensor fungiert vermutlich das S4-Segment. Es enthält an etwa jeder dritten Position die positiv geladenen Aminosäuren Arginin oder Lysin (Birnbaum et al. 2004). Aufgrund von Röntgenstrukturanalysen

wird angenommen, dass bei einer Änderung des Membranpotentials die stark positive Transmembrandomäne um ihre Längsachse kippt. Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung der α -Untereinheiten. Erst durch Aktivierung aller vier Spannungssensoren wird eine kooperative Bewegung der S6-Segmente hervorgerufen, die als Tor (*gate*) fungieren, sodass sich der Kanal öffnet (Ledwell und Aldrich 1999). Man kann Kanalzustände grob in drei Konformationen einteilen: offen, geschlossen, inaktiviert (Abbildung 2.3) (Ashcroft 1999). Im geschlossenen Zustand transportieren die Kanäle keine Ionen, können aber durch einen aktivierenden Reiz geöffnet werden. Im offenen Zustand sind die Kanäle durchlässig für Ionen. In der inaktivierten Konformation ist der Kanal nicht ionengängig und lässt sich auch nicht durch einen Stimulus öffnen (Refraktärheit). In diesen Zustand gehen Kanäle häufig nach einer Aktivierung über, was als Offen-Inaktivierung bezeichnet wird. Nach Ablauf der Refraktärzeit wechselt der Kanal zurück in den geschlossenen (aktivierbaren) Zustand. Der Übergang in die verschiedenen Zustände wird *Gating* genannt und kann abhängig vom Ionenkanaltyp charakteristische Kinetiken aufweisen.

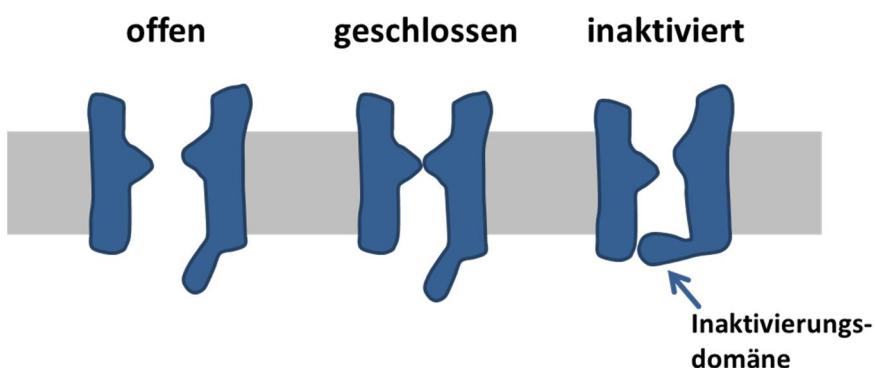


Abbildung 2.3: Kanalkonformationen (modifiziert nach Ashcroft 1999)

Beim *Shaker*-Kanal unterscheidet man zwei Mechanismen. Die schnelle N-Typ-Inaktivierung lässt sich gut durch einen Ball an einer Kette veranschaulichen (*ball and chain inactivation*) (Birnbaum et al. 2004). Als Kette fungiert der bewegliche Teil des N-Terminus. An ihm sitzt eine Inaktivierungsdomäne, deren Aminosäuresequenz mit dem Poreninneren interagiert und wie ein Ball den Kanal verschließt (Zhou et al. 2001). Daneben gibt es noch eine langsame Inaktivierungsform, die C-Typ-Inaktivierung, die im Wesentlichen auf einer Konformationsänderung im extrazellulären Bereich der Pore beruht (Hoshi et al. 1990; Hoshi et al. 1991). Treten die

Kanäle bei anhaltender Depolarisierung zunehmend in einen inaktivierten Zustand über, sodass ihre Offenwahrscheinlichkeit stark abnimmt, beobachtet man einen Abfall des kanalvermittelten Stroms, den man als makroskopische Inaktivierung bezeichnet.

2.2 Kv4-Kanäle und ihre akzessorischen Untereinheiten

Zur Kv4-Familie gehören Kv4.1, Kv4.2 und zwei Spleißvarianten des Kv4.3 (Isbrandt et al. 2000). Bei allen Varianten handelt es sich um schnell aktivierende und schnell inaktivierende Kaliumkanäle. Außerdem zeichnen sich die Kanäle durch eine sehr rasche Erholung von der Inaktivierung aus, die im Millisekundenbereich liegt (Birnbaum et al. 2004). Gesteuert durch Membrandepolarisation vermitteln sie einen transienten Auswärtsstrom, der als A-Typ-Strom bezeichnet wird. Für den A-Typ-Strom vieler Neurone des Zentralen Nervensystems (ZNS) ist die Subgruppe der Kv4.2-Kanäle zuständig. Diese Kanäle kontrollieren die neuronale Erregbarkeit durch einen unterschwellig aktivierten A-Typ-Strom I_{SA} (*subthreshold activated*) und sind für die Repolarisation nach einer Zellerregung zuständig (Coetzee et al. 1999). Durch ihre Aktivierung unterhalb der Schwelle für Aktionspotentiale wirken sie einer Depolarisation frühzeitig entgegen und können so die Generierung eines Aktionspotentials hemmen (Serôdio et al. 1994). Die Kv4.2-Kanäle finden sich hauptsächlich postsynaptisch in den somatodendritischen Regionen der Nervenzellen, wobei ihre Dichte mit der Entfernung vom Soma und in den distalen Bereichen der Dendriten zunimmt. Diese besondere Verteilung unterstützt ihre Aufgabe, durch repolarisierende Kaliumströme die retrograde Ausbreitung der Erregung in die Dendriten (*backpropagating Action Potentials = bAPs*) zu verhindern bzw. abzuschwächen (Abbildung 2.4 A) (Hoffman et al. 1997; Cai et al. 2004). Außerdem verringern die Kanäle die Amplitude von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP) (Abbildung 2.4 B). Wenn allerdings mehrere EPSPs innerhalb von 15 bis 20 ms aufeinanderfolgen, sodass sich die Kanäle von der initialen Inaktivierung nicht erholen können, führt dies zu einer Verstärkung des Potentials (Koinzidenzdetektion) (Abbildung 2.4 C). Dieser Prozess ist für die Langzeitpotenzierung von Bedeutung (Hoffman et al. 1997; Kim et al. 2005). Die Inaktivierung der Kv4-Kanäle ähnelt zwar

der N- und C-Typ-Inaktivierung des *Shaker*-Kanals, lässt sich allerdings nicht allein dadurch erklären. Die makroskopische Inaktivierung des Kv4-Kanals weist eine multiphasische Kinetik auf, sodass eine Beteiligung mehrerer Inaktivierungsmechanismen vermutet wird. Am besten lässt sich der Verlauf mit der Summe aus drei Exponentialfunktionen beschreiben.

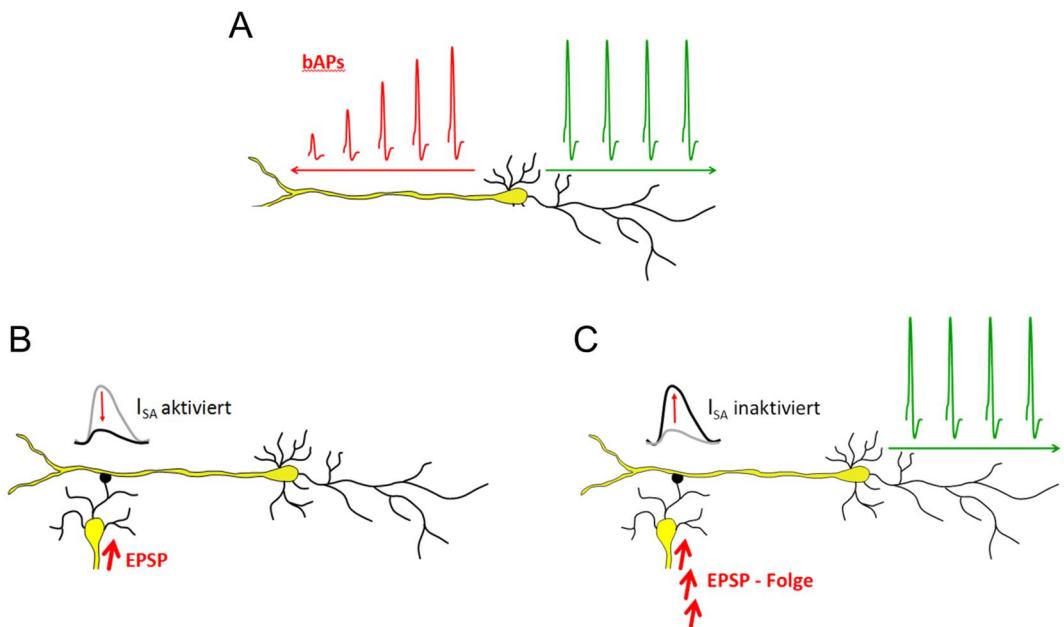


Abbildung 2.4: Physiologische Rolle des neuronalen I_{SA}

- A: Aufgrund der besonderen somatodendritischen Verteilung der Kv4.2-Kanäle wird die retrograde Ausbreitung der Erregung (bAPs) abgeschwächt (Hoffman et al. 1997; Cai et al. 2004).
- B: Der I_{SA} verringert die Amplitude von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP).
- C: Koinzidenzdetection: Bei einer Folge mehrerer EPSPs innerhalb von 15 bis 20 ms können sich die Kanäle von der initialen Inaktivierung nicht erholen, was zu einer Verstärkung des Potentials führt (Hoffman et al. 1997).

Das Besondere an Kv4-Kanälen ist ihre Fähigkeit, schon bei Potentialen unterhalb der Aktivierungsschwelle zu inaktivieren. Demnach kann der Kanal auch ohne vorheriges Öffnen eine Geschlossen-Kanalaktivierung durchlaufen. Es wird vermutet, dass die Kanäle auch nach dem Öffnen in einem geschlossen-inaktiven Zustand akkumulieren. Demnach müssen sie schon während der Depolarisation schließen und in den geschlossen-inaktiven Zustand übergehen. Dadurch ließen sich auch die drei Phasen der makroskopischen Inaktivierung erklären. Bei negativen Membranpotentialen erholt sich der Kanal von der Inaktivierung und kehrt monophasisch in den geschlossen-aktivierbaren Zustand zurück (Bähring et al. 2001a). Wenn man den nativen I_{SA} -Strom in Neuronen betrachtet, entdeckt man Unterschiede zu den Strömen

von heterolog exprimierten Kv4-Kanälen. Dies lässt sich durch Anwesenheit von Kanal-modulierenden β -Untereinheiten in Neuronen erklären, wie z. B. die Kv-Kanal-Interagierenden Proteine (*Kv Channel-Interacting Proteins* = KChIPs). KChIPs sind kleine zytoplasmatische Proteine, die zur Familie der Neuronalen Calciumsensoren (NCS) gehören (An et al. 2000; Burgoyne und Weiss 2001). Bisher sind vier Subgruppen (KChIP 1 bis 4) bekannt, die wiederum in verschiedene Spleißvarianten unterteilt werden können (Jerng et al. 2004a).

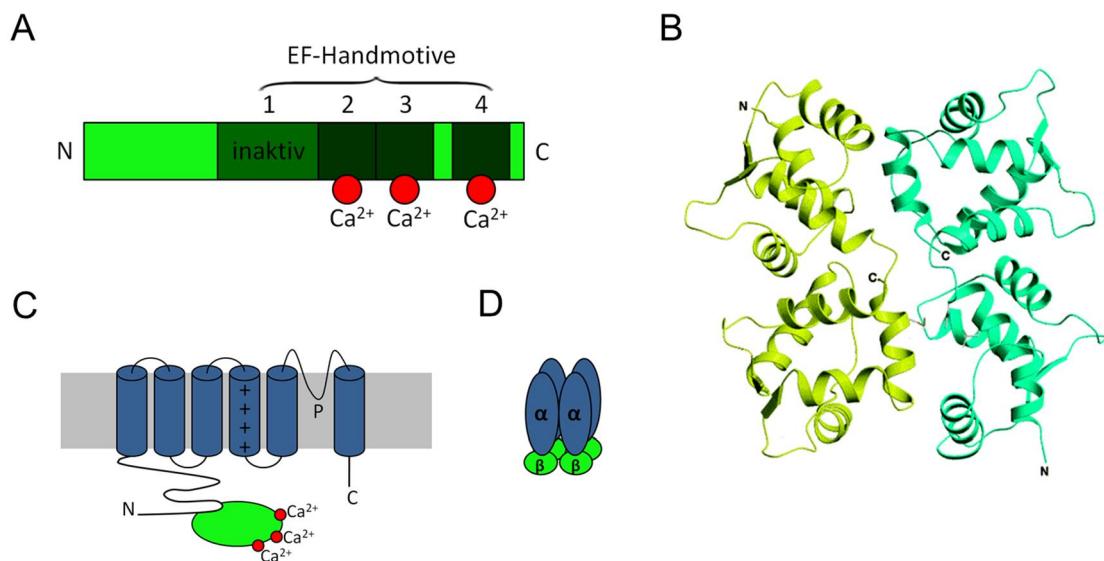


Abbildung 2.5: Aufbau von KChIPs und Kv/KChIP-Kanalkomplexen

A: Schematischer Aufbau einer KChIP-Untereinheit mit vier EF-Handmotiven (1 bis 4), wovon eine inaktiv ist und kein Calcium binden kann (Burgoyne und Weiss 2001). **B:** Atomare Struktur des KChIP3, welches in Calcium-gebundenem Zustand vermutlich als Dimer vorliegt (modifiziert nach Lusin et al. 2008). **C:** Bindung der KChIPs als β -Untereinheiten an den N-Terminus des Kv4-Kanals auf der zytoplasmatischen Seite. **D:** Oktamerbildung mit je vier α - und β -Untereinheiten.

Die C-terminale Kernregion ist zu ca. 70% konserviert und enthält vier EF-Handmotive, von denen jedoch nur drei funktionell Calcium binden können (Abbildung 2.5 A) (Burgoyne und Weiss 2001). Die variablen N-Termini dagegen machen die wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen KChIP-Untergruppen aus. KChIPs besitzen eine hydrophobe Tasche, mit der sie am zytoplasmatischen N-Terminus einer Kv4-Untereinheit binden können (Abbildung 2.5 C). Außerdem kann sich eine Verbindung zwischen KChIP und der T1-Domäne einer benachbarten α -Untereinheit des Kanals ausbilden, um den Komplex zu stabilisieren. Insgesamt lagern sich so vier β -Untereinheiten mit den Kanaluntereinheiten zu einem

Oktamer zusammen (Abbildung 2.5 D). In Untersuchungen mittels Kernspinresonanzspektroskopie zeigten Lusin et al., dass KChIP3 in Calcium-gebundener Form als stabiles Dimer vorlag (Abbildung 2.5 B) (Lusin et al. 2008). Alle vier Mitglieder der KChIP-Familie können mit Kv4-Kanälen interagieren, wobei KChIP 1 bis 3 sehr ähnliche Effekte auf deren Stromeigenschaften ausüben. Es konnte gezeigt werden, dass Kv4-Untereinheiten im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten werden. Coexpression von KChIP steigert den Transport zur Plasmamembran, vermutlich aufgrund der Maskierung eines N-terminalen ER-Retentionssignals durch die KChIP-Bindung. Zusätzlich zur Erhöhung der Membranexpression bewirken KChIP 1 bis 3 typische Veränderungen im Schaltverhalten, wie eine Verlangsamung der initialen Komponente der Kanalinaktivierung, eine Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung, eine Rechtsverschiebung der spannungsabhängigen Steady-State-Inaktivierungskurve zu weniger negativen Potentialen und eine Linkverschiebung der Aktivierungskurve zu niedrigeren Potentialwerten (An et al. 2000; Bähring et al. 2001b). Neben den KChIPs modulieren auch die Dipeptylaminopeptidase-ähnlichen Proteine (DPPs) die Kv4-Stromeigenschaften. Bekannt sind bislang zwei Subgruppen: DPPx (DPP6) und DPPy (DPP10). Bei beiden handelt es sich um Membranproteine, die aus einem kurzen intrazellulären N-Terminus, einer Transmembrandomäne und einem langen extrazellulären C-Terminus bestehen. Die C-terminale Region sowie die Transmembrandomäne sind zu ca. 50% konserviert, während der N-Terminus sehr variabel ist (Nadal et al. 2003; Jerng et al. 2004b; Radicke et al. 2005; Zagha et al. 2005). Coexpression von DPPx oder DPPy steigert die Membranexpression der Kv4-Kanäle, beschleunigt die Kanalaktivierung und -inaktivierung sowie die Erholung von der Inaktivierung. Außerdem bewirken sie eine Linkverschiebung der Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierungskurve sowie der Aktivierungskurve (Nadal et al. 2003; Radicke et al. 2005; Zagha et al. 2005; Amarillo et al. 2008). Beide DPP-Gruppen konnten in Neuronen des ZNS nachgewiesen werden (Nadal et al. 2003; Jerng et al. 2004b).

2.3 Lysosomales Protein CLN3

Beim Ceroid Lipofuscinosis, Neuronal, 3 (kurz CLN3-Protein oder Battenin genannt) handelt es sich um ein Membranprotein, das überwiegend in Lysosomen bzw. Endosomen sitzt. Das *Cln3*-Gen ist im Chromosom 16p11.2 – 12.1 lokalisiert (Järvelä et al. 1998). Es ist stark konserviert nicht nur im Menschen zu finden, sondern z. B. auch in Hunden, Mäusen und Hefen. Zudem kommt es in nahezu allen Geweben des menschlichen Körpers vor (Phillips et al. 2005). Als vesikuläres Membranprotein wird es physiologisch in sehr geringen Mengen exprimiert und ist daher schwierig zu untersuchen (Getty und Pearce 2011). Das CLN3-Protein besteht aus 438 Aminosäuren. Es besitzt sechs Transmembrandomänen, wobei sowohl der C- als auch der N-Terminus im Zytosol liegen (Abbildung 2.6). Das Protein enthält vermutlich drei lysosomale Sorting-Sequenzen (Phillips et al. 2005; Getty und Pearce 2011).

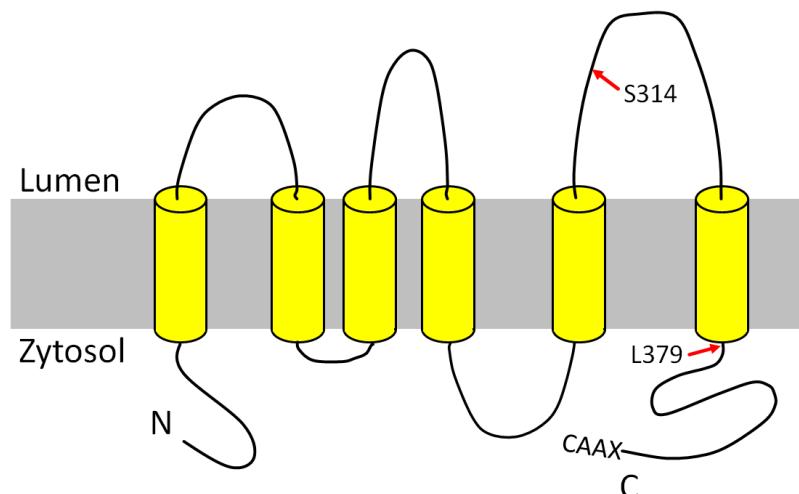


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des CLN3-Wildtyp-Proteins

Aufbau des CLN3-Wildtyp-Proteins mit sechs Transmembrandomänen und C-terminaler CAAX-Box (bestehend aus Cystein, zwei aliphatischen Aminosäuren und einer beliebigen Aminosäure). N- und C-Terminus (letzterer ab Aminosäure L379) liegen im Zytosol. Die Bindungsstelle für KChIP3 befindet sich C-terminal ab Aminosäure S314 (Chang et al. 2007).

Es wird angenommen, dass das CLN3-Protein posttranslational durch Glykosylierung, Lipidmodifikation und Phosphorylierung modifiziert wird, was für eine korrekte Lokalisation und die Funktionsfähigkeit des Proteins notwendig sein könnte (Phillips et al. 2005). Einige Untersuchungen lassen vermuten, dass CLN3 über das ER und den Golgi-Apparat zunächst zur Plasmamembran der Zelle und erst anschließend ins Lysosom transportiert wird (Järvelä et al. 1998; Järvelä et al. 1999; Mao et al. 2003;

Phillips et al. 2005). Über die Funktion ist bisher nur wenig bekannt. Es wird angenommen, dass CLN3 den pH-Wert der Lysosomen beeinflusst und eine Rolle bei der Sezernierung lysosomaler Enzyme, dem Abbau von Proteinen, Organellfusionen und der Apoptose spielt (Phillips et al. 2005). In den letzten Jahren wurden einige Interaktionen von CLN3 mit verschiedenen Proteinen entdeckt, was eine multifunktionelle Rolle vermuten lässt. Beispielsweise wurde herausgefunden, dass CLN3 mit der Na^+/K^+ -ATPase, mit dem SBDS(Shwachman-Bodian-Diamond-Syndrom)-Protein, das u. a. an RNA-Untereinheiten bindet und eine Rolle im DNA-Metabolismus spielt, sowie mit Myosin-IIb interagiert (Myosin-IIb wird v. a. im Gehirn exprimiert und ist von Bedeutung bei der Teilung, Motilität und Polarität der Zelle) (Getty und Pearce 2011). Chang et al. entdeckten, dass CLN3 mit seinem C-Terminus an der akzessorischen β -Untereinheit KChIP3 bindet (Chang et al. 2007). Durch Mutationen im Cln3-Gen wird eine Juvenile Neuronale Ceroidlipofuszinose (JNCL), auch Batten-Disease oder Spielmeyer-Vogt-Krankheit genannt, hervorgerufen. Dabei handelt es sich um die häufigste neurodegenerative Erkrankung bei Kindern mit einer weltweiten Inzidenz von 0,2 bis 7,0 auf 100.000 Geburten (Adams und Mink 2013). Sie wird autosomal rezessiv vererbt und zählt zur Gruppe der Neuronalen Ceroidlipofuszinosen (NCL), die in acht Formen klassifiziert wird. Obwohl bei jeder dieser Formen sowohl strukturell als auch in ihrer Lokalisation völlig unterschiedliche Proteine mutiert sind, ist der Krankheitsverlauf bei allen NCL-Erkrankungen sehr ähnlich. Der Hauptunterschied der Krankheitsverläufe liegt im Manifestationsalter (Mink et al. 2013). Bei der juvenilen Form treten die ersten Symptome im Grundschulalter (um das 8. Lebensjahr) auf. Die Erkrankung beginnt meist mit einer Sehschwäche, die sich auf einer Retinopathie begründet und sich daher nicht mit einer Sehhilfe korrigieren lässt. Dann kommen weitere typische ZNS-Symptome wie Lähmungen, Epilepsie, Depression, Konzentrationsstörungen, Demenz und psychotische Symptome hinzu. Die Krankheit verläuft schnell progredient, sodass die Betroffenen meist vor dem 30. Lebensjahr versterben (Adams und Mink 2013). NCL verursacht eine Störung im Zellstoffwechsel, bei der sich in den Lysosomen autofluoreszierende Lipoproteine (sogenannte Ceroide) und bei der juvenilen Form auch die Untereinheit C der mitochondrialen ATP-Synthetase ablagern (Getty und Pearce 2011). Obwohl es in fast allen Geweben des Körpers zu Ceroidablagerungen

kommt, gehen bei NCL nur Neuronen des ZNS zugrunde. Bislang gibt es keine Heilungsmöglichkeiten und die Therapie ist auf eine palliative Symptombehandlung beschränkt.

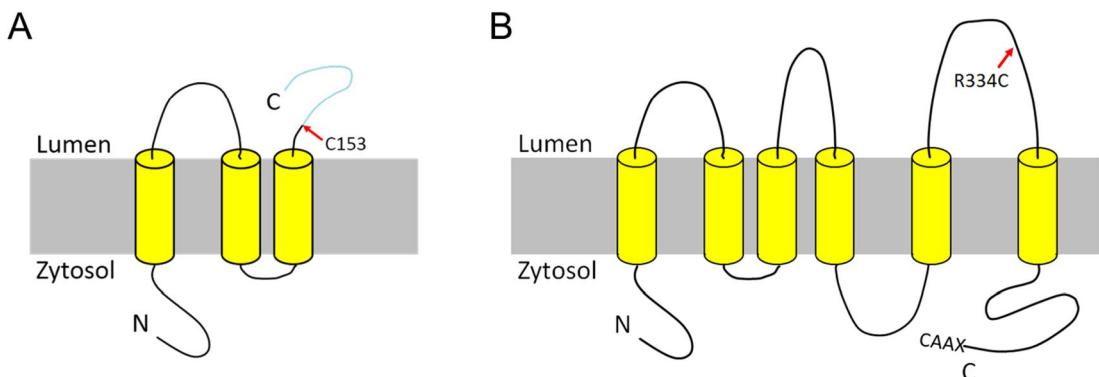


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Mutanten CLN3_{ΔC} und CLN3_{R334C}

A: Deletionsmutante CLN3_{ΔC}: Verkürztes CLN3-Protein mit 181 Aminosäuren und einer Frameshift-Mutation der letzten 28 Aminosäuren nach C153 (Getty und Pearce 2011). Es fehlen drei Transmembrandomänen, sodass der C-Terminus luminal liegt. **B:** Punktmutante CLN3_{R334C}: Eine Missense-Mutation an der intralysosomalen Aminosäure 334 führt zum Einbau eines Cysteins statt Arginin.

Inzwischen sind 57 Mutationen im Cln3-Gen bekannt, die mit der juvenilen Form der NCL assoziiert sind (NCL mutation database; MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London). Die häufigste unter ihnen ist eine 1,02-kb-Deletion. Etwa 85% aller JNCL-Erkrankten tragen diese Mutation (Phillips et al. 2005). Diese Genmutation führt durch einen vorzeitigen Stopps zu einem verkürzten Protein mit 181 Aminosäuren, von denen die letzten 28 Aminosäuren am C-Terminus aufgrund einer Verschiebung des Leserasters (Frameshift-Mutation) verändert sind (Abbildung 2.7 A) (Getty und Pearce 2011). Es gibt bisher keine Hinweise dafür, dass dieses neue Proteinende eine Funktion haben könnte (Phillips et al. 2005). Dem mutierten Protein fehlen drei Transmembrandomänen und zwei Schleifen. Dies führt zum einen dazu, dass der C-Terminus im Lumen lokalisiert ist, zum anderen gehen die lysosomale Sorting-Sequenzen verloren (Ezaki et al. 2003; Phillips et al. 2005). Neben der verkürzten Deletionsmutante gibt es auch zahlreiche Punktmutationen im Cln3-Gen, die zum Austausch einer einzelnen Aminosäure führen (Abbildung 2.7 B). Auch diese können JNCL hervorrufen, verursachen jedoch häufig einen atypischen milderden Verlauf der Erkrankung (Phillips et al. 2005).

Basierend auf dem Befund, dass CLN3 mit KChIP3 interagiert, ist es denkbar, dass CLN3 neuronale Kv4.2-Kanäle über deren akzessorische β -Untereinheit indirekt beeinflusst. Ob dies der Fall ist und ob die CLN3-Effekte gegebenenfalls durch JNCL-assoziierte Mutationen oder durch pathophysiologisch hohe Calciumkonzentrationen abgewandelt werden, sollte in der vorliegenden Arbeit herausgefunden werden. Dazu wurden die entsprechenden Proteine in HEK293-Zellen heterolog exprimiert und die Kanäle mit der Patch-Clamp-Technik funktionell charakterisiert.

3 Material und Methoden

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Verwendete Klone

Für die heterologe Proteinexpression wurde Plasmid-DNA in Zellen eingebracht (transiente Transfektion, Kapitel 3.2.4). Folgende DNA-Klone wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

pcDNA3 ⁰	(Invitrogen, Carlsbad, USA) Expressionsvektor, der zum Einschleusen von fremdem Genmaterial in Wirtszellen diente. Alle folgenden Klone lagen in diesem Vektor vor. Zusätzlich wurde pcDNA3 ⁰ als „leerer“ Vektor transfiziert, um die DNA auf eine konstante Menge zu ergänzen.
Kv4.2-HA	humaner Klon der α -Untereinheit des Kv4.2-Kanals, in die ein Hämagglutinin(HA)-Epitop in die erste extrazelluläre Schleife kloniert war. Dieses Epitop diente zum immunzytochemischen Nachweis des Kanals und hatte dabei keinen Einfluss auf seine Funktionalität. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Kanal für die transiente Transfektion der Zellen verwendet.
Kv4.2-HA-EGFP	humaner Klon der α -Untereinheit des Kv4.2-Kanals, in die sowohl ein HA- als auch ein EGFP-Epitop (siehe unten) kloniert war. Beide Epitope dienen zum Nachweis des Kanals. Dieser Kanal lag in einer stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie vor (Kapitel 3.2.1).
KChIP3	humaner Klon des Kv-Kanal-Interagierenden Proteins 3, einer zytoplasmatischen akzessorischen β -Untereinheit der Kv4-Kanäle.
CLN3wt	Wildtyp des lysosomalen Proteins CLN3 (Battenin).
CLN3 _{ΔC}	Deletionsmutante des CLN3-Proteins, bei der nach den ersten 153 Aminosäuren der C-Terminus deletiert ist und die aufgrund eines Frameshifts 28 neue Aminosäuren enthält. Bei dem Konstrukt fehlt die putative KChIP3-Bindungsstelle. In 85% der JNCL-Patienten liegt diese Mutante vor (Phillips et al. 2005).

CLN3 _{R334C}	Punktmutante des CLN3-Proteins, die JNCL hervorrufen kann. Es handelt sich dabei um die Missense-Mutation 1000C>T im Exon 13 (Munroe et al. 1997), die zum Aminosäureaustausch von Arginin zu Cystein an der intralysosomalen Stelle 334 führt.
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> , das in der vorliegenden Arbeit als Transfektionskontrolle diente. Da es durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt wird und grünlich leuchtet, sind Zellen, die EGFP exprimieren, leicht zu identifizieren. Diese Zellen haben erfolgreich Plasmid aufgenommen. „Enhanced“ steht für eine Variante des GFP, die durch eine Punktmutation über eine längere Fluoreszenzdauer auch unter UV-Strahlung verfügt.
ds-RED	wie EGFP ein Reporter für die erfolgreiche Plasmidaufnahme in die Zelle. Da die Kv4.2-Kanäle der stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie bereits mit EGFP markiert waren, musste zur Unterscheidung ein anderer Reporter für die Transfektionskontrolle verwendet werden.

3.1.2 Herstellung von DNA

Mithilfe von Bakterienkulturen lassen sich Plasmide sehr schnell (innerhalb von 3 Tagen) in großen Mengen erzeugen. Für die Retransformation der Bakterien wurden transformationskompetente *Escherichia coli* DH5 α oder JM109 verwendet. Da diese Bakterien bei -80° C tiefgefroren gelagert wurden, mussten sie zunächst langsam über ca. 30 min auf Eis auftauen. Danach wurden 50 µl dieser Bakteriensuspension mit 1 µl des gewünschten DNA-Konstrukts in einem sterilen Eppendorftube durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt und für 20 bis 30 min auf Eis gestellt. Damit die Bakterienzellen die DNA besser aufnehmen konnten, wurden sie für 90 s einem Hitze-schock bei 42° C ausgesetzt. Zur Erholung kamen sie anschließend 2 min wieder auf Eis. Dann wurden ca. 500 µl auf 37° C vorgewärmtes Nährmedium dazugegeben. Nach ca. 1 Std. Inkubation in einem Schüttler (225 U/min) bei 37° C wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf mit Ampicillin behandelten Agarplatten mithilfe eines Einmalspatels ausplattiert. Für die Vermehrung der Bakterien kamen die Platten über

Nacht (ca. 18 bis 20 Std.) bei 37° C in den Brutschrank; zunächst für 30 min ohne Deckel, im Anschluss daran umgedreht, um sicher zu gehen, dass kein Kondenswasser auf den Agar läuft und die Bakterien ertränkt. Zur Isolierung der DNA aus den Bakterienkulturen wurden zunächst Flüssigkulturen hergestellt, indem 40 ml Nährmedium mit 40 µl Ampicillin (entsprechend einer Endkonzentration von 100 µg/ml) vermischt und auf 10 Bakterienkultur-Tubes verteilt wurden. Jedes Tube wurde mit je einer Einzelkolonie plasmidtragender *Escherichia coli* beimpft, indem die Kultur mithilfe einer Pipettenspitze steril vom Agar entnommen und zusammen mit der Spitze in das Tube gegeben wurde. Die Ansätze wurden für 2 bis 4 Std. zunächst im Kühlenschrank (bei ca. +4,0° C) gelagert, bis sie im Anschluss über Nacht (ca. 15 Std.) bei 37° C in einem Warmluftschüttler (225 U/min) inkubierten. Je 2 ml dieser Flüssigkulturen wurden 10 min bei 6000 U/min abzentrifugiert und der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Mit den daraus erhaltenen Pellets erfolgte anschließend die Aufreinigung der Plasmide nach Herstellerangaben des QIAprep MiniKit. Dabei wurde für die Elution der DNA im letzten Schritt der Aufreinigung 50 µl hochreines Wasser verwendet. Abschließend wurde die DNA-Konzentration der hergestellten Lösungen durch photometrische Messung der Absorption bei den Wellenlängen 269, 280 und 320 nm in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt. Dafür wurden die DNA-Lösungen 1:100 mit Wasser verdünnt (1 µl der Lösung auf 99 µl Wasser). Als Leerwert wurden 100 µl Wasser verwendet. Da bei dieser Methode ausschließlich das hinzugefügte Konstrukt vervielfältigt wurde, konnte auf die Durchführung eines Restriktionsverdaus und einer anschließender Gelelektrophorese zur Überprüfung der präparierten DNA verzichtet werden. Die DNA-Lösungen wurden bei ca. +4 ° C im Kühlschrank gelagert.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Verwendete Zelllinien

HEK293

Humane embryonale Nierenzellen (*Human Embryonic Kidney*), die sich gut für heterologe Proteinexpression eignen.

Kv4.2-HEK293 stabile Zelllinie von humanen embryonalen Nierenzellen, in der ein EGFP- und HA-markierter Kv4.2-Kanal konstitutiv exprimiert wurde (Kapitel 3.1.1). Als Selektionsantibiotikum diente Hygromycin. Die Resistenz gegen Hygromycin wurde mittels Vektor in das Genom der Zelllinie eingeschleust.

3.2.2 Lösungen und Medien

Transfektionsreagenz	LipofectAMINE (Invitrogen)
Transfektionsmedium	OPTI-MEM (Invitrogen)
HEK293-Nährmedium	Zu 500 ml Dulbecco's Minimal Essential Medium / NUT Mix F12 (Invitrogen) wurden 50 ml Hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum (Seromed Biochrom) und 5 ml einer Penicillin-Streptomycin-Glutamin-Lösung (Invitrogen) zugegeben.
PBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (Invitrogen)
Trypsin-Lösung	Trypsin-Ethyldiamintetraessigsäure (-EDTA) (1x) in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen)

3.2.3 Zellhaltung

Die Zellen wurden in Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) in einem Brutschrank bei 37° C, 5%-igem CO₂-Gehalt der Luft und 95% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Für die Passagierung der Zellen, die alle 2 bis 3 Tage erfolgte, wurde das Kulturmedium mithilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden 1,5 ml Trypsin-Lösung hinzugegeben. Dann inkubierten sie für 1 bis 2 min im Brutschrank. Anschließend wurde der Ablöseprozess durch Zugabe von 5 ml Nährmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 1200 U/min 2 min lang zentrifugiert und das Sediment in 10 ml Nährmedium resuspendiert. Für die Transfektionsansätze wurden je 2 ml Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von 1 bis 4 x 10⁴ in 35 mm-Schälchen ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Zellschälchen für die HEK293-Zellen waren für eine bessere Haftung

der Zellen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Bei der stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie wurde diese Beschichtung nicht verwendet.

3.2.4 Transiente Transfektion

Unter einer Transfektion versteht man das Verfahren, zellfremde DNA in eine Wirtszelle einzuschleusen, damit diese anschließend die im eingebrachten Genmaterial codierten Proteine exprimiert. Dabei unterscheidet man zwischen der transienten Transfektion, bei der die Fremd-DNA mittels eines Plasmids nur vorübergehend in die Zelle eingebracht wird, und der stabilen Transfektion. Stabil bedeutet, dass die DNA dauerhaft ins Genom der Wirtszelle eingebaut wird. So wurde in der vorliegenden Arbeit bei einem Teil der Experimente eine stabile Kv4.2-HEK293-Zelllinie verwendet, die den Kanal konstitutiv und relativ gleichmäßig in der Plasmamembran exprimierte. Ansonsten kam die transiente Methode zum Einsatz. In der vorliegenden Arbeit wurde die Liposomen-Einschluss-Methode (Lipofektion) angewendet. Das Prinzip beruht auf einer Komplexbildung zwischen der negativ geladenen DNA und positiv geladenen Lipidvesikeln (Transfektionsreagenz). Da dieser Komplex lipophil ist, kann er leicht mit der Zellmembran verschmelzen und so kann die hydrophile DNA in die Wirtszelle gelangen. Die Transfektion erfolgte ca. 24 Std. nach der Ausplattierung der Zellen. Als erster Schritt wurde die zu exprimierende DNA je nach gewünschter Konstellation gemäß folgendem Schema zusammengestellt (Mengenangaben pro Kulturschälchen):

DNA für die transiente Transfektion von HEK293-Zellen:

0,1 µg Kv4.2-Kanal

0,25 µg KChIP3

2,5 µg CLN3 (Wildtyp bzw. Deletions- oder Punktmutante)

0,5 µg EGFP

DNA für die transiente Transfektion der stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie:

0,1 µg bzw. 0,25 µg KChIP3

2,0 µg bzw. 2,5 µg CLN3 (Wildtyp bzw. Deletions- oder Punktmutante)

0,5 µg ds-RED

Die nun aufgeführten Arbeitsschritte wurden unter der Sterilwerkbank durchgeführt. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf ein Zellkulturschälchen. Die zusammengestellte DNA wurde mit 100 µl OPTI-MEM und einer Mischung aus 2,5 µl LipofectAMINE und ebenfalls 100 µl OPTI-MEM gründlich gemischt. Es folgte eine mindestens 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Währenddessen wurden die Zellkulturschälchen mit 2 ml OPTI-MEM gewaschen und mit 800 µl OPTI-MEM befüllt. Da Zellen sehr kälteempfindlich sind, musste das Transfektionsmedium zuvor in einem Wasserbad bei 37° C mindestens 15 min vorgewärmt werden. Anschließend kamen die Zellen in den Brutschrank (37° C, 5% CO₂). Nach der Inkubation des DNA-Ansatzes wurden 200 µl davon tröpfchenweise in dem mit OPTI-MEM vorbereiteten Schälchen verteilt. Im Anschluss inkubierten die Zellen erneut im Brutschrank. Zum Stoppen der Transfektion wurde nach 5 bis 6 Std. das Transfektionsmedium durch 2 ml auf 37° C vorgewärmtes HEK293-Nährmedium ersetzt. Die Zellen wurden an den beiden darauffolgenden Tagen (ca. 15 bis 60 Std. nach Abschluss der Transfektion) für die elektrophysiologischen Messungen genutzt. Bis unmittelbar vor der Messung lagerten die Zellen im Brutschrank.

3.3 Elektrophysiologie

3.3.1 Die Patch-Clamp-Technik

Die Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden alle mit der Patch-Clamp-Methode durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Methode, mit der man Strom messen kann, der durch Ionenkanäle in der Membran einer Zelle fließt. Sie wurde aus dem Verfahren der Spannungsklemme (*voltage clamp*) entwickelt, bei der das Membranpotential der untersuchten Zelle auf einer vorgegebenen Spannung gehalten wird. Bei der Patch-Clamp-Methode wird eine Glaspipette, die eine Mikroelektrode enthält, dicht auf die Membran einer Zelle aufgesetzt. Dadurch wird der Patch, der Membranfleck unter der Pipette, elektrisch von der restlichen Membran isoliert. Eine Veränderung des Membranpotentials aufgrund von Strömen durch die Zellmembran wird mithilfe eines Kompensationsstroms verhindert, der bei gleichem Betrag der Stromstärke dem Membranstrom entgegengerichtet ist. Dies erreicht man durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus: Ein Operationsverstärker (OPA = *Operational amplifier*) vergleicht das Membranpotential V_m der untersuchten Zelle, das mithilfe der

Mikroelektrode in der Pipette gemessen wird, mit der gewünschten Kommandospannung V_{soll} (Abbildung 3.1). Bei einer Abweichung des Membranpotentials von der Kommandospannung liefert der Operationsverstärker an seinem Ausgang eine Spannung V_{aus} , die hoch verstärkt, aber proportional zur Differenz der beiden Eingangsspannungen ist. Dadurch fließt ein Strom durch einen Rückkoppelungswiderstand (R_f), der den Ausgang des OPA mit der Pipettenelektrode verbindet.

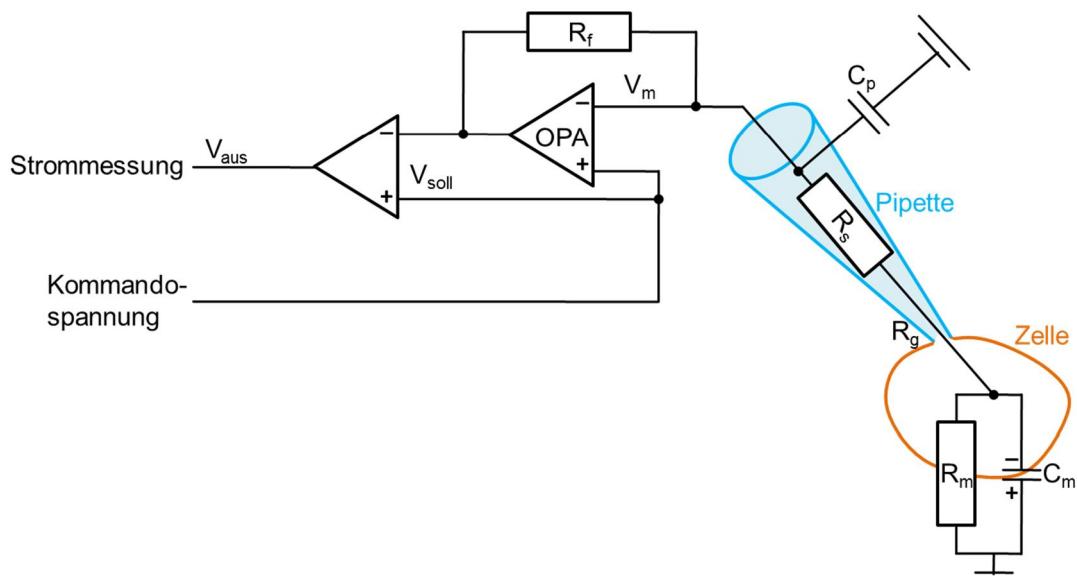


Abbildung 3.1: Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers bei einer *Whole-cell*-Ableitung
Ein Operationsverstärker (OPA) vergleicht das Membranpotential V_m mit der Kontrollspannung V_{soll} und liefert die proportional zur Differenz verstärkte Spannung V_{aus} , wodurch ein Strom durch den Rückkopplungswiderstand R_f fließt. Die Pipette und die Zellmembran lassen sich am besten durch eine Kopplung von Widerstand und Kondensator beschreiben; R_s = Serienwiderstand; R_g = Sealwiderstand; C_p = Pipettenkapazität; R_m = Membranwiderstand; C_m = Membrankapazität.

Aufgrund des sehr hohen Eingangswiderstands des OPA fließt der Strom fast ausschließlich in die Pipette. Sobald keine Spannungsdifferenz mehr an den beiden Eingängen des OPA vorliegt, also das Membranpotential der Kommandospannung entspricht, wird auch keine Spannung am Ausgang erzeugt und folglich kein Kompensationsstrom durch den Rückkoppelungswiderstand in die Pipette injiziert. Durch diesen Mechanismus wird eine beginnende Abweichung des Membranpotentials von der Kommandospannung in der Regel sofort ausgeglichen. Dieser Schaltkreis befindet sich in dem Vorverstärker direkt am Pipettenhalter (Abbildung 3.1). Er wird als Strom-Spannungs-Wandler bezeichnet, da er mit nur einer Elektrode ermöglicht, das Membranpotential auf die gewünschte Kommandospannung zu „klemmen“ und

gleichzeitig den Kompensationsstrom mithilfe der Ausgangsspannung und der Größe des Rückkoppelungswiderstands zu bestimmen. Der Kompensationsstrom entspricht dem Membranstrom mit umgekehrtem Vorzeichen. Dieser wird v. a. durch Ionenkanäle in der Zellmembran verursacht. Mithilfe der Spannungsklemme bei der Patch-Clamp-Technik lassen sich spannungsabhängige Ionenkanäle gezielt aktivieren durch Änderung der Kommandospannung.

3.3.2 Ausstattung des Messplatzes

3.3.2.1 Messstand

Da bereits geringste Erschütterungen die Messungen stören können, wurde die Messapparatur auf einem durch Luftkissen schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut. Zur Reduzierung des Hintergrundrauschens wurde der Messplatz durch einen geerdeten Faraday'schen Käfig auch von elektromagnetischen Schwingungen abgeschirmt. Als Messkammern wurden die Kulturschälchen verwendet, in denen die Zellen ausplattiert und transfiziert worden waren. Während der Experimente wurde die Badlösung kontinuierlich ausgetauscht. Dafür wurde eine 50 ml-Spritze ohne Kolben verwendet, an deren Spitze ein Infusionsschlauch über einen Dreiegehahn angeschlossen war. Der Infusionsschlauch endete in einer gebogenen Glaskapillare, über die die Badlösung ausschließlich durch Gravitationskraft in die Messkammer floss. Mithilfe einer Drehschraubenklemme konnte die Flussgeschwindigkeit auf ca. 25 µl/s eingestellt werden. Die zulaufende Badlösung wurde auf der gegenüberliegenden Seite aus der Messkammer über eine weitere gebogene Glaskapillare abgesaugt. Diese war an einen Infusionsschlauch angeschlossen, über den die Absaugung mithilfe einer Membranpumpe erfolgte. Die Badtiefe wurde so konstant gehalten und konnte durch die Form der Glaskapillare variiert werden. Für die visuelle Kontrolle der Messdurchführung wurde ein inverses Mikroskop (Axiovert, Zeiss) verwendet. Bei einem Okular mit 10-facher und Objektiven mit 10-facher bzw. 40-facher Vergrößerung war insgesamt eine maximal 400-fache Vergrößerung möglich. Zusätzlich zur normalen Weißlichtquelle wurde eine Quecksilberdampflampe (HBO-UV-Halogenlampe, Zeiss) benutzt, in deren Strahlengang ein Grün- bzw. Rotfilter geschaltet war, um die erfolgreiche Aufnahme der Transfektionsmarker EGFP bzw. ds-RED in die Zellen zu detektieren.

3.3.2.2 Patchpipetten und Elektroden

Die Patchpipetten wurden aus dünnwandigen Borosilikatglas-Kapillaren (TW150F-4, World Precision Instruments; 1,12 mm Innen- und 1,5 mm Außendurchmesser) hergestellt. Die Glasmäppchen wurden mithilfe eines horizontalen Pipettenziehgerätes mit einem 3 mm breiten Filament (DMZ-Puller, Zeitz, Augsburg) in drei Schritten fein ausgezogen und anschließend in einem weiteren Schritt hitzepoliert. Die Öffnung der Spitze konnte durch Regulierung der Hitze im Polierschritt auf ca. 1 µm und damit der Pipettenwiderstand in der verwendeten Messlösung auf 2,5 bis 3 MΩ eingestellt werden. Um die Patchpipetten mit auf Eis gekühlter Elektrolytlösung zu befüllen, wurde zuerst die Spitze für einige Sekunden in die Lösung getaucht (*tip filling*) und aufgrund der Kapillarkraft gefüllt. Anschließend wurden mithilfe einer 1 ml-Quarznaledspritze wenige Mikroliter Pipettenlösung von hinten hineingespritzt (*back filling*), sodass später beim Befestigen der Pipette der Elektrodendraht knapp in die Lösung eintauchte. Eingeschlossene Luftblasen wurden zuvor durch leichtes Klopfen gegen die Glaspipette entfernt. Jede Pipette wurde nur für eine Zellmessung verwendet und innerhalb weniger Stunden nach Herstellung verbraucht. Für die Messung wurde eine Pipette über die Messelektrode gesteckt und im Pipettenhalter am Vorverstärker befestigt. Als Elektrode wurde ein Silberdraht verwendet. Da Silber leicht polarisierbar ist und Offset-Potentiale erzeugen kann, wurde die Elektrode vor Verwendung chloriert. Dafür wurde sie in eine Kaliumchloridlösung getaucht und mit der Anode einer Gleichspannungsquelle verbunden, während die Lösung über einen Platindraht mit der Kathode verbunden war. Durch eine Redoxreaktion bildete sich nach ca. 8 min eine Silberchloridschicht auf der Elektrode, die nach 2 bis 4 Tagen erneuert werden musste. Die Messelektrode wurde mittels eines Elektrodenhalters direkt am Vorverstärker angebracht. Ebenfalls mit dem Vorverstärker verbunden wurde die Referenzelektrode. Dazu diente ein Silberdraht mit einem Silber/Silber-Chlorid-Pellet, welches in die Badlösung eingetaucht wurde. Um Druck an das Pipetteninnere anlegen zu können, war über einen Silikonschlauch ein mit Wasser gefülltes U-Rohr am Pipettenhalter angeschlossen. Mithilfe eines weiteren Infusionsschlauches und eines Dreiegehahns konnte ein konstanter Überdruck im Schlauch und im U-Rohr angelegt und anhand des Wasserstandes seine Höhe kontrolliert werden. Bei geöffnetem Dreiege-

hahn war es auch möglich durch Saugen an dem Infusionsschlauch einen Unterdruck zu produzieren.

3.3.2.3 Verstärker und Datenerfassung

An dem Objekttisch des Mikroskops war der Vorverstärker mit der Pipette und der Messelektrode angebracht. Mithilfe eines Mikromanipulators konnte der Vorverstärker bewegt und die Pipettenspitze exakt auf die Zellmembran positioniert werden. Der Vorverstärker übermittelte die gemessenen Spannungssignale an den Hauptverstärker (EPC9, HEKA Elektronik, Lamprecht), der unter der Kontrolle des Aufnahmeprogramms Pulse (HEKA Elektronik, Lamprecht) stand. Dabei wurden die eingehenden Messdaten über zwei Besselfilter mit 10 kHz und 2,9 kHz gefiltert. Zur Digitalisierung und Einspeisung der analogen Signale in den Computer (Dell, Windows) und für die Steuerung des Hauptverstärkers mittels der Software Pulse diente ein Analog-Digital/Digital-Analog-Wandler im Hauptverstärker. Die Aufnahmefrequenz der Digitalisierung betrug 1 bis 20 kHz.

3.3.3 Elektrolytlösungen

Die Patchpipetten wurden mit einer gut leitenden Elektrolytlösung auf der Grundlage von destilliertem Wasser und verschiedenen Substanzzusammensetzungen (siehe unten) befüllt, welche während der Messungen als Intrazellulärlösung diente. Der pH-Wert wurde mit 1 M Kaliumlauge (KOH) auf 7,2 eingestellt und die Lösung anschließend mit einem 0,22 µm-Sterilfilter filtriert. Abgefüllt in 200 ml-Flaschen wurde die Pipettenlösung bei +4° C im Kühlschrank aufbewahrt und innerhalb von ca. 4 Monaten verbraucht. Soweit nicht anders angegeben wurde die Standard-Pipettenlösung mit einer freien Calciumkonzentration von 15 nM verwendet, da diese der physiologischen Intrazellulärflüssigkeit sehr ähnlich ist. Bei einigen Experimenten wurde eine Pipettenlösung, welche nominal Ca²⁺-frei war, verwendet oder eine Pipettenlösung mit einer freien Calciumkonzentration von 50 µM. Mithilfe des Programms WEBMAXC Extended wurden die Konzentrationen berechnet (pH: 7,2; Temperatur: 22° C; Ionenstärke: 0,1; Magnesiumkonzentration: 0,8 mM).

Standard-Pipettenlösung

125 mM KCl
 1 mM CaCl₂ (ca. 15 nM freies Ca²⁺)
 1 mM MgCl₂ (ca. 70 μM freies Mg²⁺)
 11 mM EGTA
 10 mM HEPES
 2 mM K₂ATP
 2 mM Glutathion

<u>Berechnung mittels WEBMAXC Extended</u>		
Name	Frei (M)	Total (M)
Ca ²⁺	1.493 · 10 ⁻⁸	0.001
Mg ²⁺	6.87 · 10 ⁻⁵	0.001
ATP	0.0011069	0.002
EGTA	0.0099615	0.011

Nominal Ca²⁺-freie Pipettenlösung

125 mM KCl
 4,76 mM MgCl₂ (0,8 mM freies Mg²⁺)
 2 mM BAPTA
 2 mM EDTA
 2 mM EGTA
 10 mM HEPES
 13 mM Saccharose
 2 mM K₂ATP
 2 mM Glutathion

<u>Berechnung mittels WEBMAXC Extended</u>		
Name	Frei (M)	Total (M)
Mg ²⁺	8 · 10 ⁻⁴	0.0047626
ATP	1.924 · 10 ⁻⁴	0.002
BAPTA	0.0019242	0.002
EDTA	6.5 · 10 ⁻⁶	0.002
EGTA	0.0019141	0.002

Hoch-Calcium-Pipettenlösung

125 mM KCl
 3,78 mM CaCl₂ (50 μM freies Ca²⁺)
 2,876 mM MgCl₂ (0,8 mM freies Mg²⁺)
 2 mM EDTA
 2 mM EGTA
 10 mM HEPES
 9 mM Saccharose
 2 mM K₂ATP
 2 mM Glutathion

<u>Berechnung mittels WEBMAXC Extended</u>		
Name	Frei (M)	Total (M)
Ca ²⁺	5 · 10 ⁻⁵	0.0037795
Mg ²⁺	8 · 10 ⁻⁴	0.0028760
ATP	1.873 · 10 ⁻⁴	0.002
EDTA	1 · 10 ⁻⁶	0.002
EGTA	5.9 · 10 ⁻⁶	0.002

Als extrazelluläre Badlösung wurde eine Elektrolytlösung auf der Grundlage von destilliertem Wasser und untenstehender Substanzzusammensetzung verwendet. Der pH-Wert wurde mit Natriumlauge (NaOH) auf 7,4 eingestellt. Unter der Sterilwerk-

bank wurde die Lösung mithilfe eines Bottle-Top-Filters steril filtriert und in 250 ml-Flaschen abgefüllt. Bei Raumtemperatur gelagert wurde die Badlösung innerhalb von ca. 6 Monaten verbraucht.

Badlösung

135 mM NaCl

5 mM KCl

2 mM CaCl₂

2 mM MgCl₂

5 mM HEPES

10 mM Saccharose

3.3.4 Durchführung der Patch-Clamp-Messungen

Alle Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden bei Raumtemperatur (20° bis 25° C) durchgeführt. Zunächst wurde das Zellkulturschälchen mit 1 ml Badlösung gewaschen, mit ca. 1,5 ml der Lösung befüllt und als Messkammer in den Objekttisch des Mikroskops eingesetzt. Ca. 1 bis 2 Std. dauerten die Messungen an einem Schälchen. Eine unbenutzte mit Pipettenlösung gefüllte Patchpipette wurde fest und luftdicht verschlossen am Pipettenhalter angebracht. Dann wurde ein Überdruck von ca. 4 cm H₂O an das Pipetteninnere angelegt, um durch einen kontinuierlichen Flüssigkeitsausstrom eine Verunreinigung der Pipettenöffnung mit kleinen Schmutzpartikeln oder eine Vermischung mit der Badlösung zu vermeiden. Schließlich wurde mittels des Mikromanipulators die Pipettenspitze in die Badlösung eingetaucht. An den Übergängen der einzelnen Komponenten der Messkette (Messelektrode – Pipettenlösung – Badlösung – Referenzelektrode) können Offset-Potentiale entstehen, die durch einen Spannungsabfall zu Abweichungen der tatsächlich angelegten Membranspannung von der gewünschten Kommandospannung führen. Daher wurde das Offset-Potential korrigiert, indem der Nullpunkt des Potentials nach dem Eintauchen der Pipette in die Badlösung korrigiert wurde. Ein repetitiver rechteckförmiger Testpuls mit einer Amplitude von 5 mV über 5 ms erzeugte einen Strom, der am Computerbildschirm beobachtet werden konnte und Aufschluss über den Pipettenwiderstand gab. Unter visueller Kontrolle wurde die Pipette mithilfe des Mikromanipulators nah an eine Zelle

herangeführt und das Offset-Potential ein weiteres Mal korrigiert. Das Aufsetzen der Pipettenöffnung auf die Membran konnte man durch eine Erhöhung des Widerstands bzw. eine Stromabnahme registrieren. Dann wurde der an die Pipette angelegte Überdruck vollständig abgelassen und durch leichtes Saugen am Silikonschlauch-Pipetten-System eine Abdichtung (*Seal*) zwischen der Glaspipette und der Zellmembran erreicht, durch den der Patch und das Pipetteninnere elektrisch isoliert wurden. Dies wird als *Cell-attached*-Konfiguration bezeichnet. Eine gute Abdichtung sorgt dafür, dass Ströme fast ausschließlich über die Membran und nur zu einem sehr geringen Teil als Leckstrom zwischen Zellmembran und Pipette vorbeifließen. Um diese bei der Messung störenden Leckströme möglichst gering zu halten, wurden die Experimente nur bei einem Abdichtwiderstand von über $1\text{ G}\Omega$ (*Gigaseal*) durchgeführt. Eine schnelle Kapazitätskomponente, verursacht durch Umladeprozesse in der Pipette, wurde on-line kompensiert und ein negatives Potential von -50 mV angelegt. Dann wurde der Membranpatch unter der Pipettenöffnung durch kurzes kräftiges Saugen am Silikonschlauch-Pipetten-System durch den dadurch entstehenden Unterdruck durchbrochen. Nun lag die *Whole-cell*-Konfiguration vor, in der man die Summe aller Einzelkanalströme der gesamten Zellmembran erfassen konnte, den makroskopischen Strom. Die langsame Kapazitätskomponente, die durch Umladungsvorgänge an der Zellmembran entstand, wurde ebenfalls on-line kompensiert und das Haltepotential auf -80 mV eingestellt. Nach dem Durchbrechen der Membran erhielt man einen niederohmigen Zugang zur Zelle. Da ein höherer Serienwiderstand Spannungssprünge verzögert, wurden nur Widerstände bis $7\text{ M}\Omega$ toleriert. Zusätzlich wurde der Serienwiderstand zu 80 bis 90% kompensiert. Durch die Öffnung in der Membran vermischten sich die Pipettenlösung und die Intrazellulärflüssigkeit der Zelle miteinander. Da das Zellvolumen in Relation zum Pipettenvolumen vernachlässigbar klein war, konnte man durch die verwendete Pipettenlösung die Zusammensetzung des Zellinneren vorgeben.

3.3.5 Komensation von Kapazitäten und Serienwiderstand

Da die Pipettenwand und die Zellmembran im Versuchsaufbau eine Isolationsschicht zwischen den stromleitenden Lösungen darstellten, wirkten sie als Kondensatoren und verzögerten durch Umladungsvorgänge bei jeder Spannungsänderung den Spannungs-

aufbau. Dadurch kam es bei der Applikation von rechteckförmigen Spannungssprüngen, die in allen Pulsprotokollen angewendet wurden, zu schnell ansteigenden und exponentiell abfallenden Strömen. Diese kapazitiven Artefakte störten die Messungen und wurden durch ein RC-Glied (Parallelschaltung von Widerstand und Kondensator), welches parallel zum OPA zwischen seine beiden Eingänge geschaltet wurde, in den Experimenten kompensiert. Zusätzlich gab es einen in Reihe geschalteten variablen Widerstand, dessen Wert so gewählt wurde, dass ein Strom, der dem Umladungsstrom bei Spannungssprüngen entsprach, in die Messelektrode injiziert wurde. Dadurch verschwanden die kapazitiven Artefakte fast vollständig aus der gemessenen Stromkurve. Die kapazitiven Artefakte setzten sich aus einer schnellen und einer langsamen Komponente zusammen. Die schnelle Komponente (C_{fast}) entstand an Pipettenhalter und Pipette, die langsame an der Zellmembran (C_{slow}). Die beiden Komponenten mussten in getrennten Schaltungen kompensiert und der variable Widerstand bei jedem Versuch den Zell- bzw. Pipetteneigenschaften erneut angepasst werden. Anhand der Kompensation der langsamen Komponente ließ sich die Zellgröße abschätzen. Eine Beschleunigung der Umladungsprozesse konnte durch die Serienwiderstandskompensation erreicht werden. Hauptaufgabe war jedoch, die Spannungsverluste, die durch den Serienwiderstand hervorgerufen wurden, auszugleichen. Denn fällt bereits über den Komponenten der Messkette Spannung ab, liegt nur noch ein Teil der gewünschten Kommandospannung an der Zellmembran an. Deshalb wurde eine Spannung, die proportional zum gerade injizierten Strom war, zur Kommandospannung hinzugefügt. In den Experimenten konnte der Serienwiderstand so bis zu 90% kompensiert werden.

3.3.6 Leckstrom und endogene Ströme

Beim Leckstrom handelt es sich um einen Strom, der nicht durch spannungsaktivierte Ionenkanäle entsteht. Er wird u. a. durch den Membranwiderstand, die kapazitiven Ströme an der Zellmembran oder bei nicht ausreichend ausgeprägtem *Seal* durch Ionenströme zwischen Zelle und Pipette verursacht. Da diese unspezifischen Ströme die Auswertung der Messsignale erheblich stören können, wurden sie mit einem Subtraktionsverfahren korrigiert. Angewendet wurde die P/n-Methode, die sich zu Nutze macht, dass der Leckstrom nach dem Ohm'schen Gesetz linear von der

Spannung abhängt. Nach jedem Puls eines Protokolls wurden dieselben Spannungssprünge fünf weitere Male durchlaufen, allerdings mit nur einem Fünftel der Spannung, sodass die spannungsaktivierten Ionenkanäle während des Leckprotokolls nicht aktiviert wurden. Die Ströme wurden gemittelt, mit 5 multipliziert und dann von der ursprünglichen Stromkurve off-line abgezogen. Die verwendeten HEK293-Zellen exprimierten z. T. auch ohne Transfektion bereits Kanäle in ihrer Membran, die endogene Ströme verursachten, welche sich zu den Messsignalen hinzugliederten. Sie lagen bei manchen Experimenten abhängig von der Zellgröße bei 0,2 bis 2,5 nA. Auch wenn durch die Transfektion der gewünschte Kanal in der Membran überexprimiert wurde, konnte – v. a. bei kleineren Amplituden – der endogene Strom nicht vernachlässigt werden. Deshalb wurde im Anschluss an das Rechteckpuls-Protokoll (Kapitel 3.3.7.1) dasselbe Protokoll nochmals durchlaufen, allerdings von einer Vorpulsspannung von -35 mV aus, bei dem die Kv4.2-Kanäle vollständig inaktiviert waren. Der gemessene Strom wurde nachträglich bei der Auswertung mithilfe der Software PulseFit (HEKA Elektronik, Lamprecht) vom Messsignal abgezogen (*Buffer subtraction*).

3.3.7 Protokolle

Für die Untersuchung verschiedener Kanaleigenschaften wurden in Pulsprotokollen mithilfe des Programms Pulse die Abläufe bestimmter Spannungsänderungen vorgegeben. Die Haltespannung betrug bei allen Messungen -80 mV. Jedem Protokoll folgte ein Leckstromprotokoll, auch wenn eine *Buffer subtraction* (Kapitel 3.3.6) durchgeführt wurde.

3.3.7.1 Rechteckpuls-Protokoll

Als erstes Protokoll eines Experiments wurde immer ein Rechteckpuls durchgeführt. Er bestand aus zwei nacheinander ablaufenden Pulsen. Zunächst wurde nach einem 1500 ms langen Vorpuls bei -100 mV für 2500 ms ein depolarisierender Puls auf +40 mV gegeben (Abbildung 3.2 A), bei dem alle Kv4.2-Kanäle aktiviert wurden. Der darauffolgende Leckpuls (Abbildung 3.2 B) verlief gleich, jedoch mit einem Vorpuls bei nur -35 mV, durch den alle Kv4.2-Kanäle inaktiviert und deshalb während des anschließenden depolarisierenden Pulses nur endogener Strom sowie der Leckstrom

gemessen werden konnte. Bei der anschließenden Auswertung wurde der endogene Strom von der ersten Stromkurve subtrahiert (*Buffer subtraction*, Kapitel 3.3.6). Anhand der Stromkurve, die man aus diesem Stimulationsprotokoll erhielt, konnten die Stromdichte und die Kinetik der makroskopischen Inaktivierung bestimmt werden.

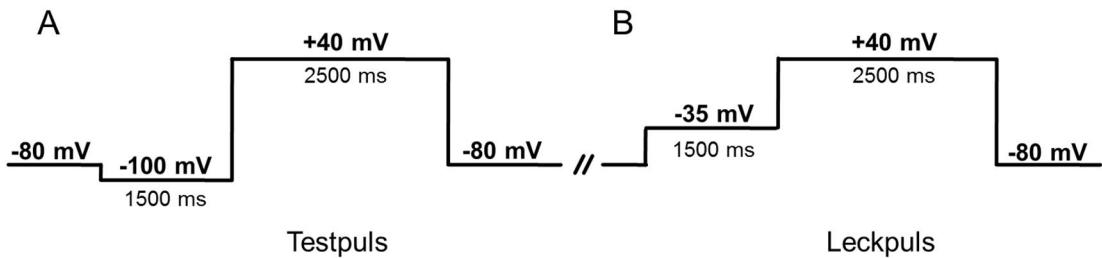


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Rechteckpuls-Protokolls
A: Testpuls. B: Leckpuls zur Subtraktion des Leckstroms und des endogenen Stroms vom Teststrom (*Buffer subtraction*).

3.3.7.2 Recovery-Protokoll

Inaktivierte Kanäle benötigen Zeit, um wieder in den aktivierbaren Zustand zurückzukehren. Um die Recovery (Erholung von der Inaktivierung) zu charakterisieren, wurden zwölf Doppelpulse (vom Haltepotential -80 mV auf +40 mV) durchgeführt.

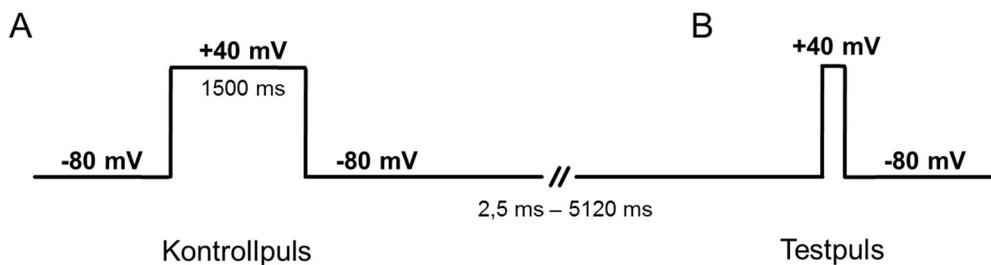


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Recovery-Protokolls
A: Kontrollpuls zur Messung aller Kanäle. B: Testpuls nach variabler Dauer des Zwischenpulsintervalls von 2,5 bis 5120 ms bei -80 mV zur Messung der erholten Kanäle.

Der erste Puls (Kontrollpuls, Abbildung 3.3 A) diente bei jedem Durchlauf zur Aktivierung und Inaktivierung nahezu aller Kanäle und dauerte deswegen 1500 ms. Der zweite Puls (Testpuls, Abbildung 3.3 B) diente als Maß für die wieder aktivierbaren (erholten) Kanäle. Zur Bestimmung der Erholungskinetik wurden die Zwischenpulsintervalle variiert. Sie begannen mit einem Wert von 2,5 ms und verdoppelten sich bei jedem Durchgang bis zu einem Zeitintervall von 5120 ms.

3.3.7.3 Steady-State-Inaktivierungs-Protokoll

Um die Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung zu untersuchen, wurden kurze Doppelpulse verwendet. Nach einem Vorpuls bei -100 mV und einem Kontrollpuls bei +40 mV wurden unterschiedliche Spannungen von -100 mV bis 0 mV (in 5 mV-Schritten) für 1750 ms angelegt (Abbildung 3.4 A). Der anschließende Testpuls bei +40 mV diente zur Bestimmung der noch aktivierbaren Kanäle (Abbildung 3.4 B).

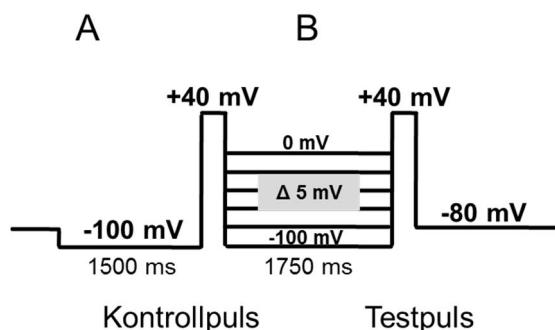


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Steady-State-Inaktivierungs-Protokolls
A: Kontrollpuls zur Messung aller Kanäle. **B:** Testpuls nach unterschiedlichen Spannungen zur Messung der noch aktivierbaren Kanäle.

3.3.7.4 IV-Aktivierungs-Protokoll

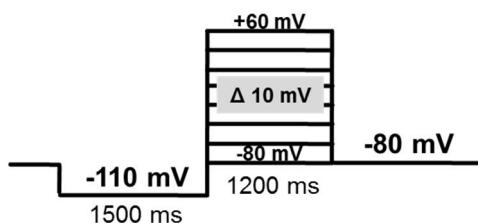


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des IV-Aktivierungs-Protokolls
 Nach einem Vorpuls bei -110 mV folgte ein Testpuls bei unterschiedlichen Spannungen zwischen -80 und +60 mV.

Das IV-Aktivierungs-Protokoll ermittelte die maximale Stromstärke in Abhängigkeit von der Spannung des Testpulses und diente damit zur Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. Einem 1500 ms langen Vorpuls bei -110 mV folgte für 1200 ms ein Testpuls von unterschiedlichen Spannungen. Beginnend bei -80 mV stieg das Potential in 10 mV-Schritten auf +60 mV (Abbildung 3.5).

3.3.8 Datenauswertung

Zur Auswertung der Stromaufnahmen wurde die Software PulseFit verwendet. Damit konnten u. a. die Zeitkonstanten der Inaktivierung, die Stromamplituden und Zellkapazitäten bestimmt werden. Die mit PulseFit aufbereiteten Daten wurden mithilfe des Computerprogramms Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA, USA) graphisch dargestellt. Mit diesem Programm wurden auch einige weiterführende Analysen zur Bestimmung der Kinetik der Erholung von der Inaktivierung sowie der Spannungsabhängigkeit von der Inaktivierung und der Aktivierung durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde mit der Software Prism 5 (GraphPad Software, USA) ein ungepaarter zweiseitiger t-Test nach Student mit Welch-Korrektur für ungleiche Varianzen (bei zwei Vergleichsgruppen) bzw. ein ANOVA-Test mit Posttest nach Dunnett (bei mehr als zwei Vergleichsgruppen) durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede bei p-Werten $< 0,05$ definiert und mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. Daten mit p-Werten $\leq 0,0001$ sind durch drei Sternchen (****) markiert. Bei Verwendung der Hoch-Calcium-Pipettenlösung wurden die Werte unmittelbar nach Zelloffnung mit den Werten u. a. nach 6 min, 12 min, 15 min, 20 min und 25 min verglichen. Dazu wurden die Messwerte der einzelnen Zellen paarweise betrachtet, um so die Abhängigkeit des Einflusses der Hoch-Calcium-Pipettenlösung auf die individuelle Zelle darzustellen. Es wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt.

3.3.8.1 Stromdichte

In der *Whole-cell*-Konfiguration wird die Summe aller Einzelkanalströme der gesamten Zelle gemessen. Da die Stromamplitude häufig mit der Zellgröße korreliert (in der Regel gilt, je größer die Zellmembran umso mehr Kanäle enthält diese), wurde zur besseren Vergleichbarkeit die Stromdichte aus dem Quotienten von maximaler Stromamplitude (A_{\max}) und Membrankapazität (C_{slow}) berechnet:

$$\text{Stromdichte} = A_{\max} / C_{\text{slow}}$$

A_{\max} entsprach dem Spitzenwert der Stromkurve, die man beim Durchführen eines Rechteckpulses erhielt. C_{slow} wurde beim Öffnen der Zelle on-line registriert und gespeichert. C_{slow} kann direkt als Maß für die Zellgröße verwendet werden, denn die

spezifische Kapazität biologischer Membranen ist mit ca. $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ annähernd proportional zur Zelloberfläche (Ashcroft 1999).

3.3.8.2 Makroskopische Inaktivierung

Die Inaktivierungskinetik ließ sich am besten durch drei Zeitkonstanten beschreiben, die man erhielt, indem man eine dreifach-exponentielle Funktion der Stromkurve anpasste:

$$I(t) = A_0 + A_1 \cdot e^{-t/\tau_1} + A_2 \cdot e^{-t/\tau_2} + A_3 \cdot e^{-t/\tau_3}$$

τ_1, τ_2 und τ_3 = Zeitkonstanten

A_1, A_2 und A_3 = Amplituden der drei Zeitkonstanten

A_0 = Amplitude der nicht-inaktivierten Stromkomponente (Offset-Amplitude)

Der prozentuale Anteil der Zeitkonstanten an der Amplitude wurde aus den erhaltenen Daten berechnet:

$$\% \tau_X = A_X / (A_1 + A_2 + A_3) \cdot 100$$

$\% \tau_X$ = prozentualer Anteil der Zeitkonstante

A_X : Amplitude von τ_X

3.3.8.3 Erholung von der Inaktivierung (Recovery)

Die Erholung von der Inaktivierung wurde mithilfe eines Doppelpuls-Protokolls analysiert. Der Peakstrom des Testpulses (I_{test}) wurde auf das Maximum des jeweiligen Kontrollpulses (I_{control}) normiert und prozentual gegen die Dauer des Zwischenpuls-intervalls logarithmisch aufgetragen. Die Datenpunkte konnten auf vier verschiedene Arten exponentiell gefittet werden:

Einfach-exponentiell ohne Offset-Strom:

$$I_{\text{test}} / I_{\text{control}} = 100 \cdot e^{-t/\tau}$$

Einfach-exponentiell mit Offset-Strom:

$$I_{\text{test}} / I_{\text{control}} = (100 - A_0) \cdot (1 - e^{-t/\tau}) + A_0$$

Doppelt-exponentiell ohne Offset-Strom:

$$I_{\text{test}} / I_{\text{control}} = (100 - \% \tau_2) \cdot (1 - e^{-t/\tau_1}) + \% \tau_2 \cdot (1 - e^{-t/\tau_2})$$

Doppelt-exponentiell mit Offset-Strom:

$$I_{\text{test}} / I_{\text{control}} = (100 - \% \tau_2 - A_0) \cdot (1 - e^{-t/\tau_1}) + \% \tau_2 \cdot (1 - e^{-t/\tau_2}) + A_0$$

τ_x = Zeitkonstante

$\% \tau_x$ = Anteil der Zeitkonstante an maximaler Amplitude

A_0 = Offset-Amplitude

Welche dieser Gleichungen angepasst wurde, hing vom jeweiligen Kurvenverlauf ab. Lag A_0 unter 5% der maximalen Amplitude, wurde eine Gleichung ohne Offset-Anpassung gewählt (folglich der Offset-Strom gleich 0 gesetzt). Ein doppelt-exponentieller Fit wurde verwendet, wenn beide Zeitkonstanten zwischen 1 und 2000 lagen, jeweils einen Anteil von mindestens 1% der maximalen Amplitude aufwiesen und τ_2 mindestens dreimal so groß wie τ_1 war. Andernfalls wurde den Datenpunkten eine einfache-exponentielle Funktion angepasst. Um die Werte der einfach- und doppelt-exponentiellen Fits vergleichen zu können, wurde aus den beiden Zeitkonstanten der doppelt-exponentiell gefiteten Kurven eine gewichtete Zeitkonstante (τ_w) ermittelt, wodurch man allerdings nur eine annähernde Beschreibung des Kurvenverlaufs erhielt:

$$\tau_w = (\tau_1 \cdot \% \tau_1 + \tau_2 \cdot \% \tau_2) / 100$$

3.3.8.4 Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung (Steady-State-Inaktivierung)

Zur Auswertung der Steady-State-Inaktivierung wurden die Peakströme des Testpulses (I_{test}) zunächst auf den dazugehörigen Kontrollpuls normiert. Anschließend wurde eine zusätzliche Normierung auf den maximal erreichten Wert unter diesen Testpulsen (I_{max}) durchgeführt. Diese Werte wurden gegen die Spannung des Zwischenpulsintervalls V aufgetragen. Als Fitfunktion diente eine Boltzmann-Gleichung:

$$I_{\text{test}} / I_{\text{max}} = (1 - A_0) / (1 + e^{V - V_{1/2} / k}) + A_0$$

$V_{1/2}$ = Spannung der halbmaximalen Inaktivierung

k = Steigungsfaktor der Kurve bei $V_{1/2}$

A_0 = Offset-Amplitude

Der Steigungsfaktor k beschreibt den Kurvenverlauf im Bereich der größten Dynamik. Er gibt den Spannungsbereich an, in dem die Stromamplitude um den Faktor e steigt. Je höher der Steigungsfaktor, desto flacher der Kurvenverlauf. In der vorliegenden Arbeit wird eine Verschiebung der Inaktivierungskurve zu negativeren bzw. zu weniger positiven Potentialen als Linksverschiebung und zu weniger negativen bzw. positiveren Potentialen als Rechtsverschiebung bezeichnet.

3.3.8.5 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Um die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung darzustellen, wurde die maximale Stromamplitude (I_{max}) im IV-Aktivierungs-Protokoll gemessen und in die Leitfähigkeit (G) umgerechnet:

$$G = I_{max} / (V_{test} - V_0)$$

V_{test} = angelegtes Testpotential

V_0 = Membranpotential, bei dem der Nettostrom 0 ist; hier bei -80 mV

(Umkehrpotential)

Die Werte für die Leitfähigkeiten wurden auf ihr jeweiliges Maximum (G_{max}) normiert und gegen das Membranpotential (V_{test}) aufgetragen. Den daraus resultierenden Datenpunkten wurde eine Boltzmanngleichung 4. Ordnung angepasst:

$$G / G_{max} = 1 / (1 + e^{(V - V_{1/2}') / k})^4$$

$V_{1/2}'$ = Spannung bei 6,5% der maximalen Aktivierung

k = Steigungsfaktor der Kurve bei $V_{1/2}$

$V_{1/2}$ wurde in der Software Kaleidagraph anhand der Kurven abgelesen, indem manuell mittels Cursor der Punkt der Kurve ermittelt wurde, der auf der y-Achse den Wert 0,5 hatte. Die zugehörige x-Koordinate entspricht $V_{1/2}$. Genau wie bei der Steady-State-Inaktivierung wurde in der vorliegenden Arbeit eine Verschiebung der Aktivierungskurve zu weniger positiven bzw. negativeren Potentialen als Linksverschiebung und eine Verschiebung zu weniger negativen bzw. positiveren Potentialen als Rechtsverschiebung bezeichnet.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und wie die Coexpression des lysosomalen Proteins CLN3 die KChIP3-vermittelte Modulation von Kv4.2-Kanälen beeinflusst. Hierfür sollte zunächst die bereits bekannte KChIP3-vermittelte Modulation von Kv4.2-Kanälen bestätigt werden (Kapitel 4.1). Im nächsten Kapitel (4.2) werden die Effekte von CLN3-Coexpression auf Kv4.2-Kanäle beschrieben. Das letzte Kapitel (4.3) behandelt schließlich die Stromeigenschaften des Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexes bei zusätzlicher Coexpression von CLN3 (Wildtyp und Mutanten).

4.1 Modulation von Kv4.2-Kanälen durch KChIP3 (Kontrolle)

KChIP3 bindet als β -Untereinheit an Kv4.2-Kanäle und beeinflusst deren Stromeigenschaften. Zu dieser Modulation gehören eine Erhöhung der Stromdichte, eine initiale Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung, eine Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung sowie eine Rechtsverschiebung der Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung und eine Linksverschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (An et al. 2000). Um diese Modulation zu bestätigen, wurden Kv4.2-Kanäle allein oder zusammen mit KChIP3 in HEK293-Zellen exprimiert und die Kanaleigenschaften an den folgenden zwei Tagen untersucht. Bei der Stromdichte und der Erholung von der Inaktivierung wurden die Daten vom 1. und 2. Tag nach Transfektion getrennt dargestellt, da sich in diesen Parametern wesentliche Unterschiede zwischen den Messtagen zeigten.

4.1.1 Stromdichte

Bekannt ist, dass Coexpression von KChIP3 zu einer Erhöhung der Kv4.2-Kanaldichte in der Zellmembran führt. Aufgrund der höheren Anzahl an Kanälen sollte sich auch die Stromamplitude bei einem definierten Testpotenzial erhöhen. Bereits am 1. Tag nach Transfektion ließen sich durch depolarisierende Pulse typische A-Typ-Ströme mit schneller Aktivierung und schneller Inaktivierung messen. Die Stromamplitude von homomeren Kv4.2-Kanälen lag am 1. Tag bei $2,16 \pm 0,41$ nA ($n = 7$) bzw. am 2. Tag

nach Transfektion bei $3,31 \pm 0,62$ nA ($n = 12$). Abbildung 4.1 A + B zeigen die Erhöhung der Stromamplituden bei Coexpression von KChIP3 an beiden Messtagen. Die Stromamplituden erhöhten sich am 1. Tag nach Transfektion auf $12,7 \pm 2,6$ nA ($n = 15$) und am 2. Tag auf $19,4 \pm 2,9$ nA ($n = 9$). Die Stromdichte lag bei den homomeren Kv4.2-Kanälen bei 125 ± 16 pA/pF ($n = 7$) am 1. Tag nach Transfektion bzw. 216 ± 39 pA/pF ($n = 12$) am 2. Tag.

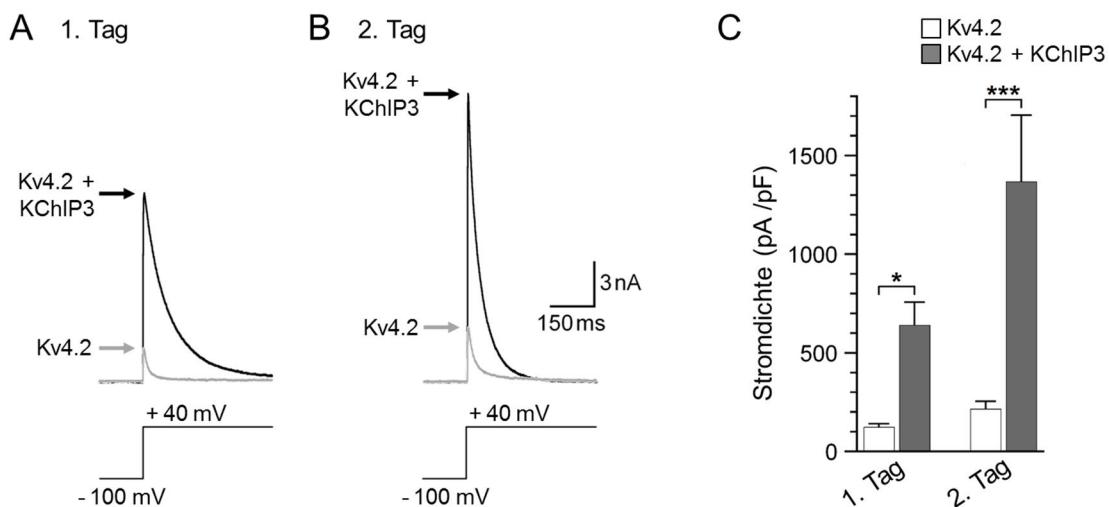


Abbildung 4.1: KChIP3-Modulation von Amplitude und Dichte Kv4.2-vermittelter Ströme
A u. B: Stromkurven bei einem Rechteckpuls von -100 mV auf +40 mV von — Kv4.2 und — Kv4.2 + KChIP3 am 1. und 2. Tag nach Transfektion. C: Stromdichten von Kv4.2 ± KChIP3 (unterteilt in 1. und 2. Tag) (Signifikanz: * $p < 0,05$; *** $p \leq 0,0001$).

Durch Coexpression von KChIP3 wurden die Stromdichten signifikant am 1. Tag um das 5-fache auf 645 ± 114 pA/pF ($p < 0,05$; $n = 15$) gesteigert und am 2. Tag um mehr als das 6-fache auf 1370 ± 340 pA/pF ($p \leq 0,0001$; $n = 9$) (Abbildung 4.1 C). Außerdem zeigte sich, dass am 2. Tag nach Transfektion die Stromdichte sowohl für Kv4.2 als auch für Kv4.2 + KChIP3 im Vergleich zum 1. Tag signifikant zugenommen hatte (beide: $p < 0,05$).

4.1.2 Makroskopische Inaktivierung

Wie in Abbildung 4.2 A zu sehen ist, weisen Kv4.2-Kanäle nach Depolarisation eine schnelle makroskopische Inaktivierung auf. Die komplexe Inaktivierungskinetik wurde durch die Summe von drei Exponentialfunktionen beschrieben (Kapitel 3.3.8.2). Dabei erhielt man folgende Zeitkonstanten mit ihren relativen Amplituden: $\tau_1 = 12,8 \pm 0,7$ ms

($72,4 \pm 2,8\%$; $n = 19$), $\tau_2 = 57,4 \pm 5,1$ ms ($22,8 \pm 2,7\%$) und $\tau_3 = 1530 \pm 240$ ms ($4,8 \pm 0,4\%$) (Abbildung 4.2 B). Bei Coexpression von KChIP3 veränderte sich die Inaktivierungskinetik der Kanäle wie folgt: Die initiale und mittlere Komponente der Inaktivierung verlangsamten sich, sodass sich die Zeitkonstanten signifikant auf einen Wert von $\tau_1 = 29,9 \pm 1,4$ ms ($26,2 \pm 1,6\%$; $p \leq 0,0001$; $n = 22$) und $\tau_2 = 81,6 \pm 5,1$ ms ($69,9 \pm 2,0\%$; $p < 0,05$) erhöhten. Die langsame Komponente dagegen wurde auf $\tau_3 = 608 \pm 80$ ms ($3,9 \pm 0,4\%$; $p < 0,05$) vermindert (Abbildung 4.2 B).

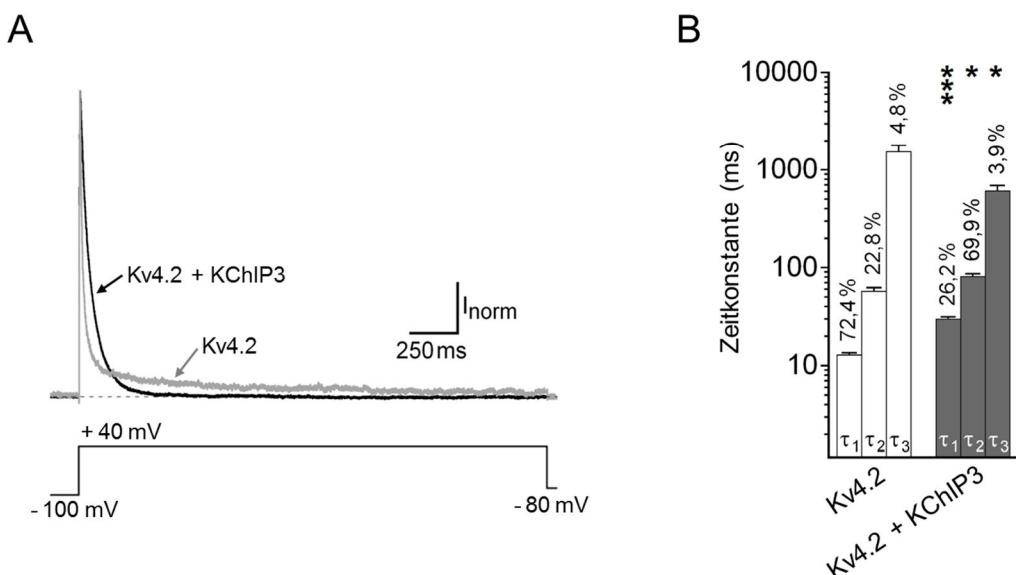


Abbildung 4.2: KChIP3-Modulation von der makroskopischen Inaktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme

A: Normierte Stromkurven bei einem Rechteckpuls von -100 mV auf +40 mV von — Kv4.2 und — Kv4.2 + KChIP3 (1. und 2. Tag kumuliert). **B:** Zeitkonstanten der makroskopischen Inaktivierung von Kv4.2 ± KChIP3 (1. und 2. Tag kumuliert) (Signifikanz: * $p < 0,05$; *** $p \leq 0,0001$).

Daher kreuzten sich die aufeinander normierten Stromkurven von Kv4.2 und Kv4.2 + KChIP3 (Abbildung 4.2 A). Auch die Änderung der Amplitudenanteile der Zeitkonstanten bei Coexpression von KChIP3 war signifikant ($p_{\tau 1/2/3} \leq 0,0001$). Unterschiede zwischen dem 1. und 2. Tag nach Transfektion zeigten sich weder bei Kv4.2 allein noch bei Kv4.2 + KChIP3.

4.1.3 Erholung von der Inaktivierung

Als nächstes wurde die Erholung der Kv4.2-Kanäle von der Inaktivierung untersucht. Abbildung 4.3 A + B zeigen solche Experimente. Es ist deutlich zu sehen, dass sich

mit zunehmender Zwischenpulsdauer mehr Kanäle aktivieren ließen, was sich in der Zunahme der Testpulsamplitude zeigte. Außerdem ist festzustellen, dass KChIP3 die Erholung von der Inaktivierung beschleunigte. So ließen sich bei Coexpression von KChIP3 schon nach kurzen Zwischenpulsintervallen höhere Stromamplituden auslösen und die vollständige Erholung wurde früher erreicht als bei Kv4.2 allein.

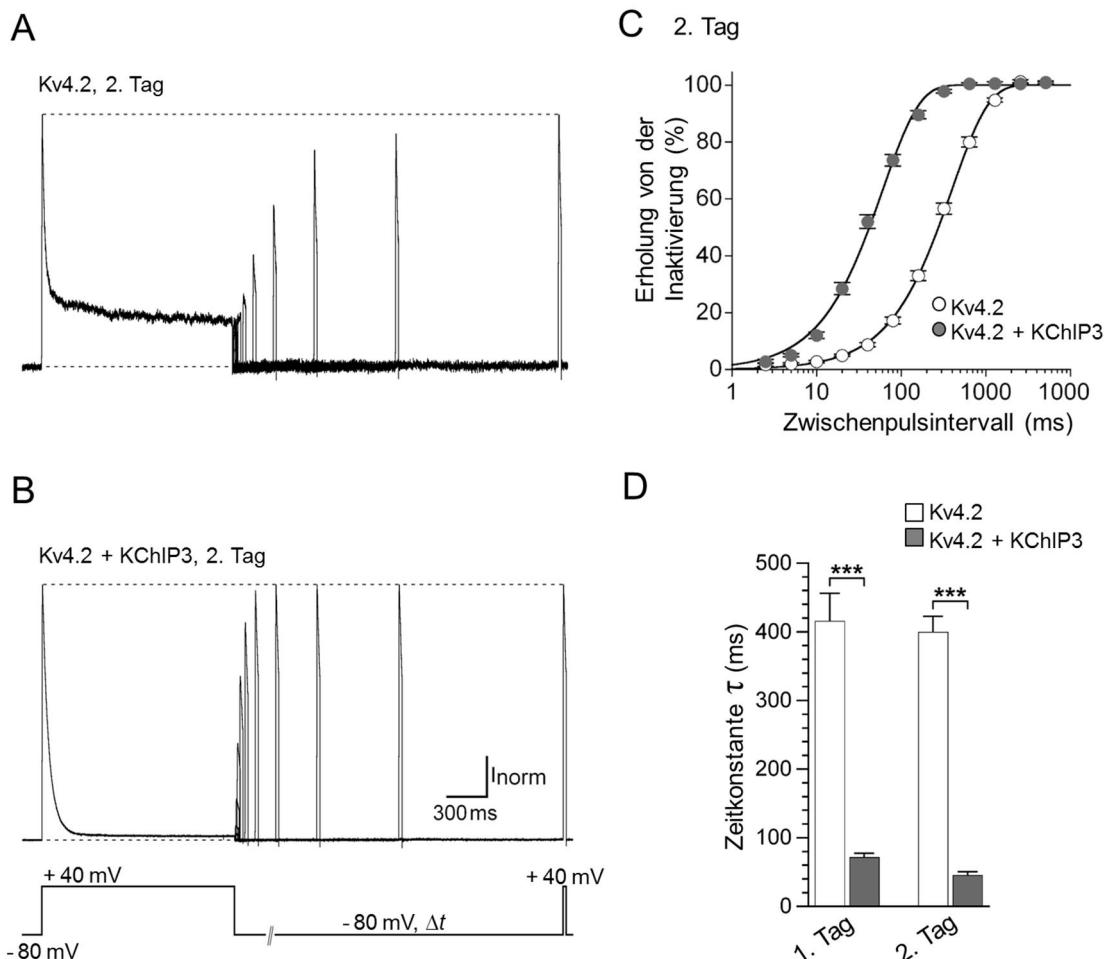


Abbildung 4.3: KChIP3-Modulation von der Erholung von der Inaktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme

A u. B: Normierte Stromkurven von Kv4.2 ± KChIP3 am 2. Tag nach Transfektion, evoziert mit dem Recovery-Protokoll (hier 11 Pulse gezeigt). ... Höhe des Peakstroms während des Testpulses, welcher die maximal aktivierbaren (vollständig erholten) Kv4.2-Kanäle demonstriert. C: Recovery-Kinetik von Kv4.2 ± KChIP3 am 2. Tag nach Transfektion (einfach-exponentiell). D: Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2 ± KChIP3 (unterteilt in 1. und 2. Tag) (Signifikanz: *** p ≤ 0,0001).

In Abbildung 4.3 C sind die relativen Testpulsamplituden semilogarithmisch gegen das Zwischenintervall aufgetragen. Den Daten wurde eine einfache-exponentielle Funktion angepasst (Kapitel 3.3.8.3). Am 1. Tag nach Transfektion war die Zeitkonstante der

Recovery-Kinetik des Kv4.2-Kanals ($\tau = 416 \pm 40$ ms; $n = 6$) durch KChIP3 auf $\tau = 71,8 \pm 5,9$ ms ($p \leq 0,0001$; $n = 11$) signifikant reduziert (Abbildung 4.3 D). Bei den homomeren Kv4.2-Kanälen fand sich keine Abhängigkeit vom Messzeitpunkt mit $\tau = 400 \pm 23$ ms ($n = 11$) am 2. Tag nach Transfektion. Bei Coexpression von KChIP3 beschleunigte sich die Erholung von der Inaktivierung am 2. Tag auf $\tau = 45,7 \pm 5,1$ ms ($p \leq 0,0001$; $n = 6$). Die KChIP3-Modulation zeigte sich demnach wie bei der Stromdichte (Kapitel 4.1.1) am 2. Tag nach Transfektion stärker ($p < 0,05$).

4.1.4 Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung

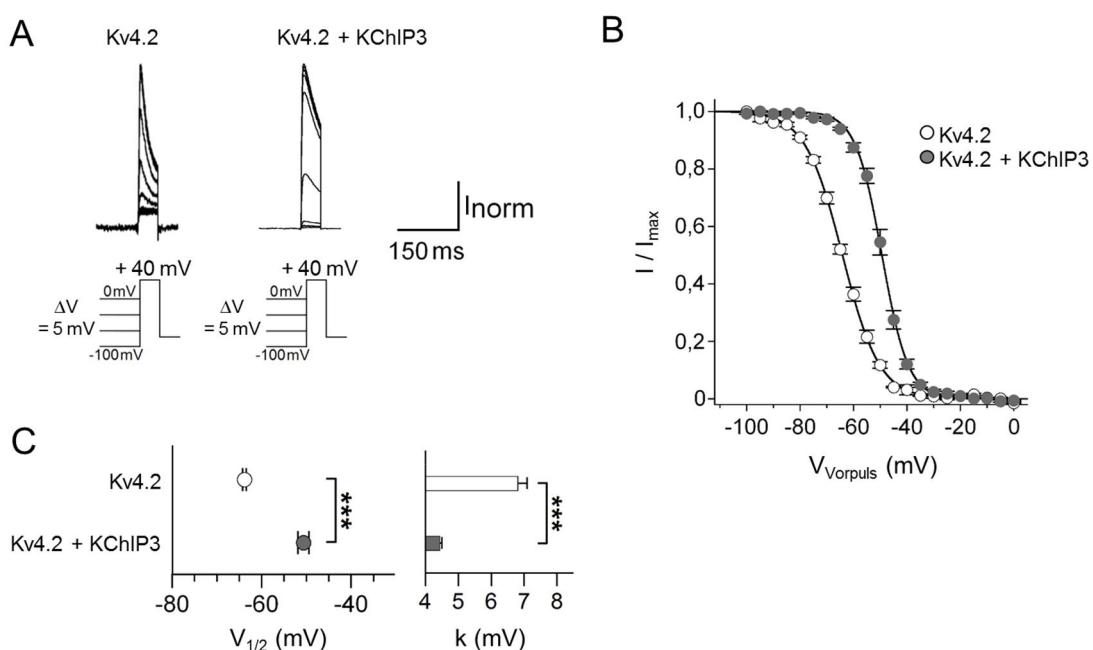


Abbildung 4.4: KChIP3-Modulation von der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme

A: Normierte Stromkurven von Kv4.2 ± KChIP3, evoziert mit dem Steady-State-Inaktivierungs-Protokoll. **B:** Inaktivierungskurve von Kv4.2 ± KChIP3 (1. und 2. Tag kumuliert). **C:** $V_{1/2}$ und k der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2 ± KChIP3 (1. und 2. Tag kumuliert) (Signifikanz: *** $p \leq 0,0001$).

Zur Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung wurde das Steady-State-Inaktivierungs-Protokoll (Kapitel 3.3.7.3) verwendet. Die hieraus resultierenden Testpulsamplituden, wie sie in Abbildung 4.4 A zu sehen sind, wurden auf ihr Maximum normiert und gegen die Vorpulsspannung aufgetragen (Kapitel 3.3.8.4). Bei Coexpression von KChIP3 kam es zu einer Rechtsverschiebung sowie zu einem steileren Verlauf der Steady-State-Inaktivierungskurve (Abbildung 4.4 B). $V_{1/2}$ und k

lagen bei Kv4.2 allein bei $V_{1/2} = -63,8 \pm 0,4$ mV ($n = 14$) und $k = 6,80 \pm 0,29$ mV und bei Coexpression von KChIP3 bei $V_{1/2} = -50,7 \pm 1,2$ mV ($p \leq 0,0001$; $n = 11$) und $k = 4,43 \pm 0,07$ mV ($p \leq 0,0001$) (Abbildung 4.4 C). Es fanden sich weder bei Kv4.2 noch bei Kv4.2 + KChIP3 signifikante Unterschiede zwischen dem 1. und 2. Tag nach Transfektion.

4.1.5 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Um zu untersuchen bei welchen Potentialen die Aktivierung stattfindet, wurde das IV-Aktivierungs-Protokoll verwendet (Kapitel 3.3.7.4). Abbildung 4.5 A zeigt normierte Beispiele gemessener Stromkurven. Die maximale Stromamplitude wurde auf die Leitfähigkeit der Kanäle umgerechnet und gegen die Testpulsspannung aufgetragen. Durch Angleichen einer Boltzmannfunktion 4. Ordnung erhielt man die Spannung der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$ sowie den Steigungsfaktor k (Kapitel 3.3.8.5).

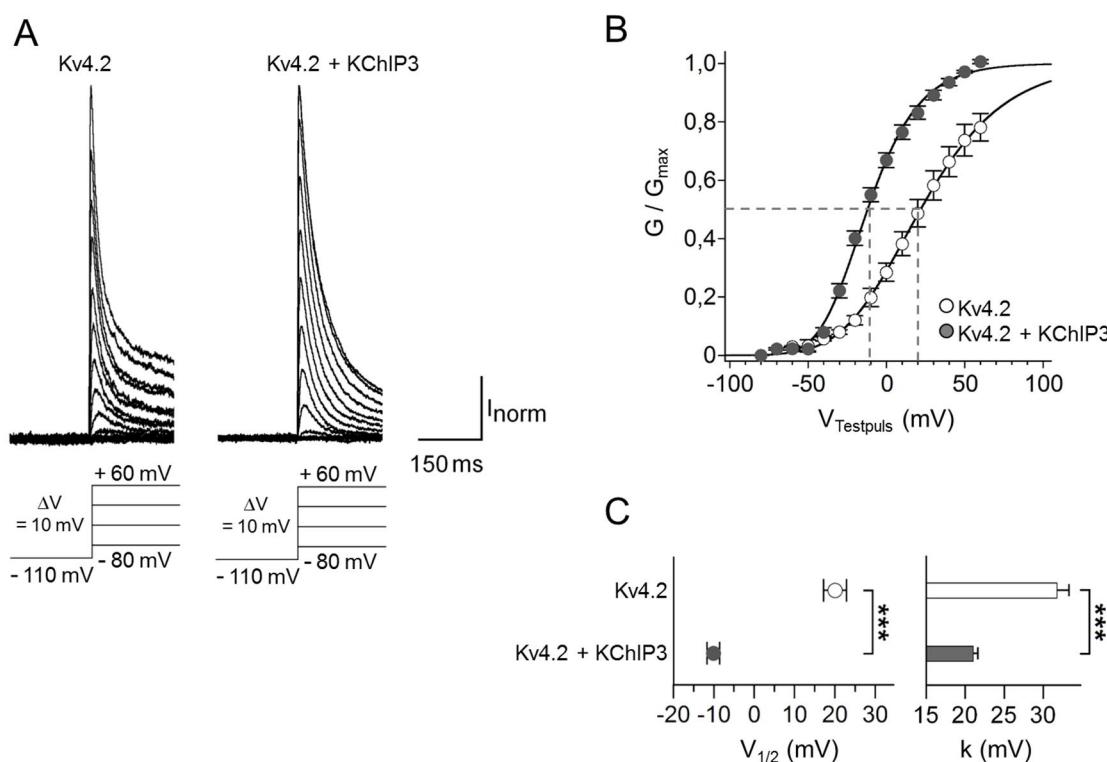


Abbildung 4.5: KChIP3-Modulation von der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme

- A: Normierte Stromkurven von Kv4.2 ± KChIP3, evoziert mit dem IV-Aktivierungs-Protokoll.
- B: Aktivierungskinetik von Kv4.2 ± KChIP3 (1. und 2. Tag kumuliert). ... Darstellung von $V_{1/2}$.
- C: $V_{1/2}$ und k der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2 ± KChIP3 (1. und 2. Tag kumuliert) (Signifikanz: *** $p \leq 0,0001$).

Bei Kv4.2-Kanal allein waren $V_{1/2} = +20,0 \pm 2,8$ mV ($n = 13$) und $k = 31,7 \pm 1,6$ mV. Wie Abbildung 4.5 B zeigt, kam es bei Coexpression von KChIP3 zu einer Linkverschiebung der Aktivierungskurve mit $V_{1/2} = -10,1 \pm 1,5$ mV ($p \leq 0,0001$; $n = 12$). Auch der Kurvenverlauf zeigte sich deutlich steiler mit $k = 21,0 \pm 0,7$ mV ($p \leq 0,0001$) (Abbildung 4.5 C). Es fanden sich weder bei Kv4.2-Kanal allein noch bei Coexpression von KChIP3 signifikante Unterschiede zwischen den beiden Messtagen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Experimente die bekannte KChIP3-vermittelte Modulation des Schaltverhaltens von Kv4.2-Kanälen bestätigten. Zudem wurde gezeigt, dass sich die KChIP3-Modulation der Stromdichte und der Erholung von der Inaktivierung am 2. Tag nach Transfektion verstärkte.

4.2 Direkte Effekte einer CLN3wt-Coexpression auf das Schaltverhalten von Kv4.2-Kanälen

Als nächstes wurde untersucht, ob und welche Effekte eine Coexpression von CLN3-Wildtyp (CLN3wt) auf das Schaltverhalten der Kv4.2-Kanäle hat. Dafür wurde CLN3wt in HEK293-Zellen mit homomeren Kv4.2-Kanälen coexprimiert und die Stromdichte, die makroskopische Inaktivierung, die Erholung von der Inaktivierung sowie die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung untersucht. Die Ergebnisse wurden mit den bereits ermittelten Werten für Kv4.2 ohne KChIP3-Coexpression aus Kapitel 4.1 verglichen und auf Signifikanzen in Bezug auf die Werte für homomere Kv4.2-Kanäle getestet.

4.2.1 Stromdichte

Abbildung 4.6 A + B zeigen die Stromamplituden von Kv4.2 sowie Kv4.2 + CLN3wt an beiden Messtagen. Bei Coexpression von CLN3wt fand sich weder am 1. Tag nach Transfektion auf die Stromamplitude mit $3,30 \pm 0,85$ nA ($n = 9$) oder auf die Stromdichte mit 186 ± 49 pA/pF ein signifikanter Effekt noch am 2. Tag auf die Stromamplitude mit $2,92 \pm 0,77$ nA oder auf die Stromdichte mit 161 ± 37 pA/pF ($n = 12$) (Abbildung 4.6 C).

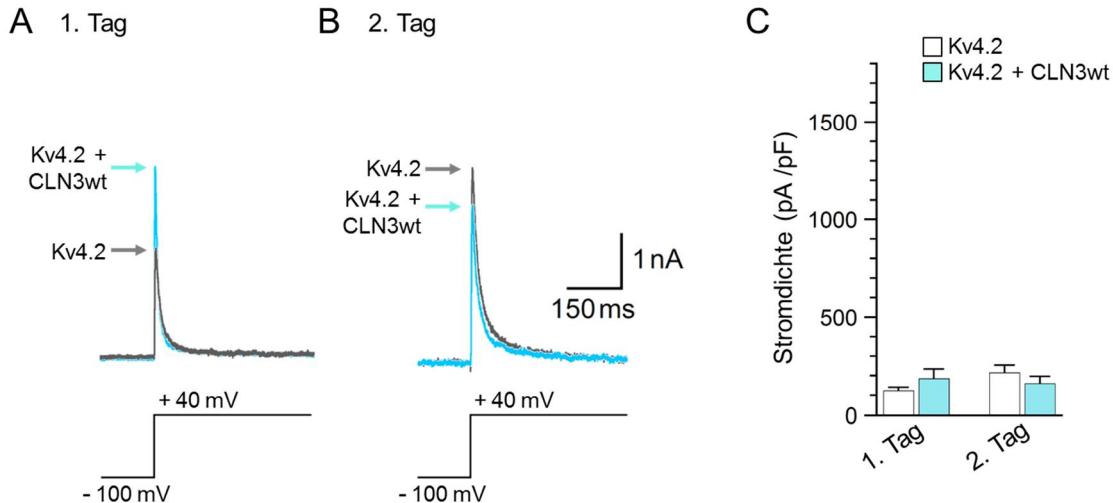


Abbildung 4.6: CLN3wt-Effekt auf Amplitude und Dichte Kv4.2-vermittelter Ströme
A u. B: Stromkurven bei einem Rechteckpuls von -100 mV auf +40 mV von — Kv4.2 und — Kv4.2 + CLN3wt am 1. und 2. Tag nach Transfektion. **C:** Stromdichten von Kv4.2 ± CLN3wt (unterteilt in 1. und 2. Tag).

4.2.2 Makroskopische Inaktivierung

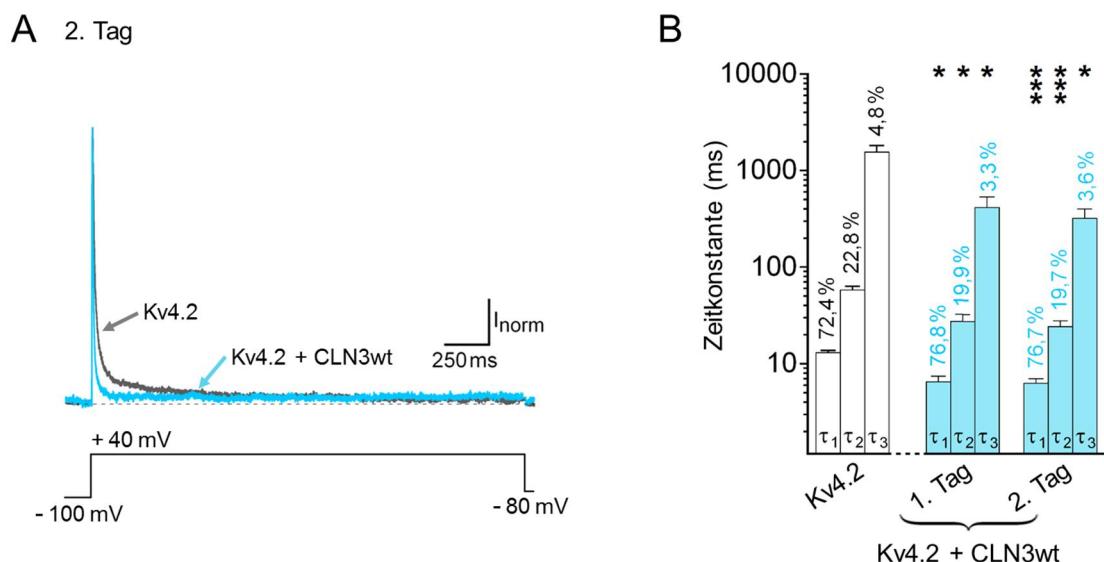


Abbildung 4.7: CLN3wt-Effekt auf die makroskopische Inaktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme
A: Normierte Stromkurven bei einem Rechteckpuls von -100 mV auf +40 mV von — Kv4.2 und — Kv4.2 + CLN3wt am 2. Tag nach Transfektion. **B:** Zeitkonstanten der makroskopischen Inaktivierung von Kv4.2 (1. und 2. Tag kumuliert) und Kv4.2 + CLN3wt (unterteilt in 1. und 2. Tag) (Signifikanz: * p < 0,05; *** p ≤ 0,0001).

Wie in Abbildung 4.7 A zu sehen ist, wurde bei Coexpression von CLN3wt die makroskopische Inaktivierung der Kv4.2-Kanäle beschleunigt. Die drei Zeitkonstanten

von Kv4.2 + CLN3wt waren am 1. Tag nach Transfektion mit $\tau_1 = 6,46 \pm 0,92$ ms ($76,8 \pm 3,4\%$; $p < 0,05$; $n = 9$), $\tau_2 = 27,3 \pm 5,1$ ms ($19,9 \pm 3,1\%$; $p < 0,05$) und $\tau_3 = 402 \pm 111$ ms ($3,3 \pm 0,9\%$; $p < 0,05$) signifikant niedriger verglichen mit den Zeitkonstanten von homomeren Kv4.2-Kanälen (Abbildung 4.7 B). Im Vergleich zwischen den beiden Messtagen war kein signifikanter Unterschied bezüglich des CLN3wt-Effekts zu erkennen. Die drei Zeitkonstanten von Kv4.2 + CLN3wt am 2. Tag nach Transfektion lagen bei $\tau_1 = 6,31 \pm 0,69$ ms ($76,7 \pm 4,1\%$; $p \leq 0,0001$; $n = 10$), $\tau_2 = 24,2 \pm 3,6$ ms ($19,7 \pm 3,6\%$; $p \leq 0,0001$) und $\tau_3 = 321 \pm 79$ ms ($3,6 \pm 0,6\%$; $p < 0,05$). Jedoch fiel auf, dass das Signifikanzniveau am 2. Tag deutlich höher war (trotz fast gleicher n-Zahlen der Messungen).

4.2.3 Erholung von der Inaktivierung

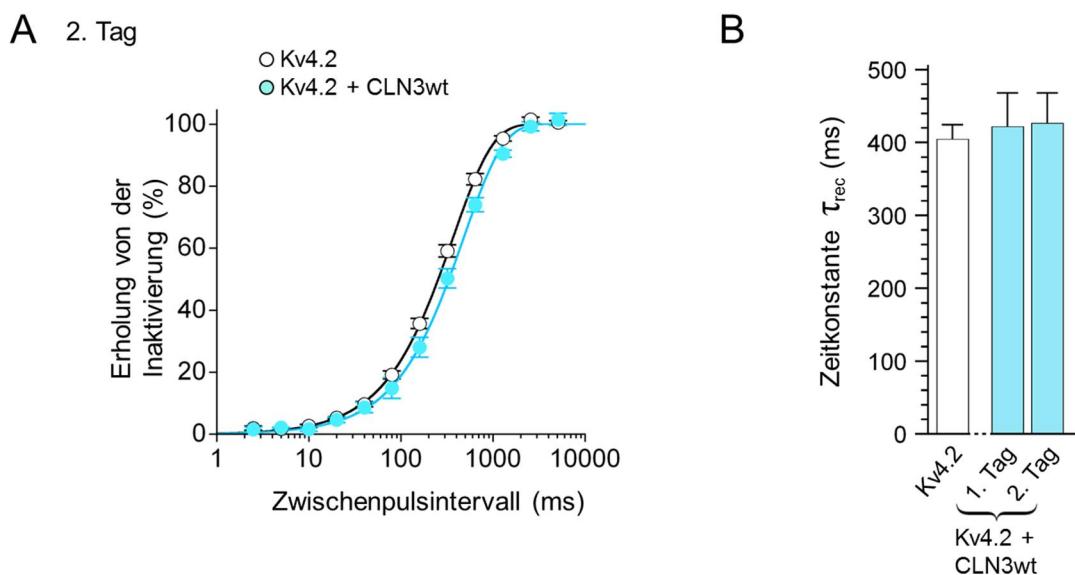


Abbildung 4.8: CLN3wt-Effekt auf die Erholung von der Inaktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme

A: Recovery-Kinetik von Kv4.2 ± CLN3wt am 2. Tag nach Transfektion (einfach-exponentieller Fit). **B:** Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2 (1. und 2. Tag kumuliert) und Kv4.2 + CLN3wt (unterteilt in 1. und 2. Tag; gewichtete Recovery-Zeitkonstante am 2. Tag).

Bei Coexpression von CLN3wt veränderte sich die Erholung von der Inaktivierung nicht (Abbildung 4.8 A). Es ließ sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messtagen finden. Am 1. Tag nach Transfektion war bei Kv4.2 + CLN3wt $\tau = 422 \pm 46$ ms ($n = 6$) und am 2. Tag die gewichtete Zeitkonstante $\tau_w = 427 \pm 41$ ms ($n = 8$) (Abbildung 4.8 B). Zu bemerken ist, dass 1 von 8 Zellen bei Coexpression von

CLN3wt am 2. Tag eine doppelt-exponentielle Recovery-Kinetik mit $\tau_1 = 283$ ms (87,1%) und $\tau_2 = 3260$ ms (12,9%) zeigte.

4.2.4 Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung

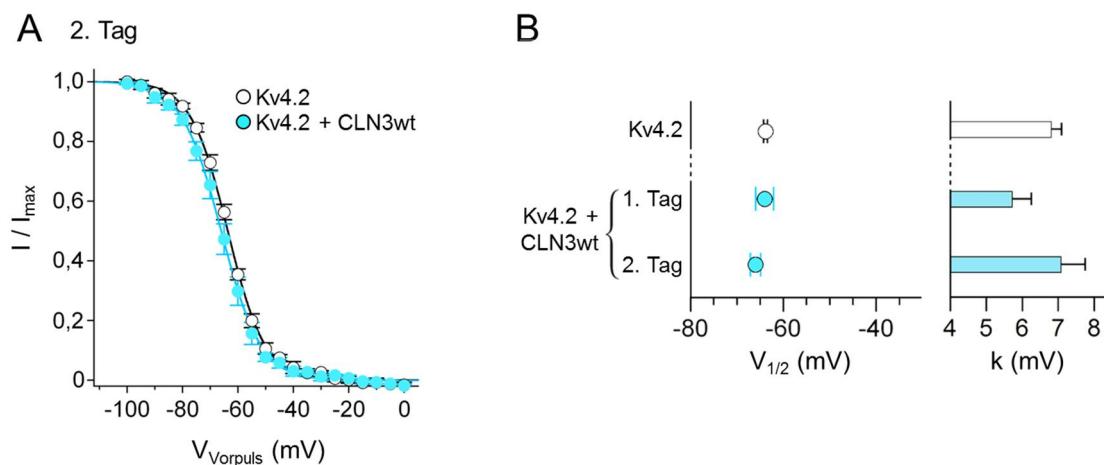


Abbildung 4.9: CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme

A: Inaktivierungskurve von Kv4.2 ± CLN3wt am 2. Tag nach Transfektion. **B:** $V_{1/2}$ und k der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2 (1. und 2. Tag kumuliert) und Kv4.2 + CLN3wt (unterteilt in 1. und 2. Tag).

Wie in Abbildung 4.9 A zu sehen ist, übte die Coexpression von CLN3wt zu homomeren Kv4.2-Kanälen am 2. Tag nach Transfektion (sowie auch am 1. Tag) keinen signifikanten Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2-Kanälen aus. So waren am 1. Tag nach Transfektion $V_{1/2} = -64,0 \pm 1,9$ mV ($n = 5$) und $k = 5,71 \pm 0,54$ mV und am 2. Tag $V_{1/2} = -66,2 \pm 1,1$ mV ($n = 5$) und $k = 7,07 \pm 0,69$ mV (Abbildung 4.9 B).

4.2.5 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Abbildung 4.10 A zeigt, dass die Coexpression von CLN3wt keinen Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2-Kanälen hatte. Die Spannung der halbmaximalen Aktivierung lag bei $V_{1/2} = +14,5 \pm 1,3$ mV ($k = 29,2 \pm 3,4$ mV; $n = 3$) am 1. Tag nach Transfektion und bei $V_{1/2} = +18,3 \pm 1,2$ mV ($k = 25,7 \pm 2,7$ mV; $n = 4$) am 2. Tag (Abbildung 4.10 B).

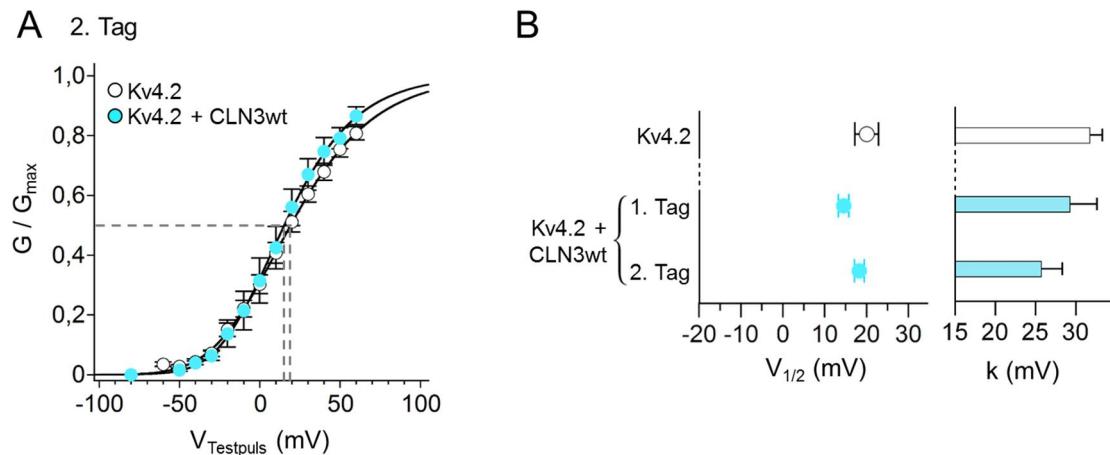


Abbildung 4.10: CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme

A: Aktivierungskinetik von Kv4.2 ± CLN3wt am 2. Tag nach Transfektion. ... Darstellung von $V_{1/2}$. B: $V_{1/2}$ und k der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2 (1. und 2. Tag kumuliert) und Kv4.2 + CLN3wt (unterteilt in 1. und 2. Tag).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Experimente einen direkten Effekt des CLN3-Wildtyp-Proteins ausschließlich auf die makroskopische Inaktivierung von Kv4.2-Kanälen zeigten.

4.3 Effekte von CLN3 auf die KChIP3-vermittelte Kv4.2-Kanalmodulation

Im Folgenden wurde der Effekt von CLN3wt sowie von zwei Mutanten ($\text{CLN3}_{\Delta C}$ und CLN3_{R334C}), die mit JNCL assoziiert werden, auf die Stromeigenschaften der Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe untersucht. Anlass hierfür waren Berichte über eine Bindung zwischen KChIP3 und CLN3wt (Chang et al. 2007).

4.3.1 Transiente Coexpression von Kv4.2, KChIP3 und CLN3wt in HEK293-Zellen

4.3.1.1 Abhängigkeit des CLN3wt-Effekts vom Messzeitpunkt

Es wurden Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt in HEK293-Zellen coexprimiert und die relevanten Parameter (Kapitel 3.3.8) bestimmt. Da sich in Kapitel 4.1 und 4.2 teilweise eine Zeitabhängigkeit sowohl der KChIP3-Modulation der Kv4.2-vermittelten Ströme

(Stromdichte und Erholung von der Inaktivierung) als auch der CLN3wt-Effekte auf homomere Kv4.2-Kanäle (veränderte Kinetik der makroskopischen Inaktivierung) zeigte, wurden auch im folgenden Kapitel die Daten für Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt an verschiedenen Tagen nach der Transfektion untersucht. Die Ergebnisse wurden mit den bereits ermittelten Daten für Kv4.2 und Kv4.2 + KChIP3 aus Kapitel 4.1 verglichen. Dabei beziehen sich die Signifikanzen auf den Unterschied zu Kv4.2 + KChIP3 des jeweiligen Messtages (Ausnahme: 3. Tag nach Transfektion bei Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt wurde mit dem 2. Tag bei Kv4.2 + KChIP3 verglichen).

4.3.1.1.1 Stromdichte

Die Erhöhung der Stromdichte von Kv4.2-Kanälen bei Coexpression von KChIP3 wurde in Kapitel 4.1.1 gezeigt. Wie in Abbildung 4.11 A zu sehen ist, war die Zunahme der Stromamplitude bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt an allen drei Messtagen signifikant geringer.

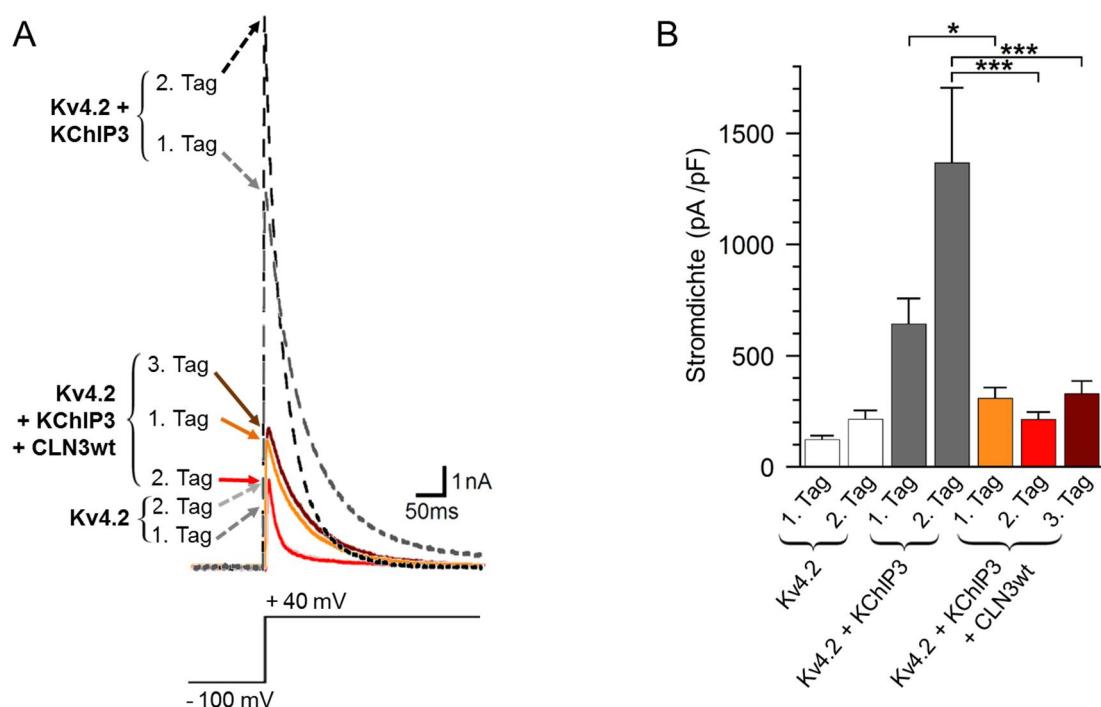


Abbildung 4.11: Zeitabhängiger CLN3wt-Effekt auf Amplitude und Stromdichte von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen

A: Stromkurven bei einem Rechteckpuls von -100 mV auf +40 mV von ...Kv4.2, ...Kv4.2 + KChIP3 am 1. und 2. Tag nach Transfektion und Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt am 1. Tag, 2. Tag und 3. Tag. B: Stromdichten von Kv4.2 ± KChIP3 (unterteilt in 1. und 2. Tag) und Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt (unterteilt in 1. Tag, 2. Tag und 3. Tag) (Signifikanz: * p < 0,05; *** p ≤ 0,0001).

Der Effekt war am 2. Tag nach Transfektion am stärksten, wo sich bei Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt die niedrigste Amplitude mit $3,29 \pm 4,9$ nA und damit auch niedrigste Stromdichte mit 215 ± 33 pA/pF ($p \leq 0,0001$; $n = 24$) aller drei Messstage zeigte, obwohl am 2. Tag die KChIP3-vermittelte Erhöhung der Stromdichte am stärksten ausgeprägt war (Abbildung 4.11 B). Hier unterschied sich die Stromdichte bei Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt nicht von der Stromdichte der homomeren Kv4.2-Kanäle. Tabelle 4.1 führt die einzelnen Daten der Amplitude und Stromdichte von Kv4.2 ± KChIP3 ± CLN3wt auf.

Tabelle 4.1: Amplitude und Stromdichte von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt

	Kv4.2		Kv4.2 + KChIP3		Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt		
	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag
Amplitude (nA)	2,16 ± 0,41	3,31 ± 0,62	12,7 ± 2,6	19,4 ± 2,9	4,29 ± 0,64	3,29 ± 0,49	4,48 ± 0,80
Stromdichte (pA/pF)	125 ± 16	216 ± 39	645 ± 114	1370 ± 340	311 ± 47	215 ± 33	330 ± 57
					$p < 0,05$	$p \leq 0,0001$	$p \leq 0,0001$
n	7	12	15	9	17	24	33

4.3.1.1.2 Makroskopische Inaktivierung

Die durch KChIP3-vermittelte Verlangsamung der Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 sowie die Beschleunigung von τ_3 der makroskopischen Inaktivierung der Kv4.2-Kanäle wurden in Kapitel 4.1.2 gezeigt. Bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt waren τ_1 und τ_2 der makroskopischen Inaktivierung weniger verlangsamt. Dies ist in Abbildung 4.12 A zu sehen, wo die Stromkurve von Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt zwischen den Strömen von Kv4.2 und Kv4.2 + KChIP3 verlief und beide Kurven kreuzte. Bei einem Vergleich von Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt an den drei Messtagen lässt sich am 2. Tag nach Transfektion die schnellste initiale Inaktivierungskinetik beobachten wie in Abbildung 4.12 B gezeigt. Dies spiegelt sich in signifikant erniedrigten τ_1 und τ_2 sowie auch in signifikant veränderten prozentualen Anteilen der Zeitkonstanten wider,

welche bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt $\tau_1 = 13,6 \pm 1,6$ ms ($49,2 \pm 6,5\%$; $p < 0,05$; $n = 22$), $\tau_2 = 55,4 \pm 4,8$ ms ($39,3 \pm 4,8\%$; $p < 0,05$) und $\tau_3 = 410 \pm 62$ ms ($11,5 \pm 2,6\%$) am 2. Tag nach Transfektion waren (Abbildung 4.12 C). Die restlichen Daten sind detailliert in Tabelle 4.2 aufgeführt.

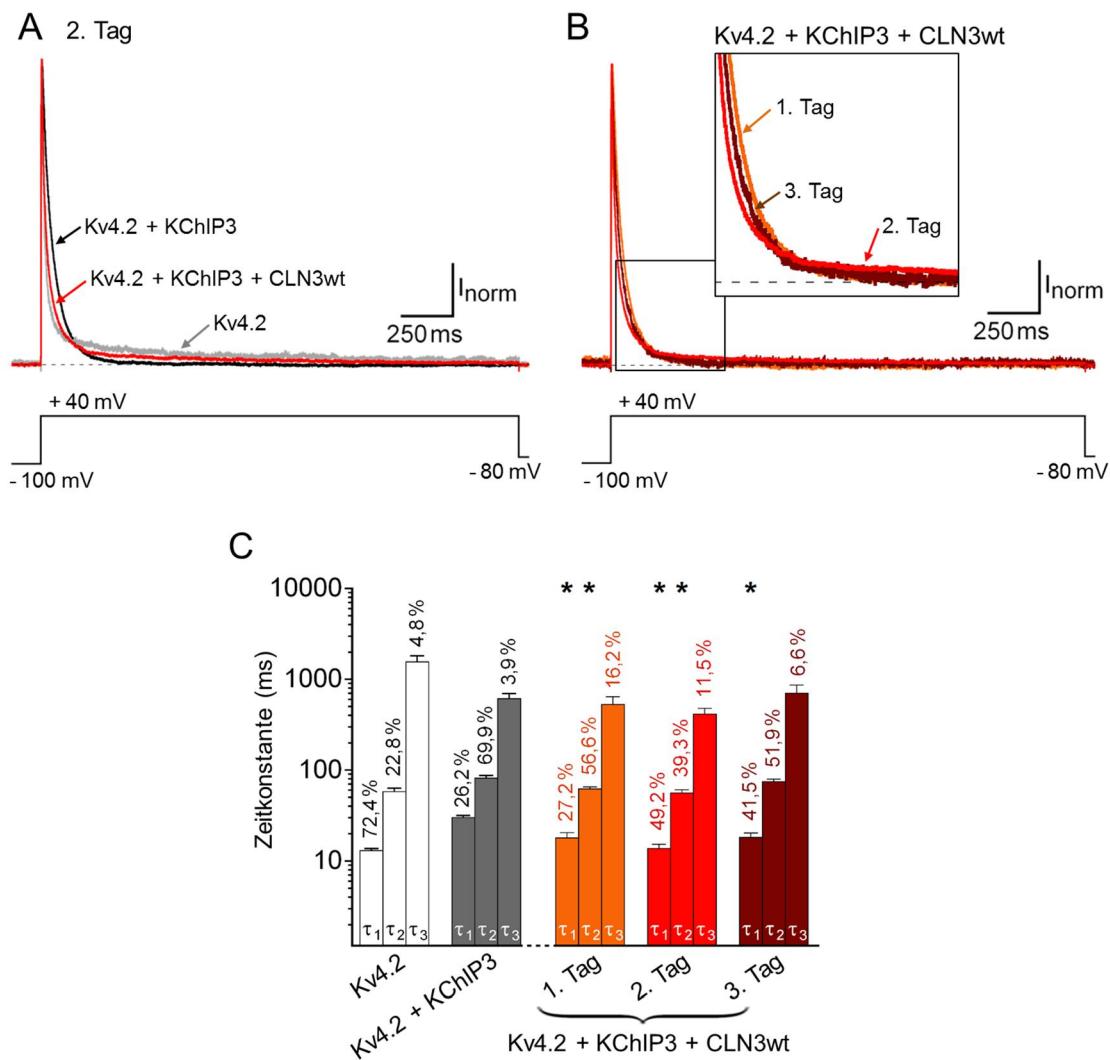


Abbildung 4.12: Zeitabhängiger CLN3wt-Effekt auf die makroskopische Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen

A: Normierte Stromkurven bei einem Rechteckpuls von -100 mV auf +40 mV von — Kv4.2, — Kv4.2 + KChIP3 und — Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt am 2. Tag nach Transfektion. **B:** Stromkurven (siehe A) von Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt am — 1. Tag, — 2. Tag und — 3. Tag nach Transfektion. Vergrößerung eines Bildausschnitts zur besseren Darstellung der relevanten Unterschiede. **C:** Zeitkonstanten der makroskopischen Inaktivierung von Kv4.2 ± KChIP3 (1. und 2. Tag kumuliert) und Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt (unterteilt in 1. Tag, 2. Tag und 3. Tag) (Signifikanz: * $p < 0,05$).

Tabelle 4.2: Zeitkonstanten der makroskopischen Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt

	Kv4.2	Kv4.2 + KChIP3	Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt		
			1. Tag	2. Tag	3. Tag
τ_1 (ms)	12,8 ± 0,7	29,9 ± 1,4	17,7 ± 2,5	13,6 ± 1,6	18,0 ± 2,2
			p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05
% τ_1	72,4 ± 2,8	26,2 ± 1,6	27,2 ± 3,9	49,2 ± 6,5	41,5 ± 5,3
			n. s.	p < 0,05	n. s.
τ_2 (ms)	57,4 ± 5,1	81,6 ± 5,1	61,5 ± 3,2	55,4 ± 4,8	73,8 ± 4,5
			p < 0,05	p < 0,05	n. s.
% τ_2	22,8 ± 2,7	69,9 ± 2,0	56,6 ± 4,3	39,3 ± 4,8	51,9 ± 5,0
			n. s.	p < 0,05	n. s.
τ_3 (ms)	1530 ± 240	608 ± 80	521 ± 110	410 ± 62	692 ± 159
			n. s.	n. s.	n. s.
% τ_3	4,8 ± 0,4	3,9 ± 0,4	16,2 ± 4,2	11,5 ± 2,6	6,6 ± 1,5
			p < 0,05	p < 0,05	n. s.
n	19	22	16	22	25

Bei Kv4.2 ± KChIP3 sind 1. und 2. Tag nach Transfektion kumuliert; n. s. = nicht signifikant.

4.3.1.1.3 Erholung von der Inaktivierung

Die durch KChIP3-vermittelte Beschleunigung der Recovery-Kinetik von Kv4.2-Kanälen wurde bereits in Kapitel 4.1.3 gezeigt. Bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt veränderte sich die Erholungskinetik derart, dass in vielen Messungen eine einfache-exponentielle Funktion zur Beschreibung der Erholungskinetik nicht geeignet war. Zur genaueren Anpassung wurde daher meist eine doppelt-exponentielle Funktion gewählt und eine gewichtete Zeitkonstante ermittelt (Kapitel 3.3.8.3). Auch zwischen den einzelnen Messungen gab es große Unterschiede, sodass sich die Zellen nach dem Verlauf der Erholung von der Inaktivierung in drei Gruppen unterteilen ließen: die Zellen mit einfacher-exponentieller schnellerer Erholungskinetik ($\tau < 80$ ms), die mit

doppelt-exponentieller Erholungskinetik (mit kleinem τ_1 und großem τ_2) und die mit einfache-exponentieller langsamer Erholungskinetik ($\tau > 150$ ms).

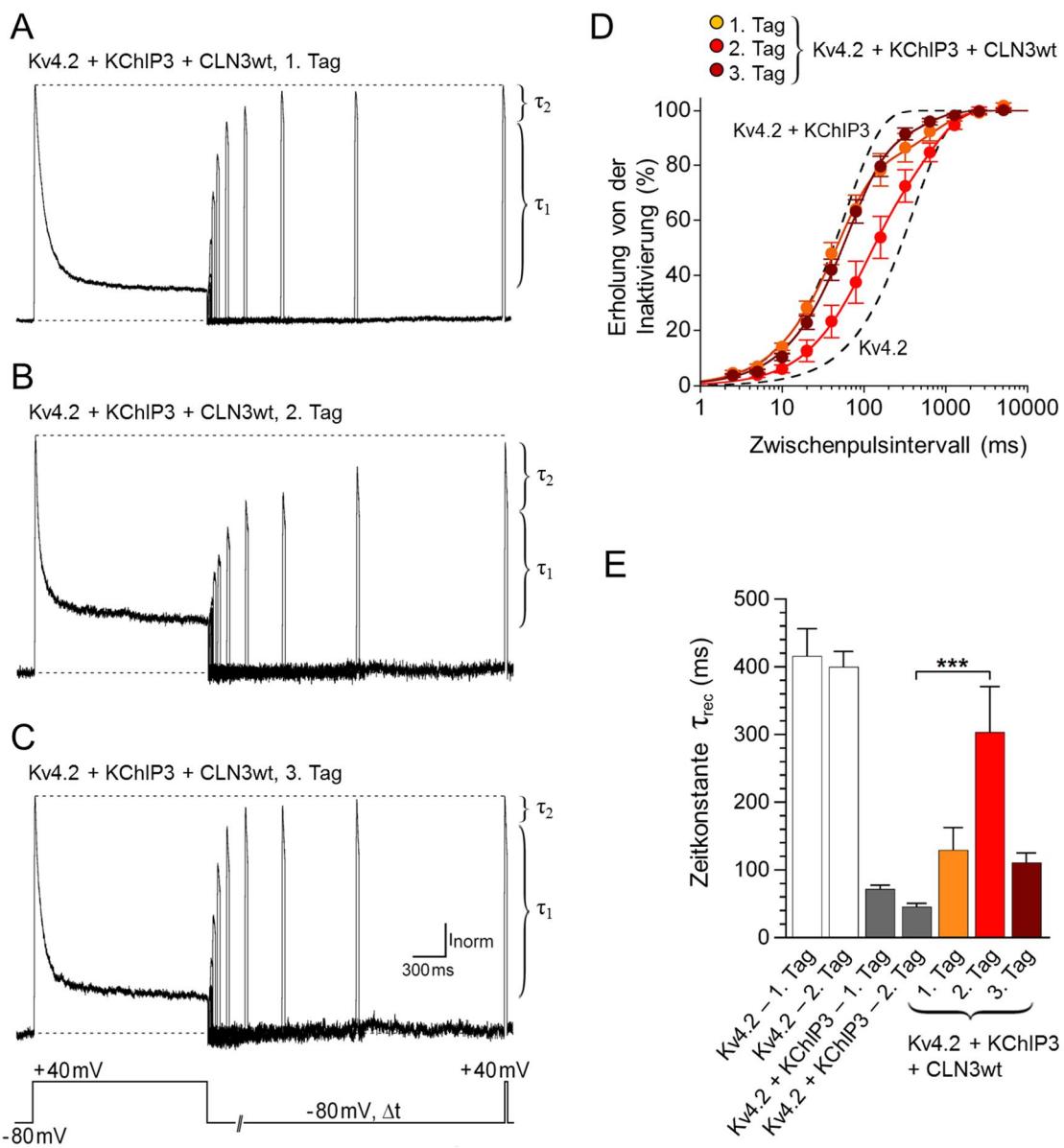


Abbildung 4.13: Zeitabhängiger CLN3wt-Effekt auf die Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen

A – C: Normierte Stromkurven von Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt am 1., 2. und 3. Tag nach Transfektion, evoziert mit dem Recovery-Protokoll (hier 11 Pulse gezeigt). ... Höhe des Peakstroms während des Testpulses, welcher die maximal aktivierbaren (vollständig erholten) Kv4.2-Kanäle demonstriert. **D:** Recovery-Kinetik mit ... Anpassung einer einfache-exponentiellen Funktion an die Daten von Kv4.2 ± KChIP3 (1. und 2. Tag kumuliert). Die restlichen Fit-Kurven beschreiben die Recovery-Kinetik für Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt am 1. Tag, – 2. Tag und – 3. Tag nach Transfektion (doppelt-exponentielle Funktion). **E:** Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2 ± KChIP3 (unterteilt in 1. und 2. Tag) und gewichtete Recovery-Zeitkonstanten von Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt (unterteilt in 1. Tag, 2. Tag und 3. Tag) (Signifikanz: *** p ≤ 0,0001).

Tabelle 4.3: Zeitkonstanten (in Subgruppen) der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt

		Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt					
		1. Tag	n	2. Tag	n	3. Tag	n
einfach-exponentiell, schnell	τ (ms)	69,8 \pm 6,2	2	54,8	1	61,2 \pm 6,6	3
doppelt-exponentiell	τ_1 (ms)	45,7 \pm 2,0	11	108 \pm 52	8	61,3 \pm 6,4	16
	% τ_1	78,4 \pm 3,5		82,9 \pm 3,5		85,3 \pm 1,8	
	τ_2 (ms)	405 \pm 90		1410 \pm 660		528 \pm 85	
	% τ_2	21,6 \pm 3,5		17,1 \pm 3,5		14,7 \pm 1,8	
einfach-exponentiell, langsam	τ (ms)	/	0	342 \pm 51	6	/	0

Unterteilt in folgende Subgruppen: einfache-exponentiell mit schneller Erholungskinetik ($\tau < 80$ ms), doppelt-exponentiell und einfache-exponentiell mit langsamer Erholungskinetik ($\tau > 150$ ms).

In Tabelle 4.3 sind die Daten dieser Subgruppierungen aufgeführt. Um die Subgruppen miteinander vergleichen zu können, wurden gewichtete Zeitkonstanten errechnet, welche Tabelle 4.4 zeigt. Bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt war die Erholung von der Inaktivierung der Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe verlangsamt, wie in Abbildung 4.13 A - C dargestellt. Hier fanden sich auch Zellen mit doppelt-exponentieller Erholungskinetik. In Abbildung 4.13 D ist der doppelt-exponentielle Verlauf der Recovery-Kinetik bei zusätzlicher CLN3wt-Coexpression am eindrücklichsten bei den Daten des 1. Messtages zu sehen. Am 2. Tag hatten 6 von 15 Zellen (40 %) eine einfache-exponentielle langsame Erholungskinetik, welche sich kaum von der Kinetik der homomeren Kv4.2-Kanäle unterschied (Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4). Nur am 2. Tag zeigte sich mit $\tau_w = 304 \pm 67$ ms ($p \leq 0,0001$; $n = 15$) eine signifikant höhere gewichtete Recovery-Zeitkonstante bei zusätzlicher CLN3wt-Coexpression verglichen mit Kv4.2 + KChIP3 (Abbildung 4.13 E).

Tabelle 4.4: (Gewichtete) Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt

	Kv4.2		Kv4.2 + KChIP3		Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt		
	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag
τ_{rec} (ms)	416 ± 40	400 ± 23	71,8 ± 5,9	45,7 ± 5,1	129 ± 33	304 ± 67	111 ± 14
					n.s.	p ≤ 0,0001	n.s.
n	6	11	11	6	13	15	19

Bei Kv4.2 ± KChIP3 ist die Zeitkonstante τ (einfach-exponentieller Fit), bei Kv4.2 + KChIP3 + CLN3 die gewichtete Zeitkonstante τ_w (errechnet aus einfach- und doppelt-exponentiellem Fit) aufgeführt. n. s. = nicht signifikant.

4.3.1.1.4 Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung

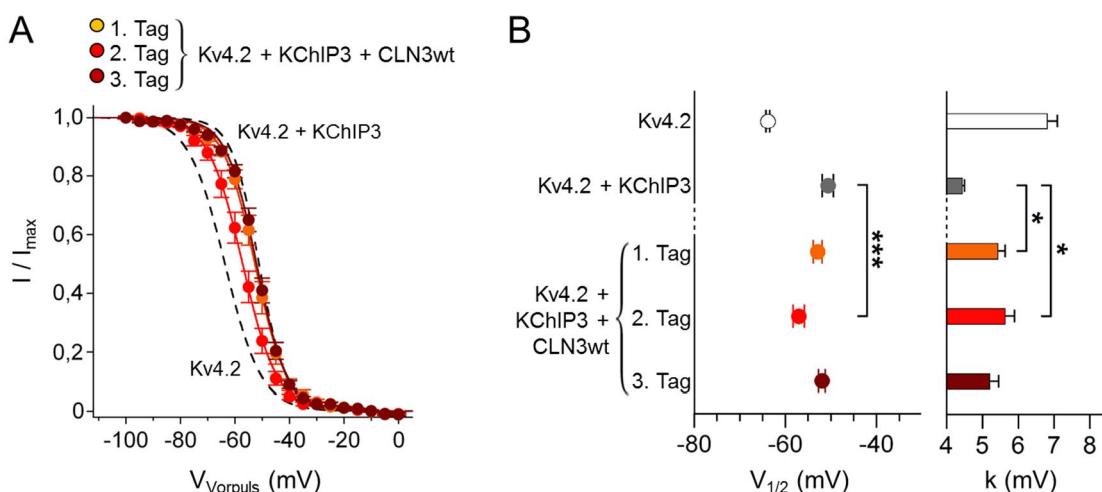


Abbildung 4.14: Zeithängiger CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen

A: Inaktivierungskurve von ...Kv4.2 ± KChIP3 (1. und 2. Tag kumuliert) und Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt (unterteilt in — 1. Tag, — 2. Tag und — 3. Tag). B: $V_{1/2}$ und k der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2 ± KChIP3 (1. und 2. Tag kumuliert) und Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt (unterteilt in 1. Tag, 2. Tag und 3. Tag) (Signifikanz: * p < 0,05; ** p ≤ 0,0001).

Die KChIP3-vermittelte Rechtsverschiebung sowie der steilere Kurvenverlauf der Inaktivierungskurve der Kv4.2-Kanäle wurden in Kapitel 4.1.4 gezeigt. Zusätzliche Coexpression von CLN3wt bewirkte am 2. Tag nach Transfektion eine signifikant geringere Rechtsverschiebung der Inaktivierungskurve, sodass die Kurve, wie in Abbildung 4.14 A zu sehen ist, zwischen denen von Kv4.2 und Kv4.2 + KChIP3 verlief; $V_{1/2}$ lag bei $V_{1/2} = -57,1 \pm 1,3$ mV ($p \leq 0,0001$; $n = 13$) (Abbildung 4.14 B).

Der Steigungsfaktor erfuhr bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt eine geringere Verminderung mit $k = 5,62 \pm 0,27$ mV ($p < 0,05$; $n = 13$) und damit einen flacheren Verlauf verglichen mit Kv4.2 + KChIP3. Bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt zeigten die Inaktivierungskurven vom 1. und 3. Tag fast keinen Unterschied zur Inaktivierungskurve von Kv4.2 + KChIP3, einzig der Steigungsfaktor vom 1. Tag war signifikant höher, was einem flacheren Verlauf der Kurve entsprach. In Tabelle 4.5 sind die einzelnen Daten aufgeführt.

Tabelle 4.5: $V_{1/2}$ und k der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt

	Kv4.2	Kv4.2 + KChIP3	Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt		
			1. Tag	2. Tag	3. Tag
$V_{1/2}$ (mV)	$-63,8 \pm 0,4$	$-50,7 \pm 1,2$	$-52,9 \pm 1,0$	$-57,1 \pm 1,3$	$-52,0 \pm 0,8$
			n. s.	$p \leq 0,0001$	n. s.
k (mV)	$6,80 \pm 0,29$	$4,43 \pm 0,07$	$5,42 \pm 0,21$	$5,62 \pm 0,27$	$5,19 \pm 0,27$
			$p < 0,05$	$p < 0,05$	n. s.
n	14	11	12	13	16

Bei Kv4.2 ± KChIP3 sind 1. und 2. Tag nach Transfektion kumuliert; n. s. = nicht signifikant.

4.3.1.1.5 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Die Linksverschiebung und der steilere Verlauf der Kv4.2-Aktivierungskurve bei Coexpression von KChIP3 wurde in Kapitel 4.1.5 gezeigt. In Abbildung 4.15 A lässt sich deutlich erkennen, dass die Kurve von Kv4.2 + KChIP3 + CLN3 nur eine geringe Linksverschiebung zeigte und daher nahe dem Graphen der homomeren Kv4.2-Kanäle verlief. Am 2. Tag nach Transfektion erfolgte die geringste Linksverschiebung mit $V_{1/2} = +15,7 \pm 1,9$ mV ($p \leq 0,0001$; $n = 12$) (Abbildung 4.15 B). Jedoch auch am 1. und 3. Tag zeigten sich bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt eine signifikant reduzierte Linksverschiebung im Vergleich zu Kv4.2 + KChIP3, am 3. Tag noch deutlich stärker als am 1. Tag. Auch der Steigungsfaktor wichen v. a. am 2. Tag mit $k = 28,8 \pm 1,1$ mV ($p \leq 0,0001$; $n = 12$) kaum vom Wert des homomeren Kv4.2-Kanals ab (Abbildung 4.15 B). Ebenfalls ein signifikant flacherer Verlauf bezogen auf

Kv4.2 + KChIP3 fand sich am 3. Tag nach Transfektion. Die restlichen Daten sind in Tabelle 4.6 aufgeführt.

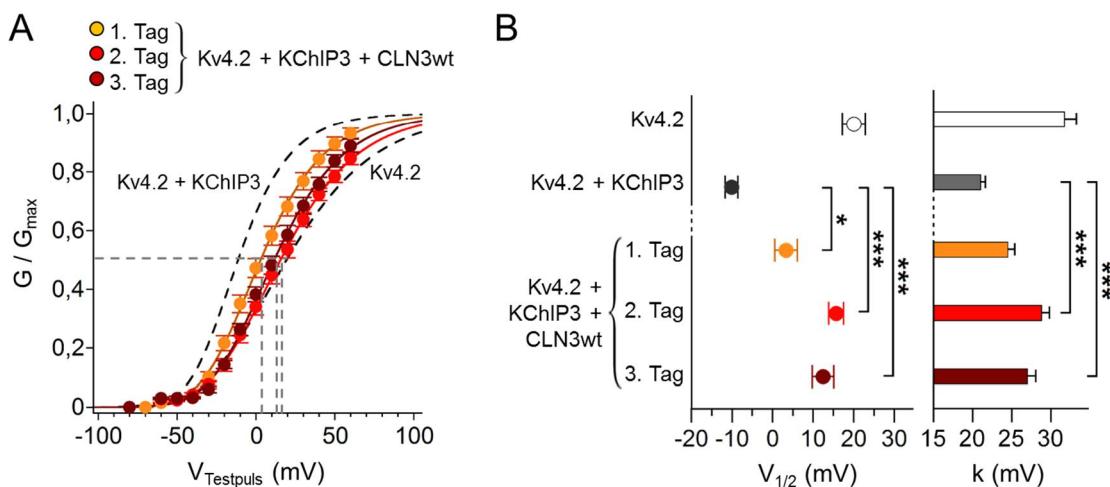


Abbildung 4.15: Zeitabhängiger CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen

A: Aktivierungskinetik von ...Kv4.2 ± KChIP3 (1. und 2. Tag kumuliert) und Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt (unterteilt in — 1. Tag, — 2. Tag und — 3. Tag). ... Darstellung von $V_{1/2}$. **B:** $V_{1/2}$ und k der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2 ± KChIP3 (1. und 2. Tag kumuliert) und Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt (unterteilt in 1. Tag, 2. Tag und 3. Tag) (Signifikanz: * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,0001$).

Tabelle 4.6: $V_{1/2}$ und k der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt

	Kv4.2	Kv4.2 + KChIP3	Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt		
			1. Tag	2. Tag	3. Tag
$V_{1/2}$ (mV)	+20,0 ± 2,8	-10,1 ± 1,5	+3,31 ± 2,79	+15,7 ± 1,9	+12,4 ± 2,6
			$p < 0,05$	$p \leq 0,0001$	$p \leq 0,0001$
k (mV)	31,7 ± 1,6	21,0 ± 0,7	24,5 ± 0,9	28,8 ± 1,1	27,0 ± 1,1
			n. s.	$p \leq 0,0001$	$p \leq 0,0001$
n	13	12	12	12	12

Bei Kv4.2 ± KChIP3 sind 1. und 2. Tag nach Transfektion kumuliert; n. s. = nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei zusätzlicher Coexpression des CLN3-Wildtyp-Proteins die KChIP3-Modulation der Stromeigenschaften von Kv4.2-Kanälen

reduziert und z. T. komplett aufgehoben war. Letzteres war bei der Stromdichte und der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung der Fall. Zudem war eine Abhängigkeit des CLN3wt-Effekts von der Zeit nach Transfektion zu beobachten, der stärkste Effekt zeigte sich ausnahmslos am 2. Tag nach Transfektion.

4.3.1.2 Abhängigkeit der CLN3wt-Effekte von der zytoplasmatischen Calciumkonzentration

Laut Chang et al. beeinflusst die intrazelluläre Calciumkonzentration das Bindungsverhalten zwischen KChIP3 und CLN3wt (Chang et al. 2007). Mittels Glutathion-S-Transferase-Pulldown-Assay haben diese Autoren gezeigt, dass die Bindung zwischen KChIP3 und CLN3wt bei einer Konzentration von 50 μM Calcium signifikant vermindert ist. Um zu untersuchen, ob Calcium den CLN3wt-Effekt auf die KChIP3-Modulation der Kv4.2-Kanäle beeinflusst, wurden in den folgenden Experimenten Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe mit und ohne CLN3wt in HEK293-Zellen exprimiert und der CLN3wt-Effekt bei intrazellulärer Perfusion mit einer Hoch-Calcium-Lösung mit 50 μM Calcium (im Folgenden als 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bezeichnet) sowie mit einer nominal Calcium-freien (Ca^{2+} -freien) Intrazellulär Lösung untersucht und mit den Werten bei Perfusion mit der Standard-Pipetten-Lösung 15 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vom 2. Tag nach Transfektion aus Kapitel 4.3.1.1 verglichen. Die Intrazellulär Lösungen mit den entsprechenden Calciumkonzentrationen wurden über die Patchpipette appliziert. Da in den vorausgegangenen Versuchen der CLN3wt-Effekt auf die Stromeigenschaften der Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe am 2. Tag nach Transfektion am stärksten ausgeprägt war, wurden die folgenden Experimente ausschließlich am 2. Tag nach Transfektion durchgeführt. Es wurde jedoch zusätzlich untersucht, ob die Zeit nach Zellöffnung bzw. die Wirkdauer des Calciums eine Rolle spielt. Hierfür wurden bei den Experimenten bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Pulsprotokolle zu unterschiedlichen Zeiten nach Zellöffnung appliziert. Mit „0 min nach Zellöffnung“ und „unmittelbar nach Zellöffnung“ wird der Zeitraum < 1 min nach Öffnung der Zelle bezeichnet. Auf diesen Wert beziehen sich die in den entsprechenden Graphen angegebenen Signifikanzen für die späteren Zeitpunkte.

4.3.1.2.1 Stromdichte

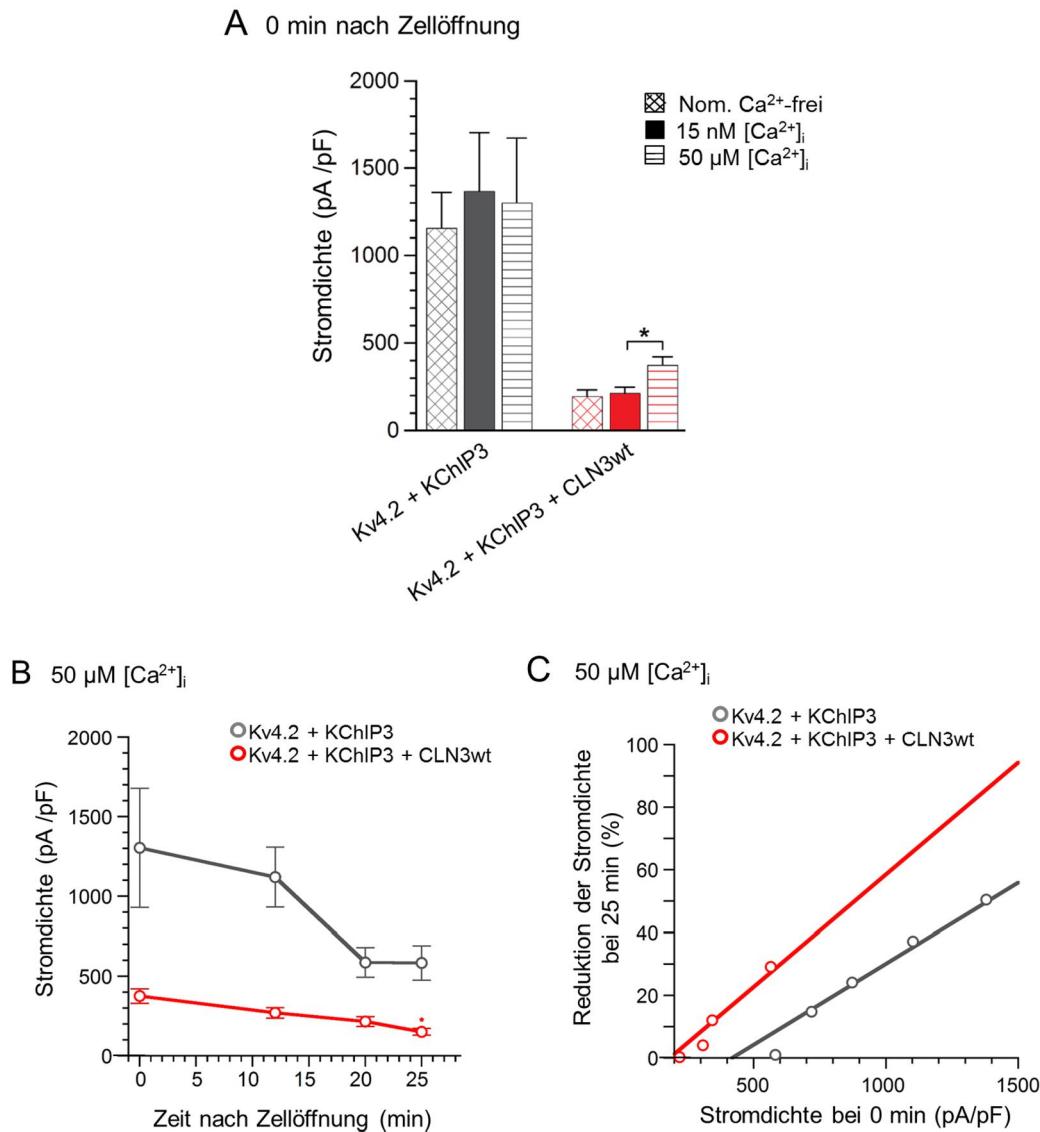


Abbildung 4.16: CLN3wt-Effekt auf die Stromdichte von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen bei nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung 0 min nach Zellöffnung und bei 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Zeit nach Zellöffnung

A: Stromdichten von Kv4.2 + KChIP3 \pm CLN3wt bei nominal Ca^{2+} -frei (kariert), 15 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (plain) und 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ (gestreift) 0 min nach Zellöffnung (Signifikanz: * $p < 0,05$). **B:** Stromdichte von Kv4.2 + KChIP3 \pm CLN3wt bei 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ 0, 12, 20 und 25 min nach Zellöffnung. **C:** Korrelation der Abnahme der Stromdichte bei 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ 25 min nach Zellöffnung (in % von der Stromdichte 0 min nach Zellöffnung) und der Stromdichte 0 min nach Zellöffnung von Kv4.2 + KChIP3 ($p \leq 0,0001$) und Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt ($p < 0,05$).

Die Reduktion der Kv4.2/KChIP3-Stromdichte bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt bei einer physiologischen intrazellulären Calciumkonzentration von 15 nM wurde in Kapitel 4.3.1.1.1 gezeigt. Bei Perfusion mit nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulär-

Lösung zeigten sich weder Änderungen des CLN3wt-Effekts noch Veränderungen in der KChIP3-Modulation in Bezug auf die Stromdichte der Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe; so lag diese bei Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt bei 196 ± 36 pA/pF ($n = 9$) und ohne zusätzliche Coexpression von CLN3wt bei 1160 ± 200 pA/pF ($n = 22$) (Abbildung 4.16 A). Bei $50 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ 0 min nach Zellöffnung fand sich bei zusätzlicher CLN3wt-Coexpression zu Kv4.2 + KChIP3 eine signifikante Steigerung der Stromdichte auf 376 ± 46 pA/pF ($p < 0,05$; $n = 8$) im Vergleich zu den Daten bei $15 \text{ nM} [\text{Ca}^{2+}]_i$. Bei Kv4.2 + KChIP3 zeigte sich bei $50 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ 0 min nach Zellöffnung mit 1310 ± 370 pA/pF ($n = 14$) kein Unterschied zu $15 \text{ nM} [\text{Ca}^{2+}]_i$. In Abbildung 4.16 B ist zu sehen, dass die Stromdichte mit der Zeit nach Zellöffnung sowohl für Kv4.2 + KChIP3 als auch für Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt in der Tendenz abnahm, wobei die Reduktion 25 min nach Zellöffnung nur bei zusätzlicher CLN3wt-Coexpression signifikant war ($p < 0,05$). Auffällend war ein Zusammenhang zwischen der Stromdichte unmittelbar nach Zellöffnung und der Reduktion im Zeitverlauf. In Abbildung 4.16 C ist die Korrelation zwischen der Anfangstromdichte und der Reduktion der Stromdichte nach 25 min dargestellt. Je größer die Stromdichte 0 min nach Zellöffnung war, desto stärker war die Stromdichte nach 25 min reduziert ($p_{\text{KChIP3}} \leq 0,0001$; $p_{\text{CLN3wt}} < 0,05$).

4.3.1.2.2 Makroskopische Inaktivierung

Die bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt beobachtete reduzierte Verlangsamung, also Beschleunigung, der initialen makroskopischen Kv4.2/KChIP3-Inaktivierung bei $15 \text{ nM} [\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde in Kapitel 4.3.1.1.2 gezeigt. Bei Perfusion mit der nominal Ca^{2+} -freien Intrazellulärlösung fand sich bei Kv4.2 + KChIP3 eine Beschleunigung aller drei Zeitkonstanten (nur τ_1 signifikant), während bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt die Zeitkonstanten verlangsamt waren (Abbildung 4.17 A). Damit näherten sich die Werte beider Gruppen bei nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulär-lösung einander an (Tabelle 4.7). Bei $50 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ zeigte sich 0 min nach Zellöffnung kein Unterschied zwischen der Kinetik der makroskopischen Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen und derer bei $15 \text{ nM} [\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abbildung 4.17 A). Bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt zu Kv4.2 + KChIP3 waren bei $50 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ 0 min nach Zellöffnung alle drei Zeitkonstanten signifikant auf $\tau_1 = 23,1 \pm 5,6$ ms

$(29,2 \pm 7,7\%; p < 0,05; n = 8)$, $\tau_2 = 83,9 \pm 7,8 \text{ ms}$ ($57,0 \pm 6,0\%$; $p < 0,05$) und $\tau_3 = 1480 \pm 610 \text{ ms}$ ($13,8 \pm 4,4\%$; $p < 0,05$) erhöht, während der prozentuale Anteil von τ_1 an der Gesamtamplitude signifikant verringert und der Anteil von τ_2 signifikant erhöht waren ($p_{\%}\tau_1 < 0,05$; $p_{\%}\tau_2 < 0,05$; $n = 8$) (Tabelle 4.7).

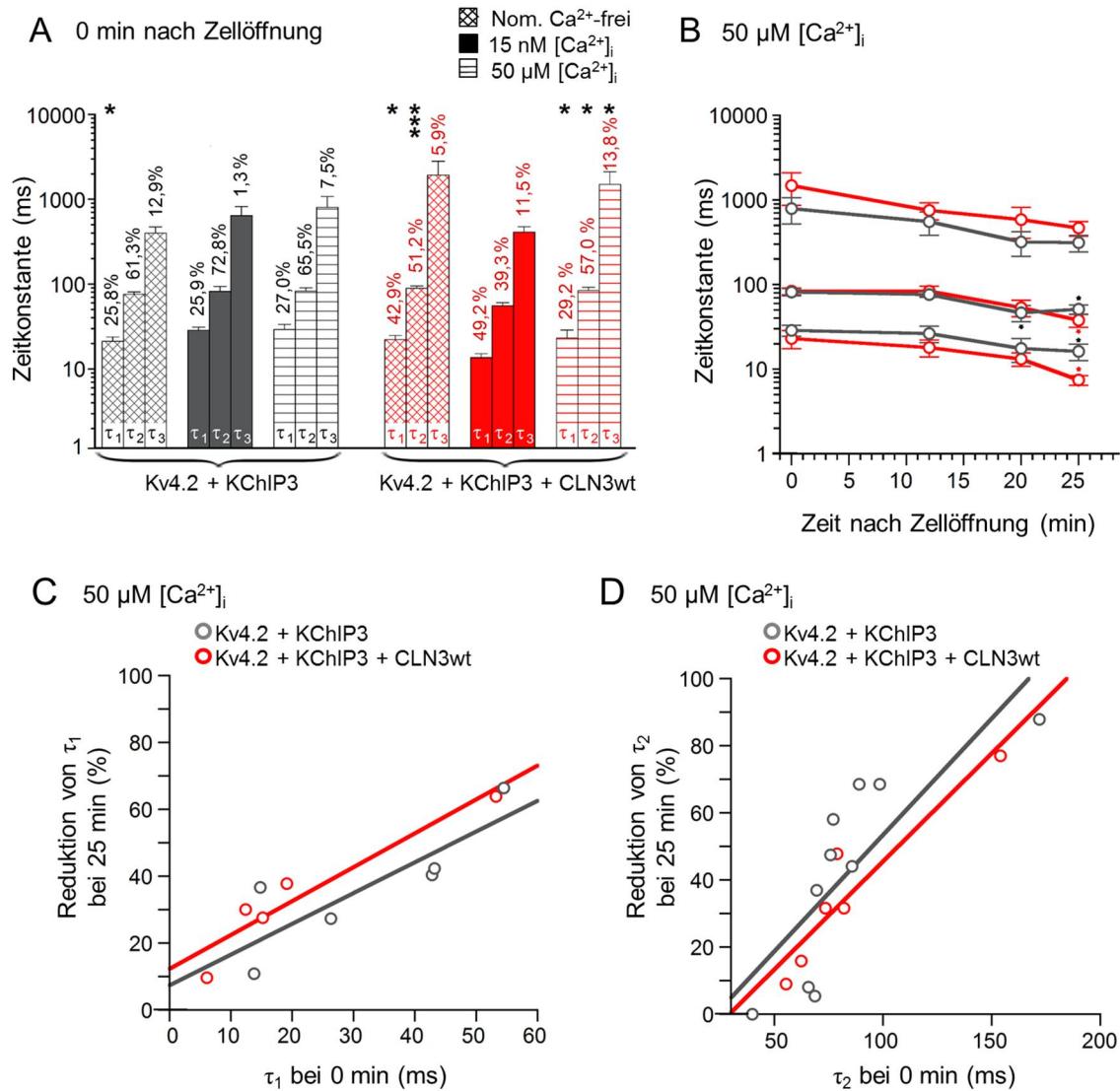


Abbildung 4.17: CLN3wt-Effekt auf die makroskopische Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen bei nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung 0 min nach Zellöffnung und bei 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Zeit nach Zellöffnung

A: Zeitkonstanten der makroskopischen Inaktivierung von Kv4.2 + KChIP3 \pm CLN3wt bei nominal Ca^{2+} -frei (kariert), 15 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (plain) und 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ (gestreift) 0 min nach Zellöffnung (Signifikanz: * $p < 0,05$; *** $p \leq 0,0001$). **B:** Zeitkonstanten von Kv4.2 + KChIP3 \pm CLN3wt bei 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ 0, 12, 20 und 25 min nach Zellöffnung (Signifikanz: * $p < 0,05$). **C u. D:** Korrelation der Abnahme der Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 bei 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ 25 min nach Zellöffnung (in % von der Zeitkonstante 0 min nach Zellöffnung) und der Zeitkonstante 0 min nach Zellöffnung von Kv4.2 + KChIP3 ($p < 0,05$) und Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt ($p < 0,05$).

Damit näherte sich bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unmittelbar nach Zellöffnung die Stromkinetik von Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt der Stromkinetik von Kv4.2 + KChIP3 trotz der zusätzlichen Coexpression von CLN3wt an. Abbildung 4.17 B zeigt die signifikante Abnahme von τ_1 und τ_2 während der Zeit nach Zellöffnung. Es ließ sich eine Korrelation zwischen τ_1 und τ_2 0 min nach Zellöffnung und der Reduktion im Zeitverlauf erkennen (Abbildung 4.17 C + D). Je größer die Zeitkonstanten desto stärker war die Reduktion dieser während der Zeit nach Zellöffnung (für τ_1 und τ_2 : $p_{\text{KChIP3}} < 0,05$; $p_{\text{CLN3wt}} < 0,05$).

Tabelle 4.7: Zeitkonstanten der makroskopischen Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt bei 15nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$, bei nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung und 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 0 min nach Zellöffnung

	Kv4.2 + KChIP3			Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt		
	15 nM [$\text{Ca}^{2+}]_i$	Nom. Ca^{2+} -frei	50 μM [$\text{Ca}^{2+}]_i$	15 nM [$\text{Ca}^{2+}]_i$	Nom. Ca^{2+} -frei	50 μM [$\text{Ca}^{2+}]_i$
τ_1 (ms)	28,4 $\pm 2,5$	21,0 $\pm 2,6$	28,9 $\pm 4,4$	13,6 $\pm 1,6$	22,3 $\pm 2,6$	23,1 $\pm 5,6$
		p < 0,05	n. s.		p < 0,05	p < 0,05
% τ_1	25,9 $\pm 2,5$	25,8 $\pm 4,8$	27,0 $\pm 6,4$	49,2 $\pm 6,5$	42,9 $\pm 7,7$	29,2 $\pm 7,7$
		n. s.	n. s.		n. s.	p < 0,05
τ_2 (ms)	81,7 $\pm 11,5$	75,3 $\pm 4,7$	81,9 $\pm 8,0$	55,4 $\pm 4,8$	89,3 $\pm 6,0$	83,9 $\pm 7,8$
		n. s.	n. s.		p ≤ 0,0001	p < 0,05
% τ_2	72,8 $\pm 4,1$	61,3 $\pm 5,1$	65,5 $\pm 6,8$	39,3 $\pm 4,8$	51,2 $\pm 7,0$	57,0 $\pm 6,0$
		n. s.	n. s.		n. s.	p < 0,05
τ_3 (ms)	641 ± 173	394 ± 71	793 ± 271	410 ± 62	1930 ± 880	1480 ± 610
		n. s.	n. s.		n. s.	p < 0,05
% τ_3	1,3 $\pm 0,4$	12,9 $\pm 4,4$	7,5 $\pm 4,6$	11,5 $\pm 2,6$	5,9 $\pm 1,3$	13,8 $\pm 4,4$
		n. s.	n. s.		p < 0,05	n. s.
n	9	20	14	22	9	8

n. s. = nicht signifikant.

4.3.1.2.3 Erholung von der Inaktivierung

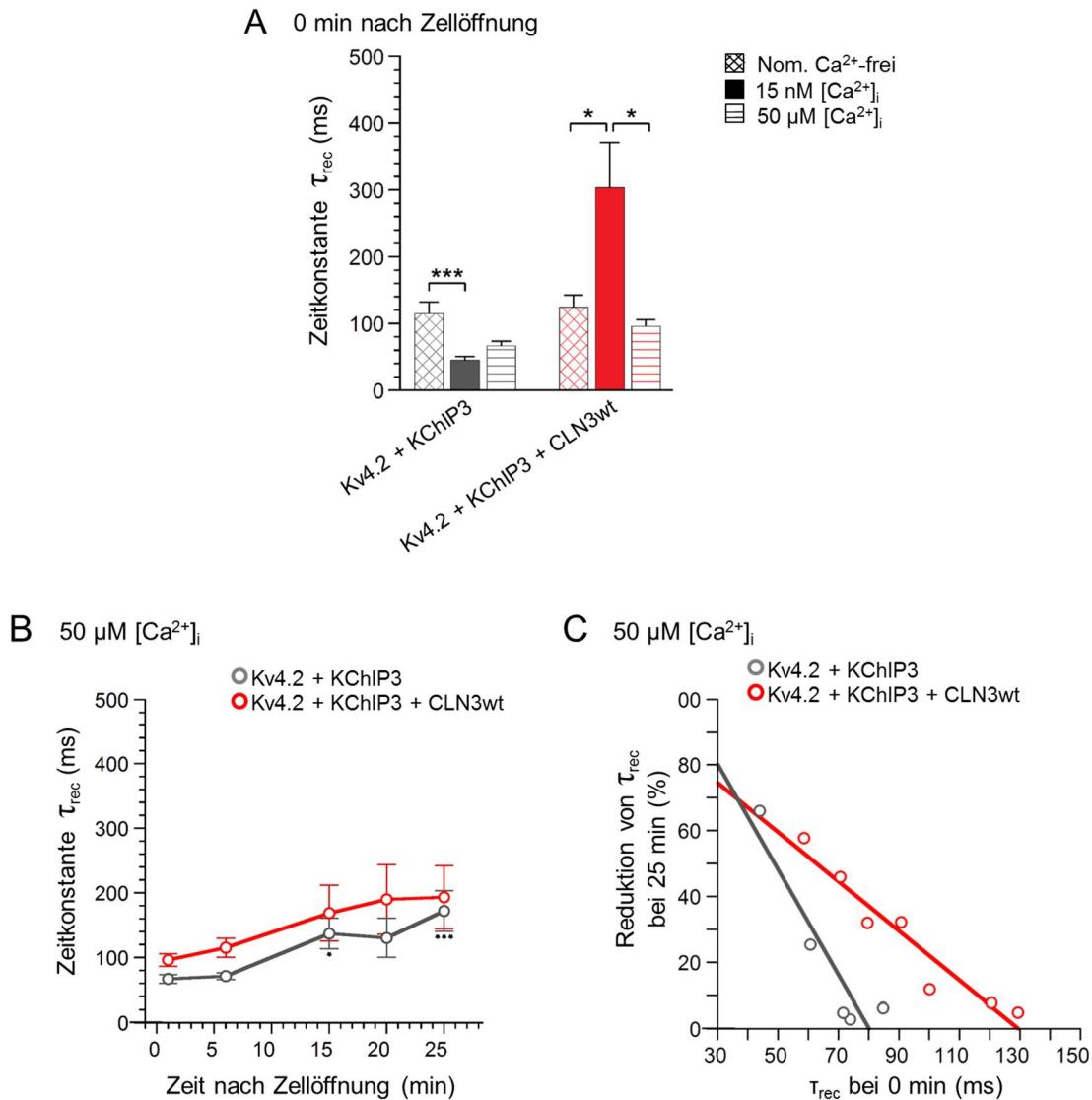


Abbildung 4.18: CLN3wt-Effekt auf die Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen bei nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung 0 min nach Zellöffnung und bei 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Zeit nach Zellöffnung

A: Recovery-Zeitkonstanten von Kv4.2 + KChIP3 \pm CLN3wt bei nominal Ca^{2+} -frei (kariert), 15 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (plain) und 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ (gestreift) 0 min nach Zellöffnung (Signifikanz: * p < 0,05; *** p < 0,0001). **B:** Recovery-Zeitkonstanten von Kv4.2 + KChIP3 \pm CLN3wt bei 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ 0, 6, 15, 20 und 25 min nach Zellöffnung (Signifikanz: * p < 0,05; *** p < 0,0001). Bei Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt wurden gewichtete Zeitkonstanten aufgetragen. **C:** Korrelation der Abnahme der Recovery-Zeitkonstante bei 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ 25 min nach Zellöffnung (in % von τ_{rec} 0 min nach Zellöffnung) und τ_{rec} 0 min nach Zellöffnung von Kv4.2 + KChIP3 (p < 0,05) und Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt (p < 0,0001).

Die durch CLN3wt vermittelte verringerte Beschleunigung der Recovery-Kinetik der Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe bei 15 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde bereits in Kapitel 4.3.1.1.3 gezeigt. Bei Perfusion des Zytosplasmas mit der nominal Ca^{2+} -freien Intrazellulär-

lösung wurde die Erholung von der Inaktivierung bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt zu Kv4.2 + KChIP3 beschleunigt und somit die Recovery-Kurve nach links verschoben. Außerdem fanden sich hierbei keine doppelt-exponentiellen Verläufe. Die Zeitkonstante lag bei $\tau = 125 \pm 18$ ms ($p < 0,05$; $n = 8$) (Abbildung 4.18 A). Ohne zusätzliche Coexpression von CLN3wt zeigte sich dagegen bei Perfusion mit der nominal Ca^{2+} -freien Intrazellulärösung eine Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung auf $\tau = 115 \pm 17$ ms ($p \leq 0,0001$; $n = 22$) in Bezug auf Kv4.2 + KChIP3 bei 15 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zeigte sich bei Kv4.2 + KChIP3 unmittelbar nach Zellöffnung kein Unterschied der Erholung von der Inaktivierung mit einer gewichteten Zeitkonstante von $\tau_w = 66,9 \pm 6,9$ ms ($n = 4$) verglichen mit den Daten bei Perfusion mit 15 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abbildung 4.18 A). Bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt war bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 0 min nach Zellöffnung die gewichtete Zeitkonstante mit $\tau_w = 98,0 \pm 9,2$ ms ($p < 0,05$; $n = 14$) signifikant reduziert in Bezug auf 15 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Damit näherte sich die Kinetik von Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt der von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen ohne zusätzliche CLN3wt-Coexpression (bei 15 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$) an. Der Anteil der Zellen mit doppelt-exponentieller Erholungskinetik von Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unmittelbar nach Zellöffnung änderte sich mit 8 von 14 Zellen (57%) nicht (53% der Zellen bei 15 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$). Von den einfach-exponentiellen Verläufen stieg jedoch der Anteil derer mit schneller Kinetik ($\tau < 80$ ms) auf 5 von 14 Zellen (36%) und nur 1 Zelle der 14 Zellen (7%) zeigte eine langsame einfach-exponentielle Erholungskinetik ($\tau > 150$ ms). Bei 15 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war der Anteil der langsamen Verläufe mit 40% deutlich größer. Im Zeitverlauf nach Zellöffnung stieg bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Recovery-Zeitkonstante nur ohne zusätzliche Coexpression von CLN3wt signifikant an, wie Abbildung 4.18 B zeigt. Auch bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt zeigte sich ein Anstieg der gewichteten Zeitkonstante, dieser war jedoch nicht signifikant aufgrund der großen Spannbreite zu den späteren Messzeitpunkten. Bei Betrachtung der Einzelwerte fiel auf, dass ab 15 min keine gewichtete Zeitkonstante nahe beim Mittelwert lag, sondern entweder unter 90 ms oder über 220 ms war. Die Anzahl der doppelt-exponentiellen Kinetiken von Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt nahm mit der Zeit nach Zellöffnung deutlich ab, sodass ab 15 min keine doppelt-exponentielle Recovery-Kinetik mehr zu beobachten waren. Die Höhe der gewichteten

Zeitkonstante bei Zellöffnung korrelierte mit dem Anteil der Reduktion bei 25 min nach Zellöffnung bei Kv4.2 + KChIP3 sowie bei Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt ($p_{KChIP3} < 0,05$; $p_{CLN3wt} \leq 0,0001$) (Abbildung 4.18 C). Je niedriger τ_{rec} und je näher die Kurve bei der Kinetik von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen lag, desto stärker nahm τ_{rec} während der Zeit nach Zellöffnung zu und näherte sich der Kinetik von homomeren Kv4.2-Kanälen an.

4.3.1.2.4 Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung

Die reduzierte Rechtsverschiebung sowie der flachere Kurvenverlauf der Steady-State-Inaktivierungskurve der Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt bei 15 nM $[Ca^{2+}]_i$ wurde in Kapitel 4.3.1.1.4 gezeigt. Die Kurve der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2 + KChIP3 war bei nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung nach links verschoben und verlief steiler verglichen mit 15 nM $[Ca^{2+}]_i$, sodass $V_{1/2} = -56,9 \pm 1,2$ mV; ($p \leq 0,0001$; $n = 15$) war und der Steigungsfaktor bei $k = 4,95 \pm 0,26$ mV lag (Abbildung 4.19 A). Demnach reduzierte sich die KChIP3-Modulation bei nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung. Bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt zeigte sich bei nominal Ca^{2+} -frei keine Veränderung von $V_{1/2}$ mit $V_{1/2} = -55,9 \pm 0,3$ mV ($n = 5$), jedoch sank der Steigungsfaktor signifikant auf $k = 4,88 \pm 0,20$ mV ($p < 0,05$). Bei Verwendung der Hoch-Calcium-Lösung 50 μM $[Ca^{2+}]_i$ kam es bei Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt 0 min nach Zellöffnung zu einer Rechtsverschiebung der Kurve mit $V_{1/2} = -53,1 \pm 0,6$ mV ($k = 5,06 \pm 0,27$ mV; $p < 0,05$; $n = 8$). Bei Kv4.2 + KChIP3 ohne zusätzliche CLN3wt-Coexpression war 0 min nach Zellöffnung kein Unterschied zwischen 15 nM $[Ca^{2+}]_i$ und 50 μM $[Ca^{2+}]_i$ zu beobachten, so war bei Letztgenanntem $V_{1/2} = -50,4 \pm 1,0$ mV ($k = 4,78 \pm 0,20$ mV; $n = 11$) (Abbildung 4.19 A). Während der Zeit nach Zellöffnung zeigte sich eine Negativverschiebung der Inaktivierungskurven sowohl mit als auch ohne zusätzliche CLN3wt-Coexpression (Abbildung 4.19 B). In Abbildung 4.19 C ist der Zusammenhang zwischen der Negativverschiebung von $V_{1/2}$ bei 25 min und $V_{1/2}$ bei 0 min nach Zellöffnung dargestellt. Es zeigte sich bei Kv4.2 + KChIP3 mit und ohne zusätzliche Coexpression von CLN3wt ein signifikanter direkter Zusammenhang: Je negativer der Ausgangswert unmittelbar nach Zellöffnung desto geringer die Negativverschiebung von $V_{1/2}$ ($p_{KChIP3} < 0,05$; $p_{CLN3wt} < 0,05$).

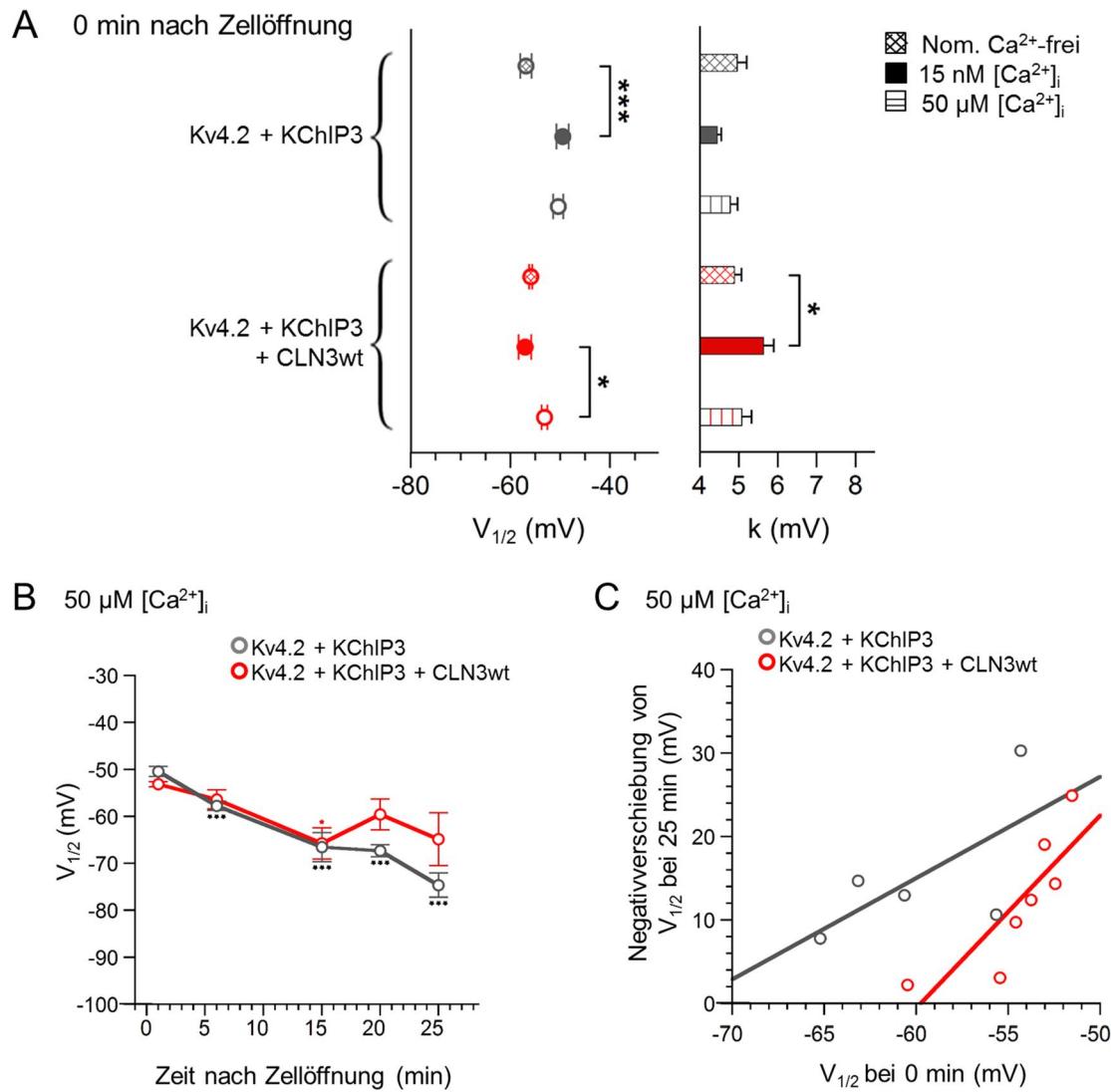


Abbildung 4.19: CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen bei nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung 0 min nach Zellöffnung und bei 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Zeit nach Zellöffnung

A: $V_{1/2}$ von Kv4.2 + KChIP3 \pm CLN3wt bei nominal Ca^{2+} -frei (kariert), 15 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (plain) und 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ (gestreift) 0 min nach Zellöffnung (Signifikanz: * $p < 0,05$; *** $p \leq 0,0001$). **B:** $V_{1/2}$ von Kv4.2 + KChIP3 \pm CLN3wt bei 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ 0, 6, 15, 20 und 25 min nach Zellöffnung (Signifikanz: * $p < 0,05$; *** $p \leq 0,0001$). **C:** Korrelation der Negativverschiebung von $V_{1/2}$ bei 50 $\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ 25 min nach Zellöffnung und $V_{1/2}$ 0 min nach Zellöffnung von Kv4.2 + KChIP3 ($p < 0,05$) und Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt ($p < 0,05$).

4.3.1.2.5 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Die verminderte Linksverschiebung und der weniger steile Verlauf der Aktivierungskurve der Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt bei 15 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde bereits in Kapitel 4.3.1.5 dargestellt. Bei Perfusion mit nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung zeigte sich die KChIP3-Modulation der

Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2-Kanälen unverändert. Es kam nur zu einer geringen nicht signifikanten Rechtsverschiebung mit $V_{1/2} = -5,67 \pm 1,11$ mV ($k = 22,0 \pm 0,4$ mV; $n = 11$) (Abbildung 4.20 A).

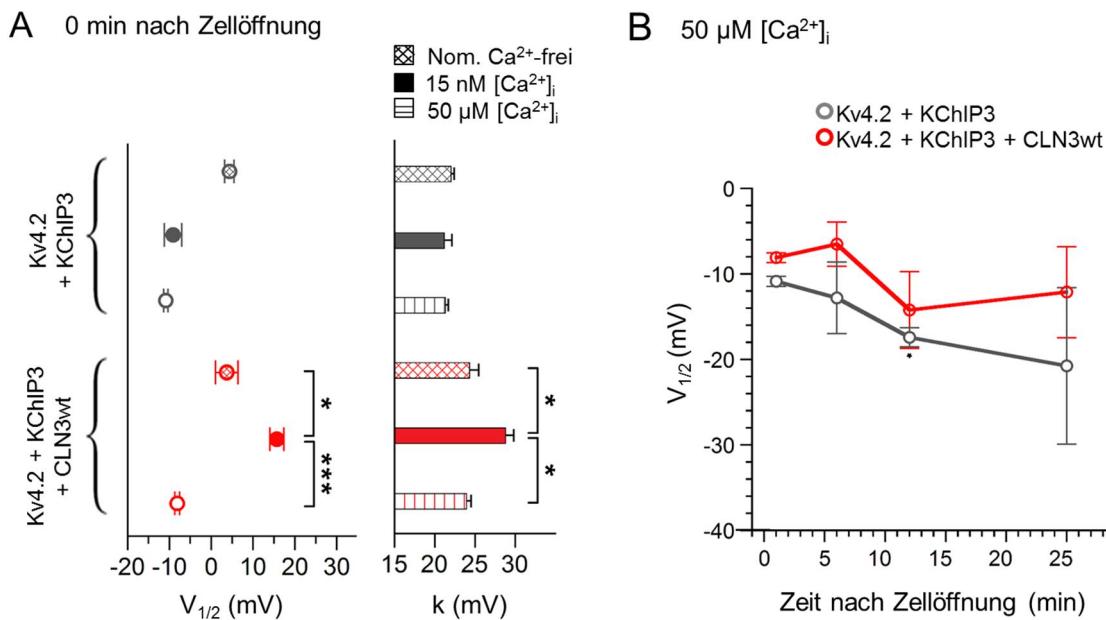


Abbildung 4.20: CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen bei nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung 0 min nach Zellöffnung und bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Zeit nach Zellöffnung

A: $V_{1/2}$ von Kv4.2 + KChIP3 ± CLN3wt bei nominal Ca^{2+} -frei (kariert), 15 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (plain) und 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (gestreift) 0 min nach Zellöffnung (Signifikanz: * $p < 0,05$; *** $p \leq 0,0001$). **B:** $V_{1/2}$ von Kv4.2 + KChIP3 ± CLN3wt bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 0, 6, 12 und 25 min nach Zellöffnung (Signifikanz: * $p < 0,05$).

Der CLN3wt-Effekt bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt wurde bei Perfusion mit nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung reduziert und es fand sich eine Linksverschiebung der Kurve, sodass $V_{1/2} = +3,74 \pm 2,65$ mV ($p < 0,05$; $n = 6$) war. Außerdem verlief die Kurve steiler bei einem Steigungsfaktor von $k = 24,3 \pm 1,2$ mV ($p < 0,05$). Bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kam es bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt mit $V_{1/2} = -8,09 \pm 0,56$ mV ($p \leq 0,0001$; $n = 3$) zu einer Linksverschiebung im Vergleich zu 15 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die Kurve verlief zudem steiler bei einem signifikant reduzierten Steigungsfaktor von $k = 23,9 \pm 0,6$ mV ($p < 0,05$). Bei den Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen ohne zusätzliche Coexpression von CLN3wt zeigte sich bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ keine Veränderung mit $V_{1/2} = -10,8 \pm 0,6$ mV ($k = 21,3 \pm 0,4$ mV; $n = 4$). Während der Zeit nach Zellöffnung verstärkte sich die Linksverschiebung der Aktivierungskurve bei Kv4.2 + KChIP3 (Abbildung 4.20 B). 12 min nach Zellöffnung war $V_{1/2}$ signifikant

verringert mit $V_{1/2} = -17,4 \pm 1,1$ mV ($k = 21,4 \pm 1,4$ mV; $p < 0,05$; $n = 4$). Damit entfernte sich die Aktivierungskurve von der Kurve der homomeren Kv4.2-Kanäle. Eine Korrelation der Veränderung in Abhängigkeit von den Daten bei 0 min nach Zellöffnung, wie sie in den vorherigen Kapiteln durchgeführt wurde, konnte bei der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung nicht durchgeführt werden, da keine Daten verschiedener Messzeitpunkte von einer einzigen Zelle vorlagen und daher kein Zeitverlauf einzelner Zellen ausgewertet werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Perfusion des Zytoplasmas mit der nominal Ca^{2+} -freien Intrazellulärösung sowohl die KChIP3-Modulation als auch der CLN3wt-Effekt reduziert waren. Lediglich auf die Stromdichte hatte die Verwendung von nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung keinen Einfluss. Bei Perfusion mit der Hoch-Calcium-Pipettenlösung traten zwei Wirkungen auf: Zum einen gab es eine schnelle Wirkung, welche sich unmittelbar nach Zellöffnung zeigte und – mit Ausnahme der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung – eine Reduzierung des CLN3wt-Effekts bzw. eine Verstärkung der KChIP3-Modulation bewirkte. Zum anderen fand sich eine langsame Wirkung, die im zeitlichen Verlauf innerhalb von 25 min nach Zellöffnung auftrat und sowohl mit als auch ohne zusätzliche Coexpression von CLN3wt eine Reduktion der KChIP3-Modulation zeigte – auch hier mit Ausnahme der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, bei der die Kurve eine weitere Linksverschiebung erfuhr. Diese Wirkung auf die Stromeigenschaften von Kv4.2 + KChIP3 mit und ohne zusätzliche CLN3wt-Coexpression präsentierte sich meist umso stärker, je ausgeprägter die KChIP3-Modulation unmittelbar nach Zellöffnung war. Dies zeigte sich v. a. bei Betrachtung der einzelnen Zellen. Auffällig war ein plötzlicher Sprung im Zeitraum von ca. 10 bis 15 min nach Zellöffnung.

4.3.2 Transiente Coexpression von KChIP3 und CLN3wt in einer stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie

Ein Nachteil der transienten Transfektion verschiedener Proteine ist, dass der Zeitpunkt der höchsten Expression der einzelnen Proteine unklar ist. Möglicherweise werden so physiologisch relevante Effekte übersehen, wenn die Proteine nicht zeitgleich in ausreichender Menge exprimiert werden. Deshalb wurden die Messungen mit

einer Zelllinie wiederholt, in der Kv4.2-Kanäle bereits stabil transfiziert waren. Die Kv4.2-Kanäle werden in dieser Zelllinie konstitutiv und relativ gleichmäßig in der Membran exprimiert. Die stabile Kv4.2-HEK293-Zelllinie ($\text{Kv4.2}_{\text{stabil}}$) wurde zunächst mit 0,25 µg KChIP3-DNA und 2,5 µg CLN3wt-DNA (dieselben Mengen wie in den Experimenten zuvor, entsprechend einem CLN3wt : KChIP3-Verhältnis von 10 : 1) transfiziert. Um herauszufinden, ob der CLN3wt-Effekt konzentrationsabhängig ist, wurde außerdem die stabile Kv4.2-HEK293-Zelllinie auch mit 0,1 µg KChIP3-DNA und 2,0 µg CLN3wt-DNA transfiziert, was einem CLN3wt : KChIP3-Verhältnis von 20 : 1 entspricht. Für die Messungen des homomeren Kv4.2-Kanals wurde nur ein leerer Vektor in die Zellen transfiziert. Es traten bei $\text{Kv4.2}_{\text{stabil}}$ keine Unterschiede zwischen den beiden Messtagen auf, daher wurden der 1. und 2. Tag nach Transfektion bei den Daten für $\text{Kv4.2}_{\text{stabil}}$ zusammengefasst. Die Daten für $\text{Kv4.2}_{\text{stabil}} + \text{KChIP3}$ und für $\text{Kv4.2}_{\text{stabil}} + \text{KChIP3} + \text{CLN3wt}$ stammen vom 2. Tag nach Transfektion, da sich hier der stärkste CLN3wt-Effekt zeigte.

4.3.2.1 Stromdichte

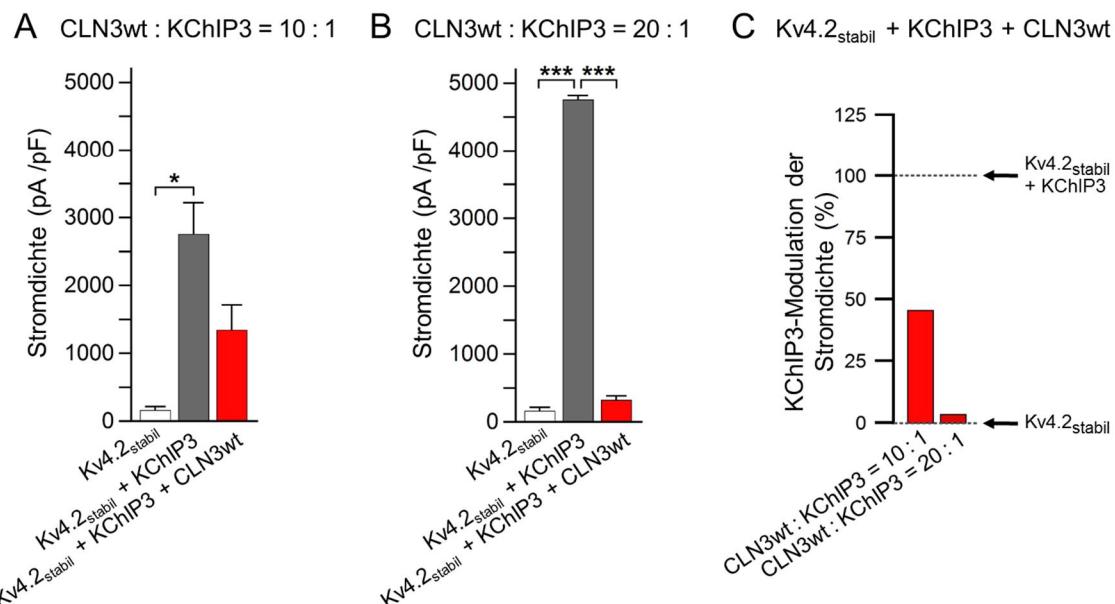


Abbildung 4.21: Dosisabhängiger CLN3wt-Effekt auf die Stromdichte von $\text{Kv4.2}_{\text{stabil}}/\text{KChIP3}$ -Kanalkomplexen

- A: Stromdichte von $\text{Kv4.2}_{\text{stabil}} \pm 0,25 \mu\text{g KChIP3} \pm 2,5 \mu\text{g CLN3wt}$ (Signifikanz: * $p < 0,05$).
- B: Stromdichte von $\text{Kv4.2}_{\text{stabil}} \pm 0,1 \mu\text{g KChIP3} \pm 2,0 \mu\text{g CLN3wt}$ (Signifikanz: *** $p \leq 0,0001$).
- C: CLN3wt-Effekt auf die $\text{Kv4.2}_{\text{stabil}}/\text{KChIP3}$ -Stromdichte bei $\text{CLN3wt : KChIP3} = 10 : 1$ bzw. $20 : 1$ als Anteil in % in Bezug auf die KChIP3-Modulation.

Die Stromdichte der homomeren Kv4.2-Kanäle lag in der stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie bei 167 ± 50 pA/pF ($n = 6$). Wie Abbildung 4.21 A zeigt, war die Stromdichte bei Cotransfektion von $0,25$ µg KChIP3-DNA auf 2760 ± 461 pA/pF ($p < 0,05$; $n = 5$) erhöht. Bei zusätzlicher CLN3wt-Coexpression im CLN3wt : KChIP3-Verhältnis von 10 : 1 zeigte sich zwar eine Reduktion der Stromdichte auf 1350 ± 370 pA/pF ($n = 7$), welche sich jedoch nicht signifikant von der Stromdichte von Kv4.2_{stabil} + KChIP3 unterschied. Im Vergleich zu den Ergebnissen mit transienter Kv4.2-Transfektion (Kapitel 4.3.1.1.1) wird deutlich, dass CLN3wt in der stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie im CLN3wt : KChIP3-Verhältnis von 10 : 1 einen deutlich schwächeren Effekt ausübte. Bei Cotransfektion von $0,1$ µg KChIP3-DNA in der stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie war die Kv4.2-vermittelte Stromdichte auf 4760 ± 63 pA/pF ($p \leq 0,0001$; $n = 4$) erhöht (Abbildung 4.21 B). Damit war die Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Stromdichte 1,7 mal so hoch wie die Stromdichte bei Cotransfektion von $0,25$ µg KChIP3-DNA. Bei zusätzlicher CLN3wt-Coexpression in einem 20-fachen Überschuss (CLN3wt : KChIP3-Verhältnis von 20 : 1) war die Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Stromdichte mit 323 ± 68 pA/pF ($p \leq 0,0001$; $n = 5$) reduziert. Abbildung 4.21 C zeigt, dass bei einem 20-fachen CLN3wt-Überschuss die Stromdichte auf 3,4% in Bezug auf Kv4.2_{stabil} + KChIP3 ohne zusätzliche Coexpression von CLN3wt reduziert war, beim 10-fachen CLN3wt-Überschuss lediglich auf 45,6%.

4.3.2.2 Makroskopische Inaktivierung

In der stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie lagen die Zeitkonstanten bei den homomeren Kv4.2-Kanälen bei $\tau_1 = 11,5 \pm 0,4$ ms ($70,3 \pm 3,1\%$; $n = 6$), $\tau_2 = 49,3 \pm 4,4$ ms ($23,6 \pm 3,0\%$) und $\tau_3 = 1650 \pm 330$ ms ($6,1 \pm 1,8\%$). Bei Cotransfektion von $0,25$ µg KChIP3-DNA waren typischerweise die initialen Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 verlangsamt und die dritte Zeitkonstante τ_3 beschleunigt mit $\tau_1 = 36,2 \pm 4,4$ ms ($33,1 \pm 2,6\%$; $p < 0,05$; $n = 5$), $\tau_2 = 97,8 \pm 8,1$ ms ($64,5 \pm 2,6\%$; $p < 0,05$) und $\tau_3 = 558 \pm 69$ ms ($2,4 \pm 0,4\%$; $p < 0,05$) (Abbildung 4.22 A). Zusätzliche Coexpression von CLN3wt in 10-fachem Überschuss zu den Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Kanalkomplexen zeigte keine Veränderung der Inaktivierung. Bei 20-fachem CLN3wt-Überschuss dagegen war eine Veränderung in der Inaktivierungskinetik zu beobachten. Dabei waren die prozentualen Anteile der Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 signifikant verändert, die

Zeitkonstanten selbst zeigten keinen signifikanten Unterschied verglichen mit Kv4.2stabil + KChIP3 (Abbildung 4.22 B).

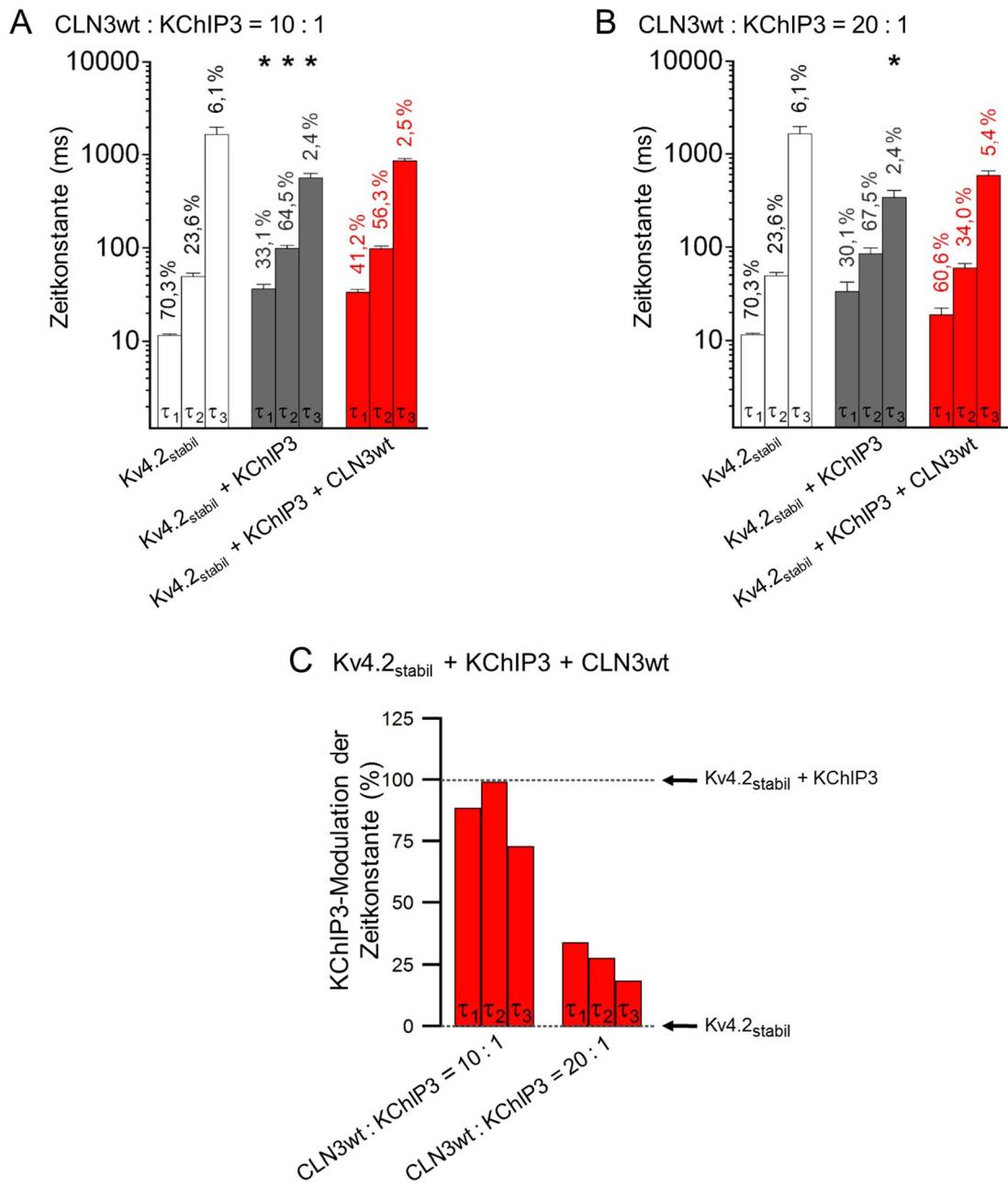


Abbildung 4.22: Dosisabhängiger CLN3wt-Effekt auf die makroskopische Inaktivierung von Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Kanalkomplexen

A: Zeitkonstanten der Inaktivierung von Kv4.2_{stabil} \pm 0,25 µg KChIP3 \pm 2,5 µg CLN3wt. **B:** Zeitkonstanten der Inaktivierung von Kv4.2_{stabil} \pm 0,1 µg KChIP3 \pm 2,0 µg CLN3wt. **C:** CLN3wt-Effekt auf die Zeitkonstanten der Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Inaktivierung bei CLN3wt : KChIP3 = 10 : 1 bzw. 20 : 1 als Anteil in % in Bezug auf die KChIP3-Modulation.

Die Daten sind in Tabelle 4.8 detailliert aufgeführt. Abbildung 4.22 C zeigt, dass bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt in 20-fachem Überschuss die KChIP3-Modulation stärker reduziert war als in 10-fachem Überschuss.

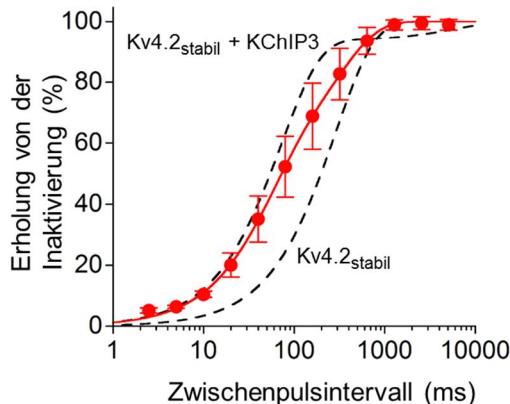
Tabelle 4.8: Zeitkonstanten der makroskopischen Inaktivierung von Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt bei einem Verhältnis von CLN3wt : KChIP3 = 10 : 1 bzw. 20 : 1

CLN3wt : KChIP3	Kv4.2 _{stabil}	Kv4.2 _{stabil} + KChIP3		Kv4.2 _{stabil} + KChIP3 + CLN3wt	
		10 : 1	20 : 1	10 : 1	20 : 1
τ_1 (ms)	11,5 ± 0,4	36,2 ± 4,4	33,2 ± 9,0	33,3 ± 2,4	18,8 ± 3,4
		p < 0,05	n. s.	n. s.	n. s.
% τ_1	70,3 ± 3,1	33,1 ± 2,6	30,1 ± 2,6	41,2 ± 7,8	60,6 ± 9,1
		p ≤ 0,0001	p ≤ 0,0001	n. s.	p < 0,05
τ_2 (ms)	49,3 ± 4,4	97,8 ± 8,1	84,8 ± 12,8	97,3 ± 7,7	59,1 ± 7,3
		p < 0,05	n. s.	n. s.	n. s.
% τ_2	23,6 ± 3,0	64,5 ± 2,6	67,5 ± 4,0	56,3 ± 8,3	34,0 ± 9,1
		p ≤ 0,0001	p ≤ 0,0001	n. s.	p < 0,05
τ_3 (ms)	1650 ± 330	558 ± 69	339 ± 63	854 ± 44	581 ± 70
		p < 0,05	p < 0,05	n. s.	n. s.
% τ_3	6,1 ± 1,8	2,4 ± 0,4	2,4 ± 0,8	2,5 ± 0,7	5,4 ± 0,8
		n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
n	6	5	4	5	5

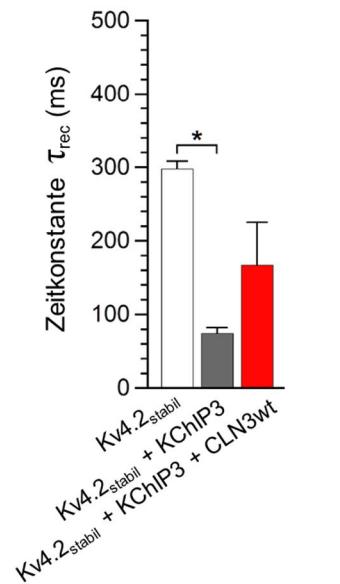
n. s. = nicht signifikant

4.3.2.3 Erholung von der Inaktivierung

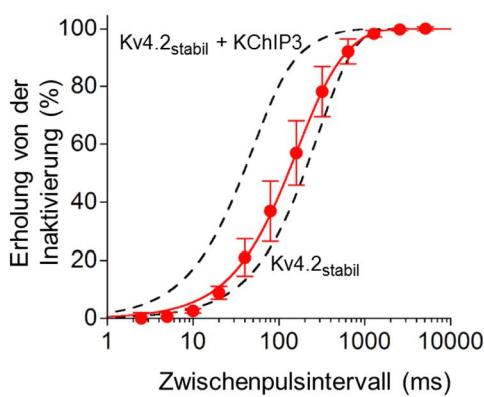
A CLN3wt : KChIP3 = 10 : 1



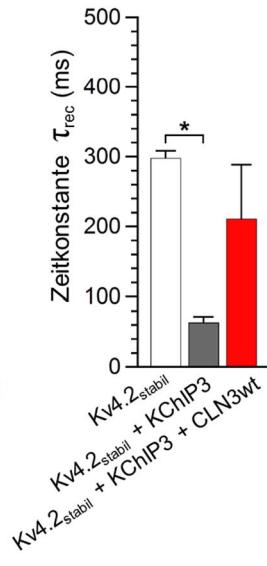
B CLN3wt : KChIP3 = 10 : 1



C CLN3wt : KChIP3 = 20 : 1



D CLN3wt : KChIP3 = 20 : 1



E Kv4.2stabil + KChIP3 + CLN3wt

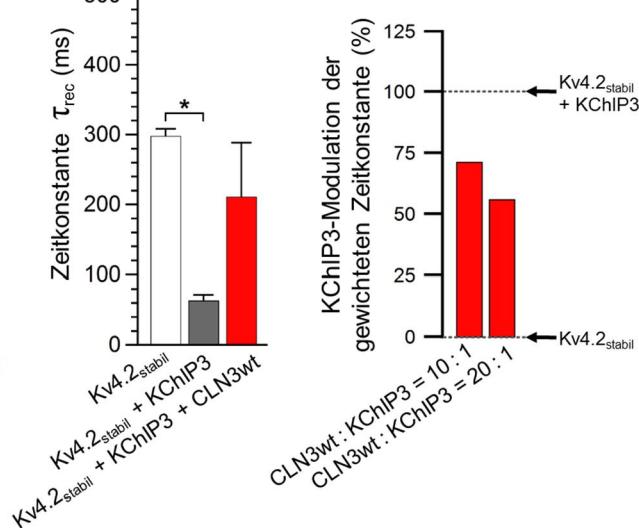


Abbildung 4.23: Dosisabhängiger CLN3wt-Effekt auf die Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Kanalkomplexen

A: Recovery-Kinetik mit ... Anpassung einer einfach-exponentiellen Funktion an die Daten von Kv4.2_{stabil} bzw. einer doppelt-exponentiellen Funktion an die Daten von Kv4.2_{stabil} + 0,25 µg KChIP3. — Anpassung einer doppelt-exponentiellen Funktion an die Recovery-Kinetik von Kv4.2_{stabil} + 0,25 µg KChIP3 + 2,5 µg CLN3wt. **B:** Recovery-Zeitkonstanten von Kv4.2_{stabil} ± 0,25 µg KChIP3 ± 2,5 µg CLN3wt. **C:** Recovery-Kinetik mit ... Anpassung einer einfach-exponentiellen Funktion an die Daten von Kv4.2_{stabil} ± 0,1 µg KChIP3. — Anpassung einer doppelt-exponentiellen Funktion an die Daten von Kv4.2_{stabil} + 0,1 µg KChIP3 + 2,0 µg CLN3wt. **D:** Recovery-Zeitkonstanten von Kv4.2_{stabil} ± 0,1 µg KChIP3 ± 2,0 µg CLN3wt. **E:** CLN3wt-Effekt auf die Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Recovery bei CLN3wt : KChIP3 = 10 : 1 bzw. 20 : 1 als Anteil in % in Bezug auf die KChIP3-Modulation.

Durch Angleichen einer einfach-exponentiellen Funktion an die Erholungskinetik erhielt man bei homomeren Kv4.2-Kanälen in der stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie die Zeitkonstante $\tau = 298 \pm 11$ ms ($n = 4$). Bei Cotransfektion von 0,25 µg KChIP3-DNA war die Erholung von der Inaktivierung beschleunigt (Abbildung 4.23 A). Die gewichtete Zeitkonstante war auf $\tau_w = 75,0 \pm 7,4$ ms ($p < 0,05$; $n = 4$) reduziert (Abbildung 4.23 B). Dabei zeigte 1 von 4 Zellen (25%) eine doppelt-exponentielle Recovery-Kinetik. Bei zusätzlicher CLN3wt-Coexpression in 10-fachem Überschuss wurde die Recovery-Kinetik von Kv4.2_{stabil} + KChIP3 verlangsamt. Es hatten 5 von 7 Zellen (71%) eine doppelt-exponentielle Recovery-Kinetik. Bei Betrachtung der gewichteten Zeitkonstanten fand sich jedoch mit $\tau_w = 168 \pm 58$ ms ($n = 7$) kein signifikanter Effekt auf die Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Recovery-Kinetik (Abbildung 4.23 B). Auch bei Cotransfektion von 0,1 µg KChIP3-DNA wurde die Erholung von der Inaktivierung der Kv4.2-Kanäle beschleunigt (Abbildung 4.23 C). Der Anteil der Zellen mit einem doppelt-exponentiellen Verlauf lag bei 25% (1 von 4). Die gewichtete Zeitkonstante war $\tau_w = 63,5 \pm 8,3$ ms ($p < 0,05$; $n = 4$) (Abbildung 4.23 D). Bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt in 20-fachem Überschuss näherte sich die Recovery-Kinetik derer von Kv4.2_{stabil} an, wie Abbildung 4.23 C zeigt. Die Hälfte der Zellen (2 von 4) wies eine doppelt-exponentielle Erholungskinetik auf. Die gewichtete Zeitkonstante unterschied sich mit $\tau_w = 211 \pm 77$ ms ($n = 4$) jedoch nicht signifikant von Kv4.2_{stabil} + KChIP3. Wie Abbildung 4.23 E zeigt, war beim CLN3wt : KChIP3-Verhältnis von 20 : 1 die gewichtete Zeitkonstante auf 55,9% in Bezug auf Kv4.2_{stabil} + KChIP3 ohne CLN3wt reduziert, beim Verhältnis von 10 : 1 lediglich auf 71,2%.

4.3.2.4 Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung

In der stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie war $V_{1/2}$ der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung bei Kv4.2_{stabil} allein $V_{1/2} = -64,6 \pm 0,4$ mV ($k = 6,86 \pm 0,45$ mV; $n = 3$). Die Steady-State-Inaktivierungskurve war bei Cotransfektion von 0,25 µg KChIP3-DNA nach rechts verschoben bei $V_{1/2} = -49,4 \pm 2,2$ mV ($k = 4,84 \pm 0,60$ mV; $p < 0,05$; $n = 3$) (Abbildung 4.24 A + B). Die zusätzliche Coexpression von 2,5 µg CLN3wt-DNA veränderte die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Kanalkomplexen nicht: $V_{1/2} = -50,7 \pm 2,4$ mV ($k = 7,11 \pm 1,20$ mV; $n = 5$).

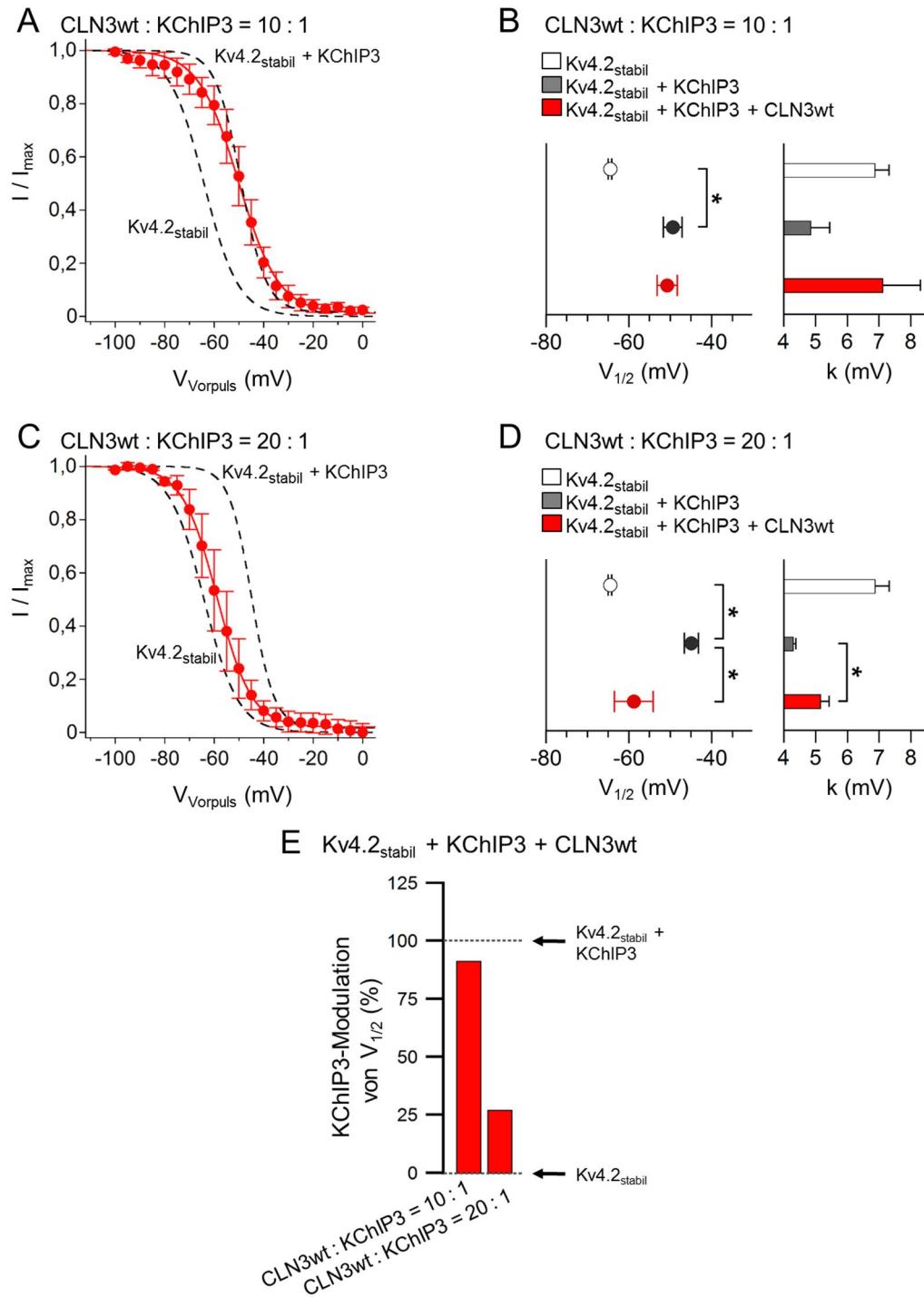


Abbildung 4.24: Dosisabhängiger CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Kanalkomplexen

A: Inaktivierungskurve von ... Kv4.2_{stabil} ± 0,25 µg KChIP3 und - Kv4.2_{stabil} + 0,25 µg KChIP3 + 2,5 µg CLN3wt. **B:** $V_{1/2}$ und k der Steady-State-Inaktivierung von Kv4.2_{stabil} ± 0,25 µg KChIP3 ± 2,5 µg CLN3wt (Signifikanz: * $p < 0,05$). **C:** Inaktivierungskurve von ... Kv4.2_{stabil} ± 0,1 µg KChIP3 und - Kv4.2_{stabil} + 0,1 µg KChIP3 + 2,0 µg CLN3wt. **D:** $V_{1/2}$ und k der Steady-State-Inaktivierung von Kv4.2_{stabil} ± 0,1 µg KChIP3 ± 2,0 µg CLN3wt (Signifikanz: * $p < 0,05$). **E:** CLN3wt-Effekt auf die Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Steady-State-Inaktivierung bei CLN3wt : KChIP3 = 10 : 1 bzw. 20 : 1 als Anteil in % in Bezug auf die KChIP3-Modulation.

Bei Cotransfektion von 0,1 µg KChIP3-DNA war die Kurve ebenfalls nach rechts verschoben, wie es in Abbildung 4.24 C zu sehen ist. Hier war $V_{1/2} = -44,9 \pm 1,7$ mV ($k = 4,3 \pm 0,1$ mV; $p < 0,05$; $n = 3$) (Abbildung 4.24 D). Damit war die KChIP3-Modulation im Vergleich zur Cotransfektion von 0,25 µg KChIP3-DNA trotz der geringeren Menge an transfizierter KChIP3-DNA stärker ausgeprägt. Bei zusätzlicher CLN3wt-Coexpression im 20-fachen Überschuss zeigte sich mit $V_{1/2} = -58,8 \pm 4,7$ mV ($p < 0,05$; $n = 3$) eine geringere Rechtsverschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve (Abbildung 4.24 C + D). Die Kurve verlief zudem flacher bei einem Steigungsfaktor von $k = 5,14 \pm 0,28$ mV ($p < 0,05$). In Abbildung 4.24 E ist zu sehen, dass bei einem CLN3wt : KChIP3-Verhältnis von 20 : 1 der Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung lediglich bei 29,4% der reinen KChIP3-Modulation (100%) lag, beim Verhältnis von 10 : 1 jedoch bei 91,4%.

4.3.2.5 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

In der stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie war $V_{1/2}$ der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung bei Kv4.2_{stabil} allein $V_{1/2} = +26,9 \pm 8,9$ mV ($k = 38,5 \pm 1,2$ mV; $n = 2$). Wie Abbildung 4.25 A zeigt, erfuhr die Aktivierungskurve bei Cotransfektion von 0,25 µg KChIP3-DNA eine Linksverschiebung mit $V_{1/2} = -8,4 \pm 3,0$ mV ($p < 0,05$; $n = 3$). Zudem verlief die Aktivierungskurve steiler bei einem signifikant verringerten Steigungsfaktor von $k = 19,5 \pm 1,7$ mV ($p \leq 0,0001$) (Abbildung 4.25 B). Zusätzliche CLN3wt-Coexpression in 10-fachem Überschuss hatte auf die Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Aktivierungskurve mit $V_{1/2} = +2,00 \pm 4,22$ mV ($k = 22,2 \pm 1,6$ mV; $n = 3$) keinen signifikanten Effekt. Bei Cotransfektion von 0,1 µg KChIP3-DNA zeigte sich ebenfalls eine Linksverschiebung der Aktivierungskurve auf $V_{1/2} = -2,87 \pm 1,51$ mV ($p < 0,05$; $n = 3$) sowie ein steilerer Kurvenverlauf mit signifikanter Reduktion des Steigungsfaktors auf $k = 21,9 \pm 2,3$ mV ($p < 0,05$), wie Abbildung 4.25 C + D zeigen. Bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt in 20-fachem Überschuss zeigte sich mit $V_{1/2} = +15,8 \pm 4,7$ mV ($n = 3$) keine signifikante Verschiebung der Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Aktivierungskurve. Jedoch verlief die Kurve flacher mit einem Steigungsfaktor von $k = 28,8 \pm 4,0$ mV ($p < 0,05$). Abbildung 4.25 E zeigt, dass sowohl bei einem 20-fachen CLN3wt-Überschuss als auch bei einem 10-fachen CLN3wt-Überschuss die KChIP3-Modulation in der Tendenz reduziert war (jedoch nicht signifikant).

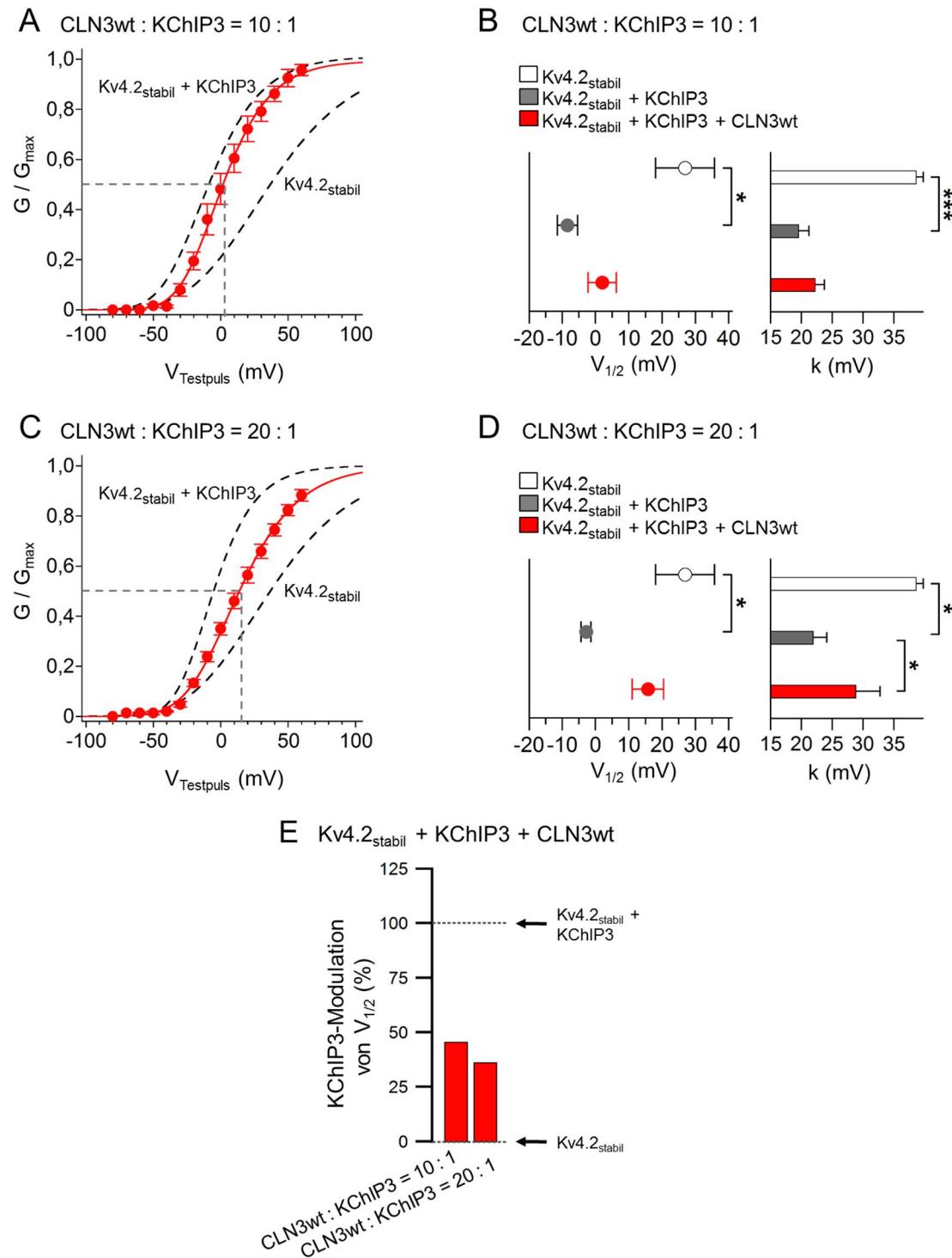


Abbildung 4.25: Dosisabhängiger CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Kanalkomplexen

A: Aktivierungskinetik von ...Kv4.2_{stabil} ± 0,25 µg KChIP3 und -Kv4.2_{stabil} + 0,25 µg KChIP3 + 2,5 µg CLN3wt. **B:** V_{1/2} und k der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2_{stabil} ± 0,25 µg KChIP3 ± 2,5 µg CLN3wt (Signifikanz: * p < 0,05; *** p ≤ 0,0001). **C:** Aktivierungskinetik von ...Kv4.2_{stabil} ± 0,1 µg KChIP3 und -Kv4.2_{stabil} + 0,1 µg KChIP3 + 2,0 µg CLN3wt. **D:** V_{1/2} und k der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2_{stabil} ± 0,1 µg KChIP3 ± 2,0 µg CLN3wt (Signifikanz: * p < 0,05). **E:** CLN3wt-Effekt auf die Kv4.2_{stabil}/KChIP3-Aktivierung bei CLN3wt : KChIP3 = 10 : 1 bzw. 20 : 1 als Anteil in % in Bezug auf die KChIP3-Modulation.

Insgesamt zeigte sich, dass die Modulation durch KChIP3 in der stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie verglichen mit den Zellen mit transienter Kv4.2-Transfektion sehr ähnlich, aber in der stabilen Zelllinie z. T. etwas stärker ausgeprägt war. Der CLN3wt-Effekt war dagegen in der stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie bei einem 10-fachen CLN3wt-Überschuss deutlich geringer. Es zeigte sich eine Dosisabhängigkeit des CLN3wt-Effekts. Bei Verdoppelung der CLN3wt-Dosis auf einen 20-fachen CLN3wt-Überschuss war eine Reduktion der KChIP3-Modulation zu beobachten, ähnlich wie bei den Zellen mit transienter Kv4.2-Transfektion (Kapitel 4.3.1.1).

4.3.3 Effekte von CLN3-Mutanten bei transienter Coexpression von Kv4.2 und KChIP3 in HEK293-Zellen

Verschiedene Mutanten des CLN3-Proteins sind mit der JNCL assoziiert. Zwei davon sind die Deletionsmutante CLN3_{ΔC} und die Punktmutante CLN3_{R334C}. Es wurde untersucht, ob und gegebenenfalls auf welche Weise diese beiden Mutanten die Stromeigenschaften von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen beeinflussen. Dafür wurde je eine der Mutanten zu Kv4.2 + KChIP3 in HEK293-Zellen in den gleichen Konzentrationen wie bei den vorangegangenen Experimenten mit CLN3wt (Kapitel 4.3.1.1) transient coexprimiert und die relevanten Parameter gemessen. Die folgenden Daten stammen ausschließlich vom 2. Tag nach Transfektion da sich hier der stärkste Effekt der Mutanten (wie auch bei CLN3wt) zeigte. Die Ergebnisse wurden mit den bereits ermittelten Werten aus Kapitel 4.3.1.1 verglichen (auch für Kv4.2 ± KChIP3 wurden im Folgenden nur Daten vom 2. Tag verwendet, welche z. T. im Kapitel 4.3.1.1 nicht im Detail aufgeführt wurden).

4.3.3.1 Stromdichte

Dass zusätzliche Coexpression des CLN3-Wildtyp-Proteins die KChIP3-vermittelte Zunahme der Kv4.2-Stromdichte reduzierte, wurde in Kapitel 4.3.1.1.1 gezeigt. In Abbildung 4.26 A sieht man, dass auch bei zusätzlicher Coexpression von CLN3_{ΔC} oder CLN3_{R334C} die Amplitude sowie die Dichte der Kv4.2/KChIP3-vermittelten Ströme reduziert wurden. Bei CLN3_{ΔC} war der Effekt jedoch mit einer Stromdichte von 737 ± 182 pA/pF ($p < 0,05$; $n = 17$) verglichen mit CLN3wt signifikant geringer

ausgeprägt. Im Gegensatz zu CLN3_{R334C}, hier unterschied sich der Effekt bei einer Stromdichte von 398 ± 96 pA/pF ($n = 16$) nicht signifikant vom CLN3wt-Effekt. Abbildung 4.26 B zeigt, dass die Mutanten wie CLN3wt die KChIP3-Modulation reduzierten, allerdings weniger stark ausgeprägt, d. h. die Stromdichte wurde nicht auf den Wert der homomeren Kv4.2-Kanäle gesenkt.

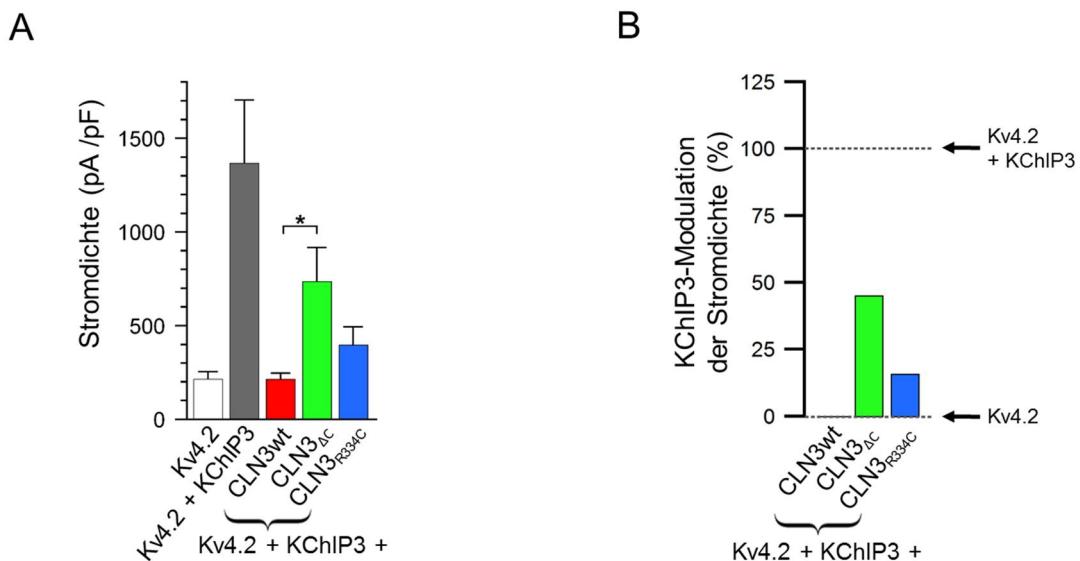


Abbildung 4.26: Effekt der CLN3-Mutanten auf Amplitude und Stromdichte von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen

A: Stromdichte von Kv4.2 ± KChIP3 ± CLN3_{WT} / Mutante (Signifikanz: * $p < 0,05$). B: Effekt von CLN3_{WT}, CLN3_{ΔC} und CLN3_{R334C} auf die Kv4.2/KChIP3-Stromdichte als Anteil in % in Bezug auf die KChIP3-Modulation.

4.3.3.2 Makroskopische Inaktivierung

Wie Kapitel 4.3.1.1.2 zeigt, beschleunigte die zusätzliche Coexpression von CLN3_{WT} die makroskopische Inaktivierung der Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe und verringerte die Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 signifikant. Die beiden untersuchten Mutanten hatten einen deutlich geringeren Effekt auf die makroskopische Inaktivierung als das CLN3-Wildtyp-Protein (Abbildung 4.27 A). Bei zusätzlicher Coexpression von CLN3_{ΔC} waren die Zeitkonstanten $\tau_1 = 22,6 \pm 3,9$ ms ($27,9 \pm 4,7\%$; $p \leq 0,0001$; $n = 17$), $\tau_2 = 60,1 \pm 5,7$ ms ($65,0 \pm 4,0\%$.) und $\tau_3 = 587 \pm 131$ ms ($7,1 \pm 1,9\%$), bei zusätzlicher Coexpression von CLN3_{R334C} $\tau_1 = 17,3 \pm 2,3$ ms ($28,3 \pm 3,7\%$; $p \leq 0,0001$; $n = 14$), $\tau_2 = 62,4 \pm 3,6$ ms ($60,5 \pm 4,6\%$) und $\tau_3 = 454 \pm 78$ ms ($11,2 \pm 3,3\%$). Wie in Abbildung 4.27 B dargestellt, wurde bei zusätzlicher Coexpression der Mutanten die

KChIP3-Modulation der Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 reduziert, jedoch nicht so stark wie bei Coexpression des CLN3-Wildtyp-Proteins.

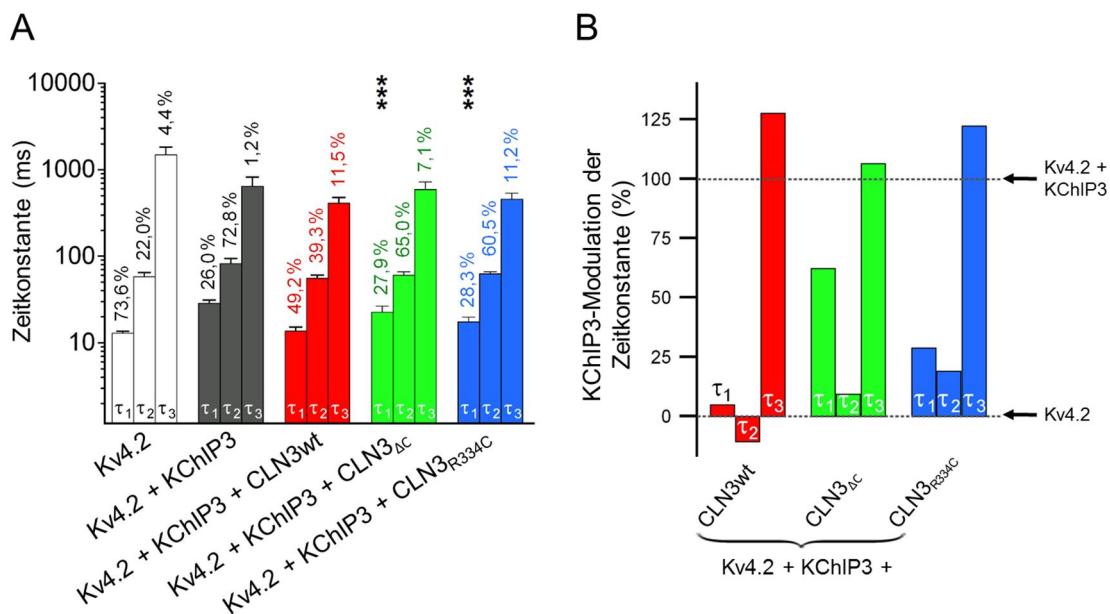


Abbildung 4.27: Effekt der CLN3-Mutanten auf die makroskopische Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen

A: Zeitkonstanten der makroskopischen Inaktivierung von Kv4.2 \pm KChIP3 \pm CLN3_{WT} / Mutante (Signifikanz: *** p \leq 0,0001). **B:** Effekt von CLN3_{WT}, CLN3_{ΔC} und CLN3_{R334C} auf die Zeitkonstanten der Kv4.2/KChIP3-Inaktivierung als Anteil in % in Bezug auf die KChIP3-Modulation.

4.3.3.3 Erholung von der Inaktivierung

Die Reduktion der KChIP3-Modulation auf die Erholungskinetik bei zusätzlicher Coexpression von CLN3_{WT} sowie das Auftreten von doppelt-exponentiellen Recovery-Kinetiken wurden in Kapitel 4.3.1.1.3 dargestellt. Wie Abbildung 4.28 A zeigt, erfuhr die Kv4.2/KChIP3-Recovery-Kurve bei zusätzlicher Coexpression von CLN3_{ΔC} sowie von CLN3_{R334C} eine geringere Rechtsverschiebung im Vergleich zur Recovery-Kurve bei zusätzlicher Coexpression von CLN3_{WT}. Die gewichteten Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung der beiden Mutanten unterschieden sich signifikant von CLN3_{WT} (Abbildung 4.28 B). So war bei zusätzlicher Coexpression von CLN3_{ΔC} $\tau_w = 88,5 \pm 20,9$ ms ($p < 0,05$; $n = 17$) und von CLN3_{R334C} $\tau_w = 100 \pm 14$ ms ($p < 0,05$; $n = 14$). Wie Abbildung 4.28 C zeigt, wurde die KChIP3-Modulation der gewichteten Recovery-Zeitkonstante durch zusätzliche Coexpression der beiden Mutanten kaum reduziert.

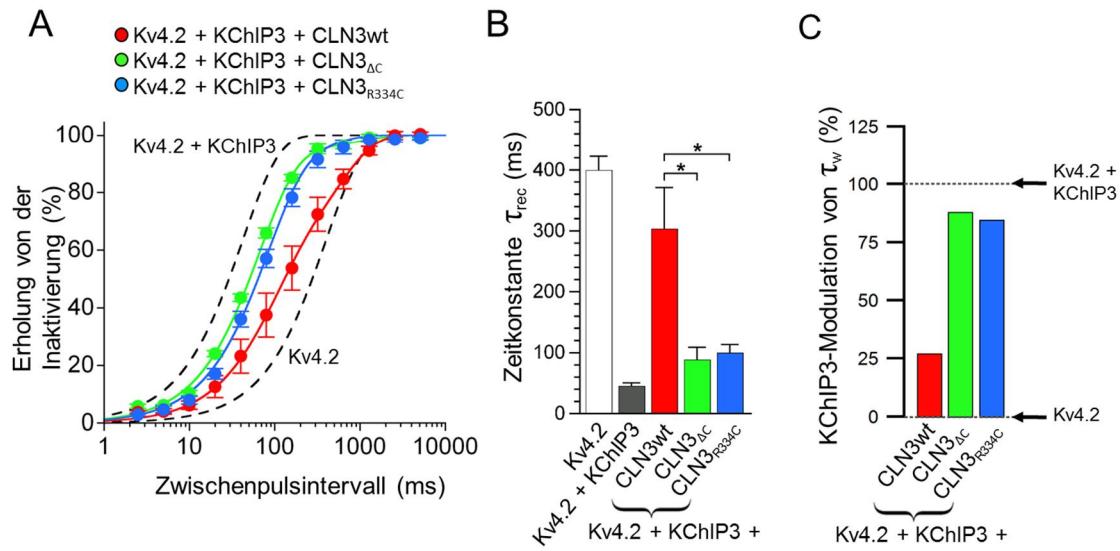


Abbildung 4.28: Effekt der CLN3-Mutanten auf die Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen

A: Recovery-Kinetik mit ... Anpassung einer einfach-exponentiellen Funktion an die Daten von Kv4.2 ± KChIP3. Die restlichen Fit-Kurven beschreiben die Recovery-Kinetik für — Kv4.2 + KChIP3 + CLN3_{WT}, — Kv4.2 + KChIP3 + CLN3_{ΔC} und — Kv4.2 + KChIP3 + CLN3_{R334C} (doppelt-exponentielle Funktion). **B:** Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2 ± KChIP3 ± CLN3_{WT} / Mutante (Signifikanz: * p < 0,05). **C:** Effekt von CLN3_{WT}, CLN3_{ΔC} und CLN3_{R334C} auf die gewichtete Zeitkonstante der Kv4.2/KChIP3-Recovery als Anteil in % in Bezug auf die KChIP3-Modulation.

Es fanden sich allerdings, wie bei zusätzlicher Coexpression des CLN3-Wildtyp-Proteins, auch bei den beiden untersuchten Mutanten Zellen mit einer doppelt-exponentiellen Erholungskinetik. So zeigten 6 von 17 (35%) Zellen bei zusätzlicher Coexpression von CLN3_{ΔC} eine doppelt-exponentielle Kinetik und 8 von 14 (57%) Zellen bei zusätzlicher Coexpression von CLN3_{R334C}. 1 von 17 Zellen (6%) zeigte bei Kv4.2 + KChIP3 + CLN3_{ΔC} eine langsam einfache-exponentielle Recovery-Kinetik, welche sich von der Kinetik der homomeren Kv4.2-Kanäle nicht unterschied. In Tabelle 4.9 sind die Daten detailliert aufgeführt.

Tabelle 4.9: Zeitkonstanten (in Subgruppen) der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt und CLN3-Mutanten

		Kv4.2 + KChIP3 +					
		CLN3wt	n	CLN3 _{ΔC}	n	CLN3 _{R334C}	n
einfach-exponentiell, schnell	τ (ms)	54,8	1	53,5 ± 3,1	10	77,7 ± 8,6	6
Doppelt-exponentiell	τ₁ (ms)	108 ± 52	8	54,4 ± 4,4	6	51,0 ± 6,4	8
	%τ₁	82,9 ± 3,5		90,0 ± 1,7		83,2 ± 3,5	
	τ₂ (ms)	1410 ± 660		556 ± 230		572 ± 237	
	%τ₂	17,1 ± 3,5		10,0 ± 1,7		16,8 ± 3,5	
einfach-exponentiell, langsam	τ (ms)	342 ± 51	6	400	1	/	0

Unterteilt in folgende Subgruppen: einfache-exponentiell mit schneller Erholungskinetik ($\tau < 80$ ms), doppelt-exponentiell und einfache-exponentiell mit langsamer Erholungskinetik ($\tau > 150$ ms).

4.3.3.4 Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung

Die Reduktion der KChIP3-Modulation der Kv4.2-Steady-State-Inaktivierung bei zusätzlicher Coexpression von CLN3wt wurde bereits in Kapitel 4.3.1.1.4 gezeigt. Auch bei zusätzlicher Coexpression der beiden untersuchten Mutanten erfuhr die Steady-State-Inaktivierungskurve der Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe eine geringere Rechtsverschiebung (Abbildung 4.29 A). Bei CLN3_{ΔC} war $V_{1/2} = -56,3 \pm 0,9$ mV ($k = 4,94 \pm 0,19$ mV; $n = 13$) und bei CLN3_{R334C} war $V_{1/2} = -55,0 \pm 1,6$ mV ($k = 4,98 \pm 0,22$ mV; $n = 11$), beide zeigten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Daten bei zusätzlicher CLN3wt-Coexpression (Abbildung 4.29 B). Abbildung 4.29 C verdeutlicht nochmal, dass bei zusätzlicher Coexpression der beiden untersuchten Mutanten keine wesentliche Reduktion des CLN3-Effekts auf die KChIP3-vermittelte Modulation von $V_{1/2}$ der Kv4.2-Steady-State-Inaktivierung zu beobachten war.

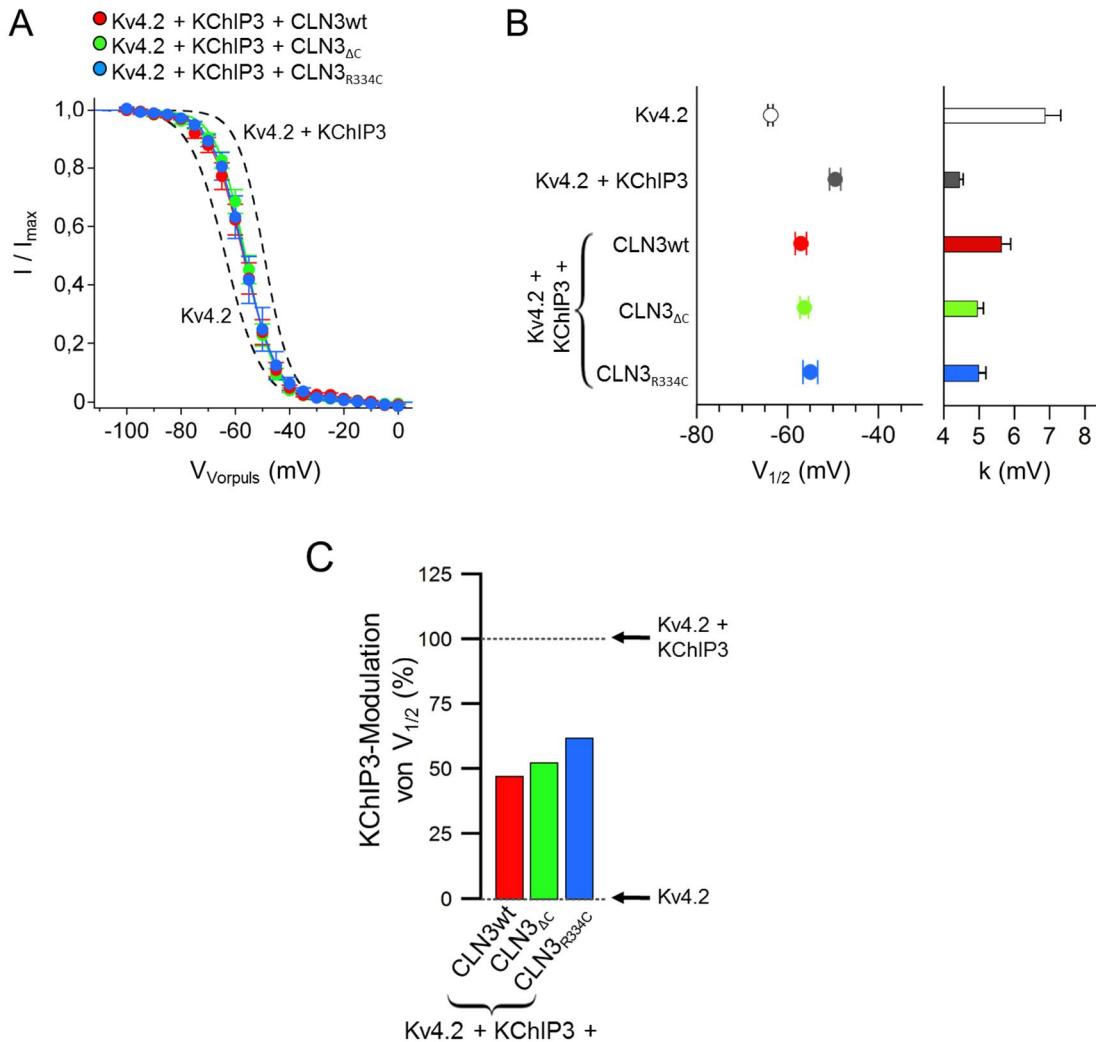


Abbildung 4.29: Effekt der CLN3-Mutanten auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen

A: Inaktivierungskurve von $\dots \text{Kv4.2} \pm \text{KChIP3}$, $\text{---} \text{Kv4.2} + \text{KChIP3} + \text{CLN3}^{\text{wt}}$, $\text{---} \text{Kv4.2} + \text{KChIP3} + \text{CLN3}_{\Delta C}$ und $\text{---} \text{Kv4.2} + \text{KChIP3} + \text{CLN3}_{\text{R334C}}$. **B:** $V_{1/2}$ und k der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von $\text{Kv4.2} \pm \text{KChIP3} \pm \text{CLN3}^{\text{wt}}/\text{Mutante}$. **C:** Effekt von CLN3^{wt} , $\text{CLN3}_{\Delta C}$ und $\text{CLN3}_{\text{R334C}}$ auf $V_{1/2}$ der $\text{Kv4.2}/\text{KChIP3}$ -Steady-State-Inaktivierung als Anteil in % in Bezug auf die KChIP3-Modulation.

4.3.3.5 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Die $\text{Kv4.2}/\text{KChIP3}$ -Aktivierungskurve erfuhr bei zusätzlicher Coexpression des CLN3-Wildtyp-Proteins eine geringere Linksverschiebung und einen weniger steilen Verlauf, wie bereits in Kapitel 4.3.1.1.5 dargestellt. Bei zusätzlicher Coexpression der beiden untersuchten Mutanten war dieser Effekt deutlich geringer (Abbildung 4.30 A). So zeigte sich sowohl bei $\text{CLN}_{\Delta C}$ mit $V_{1/2} = +0,30 \pm 1,99$ mV ($p \leq 0,0001$; $n = 12$) als auch bei $\text{CLN}_{\text{R334C}}$ mit $V_{1/2} = +2,83 \pm 2,84$ mV ($p < 0,05$; $n = 14$) ein signifikanter

Unterschied zu CLN3wt (Abbildung 4.30 B). Die Aktivierungskurve bei zusätzlicher Coexpression von CLN3_{ΔC} war signifikant steiler mit $k = 23,7 \pm 0,69$ mV ($p \leq 0,0001$) als die bei CLN3wt, der Steigungsfaktor von CLN3_{R334C} unterschied sich mit $k = 25,8 \pm 1,34$ mV nicht signifikant von CLN3wt. In Abbildung 4.30 C ist deutlich zu sehen, dass die KChIP3-vermittelte Linksverschiebung der Kv4.2-Aktivierungskurve durch beide untersuchten CLN3-Mutanten im Gegensatz zum CLN3-Wildtyp-Protein kaum reduziert wurde.

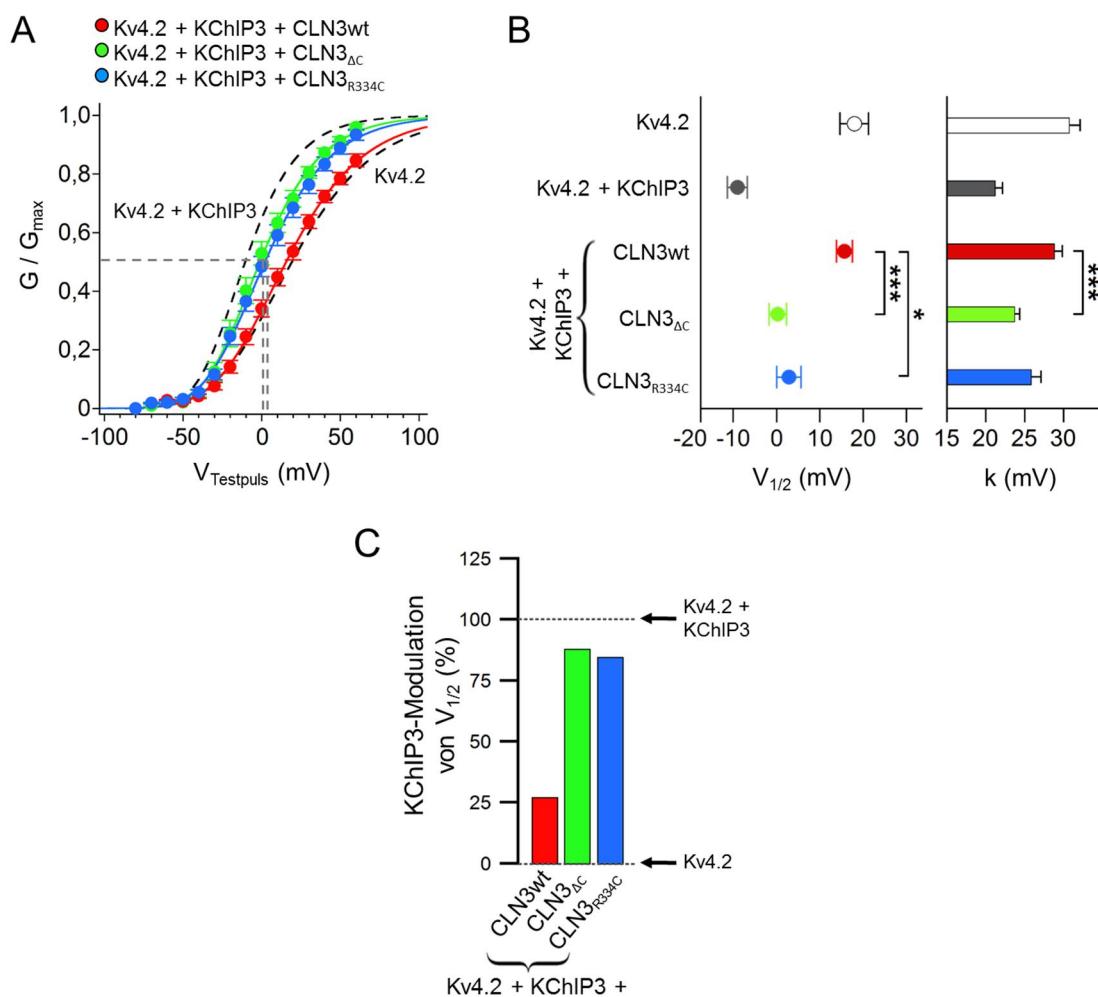


Abbildung 4.30: Effekt der CLN3-Mutanten auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen

A: Aktivierungskinetik von \dots Kv4.2 \pm KChIP3, $\textcolor{red}{—}$ Kv4.2 + KChIP3 + CLN3wt, $\textcolor{green}{—}$ Kv4.2 + KChIP3 + CLN3_{ΔC} und $\textcolor{blue}{—}$ Kv4.2 + KChIP3 + CLN3_{R334C}. **B:** $V_{1/2}$ und k der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2 \pm KChIP3 \pm CLN3_{WT}/Mutante (Signifikanz: * $p < 0,05$; *** $p \leq 0,0001$). **C:** Effekt von CLN3wt, CLN3_{ΔC} und CLN3_{R334C} auf $V_{1/2}$ der Kv4.2/KChIP3-Aktivierung als Anteil in % in Bezug auf die KChIP3-Modulation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CLN3-Mutanten ebenfalls einen Effekt auf die KChIP3-Modulation der Kv4.2-Kanäle hatten, welcher einem abgeschwächten CLN3-Wildtyp-Effekt entsprach. Neue Effekte waren nicht zu beobachten. Beim Vergleich der beiden Mutanten miteinander zeigte sich, dass die Punktmutante CLN3_{R334C} meist einen stärkeren Effekt aufwies als die Deletionsmutante CLN3_{ΔC}.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte herausgefunden werden, ob das lysosomale Protein CLN3 über seine Interaktion mit KChIP3 die elektrophysiologischen Eigenschaften von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen beeinflussen kann. Die beobachteten Effekte einer CLN3-Coexpression legen nahe, dass CLN3 der KChIP3-vermittelten Modulation von Kv4.2-Kanälen entgegenwirkt.

5.1 KChIP3/Calsenilin/DREAM als neuronaler Calciumsensor

KChIP3 findet sich v. a. im ZNS und nimmt unter den KChIPs eine besondere Rolle ein. Zwar hat diese β -Untereinheit nicht den stärksten Kv-Kanal-modulierenden Effekt (Abbildung 5.1 A), dafür besitzt KChIP3 noch zwei weitere Funktionen: Zum einen kann es mit dem Ca^{2+} -Signaling-Protein Presenilin interagieren und die proteolytische Spaltung von Presenilin 2 beeinflussen (Abbildung 5.1 B) (Buxbaum et al. 1998). In dieser Funktion wird es als Calsenilin bezeichnet. Aufgrund seiner proapoptotischen Wirkung wird die chronische Steigerung des Calsenilin-Levels mit der Alzheimer-Erkrankung in Verbindung gebracht (Lilliehook et al. 2002; Jo et al. 2004). Zum anderen weist KChIP3 eine 99%-ige Homologie zum Protein DREAM (*Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator*) auf (Carrión et al. 1999). Es kann im Zellkern an DNA binden und dort als Transkriptionsrepressor wirken (Abbildung 5.1 C) (Mellström und Naranjo 2001). Über eine Calcium-abhängige Bindung an die regulatorische Sequenz des Prodynorphin-Gens, welches das endogene Opioidpeptid Dynorphin kodiert, spielt es eine Rolle bei der Schmerzempfindung. DREAM bindet bei einer Calciumkonzentration von bis zu 100 nM (knapp über der physiologischen Konzentration) an DNA. Bei erhöhtem Calcium dissoziert DREAM von der DNA ab, sodass Dynorphin transkribiert wird (Cheng et al. 2002); die Halbmaximale liegt unter 1 μM freies Calcium (Burgoyne und Weiss 2001). Es gibt ferner Hinweise darauf, dass KChIP3/Calsenilin/DREAM in der Calcium-gebundenen Form als Dimer vorliegt und dass es an der zweiten EF-Hand Magnesium statt Calcium bindet (nicht gezeigt in Abbildung 5.1) (Osawa et al. 2005; Lusin et al. 2008). Außerdem kann

KChIP3/Calsenilin/DREAM im Zellkern auch die Transkription des CACNA1c-Gens unterdrücken, welches die α -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals Cav1.2 codiert. Hier erfolgt allerdings bei erhöhter zytoplasmatischer Calciumkonzentration eine CaMKII-vermittelte Translokation von KChIP3/Calsenilin/DREAM in den Zellkern (nicht gezeigt in Abbildung 5.1) (Ronkainen et al. 2011).

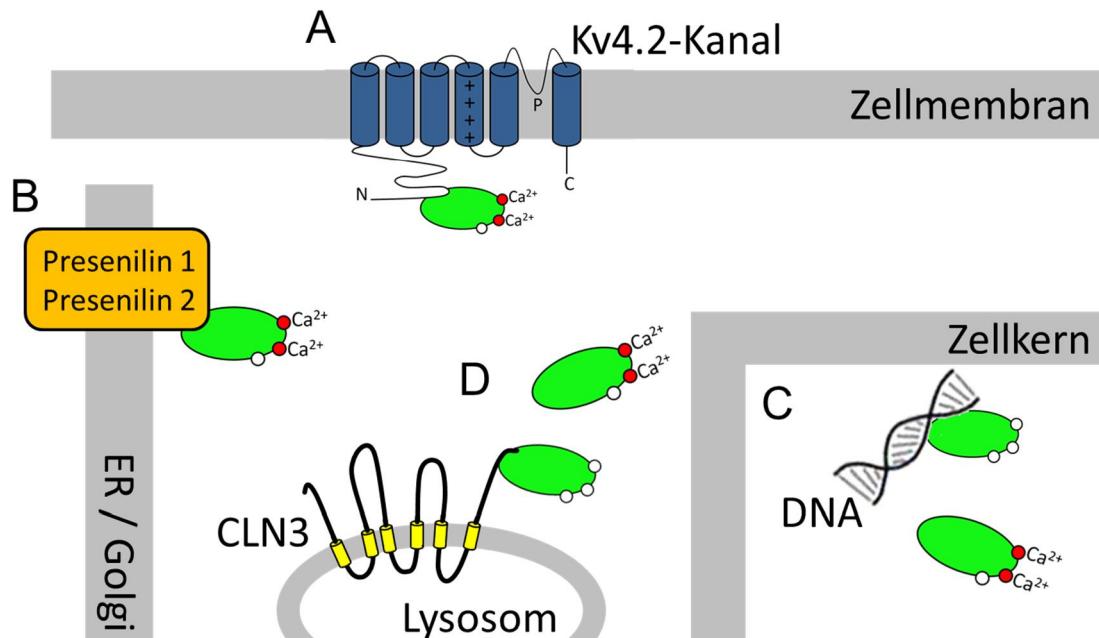


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Funktionen von KChIP3/Calsenilin/DREAM

A: KChIP3 bindet an Kv4.2-Kanäle und beeinflusst deren Stromeigenschaften. B: Calsenilin interagiert mit dem Ca^{2+} -Signaling-Protein Presenilin und beeinflusst die proteolytische Spaltung von Presenilin 2 (Buxbaum et al. 1998). C: DREAM bindet im Zellkern an die DNA und wirkt dort als Calcium-abhängiger Transkriptionsrepressor (Carrión et al. 1999). D: KChIP3 bindet an das lysosomale Protein CLN3, wobei die Lokalisation dieser Interaktion unbekannt ist. In der Calcium-gebundenen Form dissoziiert es von CLN3 ab (Chang et al. 2007; Getty und Pearce 2011).

Der Einfluss von KChIP3 auf die Stromeigenschaften der Kv4.2-Kanäle ist bereits gut untersucht. So ist bekannt, dass Coexpression von KChIP3 eine Erhöhung der Kv4.2-Kanalexpression in der Membran bewirkt, was eine Steigerung der Stromdichte zur Folge hat. Außerdem bewirkt KChIP3-Coexpression Veränderungen im Schaltverhalten wie eine Verlangsamung der initialen Komponente der Kv4.2-Inaktivierung, eine Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung, eine Rechtsverschiebung der Inaktivierungskurve und eine Linksverschiebung der Aktivierungskurve (An et al. 2000; Bähring et al. 2001b). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit konnten

diese Effekte bestätigt werden. Wobei zu erwähnen ist, dass die Verschiebung der Aktivierungskurve aufgrund der deutlichen Größenunterschiede der Stromamplituden möglicherweise artefaktbehaftet und daher nur eingeschränkt interpretierbar ist. Das spiegelt sich auch in den meist sehr breiten Messstreuungen der entsprechenden Daten wider.

Bei den KChIPs handelt es sich um Calcium-bindende Proteine aus der Familie der NCS (Neuronalen Calciumsensoren). Anders als bei der DREAM/DNA-Interaktion ist eine Calciumabhängigkeit des Bindungsverhaltens der KChIPs zum Kv4.2-Kanal nicht eindeutig geklärt. Groen und Bähring beobachteten in Patch-Clamp-Experimenten am Beispiel von Kv4.3/KChIP2-Kanalkomplexen mittels Verwendung von Mutationen der EF-Handmotive des KChIP2, dass die Bildung dieses Komplexes nicht Calcium-abhängig ist (Groen und Bähring 2017). Pioletti et al. dagegen stellten anhand von Pulldown-Assays eine Calciumabhängigkeit der Bindung zwischen Kv4.3 und KChIP1 ebenfalls unter Verwendung von Mutationen der EF-Handmotive dar (Pioletti et al. 2006). Möglicherweise müssen alle drei EF-Handmotive mutiert und damit unfähig sein Calcium zu binden, um die Calciumabhängigkeit der Bindung zwischen Kv4-Kanälen und KChIPs aufzuheben (Groen und Bähring 2017). Unabhängig vom Bindungsverhalten zwischen KChIPs und Kv4-Kanälen konnte gezeigt werden, dass die KChIP-vermittelte Modulation der Stromeigenschaften von Kaliumkanälen durch Mutationen in den aktiven EF-Handmotiven 2, 3 oder 4 verloren geht (An et al. 2000; Groen und Bähring 2017). Zudem können Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration zu einer Konformationsänderung von KChIPs führen (Osawa et al. 2005; Bähring 2018). In der vorliegenden Arbeit konnte bei Perfusion des Zytosplasmas mit der nominal Ca^{2+} -freien Intrazellulärösung eine Reduktion der KChIP3-Modulation beobachtet werden. Bei Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration auf 50 μM dagegen zeigte sich bei Messung sofort nach Calciumgabe eine KChIP3-Modulation, welche sich von den Ergebnissen bei einer zytoplasmatischen Calciumkonzentration von 15 nM nicht unterschied. Einige Minuten nach Perfusion mit der Hoch-Calcium-Lösung fanden sich Veränderungen der Kanaleigenschaften, die einer Reduzierung der KChIP3-Modulation entsprachen. Eine mögliche Erklärung für die Abnahme der Kv4.2/KChIP3-Stromdichten während der

Perfusionszeit ist eine Erhöhung des Serienwiderstands im Laufe der Messungen. V. a. große Stromamplituden sind sehr empfindlich vom Serienwiderstand abhängig. Um diese Fehlerquelle möglichst minimal zu halten, wurde eine Kompensation des Serienwiderstands durchgeführt, indem eine Spannung, welche proportional zum gerade injizierten Strom war, zur Kommandospannung hinzugefügt wurde. So konnte der Serienwiderstand bis zu 90% kompensiert werden. Auch zeigte sich bei den anderen untersuchten Kanaleigenschaften (Makroskopische Aktivierung, Erholung von der Inaktivierung, Steady-State-Inaktivierung), welche nicht vom Serienwiderstand beeinflusst werden, eine Reduktion der KChIP3-Modulation, was konsistent zu den Resultaten der Abnahme der Stromdichte ist. Ebenfalls passend ist, dass bei allen untersuchten Kanaleigenschaften der zeitliche Verlauf nicht konstant war, sondern im Zeitraum zwischen ca. 12 und 15 min die stärkste Wirkung zeigte. Das legt die Vermutung nahe, dass ein einziger Mechanismus die Veränderungen unabhängig von einer CLN3-Coexpression hervorrief. Die Abnahme der Stromdichte während der Messungen könnte auch einen sogenannten Run-down darstellen. Dabei handelt es sich um ein Phänomen, bei dem im zeitlichen Verlauf der Patch-Clamp-Messungen, vermutlich durch Auswaschung der physiologischen intrazellulären Bestandteile, die Ströme kleiner werden. Dieses Phänomen weist Unterschiede bei den verschiedenen Kaliumkanälen auf, resultiert jedoch immer in einer Abnahme der Stromdichte über die Zeit. Calcium-abhängige Enzyme, die durch erhöhte Calciumkonzentrationen aktiviert bzw. deaktiviert werden und den Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplex modifizieren, könnten ebenfalls einen Einfluss haben. Bekannt ist u. a. eine Calcium-abhängige Bindung von KChIP3 an Calmodulin (CaM). CaM spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von CaM-abhängigen Enzymen, wie z. B. der Phosphatase Calcineurin (Ramachandran et al. 2012). Die Verwendung des Calcineurin-Inhibitors FK506 blockiert den KChIP3-vermittelten Transport von Kv4.2 und reduziert die Kanalexpression in der Zellmembran (Ruiz-Gomez et al. 2007). Enzyme könnten KChIP3-abhängig aber auch KChIP3-unabhängig direkt die Kv4.2-Kanäle beeinflussen, wobei hierzu keine Untersuchungen gefunden werden konnten. Eine Enzym-vermittelte Modifizierung des Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexes könnte die zeitliche Verzögerung und den Sprung im Verlauf erklären. Um eine ganz ähnliche Beobachtung handelt es sich beim bereits oben erklärten Run-down der Stromdichte von Kaliumkanälen. Die

Calcium-abhängige Reduktion der KChIP3-Modulation könnte auch direkt vom KChIP3 abhängig sein, da es sich bei diesen akzessorischen β -Untereinheiten um Calciumsensoren handelt, die bekanntermaßen eine Calcium-abhängige Funktion besitzen. Neben Enzymen sind auch Calciumkanäle, die die intrazelluläre Calciumkonzentration beeinflussen, von Bedeutung. Anderson et al. beobachteten eine Linksverschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve vom I_{SA} unter Verwendung des Calciumkanalblockers Mibepridil, welcher den Cav3-vermittelten T-Typ-Strom blockiert. Dies zeigte sich jedoch nicht unter der Applikation des High-voltage-activated-Calciumkanalblockers SNX-483 in Sternzellen in Rattenkleinhirnschnitten (Anderson et al. 2010a). Daher wird vermutet, dass ein Calciumeinstrom via Cav3-Kanäle in die Zelle das *Gating* des A-Typ Stroms modifiziert (Bähring 2018). Eine Coimmunopräzipitation von Anderson et al. deutet auf einen Signaling-Komplex aus Kv4.2, KChIP3 und Cav3 hin. Die Linksverschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve des I_{SA} durch Mibepridil ließ sich bei Coexpression von Kv4.2, KChIP3, Cav3 und einer DPP-Untereinheit in tsA-201-Zellen reproduzieren, jedoch nicht, wenn KChIP3 durch KChIP1, KChIP2 oder KChIP4 ersetzt wurde (Anderson et al. 2010a; Anderson et al. 2010b). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass durch einen Cav3-vermittelten Calciumeinstrom das *Gating* von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen beeinflusst wird (Bähring 2018). Hierzu passt auch die Beobachtung von Heath et al., dass die regionalen Unterschiede der Cav3-Kanalexpression direkt mit dem Vorhandensein des I_{SA} korreliert. Diese Unterschiede verschwanden bei Verwendung von Calciumkanalblockern (Heath et al. 2014). Es kann zudem geschlussfolgert werden, dass der Calciumeinstrom und damit die Bindung von Calcium an KChIP3 eine Rechtsverschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve bewirkt, was einer Verstärkung der KChIP3-vermittelten Modulation von Kv4.2-Kanälen entspricht. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine Linksverschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve unter Perfusion mit nominal Ca^{2+} -freier Pipettenlösung beobachtet werden, was die oben erwähnte Vermutung von Anderson et al. unterstützt (Anderson et al. 2010a; Anderson et al. 2010b). Ein Einfluss von Calcium direkt auf Kv4.2-Kanäle ist bisher nicht beschrieben. Wang et al. beobachteten, dass in Anwesenheit von Arachnidonsäure die Calcium-abhängigen Effekte auf den I_{SA} verschwanden, sodass eine KChIP-vermittelte Calciumabhängigkeit nahe liegt (Wang et al. 2005).

Diese Vermutung passt zur der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Korrelation zwischen der initialen KChIP3-Modulation und der Ausprägung der Veränderung im Verlauf der Zeit bei Applikation der Hoch-Calcium-Lösung. Denn bei Betrachtung der einzelnen Zellen war festzustellen, dass sich diese Wirkung umso stärker zeigte, je ausgeprägter die initiale KChIP3-Modulation direkt nach Zellöffnung war. Ursächlich könnte eine Veränderung der KChIP3-Modulation des Kv4.2-Kanals per se sein, d. h. dass sich in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration die Wirkung des KChIP3 auf den Kv4.2-Kanal verändert. Bekannt ist, dass KChIP1 Calcium-abhängig den Transport von Kv4.2-Kanälen in die Plasmamembran unterstützt (Bähring 2018), eine ähnliche Funktion ist auch für KChIP3 denkbar und würde zu der in der vorliegenden Arbeit gemessenen Erhöhung der Stromdichte bei intrazellulärer Calciumapplikation (sowohl von 15 nM als auch 50 µM) im Vergleich zur Gabe der nominal Ca^{2+} -freien Intrazellulärlösung passen. Aber auch eine Calcium-abhängige Beeinflussung des Bindungsverhaltens von Kv4.2 und KChIP3 könnte die Veränderungen der KChIP3-Modulation der Kv4.2-vermittelten Ströme bei verschiedenen intrazellulären Calciumkonzentrationen erklären. Wie es auch bei DREAM zu beobachten ist, könnte die Dissoziation des KChIP3 vom Kv4.2-Kanal bei Calciumerhöhung eine Ursache sein (Burgoyne und Weiss 2001). Zaidi et al. beobachteten, dass KChIP3 bei erhöhter zytoplasmatischer Calciumkonzentration vermehrt im Zellkern lokalisiert war. Da dies auch für die EF-Hand-Mutante galt, die unfähig war Calcium zu binden, war vermutlich nicht die direkte Bindung von Calcium, sondern ein anderer Calcium-abhängiger Mechanismus für die Translokation in den Zellkern verantwortlich (Zaidi et al. 2004). Möglicherweise sind derselbe Mechanismus und die daraus folgende Translokation in den Zellkern für die Reduzierung der KChIP3-Modulation der Kv4.2-Kanäle ursächlich. Dies würde auch zur zeitlichen Verzögerung und zur Zunahme der Veränderung während der Perfusionszeit passen. Außerdem ließe sich damit die beobachtete KChIP3-Abhängigkeit der Reduzierung gut erklären: Je mehr KChIP3 an den Kv4.2-Kanälen gebunden vorlag, also je stärker die KChIP3-Modulation unmittelbar nach Zellöffnung war, umso mehr KChIP3 könnte sich vom Kv4.2-Kanal lösen und umso größer wären die Veränderungen der Stromeigenschaften.

5.2 CLN3-Effekt auf die Stromeigenschaften von Kv4.2-Kanälen

Zusätzliche Coexpression von CLN3 hatte unter bestimmten Bedingungen einen Einfluss auf die Stromeigenschaften der Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe. Dabei war die Wirkung stets dieselbe: Die Stromdichte war reduziert, die Erholung von der Inaktivierung war verlangsamt und die Steady-State-Inaktivierungskurve zeigte eine Linksverschiebung. Die makroskopische Inaktivierungskinetik behielt ihren dreifach-exponentiellen Verlauf, wobei die initiale und die mittlere Zeitkonstante erniedrigt waren. Der CLN3-Effekt auf die dritte Zeitkonstante dagegen war nicht ganz konsistent, wobei zu beachten ist, dass es sich bei diesem Wert auch um einen relativ ungenau zu messenden und daher fehleranfälligen Wert handelt. Insgesamt ließen sich all diese Effekte, mit Ausnahme der dritten Zeitkonstante der makroskopischen Inaktivierungskinetik, durch eine Reduktion der KChIP3-Modulation der Kv4.2-Kanäle erklären, da sich die Messwerte bei zusätzlicher Coexpression von CLN3 den Daten von Kv4.2-Kanälen ohne KChIP3-Coexpression annäherten und diese z. T. sogar erreichten, jedoch nicht unter- oder überschritten. Bei der Erholung von der Inaktivierung fand sich eine bemerkenswerte Beobachtung, da bei zusätzlicher CLN3-Coexpression doppelt-exponentielle Recovery-Kinetiken auftraten. Dies legt nahe, dass sowohl sich schnell erholende als auch sich nur langsam erholende Kanäle gleichzeitig zu unterschiedlichen Anteilen vorlagen. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass es Kv4.2-Kanäle mit und ohne KChIP3-Modulation gab. Eine weitere mögliche Erklärung für die doppelt-exponentielle Recovery-Kinetik ist eine Erholung aus zwei unterschiedlichen Inaktivierungszuständen der Kanäle. Z. B. weisen Kv1.5-Kanäle grundsätzlich eine doppelt-exponentielle Recovery-Kinetik auf, da diese sowohl im offenen als auch im geschlossenen Zustand inaktivieren können (Rich und Snyders 1998). Kv4-Kanäle gehen vornehmlich aus dem geschlossenen Zustand in einen inaktivierten Zustand über und zeigen eine einfach-exponentielle Recovery-Kinetik. In Gegenwart eines Open-Channel-Blockers kann diese Kinetik jedoch biphasisch erscheinen, da sich zur eigentlichen Recovery noch die Erholung von der Blockierung gesellt (siehe z. B. Groen und Bähring 2017). Eine derartige Funktion des CLN3, etwa vermittelt durch einen seiner Proteintermini, ist nicht sicher auszuschließen, aber aufgrund der KChIP3-Abhängigkeit des CLN3-Effekts eher unwahrscheinlich. Es ist

eher anzunehmen, dass in Gegenwart von CLN3 unterschiedliche Kanalpopulationen mit schneller und langsamer Recovery-Kinetik vorlagen.

In den verschiedenen Messreihen zeigte der CLN3-Effekt eine unterschiedlich starke Ausprägung. Eine Rolle spielten dabei die Zeit nach Transfektion, die verwendete Zelllinie sowie das Konzentrationsverhältnis von CLN3-DNA zu KChIP3-DNA. Der maximale CLN3-Effekt war am 2. Tag nach Transfektion zu beobachten. Am 1. und 3. Tag war der CLN3-Effekt auf alle Stromeigenschaften deutlich schwächer. Es wird beim CLN3-Protein eine von der Zelllokalisierung abhängige Wirkung diskutiert (Getty und Pearce 2011). Es besteht die Vermutung, dass CLN3 über das ER und den Golgi-Apparat zunächst zur Plasmamembran der Zelle transportiert wird, bevor es schließlich ins Lysosom gelangt (Järvelä et al. 1998; Järvelä et al. 1999; Mao et al. 2003; Phillips et al. 2005). Falls CLN3 seine Wirkung auf die Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe nur bei Co-Lokalisierung an der Zellmembran ausübt, ließe sich die Zunahme des CLN3-Effekts am 2. Tag dadurch erklären, dass die Expression des CLN3-Proteins an der Membran am 2. Tag nach Transfektion sein Maximum erreichte. Anschließend wurde das CLN3 möglicherweise weiter in das Lysosom transportiert und verlor so seinen Einfluss auf die Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe, was zu einer Reduzierung des Effekts am 3. Messtag führte. Da Lysosomen innerhalb der Zelle frei beweglich sind, ist eine Interaktion von CLN3 mit Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen, auch wenn CLN3 sich in der lysosomalen Membran befindet, bei einer Lokalisierung der Lysosomen nahe zur Plasmamembran nicht auszuschließen. Bemerkenswerterweise spielte auch die Transfektionsart des Kv4.2-Kanals eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung des CLN3-Effekts. Bei Verwendung der stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie war der CLN3-Effekt im Vergleich zur transienten Kv4.2-Transfektion stark reduziert. Diese Beobachtung lässt die Vermutung aufkommen, dass das CLN3-Wildtyp-Protein seinen Einfluss auf die Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe auf deren Weg von der Translation bis zur Zellmembran ausübte. Zwar wird auch in der stabilen Kv4.2-HEK293-Zelllinie der Kanal ständig erneuert (sogenannter Turn-over), aber bei transiente Transfektion werden innerhalb eines kurzen Zeitraumes große Mengen an Kv4.2-, KChIP3- und CLN3-Protein parallel produziert, was die Möglichkeit zur Interaktion auf dem Weg vom ER zur Plasmamembran erhöht. Unabhängig von diesen Überlegungen stellt sich

bei der Interaktion von CLN3 mit KChIP3 die Frage, ob sich ein ternärer Kv4.2/KChIP3/CLN3-Komplex bildet und die Stromeigenschaften durch die zusätzliche Bindung von CLN3 an die Kv4/KChIP3-Kanalkomplexe beeinflusst werden oder ob eine Bindung von CLN3 und KChIP3 ohne Kv4.2 vorliegt. Durch eine kompetitive Interaktion, bei der CLN3 und Kv4.2 um die KChIP3-Bindung konkurrieren, ließe sich die Reduktion der KChIP3-Modulation durch CLN3 am besten erklären. Denn durch ein „Abfangen“ des KChIP3 kann dieses am Kv4.2-Kanal seinen Einfluss nicht mehr ausüben. Außerdem ist bekannt, dass CLN3 eine wichtige Rolle beim *Trafficking* spielt (Phillips et al. 2005). Möglicherweise ist CLN3 auch für das *Trafficking* des KChIP3 verantwortlich und verhindert über eine veränderte Lokalisation die Bindung an den Kv4.2-Kanal. Zur Hypothese der kompetitiven KChIP3-Bindung durch CLN3 passt die Dosisabhängigkeit des CLN3-Effekts. Je mehr CLN3 vorhanden ist, umso größer ist der kompetitive Effekt und umso geringer die KChIP3-Bindung und damit auch die KChIP3-Modulation der Kv4.2-Kanäle, wie es die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, denn bei einem 20-fachen CLN3-Überschuss war der CLN3-Effekt viel stärker ausgeprägt als bei einem 10-fachen Überschuss. Die Ergebnisse der Messungen mit der Hoch-Calcium-Lösung dagegen passen zur Annahme eines ternären Komplexes aus Kv4.2, KChIP3 und CLN3 mit veränderten Stromeigenschaften. Durch die zusätzliche Bindung von CLN3 könnte die KChIP3-Modulation reduziert werden. Chang et al. haben gezeigt, dass bei einer intrazellulären Calciumkonzentration von 50 µM die Bindung von CLN3 und KChIP3 signifikant reduziert war (Chang et al. 2007). Das CLN3-Wildtyp-Protein könnte sich bei erhöhter Calciumkonzentration vom Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplex lösen und die Hemmung der KChIP3-Modulation könnte so verschwinden. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit ließ sich bei Verwendung der Hoch-Calcium-Lösung unmittelbar nach Zelloffnung eine kaum verminderte KChIP3-Modulation feststellen trotz zusätzlicher CLN3-Coexpression, welche bei physiologischer Calciumkonzentration die KChIP3-Modulation signifikant reduzierte. CLN3 bewirkte auch ohne Coexpression von KChIP3 einen signifikanten Effekt auf die makroskopische Inaktivierung von Kv4.2-Kanälen, und zwar derart, dass der Effekt ebenfalls einer Reduktion der KChIP3-Modulation entspräche. Daraus ergeben sich zwei Möglichkeiten: Entweder war der CLN3-Effekt nicht allein KChIP3-vermittelt oder

aber es lag in den Zellen endogenes KChIP3 vor. Letzteres ist die naheliegendere Erklärung. Die in den Experimenten verwendeten HEK293-Zellen besitzen nicht nur Proteine, deren DNA mittels Transfektion in die Zelle eingebracht werden, sondern exprimieren auch endogene Proteine, sodass das Vorhandensein von endogenem KChIP3 nicht auszuschließen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden auch zwei CLN3-Mutanten untersucht. Bisher sind 57 CLN3-Mutationen bekannt, die die neuropädiatrische Erkrankung JNCL auslösen können (NCL mutation database; MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London). Dabei unterscheiden sich die Mutanten z. T. sehr stark voneinander. Am häufigsten ist die Deletionsmutante CLN3_{ΔC} mit einer 1,02-kb-Deletion. Es handelt sich hierbei um ein verkürztes Protein, dem drei Transmembrandomänen und zwei Schleifen fehlen (siehe Abbildung 2.7 A). Dies führt, wenn man eine lysosomale Lokalisation voraussetzt, zum einen dazu, dass der C-Terminus im Lumen liegt, zum anderen gehen die lysosomalen Sorting-Sequenzen verloren (Ezaki et al. 2003; Phillips et al. 2005). Im Hinblick auf die Veränderungen des C-Terminus ist die KChIP3-Bindungsfähigkeit der CLN3-Mutanten zu diskutieren: Chang et al. fanden heraus, dass die Bindungsstelle für KChIP3 im CLN3-Protein am C-Terminus im Bereich ab der Aminosäure 314 liegt (siehe Abbildung 2.6) (Chang et al. 2007). Diese putative Bindungsdomäne fehlt bei der Deletionsmutante CLN3_{ΔC} vollständig (siehe Abbildung 2.7 A), wodurch die Interaktion mit KChIP3 eigentlich aufgehoben sein müsste. Trotzdem zeigte die Deletionsmutante in der vorliegenden Arbeit noch deutliche Effekte. Bei der Punktmutante CLN3_{R334C} liegt die von Chang et al. proklamierte Bindungsstelle bis auf diese Punktmutation korrekt vor (siehe Abbildung 2.7 B). Hierzu passt, dass der Effekt der Punktmutante zwar reduziert, aber nicht vollständig aufgehoben und zudem wesentlich stärker ausgeprägt war als der Effekt der Deletionsmutante. Betrachtet man jedoch die CLN3-Membrantopologie genauer, so fällt auf, dass der C-Terminus erst ab Aminosäure 379 im Zytosol liegt (siehe Abbildung 2.6). Unter der Annahme, dass die KChIP3/CLN3-Interaktion bei lysosomaler Lokalisation des CLN3 stattfindet, müsste sich die KChIP3-Bindungsstelle im Zytosol, also am C-Terminus ab Aminosäure 379, befinden. Damit läge die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Punktmutation R334C außerhalb der Bindungs-

domäne. In diesem Fall dürfte die Interaktion zwischen KChIP3 und CLN3_{R334C} gar nicht beeinträchtigt sein, was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigen. Fast alle der bisher bekannten CLN3-Punktmutationen, die mit JNCL assoziiert werden, sind vor Aminosäure 379 lokalisiert. Nur eine der bisher entdeckten Missense-Mutanten weist eine zytoplasmatische Mutation auf (NCL mutation database; MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London). Daraus ergibt sich die Vermutung, dass die Interaktion zwischen CLN3 und KChIP3 nicht bei einer CLN3-Lokalisation im Lysosom, sondern eher an der Plasmamembran bzw. frei im Zytoplasma stattfindet. Eine von der Zelllokalisierung abhängige Wirkung des CLN3-Proteins ist bei Betrachtung der Mutanten von besonderer Bedeutung. Man nahm lange Zeit an, dass das trunkierte Protein aufgrund einer Fehlfaltung das ER nicht verlassen kann und daher funktionslos ist (Järvelä et al. 1999). Allerdings wird auch eine Restfunktion der Deletionsmutante diskutiert. Es gibt Untersuchungen, die das Protein CLN3_{ΔC} nicht nur im ER, sondern auch im Zytoplasma und Zellkern nachweisen konnten (Kitzmüller et al. 2008). Im Lysosom ließ es sich bisher jedoch nicht nachweisen. In der vorliegenden Arbeit konnten bei zusätzlicher Coexpression von CLN3_{ΔC} signifikante Veränderungen in der Stromdichte und der Steady-State-Inaktivierungskurve von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen beobachtet werden. Bei Betrachtung aller Stromeigenschaften zeigte sich, dass die Deletionsmutante wie das CLN3-Wildtyp-Protein die KChIP3-Modulation reduzierte, mit maximaler Wirkung am 2. Tag nach Transfektion, wenn auch deutlich schwächer ausgeprägt und nur in den beiden oben genannten Eigenschaften signifikant. Dies widerspricht der Annahme, dass die untersuchte Deletionsmutante aufgrund einer Fehlfaltung das ER nicht verlassen kann. Neben den Deletionsmutanten können auch Punktmutanten des CLN3-Proteins zur JNCL führen. An reinen Missense-Mutationen sind bisher 11 verschiedene Loci bekannt. Bei näherer Betrachtung fällt auf, dass diese, bis auf eine Ausnahme (N416G), luminal bzw. in den Transmembrandomänen gelegen sind (NCL mutation database; MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London). Stellvertretend für diese Mutanten wurde in der vorliegenden Arbeit die Punktmutante CLN3_{R334C} verwendet, bei der es durch eine Missense-Mutation bei Aminosäure 334 zum Einbau eines Cysteins anstatt eines Arginins kommt. Die mutierte Aminosäure liegt intralysosomal in Schleife 5 (siehe Abbildung 2.7 B). Die

mit JNCL assoziierten Punktmutanten des CLN3-Proteins sind im Gegensatz zur Deletionsmutante unverändert im Lysosom lokalisiert (Haskell et al. 2000; Mao et al. 2003; Phillips et al. 2005). Je nach Mutation gibt es auch atypische mildere Verlaufformen von JNCL. Die Punktmutante CLN3_{R334C} jedoch ruft wie die Deletionsmutante die klassische Form der JNCL hervor (Munroe et al. 1997; Golabek et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die Punktmutante CLN3_{R334C} einen Einfluss auf die Stromeigenschaften der Kv4.2/ KChIP3-Kanalkomplexe hatte. Im Vergleich zur Deletionsmutante war der Effekt meist stärker ausgeprägt, im Vergleich zum CLN3-Wildtyp-Protein jedoch deutlich schwächer. Auch war ein Maximum des Effekts am 2. Tag zu beobachten. Die deutliche Reduktion des CLN3-Effekts der Deletionsmutante könnte darauf beruhen, dass dieses Protein im ER zurückgehalten wird, wie Järvelä et al. vermuten (Järvelä et al. 1999). Dass dennoch ein schwacher CLN3-Effekt beobachtet wurde, könnte dabei eine Folge der starken Überexpression sein, sodass doch einige Proteine das ER verlassen. Dies würde bedeuten, dass nicht das fehlerhafte Protein an sich, sondern die Fehllokalisierung die Abschwächung des CLN3-Effekts verursacht. Gegen diese Hypothese sprachen jedoch die Ergebnisse der Punktmutante, die korrekt im Lysosom lokalisiert sein soll (Haskell et al. 2000; Mao et al. 2003; Phillips et al. 2005), aber dennoch in der vorliegenden Arbeit einen deutlich reduzierten CLN3-Effekt aufwies. Allerdings ist der genaue Ablauf bis zur finalen Lokalisation der Punktmutante nicht ausreichend untersucht. Es wird diskutiert, dass das CLN3-Wildtyp-Protein über die Zellmembran transportiert wird (Järvelä et al. 1998; Järvelä et al. 1999; Mao et al. 2003; Phillips et al. 2005), wo eine Interaktion mit dem Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplex stattfinden könnte. Möglicherweise ist dieser Vorgang, trotz letztendlich korrekter Lokalisation im Lysosom, bei der Punktmutante CLN3_{R334C} gestört und damit auch die Interaktion mit KChIP3.

5.3 Schlussfolgerungen für einen möglichen Zusammenhang mit JNCL

Bei JNCL kommt es durch CLN3-Mutationen zu den namensgebenden auto-fluoreszierenden Ablagerungen sowie zur Beeinflussung lysosomaler Enzyme (Phillips et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass sowohl CLN3 als auch

die zwei untersuchten Mutanten CLN3_{ΔC} und CLN3_{R334C} einen Einfluss auf die Strom-eigenschaften der Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe hatten. Zu diskutieren ist, ob diese Interaktion bei der Ausprägung der Krankheit eine Rolle spielt. Typische Symptome einer JNCL sind progrediente Retinopathie, Lähmung, Epilepsie, Abbau der Kognition („Demenz“), Depression und Psychose (Adams und Mink 2013). Grundsätzlich ist bei den auf Proteinüberexpression basierenden Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kritisch zu hinterfragen, ob die physiologische Menge des CLN3 merklichen Einfluss ausüben kann. Es ist unklar, in welcher Menge CLN3 intrazellulär vorliegt. Ezaki et al. gelang es erst nach Aufreinigung (*Purification*) das CLN3-Protein im Gehirn von Mäusen durch eine Affinitätschromatographie mit anti-mCLN3 zu detektieren (Ezaki et al. 2003). Dies lässt vermuten, dass CLN3 physiologisch nur in sehr geringer Menge vorliegt. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde CLN3 in 10- bis 20-fachem Überschuss zu KChIP3 transfiziert. Dabei hat sich eine deutliche Dosis-abhängigkeit des CLN3-Effekts gezeigt. Es bleibt aber unklar, ob der CLN3-Effekt nur *in vitro* und oder auch *in vivo* existiert.

5.3.1 Pathologische Veränderungen in Assoziation mit Kv4.2-Kanälen

Kv4.2-Kanäle im ZNS vermitteln den unterschwellig aktivierten A-Typ-Strom I_{mA} und kontrollieren die neuronale Erregbarkeit durch frühzeitige Hemmung einer Depolarisation (Serôdio et al. 1994; Coetzee et al. 1999). Dem A-Typ-Strom wird eine neuro-protektive Funktion unter ischämischen Bedingungen zugeschrieben (Deng et al. 2011). Ein verminderter I_{mA} ist bei Temporallappen-Epilepsie zu beobachten (Bernard et al. 2004; D'Adamo et al. 2013). Lee et al. fanden heraus, dass auch eine gestörte Inaktivierung der Kv4.2-Kanäle eine wichtige Rolle bei der Epileptogenese spielt (Lee et al. 2014). Auch bei JNCL kann es zu Epilepsie kommen. Meist handelt es sich dabei um generalisierte Grandmal-Anfälle, aber auch andere Epilepsieformen sind möglich (Augustine et al. 2015). Jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die beiden untersuchten CLN3-Mutanten die KChIP3-Modulation weniger reduzierten als das CLN3-Wildtyp-Protein. Daraus würde sich eine Erhöhung der Stromdichte des Kv4.2-Kanals ergeben, welche normalerweise nicht mit Epilepsie in Verbindung gebracht wird. Neben der Epilepsie spielt der Kv4.2-Kanal auch bei der Erbkrankheit

Fragiles X-Syndrom eine Rolle. Dem Fragilen X-Syndrom liegt eine Mutation im Fragile-X-Mental-Retardation-Protein (FMRP) zugrunde. Sie ist die häufigste genetische Ursache kognitiver Retardierung. Daneben kommt es auch zu Hyperaktivität, Sprachstörungen und Epilepsie. Lee et al. konnten zeigen, dass FMRP die Expression der Kv4.2-Kanäle supprimiert. Beim Fragilen X-Syndrom kommt es zu einem Funktionsverlust des FMRP. Anhand von Knockout-Mäusen konnte beobachtet werden, dass die Kv4.2-Expression im Hippocampus in Abwesenheit von FMRP stark erhöht war, was zu einem Defizit in der Langzeitpotenzierung führte (Lee et al. 2011). Die Langzeitpotenzierung spielt eine wichtige Rolle beim Lernprozess. Unter Einsatz eines Kanalblockers konnte die Fähigkeit zur Langzeitpotenzierung wiedererlangt werden, was einen direkten Zusammenhang mit der Kv4-Kanalexpression zeigte (Lauterborn et al. 2007). Dies steht in Analogie zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit: Bei den mit JNCL assoziierten Mutanten kam es zu einem Verlust bzw. zu einer Verminderung des CLN3-Effekts, woraus eine Erhöhung der Kv4.2-Expression resultierte. Trotz einiger Unterschiede zwischen JNCL und Fragilem X-Syndrom gibt es auch Überschneidungen der Symptome, wie z. B. Konzentrationsstörungen, kognitive Retardierung und epileptische Anfälle. Es könnte also ein Zusammenhang zwischen diesen Symptomen und der erhöhten Kv4.2-Expression bestehen. Im Widerspruch dazu stehen jedoch die Untersuchungen von Gross et al., die eine Reduzierung der Kv4.2-Kanalexpression beim Fragilen X-Syndrom beobachteten (Gross et al. 2011). Diese Ergebnisse würden wiederum im Einklang mit dem bereits erwähnten Zusammenhang zwischen reduzierter Kv4.2-Kanalexpression und Epilepsie stehen (D'Adamo et al. 2013).

5.3.2 Pathologien in Verbindung mit KChIP3

KChIP3 interagiert u. a. mit den beiden Proteinen Presenilin 1 und Presenilin 2. Mutationen von Presenilin-Proteinen sind mit einer vererbaren Form der Alzheimer-Demenz assoziiert, der Early-onset-Alzheimer-Erkrankung (Bähring 2018). Dabei handelt es sich um eine rasch fortschreitende, vor dem 65. Lebensjahr auftretende Erkrankung, die in der Regel autosomal dominant vererbt wird (Birnbaum et al. 2004; Sassi et al. 2014). JNCL-Erkrankte weisen Symptome auf, die auch typisch für eine Alzheimer-Erkrankung sind, wie z. B. der Verlust des Kurzzeitgedächtnisses und

Schwierigkeiten im abstrakten Denken. Während in den Untersuchungen von Birnbaum et al. die Expression von Presenilin 1 in HEK293-Zellen für einen erhöhten Kaliumauswärtsstrom sorgte, zeigte eine Mutante des Presenilin 1 keinen Effekt auf den Strom (Birnbaum et al. 2004). Inwieweit die Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexe nun aber eine Rolle bei der Alzheimer-Erkrankung spielen, ist nicht geklärt. Sollte ein Zusammenhang bestehen, so geht ein reduzierter A-Typ-Strom mit der Erkrankung einher. Hier lässt sich keine Verbindung zum Effekt der CLN3-Mutanten finden, da diese in den Experimenten der vorliegenden Arbeit mit einem verstärkten Kaliumstrom assoziiert waren. Als weitere Funktion ist bekannt, dass KChIP3 die Expression von N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA-)Rezeptoren herunterreguliert. NMDA-Rezeptoren spielen eine Rolle bei der synaptischen Übertragung, der Plastizität und beim Gedächtnis. Eine Überaktivierung dieses Rezeptors ist u. a. mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert. Beim Knockdown von DREAM mittels siRNA in hippocampalen Neuronen zeigten sich erhöhte NMDA-vermittelte Ströme und daraus resultierend ein verstärkter Zelluntergang (Wang und Wang 2012). Überexpression von DREAM dagegen reduzierte diese Ströme. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Interaktion mit PSD-95 nachgewiesen, was zur Reduzierung der Langzeitdepression, dem Gegenteil der Langzeitpotenzierung, führte (Wu et al. 2010). Die erste Manifestation von JNCL ist meist eine Retinopathie mit zunehmender Sehverschlechterung. KChIP3 wird mit der Retinopathie beim Diabetes mellitus in Verbindung gebracht. Chavira-Suárez et al. entdeckten, dass KChIP3 in der Retina von Ratten unter hyperglykämischen Bedingungen, wie sie beim Diabetes mellitus typisch sind, hochreguliert wurde und den retinalen Strom der Kv4.2- und Kv4.3-Kanäle steigerte (Chavira-Suárez et al. 2011; Chavira-Suárez et al. 2012). Auch andere Untersuchungen zeigten eine Assoziation von retinalem A-Typ-Strom und diabetischer Retinopathie (Pannicke et al. 2005; Pannicke et al. 2006). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit war bei zusätzlicher Coexpression der CLN3-Mutanten der Kv4.2-Strom gesteigert (durch einen abgeschwächten CLN3-Effekt und einer damit verbundenen verstärkten KChIP3-Modulation). Sollte also ein hochregulierter K4.2-Strom eine Retinopathie auslösen bzw. mitbedingen, so könnte die CLN3-Interaktion mit den Kv4.2/KChIP3-Kanal-komplexen hier eine wesentliche Rolle spielen. Vermutlich ist jedoch der Untergang von Neuronen, ganz ähnlich wie er auch beim

Diabetes in geringerem Umfang passiert, die Ursache der Sehbeeinträchtigung. Da es sich beim Sehnerv um eine Fortsetzung von Neuronen aus dem Gehirn und nicht um einen peripheren Nerv handelt und das Sehvermögen eine sensible Sinneswahrnehmung ist, manifestieren sich Schädigungen des ZNS häufig als erstes durch eine Visuseinschränkung. Das mit dem KCHIP3 eng verwandte DREAM spielt zudem eine Rolle bei Entzündungsreaktionen. DREAM supprimiert die Expression von Deubiquitinase A20, welche wiederum den Entzündungsmediator NF-κB hemmt. Außerdem zeigte sich bei Mutation des DREAM eine Reduzierung der Zytokine IL-2, IL-4 und IFN-γ, eine Vermehrung der B-Lymphozyten sowie eine verminderte IgG-Produktion. Dies spielt v. a. bei Lungenentzündungen eine Rolle, sodass DREAM-Knockout-Mäuse eine verminderte Entzündungsreaktion bei Lungenentzündungen aufwiesen (Tiruppathi et al. 2014). Bisher ist nicht bekannt, ob es sich bei der JNCL um einen entzündlichen Prozess des ZNS handelt. Somit ist eine direkte Assoziation zum Krankheitsbild in diesem Rahmen nicht möglich. Grundsätzlich können entzündliche Prozesse einen Zellabbau, wozu es bei der JNCL im ZNS kommt, unterstützen.

5.3.3 Besondere Rolle der Neuronen in JNCL

Bei JNCL kommt es zu autofluoreszierenden Ablagerungen, die in allen Zellen des Körpers zu finden sind (Phillips et al. 2005). Da aber nur Neurone des ZNS bei der Erkrankung absterben, stellt sich die Frage, ob insbesondere zentrale Neuronen besonders sensibel auf die Ceroidansammlungen reagieren oder ob die Ablagerungen nur ein Nebenbefund sind und eine andere Ursache die Erkrankung auslöst. Es existieren widersprüchliche Untersuchungen und Befunde darüber, ob CLN3 am stärksten in Neuronen oder in anderen Organen exprimiert wird, was die Diskussion eines Zusammenhangs mit dem Krankheitsverlauf, welcher ausschließlich zentrale Neuronen betrifft, erschwert. Margraf et al. und Luiro et al. fanden mittels Immunoblot bzw. Immunfärbung die größte Expression von CLN3 in Neuronen (Margraf et al. 1999; Luiro et al. 2001). Im Widerspruch hierzu stehen die Untersuchungen von Ezaki et al., welche im Gehirn von Mäusen das CLN3-Protein nicht mittels eines gewöhnlichen Immunoblots sondern nur nach Aufreinigung (*Purification*) durch eine Affinitätschromatographie detektieren konnten und dies auch nur in wesentlich geringerer Menge als z. B. in der Leber (Ezaki et al. 2003). Innerhalb des ZNS selbst

konnte das CLN3-Protein v. a. im visuellen Cortex, im limbischen System, im Kleinhirn und generell stärker in kortikalen als in subkortikalen Bereichen nachgewiesen werden (Margraf et al. 1999; Luiro et al. 2001; Ding et al. 2011). Dass CLN3 in diesen Bereichen höher exprimiert wird, passt gut zu den typischen (oben aufgeführten) Symptomen der JNCL. Auch KChIP3 wird v. a. im Gehirn exprimiert (An et al. 2000). Hierbei fällt auf, dass es genau wie das CLN3-Protein v. a. im Hippocampus, Kortex und Kleinhirn lokalisiert ist, was für eine spezielle neuronale Interaktion zwischen KChIP3 und CLN3 sprechen könnte (Park et al. 2013). Aber auch unabhängig von der Expression wird vermutet, dass CLN3 in Neuronen eine besondere Rolle spielt, da es in diesen Zellen eine spezielle subzelluläre Lokalisation aufweisen kann, z. B. in Vesikeln, und außerdem eine abweichende Molekulargröße besitzt (Ezaki et al. 2003; Mao et al. 2003; Kyttälä et al. 2004). Außerdem beobachteten Luiro et al. mittels Immunfärbung, dass CLN3 in Neuronen von Mäusen v. a. an der Plasmamembran lokalisiert war (Luiro et al. 2001). Wie bereits oben diskutiert, könnte die besondere CLN3-Lokalisation eine wesentliche Rolle bei der Interaktion mit den Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen in der Zellmembran spielen. Bei vermehrter Expression in der Plasmamembran könnte die Interaktion zwischen CLN3 und den Kanälen begünstigt bzw. überhaupt erst möglich sein und damit in den Neuronen stärker ins Gewicht fallen als bei den restlichen Zellen, bei denen aufgrund der lysosomalen Lokalisation die Interaktion weniger wahrscheinlich wäre. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden keine Neuronen sondern HEK293-Zellen verwendet. Auch die Lokalisation des Kv4.2-Kanals, der in Neuronen vermehrt in distalen Dendriten exprimiert wird, könnte eine Rolle spielen. Es konnte gezeigt werden, dass der Turn-over des Kv4.2-Kanals in den distalen Dendriten schneller abläuft als in Somanähe (Nestor und Hoffman 2012). Möglicherweise entspricht dies dem Turn-over der Zellen mit transienter Kv4.2-Transfektion, in denen sich der stärkere CLN3-Effekt zeigte. Es ist schwer abzuschätzen, in wie weit sich die CLN3-Funktion in Neuronen von der in den HEK293-Zellen unterscheidet. Neben der Funktion des CLN3-Proteins und seinem möglichen Effekt auf K4.2-Kanäle sowie KChIP/DREAM/Calsenilin ist bei JNCL das Absterben der Neuronen, auf das sich alle Symptome der Erkrankung zurückführen lassen können, sicherlich der wichtigste pathophysiologische Aspekt. Der Vorgang der Apoptose ist sehr komplex. Der Körper „hat Interesse daran“,

fehlerhafte Zellen absterben zu lassen. Sowohl Kv4.2-Kanäle, als auch KChIP3 und CLN3 werden mit dem Vorgang der Apoptose assoziiert. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass es sowohl bei einer Alzheimer-Erkrankung als auch unter ischämischen Bedingungen zu einer Überexpression von KChIP3 und damit zur Induktion einer Apoptose kommt (Jo et al. 2001; Park et al. 2013). Da KChIP3 mit einer Vielzahl an Proteinen interagieren kann, ist der Regulationsmechanismus der Apoptose bisher größtenteils ungeklärt. Im Vergleich zu den anderen KChIPs (KChIP 1, 2 und 4) zeigte sich nur bei KChIP3 ein apoptotischer Effekt in HeLa-Zellen (menschliche Zellen eines Zervixkarzinoms). Allerdings ließ sich dieser Effekt in COS-7-Zellen (Nierenzellen von grünen Meerkatzen) und PC12-Zellen (Phäochromozytomzellen von Ratten) nicht reproduzieren (Venn et al. 2008). Die proapoptotische Wirkung hängt mit der Interaktion zwischen KChIP3 und Presenilin und der damit verbundenen Modulation des Ca^{2+} -Signalings zusammen. KChIP3 wird aber auch durch Supprimierung der Transkription des apoptotischen Proteins HRK ein anti-apoptotischer Effekt zugeschrieben (Wang und Wang 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass CLN3-Mutanten eine geringere Reduzierung der KChIP3-Modulation von Kv4.2-Kanälen bewirkten als das CLN3-Wildtyp-Protein. Möglicherweise liegt der Grund in einer verminderten CLN3/KChIP3-Bindung und damit einer größeren der Zelle zur Verfügung stehenden freien KChIP3-Menge. Die erhöhte freie KChIP3-Menge könnte wiederum in Neuronen einen apoptotischen Effekt haben. Auch die Kv4.2-Kanäle und ein bei ihrer erhöhten Expression verstärkter Kaliumstrom spielen eine Rolle bei der Initiierung der Apoptose (Hu et al. 2005). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit kam es bei zusätzlicher Coexpression der CLN3-Mutanten KChIP3-vermittelt zu einer Erhöhung des Kv4.2-Stroms. Dies könnte über den erhöhten Kaliumstrom zur Apoptose beitragen. Vielleicht ist auch die Mutation des CLN3-Proteins in seiner Funktion als lysosomales Protein Auslöser der JNCL. Lysosomen sind zuständig für den Abbau von Stoffwechselprodukten in der Zelle. Eine Störung dieses Abbauprozesses könnte zu den Ablagerungen führen, wie sie bei der JNCL entstehen und aufgrund derer zum Selbstschutz bei eingeschränkter Zellfunktion die Apoptose ausgelöst wird. Aufgrund der Komplexität der Apoptose ist es sehr schwierig, einen direkten Zusammenhang zwischen CLN3-Mutanten und dem Absterben von Neuronen herzustellen. Generell ist

das intrazelluläre Zusammenspiel der einzelnen Proteine ein empfindliches Konstrukt. Dies macht es unübersichtlich, die Interaktionen in ihren Folgen vollständig zu überblicken.

6 Zusammenfassung

Kv4.2-Kanäle sind spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, die sowohl schnell aktivieren als auch schnell inaktivieren. Sie vermitteln den A-Typ-Strom (I_{A}) und regulieren die dendritische Erregung im ZNS. An diesen Kanal kann sich KChIP3 als akzessorische β -Untereinheit anlagern und dessen Stromeigenschaften beeinflussen. Außerdem wirkt KChIP3 durch seine Interaktion mit DNA als Transkriptionsrepressor und interagiert mit dem Ca^{2+} -Signaling-Protein Presenilin sowie mit dem lysosomalen Protein CLN3. In der vorliegenden Arbeit konnte dementsprechend gezeigt werden, dass bei Coexpression von CLN3 in HEK293-Zellen die KChIP3-Modulation auf Kv4.2-Kanäle reduziert war. Diese Wirkung war besonders stark ausgeprägt am 2. Tag nach Transfektion, bei Verwendung von Zellen mit transient transfiziertem Kv4.2-Kanal, und bei einem 20-fachen CLN3-Überschuss gegenüber KChIP3. Bestimmte Mutationen im CLN3-Gen können die neuropädiatrische Erkrankung JNCL hervorrufen, bei der Neuronen des ZNS absterben. In den Experimenten mit der Deletionsmutante $\text{CLN3}_{\Delta C}$, bei welcher es sich um die häufigste JNCL-auslösende Mutante handelt, und mit der Punktmutante CLN3_{R334C} zeigte sich im Vergleich zum CLN3-Wildtyp-Protein eine Abschwächung des CLN3-Effekts, was einer weniger ausgeprägten Reduzierung der KChIP3-Modulation von Kv4.2-Kanälen entsprach. Die zytoplasmatische Calciumkonzentration hatte sowohl auf die KChIP3-Modulation als auch den CLN3-Effekt einen Einfluss. Eine Erhöhung auf $50 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$ zeigte zwei Wirkungskomponenten: Erstens ein schneller, direkt nach Zellöffnung und nur bei Coexpression von CLN3 auftretender Effekt, der sich in einer Reduzierung des CLN3-Effekts äußerte. Zweitens ein im zeitlichen Verlauf der Messung progredienter Effekt, der sowohl in An- als auch in Abwesenheit von CLN3 zu einer Abnahme der KChIP3-Modulation führte.

7 Summary

Kv4.2 channels are voltage-gated potassium channels, which activate and inactivate rapidly. They elicit the A-type current (I_{SA}) and regulate dendritic excitation in the central nervous system. The accessory β -subunit KChIP3 can bind to this channel and influence its current characteristics. KChIP3 can also interact with DNA to function as a transcriptional repressor, with the Ca^{2+} signaling protein presenilin, and with the lysosomal protein CLN3. Accordingly, in the present study it could be shown that the KChIP3 modulation of Kv4.2 channels was reduced when CLN3 was coexpressed in HEK293 cells. This effect was especially pronounced on the 2nd day after transfection, when cells were transiently transfected with Kv4.2 and with a twenty-fold excess of CLN3 relative to KChIP3. Certain mutations of the CLN3 gene can cause the neuropsychiatric disease JNCL, which leads to neuronal cell death in the central nervous system. In experiments with the deletion mutant CLN3_{ΔC}, the most common mutant causing JNCL, and with the point mutant CLN3_{R334C}, the CLN3 effect was weaker compared to CLN3 wild-type; i. e., the reduction of the KChIP3 modulation of Kv4.2 channels was milder. The cytoplasmic calcium concentration affected both the KChIP3 modulation of Kv4.2 channels itself, and the CLN3 effect on the KChIP3 modulation. An increase to 50 μ M $[Ca^{2+}]_i$ had two different consequences: First, in coexpression experiments the CLN3 effect on KChIP3 modulation was reduced rapidly and directly after cell-opening. Second, KChIP3 modulation itself decreased progressively over time, both with and without coexpressed CLN3.

8 Abkürzungsverzeichnis

e	Euler'sche Zahl
%	Prozent
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
$\mu\text{F}/\text{cm}^2$	Mikrofarad pro Quadratzentimeter
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol, mikromolar (bzw. Mikromol pro Liter)
A	Amplitude
ATP	Adenosintriphosphat
bAP	retrograde Erregungsausbreitung in Dendriten
BAPTA	1,2-Bis-(2-Aminophenoxy)Ethan-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
bzw.	beziehungsweise
C	Kapazität, Celsius, Cystein
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CAAX	Aminosäuren-Abfolge: Cystein, zwei aliphatische Aminosäuren, beliebige Aminosäure
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
Cav	spannungsgesteuerter Calciumkanal
CLN3	Ceroid Lipofuscinosis, Neuronal, 3
CLN3wt	Wildtyp des CLN3-Proteins
CLN3 _{R334C}	Punktmutante des CLN3-Proteins
CLN3 _{ΔC}	Deletionsmutante des CLN3-Proteins
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
COS-7	Nierenzellen von grünen Meerkatzen
C-Terminus	Carboxyterminus
C-Typ-Inaktivierung	Inaktivierung mit Beteiligung des Carboxyterminus
D	Asparaginsäure
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP	Dipeptidylaminopeptidase-ähnliches Protein
DREAM	Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator
ds-RED	Transfektionsreporter (Discosoma species red fluorescent protein)
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGFP	Transfektionsreporter (Enhanced Green Fluorescent Protein)
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPSP	exzitatorische postsynaptische Potentiale
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
FMRP	Fragile-X-Mental-Retardation-Protein
G	Glycin, Leitfähigkeit

GΩ	Gigaohm
H ₂ O	Wasser
HA	Hämaggglutinin
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HEK293	humane embryonale Nierenzellen
HeLa	humane Zellen eines Zervixkarzinoms
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
HRK	Aktivator der Apoptose Harakiri
I	Stromstärke
i. e.	id est
I _{SA}	unterschwellig aktiverter A-Typ-Strom
JNCL	Juvenile Neuronale Ceroidlipofuszinose
K ⁺	Kalium
K ₂ ATP	Adenosintriphosphat-Dipotassium
kb	Kilobase
KChIP	Kv-Kanal-Interagierendes Protein
KCl	Kaliumchlorid
kHz	Kilohertz
KOH	Kaliumlauge
Kv	spannungsgesteuerter Kaliumkanal
M	Mol, molar (bzw. Mol pro Liter)
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute/n
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol, millimolar (bzw. Millimol pro Liter)
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
n	Anzahl
N	Asparagin
n. s.	nicht signifikant
nA	Nanoampere
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumlauge
NCL	Neuronale Ceroidlipofuszinose
NCS	Neuronale Calciumsensoren
nm	Nanometer
nM	Nanomol, nanomolar (bzw. Nanomol pro Liter)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nom.	nominal
N-Terminus	Aminoterminus
N-Typ-Inaktivierung	Inaktivierung mit Beteiligung des Aminoterminus
OPA	Operationsverstärker
p	Signifikanzniveau
pA/pF	Pikoampere pro Pikofarad

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC12	Phäochromozytomzellen von Ratten
pcDNA3 ⁰	Expressionsvektor
P-Domäne	Porendomäne der Kv4.2-Kanäle
pH	potentia Hydrogenii
PSD-95	Postsynaptic density protein 95
R	Widerstand, Arginin
RC-Glied	Parallelschaltung von Widerstand und Kondensator
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde/n
S	Serin
S1 bis S6	Transmembrandomänen 1 bis 6 der Kv4.2-Kanäle
SBDS	Shwachman-Bodian-Diamond-Syndrom
siRNA	Interferierende Ribonukleinsäure
Std.	Stunde/n
T	Threonin
T1	Tetramerisierungsdomäne der Kv4.2-Kanäle
tsA-201	transformierte humane embryonale Nierenzellen (exprimiert SV40 Temperatur-sensitives T-Antigen)
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultra-Violett
V	Spannung/Potential
v. a.	vor allem
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Literaturverzeichnis

- Adams, H. R.; Mink, J. W. (2013): Neurobehavioral features and natural history of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten disease). *Journal of Child Neurology* 28 (9), 1128–1136.
- Amarillo, Y.; De Santiago-Castillo, J. A.; Dougherty, K.; Maffie, J.; Kwon, E.; Covarrubias, M.; Rudy, B. (2008): Ternary Kv4.2 channels recapitulate voltage-dependent inactivation kinetics of A-type K⁺ channels in cerebellar granule neurons. *The Journal of Physiology* 586 (8), 2093–2106.
- An, W. F.; Bowlby, M. R.; Betty, M.; Cao, J.; Ling, H. P.; Mendoza, G.; Hinson, J. W.; Mattsson, K. I.; Strassle, B. W.; Trimmer, J. S.; Rhodes, K. J. (2000): Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 403 (6769), 553–556.
- Anderson, D.; Mehaffey, W. H.; Iftinca, M.; Rehak, R.; Engbers, J. D.; Hameed, S.; Zamponi, G. W.; Turner, R. W. (2010a): Regulation of neuronal activity by Cav3-Kv4 channel signaling complexes. *Nature Neuroscience* 13 (3), 333-337.
- Anderson, D.; Rehak, R.; Hameed, S.; Mehaffey, W. H.; Zamponi, G. W.; Turner, R. W. (2010b): Regulation of the KV4.2 complex by CaV3.1 calcium channels. *Channels* 4 (3), 163-167.
- Ashcroft, F. M. (1999): Ion Channels and Disease: Channelopathies. *Academic Press*, 1. Auflage, 21-45, San Diego.
- Augustine, E. F.; Adams, H. R.; Beck, C. A.; Vierhile, A.; Kwon, J.; Rothberg, P. G.; Marshall, F.; Block, R.; Dolan, J.; Mink, J. W. (2015): Standardized assessment of seizures in patients with juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Developmental Medicine and Child Neurology* 57 (4), 366–371.
- Bähring, R. (2018): Kv channel-interacting proteins as neuronal and non-neuronal calcium sensors. *Channels* 12 (1), 187-200.
- Bähring, R.; Boland, L. M.; Varghese, A.; Gebauer, M.; Pongs, O. (2001a): Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels. *Journal of Physiology* 535 (Pt 1), 65–81.

- Bähring, R.; Dannenberg, J.; Peters, H. C.; Leicher, T.; Pongs, O.; Isbrandt, D. (2001b): Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *Journal of Biological Chemistry* 276 (26), 23888–23894.
- Bernard, C.; Anderson, A.; Becker, A.; Poolos, N. P.; Beck, H.; Johnston, D. (2004): Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science* 305 (5683), 532–535.
- Birnbaum, S. G.; Varga, A. W.; Yuan, L.-L.; Anderson, A. E.; Sweatt, J. D.; Schrader, L. A. (2004): Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. *Physiological Reviews* 84 (3), 803–833.
- Burgoyne, R. D.; Weiss, J. L. (2001): The neuronal calcium sensor family of Ca^{2+} -binding proteins. *Biochemical Journal* 353 (Pt 1), 1–12.
- Buxbaum, J. D.; Choi, E. K.; Luo, Y.; Lilliehook, C.; Crowley, A. C.; Merriam, D. E.; Wasco, W. (1998): Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nature Medicine* 4 (10), 1177–1181.
- Cai, X.; Liang, C. W.; Muralidharan, S.; Kao, J. P.; Tang, C.-M.; Thompson, S. M. (2004): Unique roles of SK and Kv4.2 potassium channels in dendritic integration. *Neuron* 44 (2), 351–364.
- Carrión, A. M.; Link, W. A.; Ledo, F.; Mellström, B.; Naranjo, J. R. (1999): DREAM is a Ca^{2+} -regulated transcriptional repressor. *Nature* 398 (6722), 80–84.
- Chang, J.-W.; Choi, H.; Kim, H.-J.; Jo, D.-G.; Jeon, Y.-J.; Noh, J.-Y.; Park, W. J.; Jung, Y.-K. (2007): Neuronal vulnerability of CLN3 deletion to calcium-induced cytotoxicity is mediated by calsenilin. *Human Molecular Genetics* 16 (3), 317–326.
- Chavira-Suárez, E.; Sandoval, A.; Felix, R.; Lamas, M. (2011): Expression and high glucose-mediated regulation of K^+ channel interacting protein 3 (KChIP3) and Kv4 channels in retinal Müller glial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404 (2), 678–683.

- Chavira-Suárez, E.; Sandoval, A.; Quintero, H.; Bustamante, P.; Felix, R.; Lamas, M. (2012): Hyperglycemia induces early upregulation of the calcium sensor KChIP3/DREAM/calsenilin in the rat retina. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 418 (2), 420–425.
- Cheng, H.-Y.; Pitcher, G. M.; Laviolette, S. R.; Whishaw, I. Q.; Tong, K. I.; Kockeritz, L. K.; Wada, T.; Joza, N. A.; Crackower, M.; Goncalves, J.; Sarosi, I.; Woodgett, J. R.; Oliveira-dos-Santos, A. J.; Ikura, M.; van der Kooy, D.; Salter, M. W.; Penninger, J. M. (2002): DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation. *Cell* 108 (1), 31–43.
- Coetzee, W. A.; Amarillo, Y.; Chiu, J.; Chow, A.; Lau, D.; McCormack, T.; Moreno, H.; Nadal, M. S.; Ozaita, A.; Pountney, D.; Saganich, M.; Vega-Saenz de Miera, E.; Rudy, B. (1999): Molecular diversity of K^+ channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* 868, 233–285.
- Covarrubias, M.; Wei, A. A.; Salkoff, L. (1991): Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K^+ current systems. *Neuron* 7 (5), 763–773.
- D'Adamo, M. C.; Catacuzzeno, L.; Di Giovanni, G.; Franciolini, F.; Pessia, M. (2013): K^+ channel epilepsy: progress in the neurobiology of potassium channels and epilepsy. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7, 134.
- Deng, P.; Pang, Z.-P.; Lei, Z.; Shikano, S.; Xiong, Q.; Harvey, B. K.; London, B.; Wang, Y.; Li, M.; Xu, Z. C. (2011): Up-regulation of A-type potassium currents protects neurons against cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31 (9), 1823–1835.
- Ding, S.-L.; Tecedor, L.; Stein, C. S.; Davidson, B. L. (2011): A knock-in reporter mouse model for Batten disease reveals predominant expression of Cln3 in visual, limbic and subcortical motor structures. *Neurobiology of Disease* 41 (2), 237–248.
- Doyle, D. A.; Morais Cabral, J.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. (1998): The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* 280 (5360), 69–77.

- Ezaki, J.; Takeda-Ezaki, M.; Koike, M.; Ohsawa, Y.; Taka, H.; Mineki, R.; Murayama, K.; Uchiyama, Y.; Ueno, T.; Kominami, E. (2003): Characterization of Cln3p, the gene product responsible for juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis, as a lysosomal integral membrane glycoprotein. *Journal of Neurochemistry* 87 (5), 1296–1308.
- Getty, A. L.; Pearce, D. A. (2011): Interactions of the proteins of neuronal ceroid lipofuscinosis: clues to function. *Cellular and Molecular Life Science* 68 (3), 453–474.
- Golabek, A. A.; Kida, E.; Walus, M.; Kaczmarski, W.; Michalewski, M.; Wisniewski, K. E. (2000): CLN3 protein regulates lysosomal pH and alters intracellular processing of Alzheimer's amyloid-beta protein precursor and cathepsin D in human cells. *Molecular Genetics and Metabolism* 70 (3), 203–213.
- Groen, C.; Bähring, R. (2017): Modulation of human Kv4.3/KChIP2 channel inactivation kinetics by cytoplasmic Ca^{2+} . *Pflugers Archiv – European Journal of Physiology* 469 (11), 1457-1470.
- Gross, C.; Yao, X.; Pong, D. L.; Jeromin, A.; Bassell, G. J. (2011): Fragile X mental retardation protein regulates protein expression and mRNA translation of the potassium channel Kv4.2. *Journal of Neuroscience* 31 (15), 5693–5698.
- Gutman, G. A.; Chandy, K. G.; Grissmer, S.; Lazdunski, M.; MacKinnon, D.; Pardo, L. A.; Robertson, G. A.; Rudy, B.; Sanquinetti, M. C.; Stühmer, W.; Wang, X. (2005): International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews* 57 (4), 473–508.
- Haskell, R. E.; Carr, C. J.; Pearce, D. A.; Bennett, M. J.; Davidson, B. L. (2000): Batten disease: evaluation of CLN3 mutations on protein localization and function. *Human Molecular Genetics* 9 (5), 735–744.
- Heath, N. C.; Rizwan, A. P.; Engbers, J. D.; Anderson, D.; Zamponi, G. W.; Turner, R. W. (2014): The expression pattern of a Cav3-Kv4 complex differentially regulates spike output in cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience* 34 (26), 8800-8812.
- Hoffman, D. A.; Magee, J. C.; Colbert, C. M.; Johnston, D. (1997): K^+ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387 (6636), 869–875.

- Hoshi, T.; Zagotta, W. N.; Aldrich, R. W. (1990): Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250 (4980), 533–538.
- Hoshi, T.; Zagotta, W. N.; Aldrich, R. W. (1991): Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* 7 (4), 547–556.
- Hu, C.-L.; Liu, Z.; Gao, Z.-Y.; Zhang, Z.-H.; Mei, Y.-A. (2005): 2-iodomelatonin prevents apoptosis of cerebellar granule neurons via inhibition of A-type transient outward K⁺ currents. *Journal of Pineal Research* 38 (1), 53–61.
- Isacoff, E. Y.; Jan, Y. N.; Jan, L. Y. (1990): Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in Xenopus oocytes. *Nature* 345 (6275), 530–534.
- Isbrandt, D.; Leicher, T.; Waldschütz, R.; Zhu, X.; Luhmann, U.; Michel, U.; Sauter, K.; Pongs, O. (2000): Gene structures and expression profiles of three human KCND (Kv4) potassium channels mediating A-type currents I_{TO} and I_{SA}. *Genomics* 64 (2), 144–154.
- Järvelä, I.; Sainio, M.; Rantamäki, T.; Olkkonen, V. M.; Carpén, O.; Peltonen, L.; Jalanko, A. (1998): Biosynthesis and intracellular targeting of the CLN3 protein defective in Batten disease. *Human Molecular Genetics* 7 (1), 85–90.
- Järvelä, I.; Lehtovirta, M.; Tikkanen, R.; Kyttälä, A.; Jalanko, A. (1999): Defective intracellular transport of CLN3 is the molecular basis of Batten disease (JNCL). *Human Molecular Genetics* 8 (6), 1091–1098.
- Jerng, H. H.; Pfaffinger, P. J.; Covarrubias, M. (2004a): Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Molecular and Cellular Neuroscience* 27 (4), 343–369.
- Jerng, H. H.; Qian, Y.; Pfaffinger, P. J. (2004b): Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophysical Journal* 87 (4), 2380–2396.
- Jo, D.-G.; Kim, M. J.; Choi, Y. H.; Kim, I. K.; Song, Y. H.; Woo, H. N.; Chung, C.-W.; Jung, Y.-K. (2001): Pro-apoptotic function of calsenilin/DREAM/KChIP3. *FASEB Journal* 15 (3), 589–591.

- Jo, D.-G.; Lee, J.-Y.; Hong, Y.-M.; Song, S.; Mook-Jung, I.; Koh, J.-Y.; Jung, Y.-K. (2004): Induction of pro-apoptotic calsenilin/DREAM/KChIP3 in Alzheimer's disease and cultured neurons after amyloid-beta exposure. *Journal of Neurochemistry* 88 (3), 604–611.
- Kim, J.; Wei, D.-S.; Hoffman, D. A. (2005): Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *Journal of Physiology* 569 (Pt 1), 41–57.
- Kitzmüller, C.; Haines, R. L.; Codlin, S.; Cutler, D. F.; Mole, S. E. (2008): A function retained by the common mutant CLN3 protein is responsible for the late onset of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Human Molecular Genetics* 17 (2), 303–312.
- Kobertz, W. R.; Williams, C.; Miller, C. (2000): Hanging gondola structure of the T1 domain in a voltage-gated K⁺ channel. *Biochemistry* 39 (34), 10347–10352.
- Kyttälä, A.; Ihrke, G.; Vesa, J.; Schell, M. J.; Luzio, J. P. (2004): Two motifs target Batten disease protein CLN3 to lysosomes in transfected nonneuronal and neuronal cells. *Molecular Biology of the Cell* 15 (3), 1313–1323.
- Lauterborn, J. C.; Rex, C. S.; Kramár, E.; Chen, L. Y.; Pandiarajan, V.; Lynch, G.; Gall, C. M. (2007): Brain-derived neurotrophic factor rescues synaptic plasticity in a mouse model of fragile X syndrome. *Journal of Neuroscience* 27 (40), 10685–10694.
- Ledwell, J. L.; Aldrich, R. W. (1999): Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation. *Journal of General Physiology* 113 (3), 389–414.
- Lee, H. Y.; Ge, W.-P.; Huang, W.; He, Y.; Wang, G. X.; Rowson-Baldwin, A.; Smith, S. J.; Jan, Y. N.; Jan, L. Y. (2011): Bidirectional regulation of dendritic voltage-gated potassium channels by the fragile X mental retardation protein. *Neuron* 72 (4), 630–642.
- Lee, H.; Lin, M.-C.; Kornblum, H. I.; Papazian, D. M.; Nelson, S. F. (2014): Exome sequencing identifies de novo gain of function missense mutation in KCND2 in identical twins with autism and seizures that slows potassium channel inactivation. *Human Molecular Genetics* 23 (13), 3481–3489.

- Li, M.; Jan, Y. N.; Jan, L. Y. (1992): Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* 257 (5074), 1225–1230.
- Lilliehook, C.; Chan, S.; Choi, E. K.; Zaidi, N. F.; Wasco, W.; Mattson, M. P.; Buxbaum, J. D. (2002): Calsenilin enhances apoptosis by altering endoplasmic reticulum calcium signaling. *Molecular and Cellular Neuroscience* 19 (4), 552–559.
- Luiro, K.; Kopra, O.; Lehtovirta, M.; Jalanko, A. (2001): CLN3 protein is targeted to neuronal synapses but excluded from synaptic vesicles: new clues to Batten disease. *Human Molecular Genetics* 10 (19), 2123–2131.
- Lusin, J. D.; Vanarotti, M.; Li, C.; Valiveti, A.; Ames, J. B. (2008): NMR structure of DREAM: Implications for Ca^{2+} -dependent DNA binding and protein dimerization. *Biochemistry* 47 (8), 2252–2264.
- Mao, Q.; Xia, H.; Davidson, B. L. (2003): Intracellular trafficking of CLN3, the protein underlying the childhood neurodegenerative disease, Batten disease. *FEBS Letters* 555 (2), 351–357.
- Margraf, L. R.; Boriack, R. L.; Routheut, A. A.; Cuppen, I.; Alhilali, L.; Bennett, C. J.; Bennett, M. J. (1999): Tissue expression and subcellular localization of CLN3, the Batten disease protein. *Molecular Genetics and Metabolism* 66 (4), 283–289.
- Mellström, B.; Naranjo, J. R. (2001): Ca^{2+} -dependent transcriptional repression and derepression: DREAM, a direct effector. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 12 (1), 59–63.
- Mink, J. W.; Augustine, E. F.; Adams, H. R.; Marshall, F. J.; Kwon, J. M. (2013): Classification and natural history of the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Journal of Child Neurology* 28 (9), 1101–1105.
- Munroe, P. B.; Mitchison, H. M.; O'Rawe, A. M.; Anderson, J. W.; Boustany, R. M.; Lerner, T. J.; Taschner, P. E.; de Vos, N.; Breuning, M. H.; Gardiner, M.; Mole, S. E. (1997): Spectrum of mutations in the Batten disease gene, CLN3. *The American Journal of Human Genetics* 61 (2), 310–316.

- Nadal, M. S.; Ozaita, A.; Amarillo, Y.; Vega-Saenz de Miera, E.; Ma, Y.; Mo, W.; Goldberg, E. M.; Misumi, Y.; Ikehara, Y.; Neubert, T. A.; Rudy B. (2003): The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron* 37 (3), 449–461.
- Nestor, M. W.; Hoffman, D. A. (2012): Differential cycling rates of Kv4.2 channels in proximal and distal dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* 22 (5), 969–980.
- Osawa, M.; Dace, A.; Tong, K. I.; Valiveti, A.; Ikura, M.; Ames, J. B. (2005): Mg²⁺ and Ca²⁺ differentially regulate DNA binding and dimerization of DREAM. *Journal of Biology Chemistry* 280 (18), 18008–18014.
- Pannicke, T.; Uckermann, O.; Iandiev, I.; Biedermann, B.; Wiedemann, P.; Perlman, I.; Reichenbach, A.; Bringmann A. (2005): Altered membrane physiology in Müller glial cells after transient ischemia of the rat retina. *Glia* 50 (1), 1–11.
- Pannicke, T.; Iandiev, I.; Wurm, A.; Uckermann, O.; vom Hagen, F.; Reichenbach, A.; Wiedemann, P.; Hammes, H.-P.; Bringmann, A. (2006): Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina. *Diabetes* 55 (3), 633–639.
- Park, J.-S.; Manzanero, S.; Chang, J.-W.; Choi, Y.; Baik, S.-H.; Cheng, Y.-L.; Li, Y.-I.; Gwon, A.-R.; Woo, H.-N.; Jang, J.; Choi, I.-Y.; Lee, J.-Y.; Jung, Y.-K.; Tang, S.-C.; Sobey, C. G.; Arumugam, T. V.; Jo, D.-G. (2013): Calsenilin contributes to neuronal cell death in ischemic stroke. *Brain Pathology* 23 (4), 402–412.
- Phillips, S. N.; Benedict, J. W.; Weimer, J. M.; Pearce, D. A. (2005): CLN3, the protein associated with batten disease: structure, function and localization. *Journal of Neuroscience Research* 79 (5), 573–583.
- Pioletti, M.; Findeisen, F.; Hura, G. L.; Minor, D. L. (2006): Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer. *Nature Structural and Molecular Biology* 13 (11), 987-995.

- Radicke, S.; Cotella, D.; Graf, E. M.; Ravens, U.; Wettwer, E. (2005): Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative beta-subunit of human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3. *The Journal of Physiology* 565 (Pt 3), 751–756.
- Ramachandran, P. L.; Craig, T. A.; Atanasova, E. A.; Cui, G.; Owen, B. A.; Bergen, H. R.; Mer, G.; Kumar, R. (2012): The potassium channel interacting protein 3 (DREAM/KChIP3) heterodimerizes with and regulates calmodulin function. *Journal of Biological Chemistry* 287 (47), 39439–39448.
- Rich, T. C.; Snyders, D. J. (1998): Evidence for multiple open and inactivated states of the hKv1.5 delayed rectifier. *Biophysical Journal* 75 (1), 183-195.
- Ronkainen, J. J.; Hänninen, S. L.; Korhonen, T.; Koivumäki, J. T.; Skoumal, R.; Rautio, S.; Ronkainen, V. P.; Tavi, P. (2011): Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II represses cardiac transcription of the L-type calcium channel alpha_{1C}-subunit gene (Ca²⁺na_{1c}) by DREAM translocation. *Journal of Physiology* 589 (Pt 11), 2669-2686.
- Ruiz-Gómez, A.; Mellström, B.; Tornero, D.; Morato, E.; Savignac, M.; Holguín, H.; Aurrekoetxea, K.; González, P.; González-García, C.; Ceña, V.; Mayor, F.; Naranjo, J. R. (2007): G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of downstream regulatory element antagonist modulator regulates membrane trafficking of Kv4.2 potassium channel. *Journal of Biological Chemistry* 282 (2), 1205–1215.
- Sassi, C.; Guerreiro, R.; Gibbs, R.; Ding, J.; Lupton, M. K.; Troakes, C.; Lunnon, K.; Al-Sarraj, S.; Brown, K. S.; Medway, C.; Lord, J.; Turton, J.; Mann, D.; Snowden, J.; Neary, D.; Harris, J.; Bras, J.; Morgan, K.; Powell, J. F.; Singleton, A.; Hardy, J. (2014): Exome sequencing identifies 2 novel presenilin 1 mutations (p.L166V and p.S230R) in British early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 35 (10), 2422.e13-6.
- Serôdio, P.; Kentros, C.; Rudy, B. (1994): Identification of molecular components of A-type channels activating at subthreshold potentials. *Journal of Neurophysiology* 72 (4), 1516–1529.

- Tempel, B. L.; Papazian, D. M.; Schwarz, T. L.; Jan, Y. N.; Jan, L. Y. (1987): Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* 237 (4816), 770–775.
- Tiruppathi, C.; Soni, D.; Wang, D.-M.; Xue, J.; Singh, V.; Thippegowda, P. B.; Cheppudira, B. P.; Mishra, R. K.; Debroy, A.; Qian, Z.; Bachmaier, K.; Zhao, Y. Y.; Christman, J. W.; Vogel, S. M.; Ma, A.; Malik, A. B. (2014): The transcription factor DREAM represses the deubiquitinase A20 and mediates inflammation. *Nature Immunology* 15 (3), 239–247.
- Venn, N.; Haynes, L. P.; Burgoyne, R. D. (2008): Specific effects of KChIP3/calsenilin/DREAM, but not KChIPs 1, 2 and 4, on calcium signalling and regulated secretion in PC12 cells. *Biochemical Journal* 413 (1), 71–80.
- Wang, K.; Wang, Y. (2012): Negative modulation of NMDA receptor channel function by DREAM/calsenilin/KChIP3 provides neuroprotection? *Frontiers in Molecular Neuroscience* 5, 39.
- Wang, X.; Bao, J.; Zeng, X.-M.; Liu, Z.; Mei, Y.-A. (2005): Elevation of intracellular Ca²⁺ modulates A-currents in rat cerebellar granule neurons. *Journal of Neuroscience Research* 81 (4), 530–540.
- Wu, L.-J.; Mellström, B.; Wang, H.; Ren, M.; Domingo, S.; Kim, S. S.; Li, X.-Y.; Chen, T.; Naranjo, J. R.; Zhuo, M. (2010): DREAM (Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator) contributes to synaptic depression and contextual fear memory. *Molecular Brain* 3, 3.
- Zagha, E.; Ozaita, A.; Chang, S. Y.; Nadal, M. S.; Lin, U.; Saganich, M. J.; McCormack, T.; Akinsanya, K. O.; Qi, S. Y.; Rudy, B. (2005): DPP10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels. *Journal of Biological Chemistry* 280 (19), 18853–18861.
- Zaidi, N. F.; Thomson, E. E.; Choi, E.-K.; Buxbaum, J. D.; Wasco, W. (2004): Intracellular calcium modulates the nuclear translocation of calsenilin. *Journal of Neurochemistry* 89 (3), 593–601.

Zhou, M.; Morais-Cabral, J. H.; Mann, S.; MacKinnon, R. (2001): Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411 (6838), 657–661.

Internetquelle:

NCL mutation database; MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London [Online im Internet]

URL: <http://www.ucl.ac.uk/ncl/CLN3mutationtable.htm> [Stand: 14.10.2013, 10:30]

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Phylogenetischer Baum für Kv-Kanäle (modifiziert nach Gutman et al. 2005).....	2
Abbildung 2.2: Aufbau von Kaliumkanälen	3
Abbildung 2.3: Kanalkonformationen (modifiziert nach Ashcroft 1999).....	4
Abbildung 2.4: Physiologische Rolle des neuronalen ISA	6
Abbildung 2.5: Aufbau von KChIPs und Kv/KChIP-Komplexen	7
Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des CLN3-Wildtyp-Proteins	9
Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Mutanten CLN3 _{ΔC} und CLN3 _{R334C}	11
Abbildung 3.1: Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers bei einer <i>Whole-cell</i> -Ableitung	19
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Rechteckpuls-Protokolls.....	28
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Recovery-Protokolls	28
Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Steady-State-Inaktivierungs-Protokolls	29
Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des IV-Aktivierungs-Protokolls.....	29
Abbildung 4.1: KChIP3-Modulation von Amplitude und Dichte Kv4.2-vermittelter Ströme.....	35
Abbildung 4.2: KChIP3-Modulation von der makroskopischen Inaktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme	36
Abbildung 4.3: KChIP3-Modulation von der Erholung von der Inaktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme	37
Abbildung 4.4: KChIP3-Modulation von der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme	38
Abbildung 4.5: KChIP3-Modulation von der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme	39
Abbildung 4.6: CLN3wt-Effekt auf Amplitude und Dichte Kv4.2-vermittelter Ströme	41
Abbildung 4.7: CLN3wt-Effekt auf die makroskopische Inaktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme	41
Abbildung 4.8: CLN3wt-Effekt auf die Erholung von der Inaktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme	42
Abbildung 4.9: CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme	43

Abbildung 4.10: CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung Kv4.2-vermittelter Ströme.....	44
Abbildung 4.11: Zeitabhängiger CLN3wt-Effekt auf Amplitude und Stromdichte von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen	45
Abbildung 4.12: Zeitabhängiger CLN3wt-Effekt auf die makroskopische Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen	47
Abbildung 4.13: Zeitabhängiger CLN3wt-Effekt auf die Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen.....	49
Abbildung 4.14: Zeitabhängiger CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen.....	51
Abbildung 4.15: Zeitabhängiger CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen.....	53
Abbildung 4.16: CLN3wt-Effekt auf die Stromdichte von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen bei nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung 0 min nach Zellöffnung und bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Zeit nach Zellöffnung.....	55
Abbildung 4.17: CLN3wt-Effekt auf die makroskopische Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen bei nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung 0 min nach Zellöffnung und bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Zeit nach Zellöffnung.....	57
Abbildung 4.18: CLN3wt-Effekt auf die Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen bei nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung 0 min nach Zellöffnung und bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Zeit nach Zellöffnung	59
Abbildung 4.19: CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen bei nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung 0 min nach Zellöffnung und bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Zeit nach Zellöffnung	62
Abbildung 4.20: CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen bei nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung 0 min nach Zellöffnung und bei 50 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Zeit nach Zellöffnung	63
Abbildung 4.21: Dosisabhängiger CLN3wt-Effekt auf die Stromdichte von Kv4.2 _{stabil} /KChIP3-Kanalkomplexen	65
Abbildung 4.22: Dosisabhängiger CLN3wt-Effekt auf die makroskopische Inaktivierung von Kv4.2 _{stabil} /KChIP3-Kanalkomplexen	67
Abbildung 4.23: Dosisabhängiger CLN3wt-Effekt auf die Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2 _{stabil} /KChIP3-Kanalkomplexen	69

Abbildung 4.24: Dosisabhängiger CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2 _{stabil} /KChIP3-Kanalkomplexen	71
Abbildung 4.25: Dosisabhängiger CLN3wt-Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2 _{stabil} /KChIP3-Kanalkomplexen	73
Abbildung 4.26: Effekt der CLN3-Mutanten auf Amplitude und Stromdichte von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen	75
Abbildung 4.27: Effekt der CLN3-Mutanten auf die makroskopische Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen	76
Abbildung 4.28: Effekt der CLN3-Mutanten auf die Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen	77
Abbildung 4.29: Effekt der CLN3-Mutanten auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen	79
Abbildung 4.30: Effekt der CLN3-Mutanten auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen	80
Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Funktionen von KChIP3	83

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Amplitude und Stromdichte von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt.....	46
Tabelle 4.2: Zeitkonstanten der makroskopischen Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt.....	48
Tabelle 4.3: Zeitkonstanten (in Subgruppen) der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt	50
Tabelle 4.4: (Gewichtete) Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt	51
Tabelle 4.5: $V_{1/2}$ und k der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt	52
Tabelle 4.6: $V_{1/2}$ und k der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt	53
Tabelle 4.7: Zeitkonstanten der makroskopischen Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt bei 15nM $[Ca^{2+}]_i$, bei nominal Ca^{2+} -freier Intrazellulärösung und 50 μM $[Ca^{2+}]_i$ 0 min nach Zellöffnung ...	58
Tabelle 4.8: Zeitkonstanten der makroskopischen Inaktivierung von Kv4.2 _{stabil} /KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt bei einem Verhältnis von CLN3wt : KChIP3 = 10 : 1 bzw. 20 : 1	68
Tabelle 4.9: Zeitkonstanten (in Subgruppen) der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP3-Kanalkomplexen mit und ohne Coexpression von CLN3wt und CLN3-Mutanten.....	78

12 Danksagung

Zu allererst möchte ich natürlich Herrn Prof. Dr. Robert Bähring ganz herzlich danken für die großartige und intensive Betreuung meiner Arbeit sowie für die Einführung in die faszinierende Welt des Patch-Clamps.

Herrn Prof. Dr. Ehmke danke ich sehr für die Möglichkeit, meine Experimente in seinem Institut durchzuführen, wo ich einen sehr gut ausgestatteten Arbeitsplatz zur Verfügung hatte.

Herrn PD Dr. Stephan Storch möchte ich für die Bereitstellung der CLN3-Mutanten und die Durchführung der Western-Blots danken, die meine eigenen Experimente sehr gut ergänzt haben.

Mein Dank gilt außerdem: Herrn Dr. Daniel Minge, der mir stets hilfsbereit und motivierend zur Seite stand. Frau Dr. Jessica Wollberg für ihre zahlreichen Tipps und Tricks und die große Hilfe bei der Einarbeitung in Kaleidagraph. Frau Annett Hasse, die liebevolle „Ziehmutter“ meiner HEK-Zellen. Frau Telse Kock, die mich stets mit DNA versorgte. Herr Dr. Günter Glassmeier für viele hilfreiche Tipps am Patch-Clamp-Stand. Herr Peter Bassalay für die Hilfe bei technischen Problemen jeglicher Art.

Und zu guter Letzt möchte ich mich bei allen Doktoranden der „AG RB“ und den Mitarbeitern des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie bedanken, die mit ihrer ausnahmslos freundlichen und hilfsbereiten Art dafür gesorgt haben, dass ich trotz Dunkelheit und Kaffeeverbot immer sehr gerne ins Labor gekommen bin.

13 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

14 Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Hamburg, den 29.04.2019

Anja Carolin Seifert