

Aus dem Institut für Angewandte Physiologie
im Zentrum für Experimentelle Medizin der Universität Hamburg

Direktor: Prof. Dr. J. R. Schwarz

Einflüsse von Expressionssystem und β -Untereinheiten auf erg-Kaliumkanäle

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Jan-Hendrik Buhk

aus Hamburg

Freie und Hansestadt Hamburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am 11.06.2004

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. J. R. Schwarz

Prüfungsausschuss, 2. Gutachterin: PD Dr. C. K. Bauer

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. O. Strauß

INHALTSVERZEICHNIS

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung	2
3	Material und Methoden	
3.1	Zellkultur und Molekularbiologie	
3.1.1	<i>Zelllinien</i>	9
3.1.2	<i>Herstellung von MMQ- und GH₃/B₆-Zytoplasma-Präparationen</i>	10
3.1.3	<i>Plasmide</i>	11
3.2	Methoden	
3.2.1	<i>Heterologe Expression</i>	12
3.2.2	<i>Patch-Clamp-Technik</i>	13
3.2.3	<i>Patchpipetten</i>	17
3.2.4	<i>Lösungen und Chemikalien</i>	17
3.2.5	<i>Zellextrakt</i>	18
3.2.6	<i>Arbeitsplatz</i>	19
3.3	Datenerfassung und Auswertung	19
3.4	Herstellerverzeichnis	21
4	Ergebnisse	
4.1	Der erg-Strom in GH ₃ /B ₆ - und MMQ-Zellen	22
4.1.1	<i>Native Ströme</i>	22
4.1.2	<i>Heterologe Expression von erg1 in GH₃/B₆-, MMQ- und CHO-Zellen</i>	31
4.1.3	<i>Experimente mit Zytoplasma-Präparationen</i>	34
4.1.4	<i>Inside-out-Experimente mit erg1 in MMQ-Zellen</i>	38
4.2	Koexpression des KCNQ1-Kanals mit KCNE β-Untereinheiten	40
4.3	Koexpression von erg-Kanälen mit KCNE β-Untereinheiten	43
4.3.1	<i>Aktivierung</i>	44

4.3.2	<i>Deaktivierung</i>	50
4.3.3	<i>Inaktivierung</i>	61
4.4	Einflüsse auf die Stromdichte	63
4.5	Untersuchung von α - und β -Untereinheiten mit Antigen-Epitop	66
5	Diskussion	
5.1	Der E-4031-sensitive Strom in GH ₃ /B ₆ - und MMQ-Zellen	69
5.2	Überexpression von erg1 in GH ₃ /B ₆ -, MMQ- und CHO-Zellen	70
5.3	Annäherung an den spezifischen Faktor der MMQ-Zellen	71
5.4	Die kontrovers diskutierte Funktion der KCNE β -Untereinheiten	73
5.5	Die Bedeutung der KCNE β -Untereinheiten für die erg K ⁺ -Kanäle	75
5.6	Die LQT-5-Mutante D77N-KCNE1	79
5.7	Ausblick	80
6	Literatur	82
7	Zusammenfassung	91
8	Danksagung	93
9	Lebenslauf	94
10	Erklärung	95
11	Eigene Publikationen	96

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der biophysikalischen Eigenschaften der erg-K⁺-Kanalfamilie, deren Mitglieder in vielen unterschiedlichen Gewebstypen – so zum Beispiel im Myokard und in der Adenohypophyse – funktionell exprimiert sind. Die ungewöhnliche Kinetik der erg-Kanäle, mit der sich die vorliegende Arbeit befasst, ist funktionell ausgesprochen bedeutsam. Diese wurde unter verschiedenen Expressions- und Messbedingungen experimentell auf die Möglichkeit hin untersucht, welchen Einfluss das Expressionssystem und insbesondere die Koexpression von β -Untereinheiten auf deren Schaltverhalten haben könnten.

Als Grundlage der Untersuchungen dienten die vorhandenen Erkenntnisse über verschiedene Eigenschaften des nativ vorkommenden, pharmakologisch eindeutig isolierbaren erg-K⁺-Stroms in unterschiedlichen Zelllinien (in diesem Fall: GH₃/B₆- und MMQ-Zellen) sowie außerdem der vor allem in heterologen Systemen beschriebene Einfluss der KCNE β -Untereinheiten auf die Kinetik verschiedener verwandter Kaliumkanal α -Untereinheiten.

Die vorliegende Arbeit soll also dazu beitragen,

1. zu klären, was die Ursache für die unterschiedliche Kinetik des erg-K⁺-Stroms in verschiedenen Expressionssystemen sein könnte,
2. herauszufinden, welche Rolle in diesem Zusammenhang den KCNE β -Untereinheiten zukommt.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen dieser Arbeit wurden gänzlich unter Anwendung der Patch-Clamp-Technik (Hamill *et al.*, 1981) durchgeführt. Diese Methode erlaubt es, unter gut standardisierbaren Bedingungen Messungen von Kanalströmen einzelner Zellen durchzuführen.

2 Einleitung

In der großen Familie der Ionenkanalproteine bilden die K^+ -Kanäle die umfangreichste Untergruppe. Sie können anhand verschiedener Eigenschaften eingeteilt werden: Man unterscheidet morphologisch K^+ -Kanal α -Untereinheiten mit 2, 4 oder 6 Transmembrandomänen, die sich in der Regel zu Tetrameren zusammenlagern, um einen funktionellen Kanal zu ergeben. Es können Homo- oder Heteromultimere entstehen; außerdem können sich in unterschiedlicher Zahl akzessorische β -Untereinheiten anlagern. Die K^+ -Kanäle können funktionell in einwärts- oder auswärtsrektifizierende spannungsabhängige beziehungsweise spannungsunabhängige K^+ -Kanäle eingeteilt werden (Brandts & Pott, 2000). Die in dieser Arbeit speziell untersuchten erg- K^+ -Kanäle sind spannungsabhängige K^+ -Kanäle mit 6 Transmembrandomänen, wobei sie als Besonderheit einen funktionell einwärtsgleichrichtenden Charakter aufweisen (Warmke & Ganetzky, 1994; Trudeau *et al.*, 1995). Die klassischen einwärtsgleichrichtenden K^+ -Kanäle weisen zwei Transmembrandomänen auf.

Erg-(ether-à-gogo-related gene)- K^+ -Kanäle gehören in die Familie der EAG-(ether-à-gogo)- K^+ -Kanäle, die zuerst von einer *Drosophila*-Mutante kloniert wurden, die unter Äthernarkose eine Art „Gogo-Tanz“ aufführte (Warmke *et al.*, 1991) – daher der eigentümliche Name. Die Kanalfamilie enthält als dritte Gruppe neben den erg- und den eag-Kanälen noch die elk-(ether-à-gogo-like-K⁺)-Kanäle (Warmke & Ganetzky, 1994; Bauer & Schwarz, 2001).

Erg-Kanäle sind bereits in vielen verschiedenen Gewebetypen entdeckt worden (Bauer & Schwarz, 2001). Bisher am besten charakterisiert ist der erg1-Strom im Myokard. Die Untersuchung des Aktionspotentials der Kardiomyozyten ergab eine Unterteilung des späten repolarisierenden K^+ -Stroms („delayed rectifier“) in den relativ schnell aktivierenden I_{Kr} und den langsam aktivierenden I_{Ks} (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990), wobei der I_{Kr} von erg1 α -Untereinheiten getragen wird (Sanguinetti *et al.*, 1995). Es liegen Arbeiten vor, die eine Beteiligung von KCNE1 β -Untereinheiten (McDonald *et al.*, 1997; Finley *et al.*, 2002) oder KCNE2 β -Untereinheiten (Abbott *et al.*, 1999) am I_{Kr} beschreiben. Andere Autoren dagegen können eine Beteiligung von vor allem KCNE2 am I_{Kr} nicht nachvollziehen (Cui *et al.*, 2001; Weerapura *et al.*, 2001) beziehungsweise sehen keine Alteration in der Funktion bei Koexpression im heterologen System (Schledermann *et al.*, 2001). KCNE1 dagegen spielt eine herausragende Rolle beim I_{Ks} , der durch Heteromultimere aus

KCNQ1 und KCNE1 getragen wird (Sanguinetti *et al.*, 1996B), die sich deutlich anders verhalten als Homomultimere von KCNQ1 (s. auch Kap. 3.2).

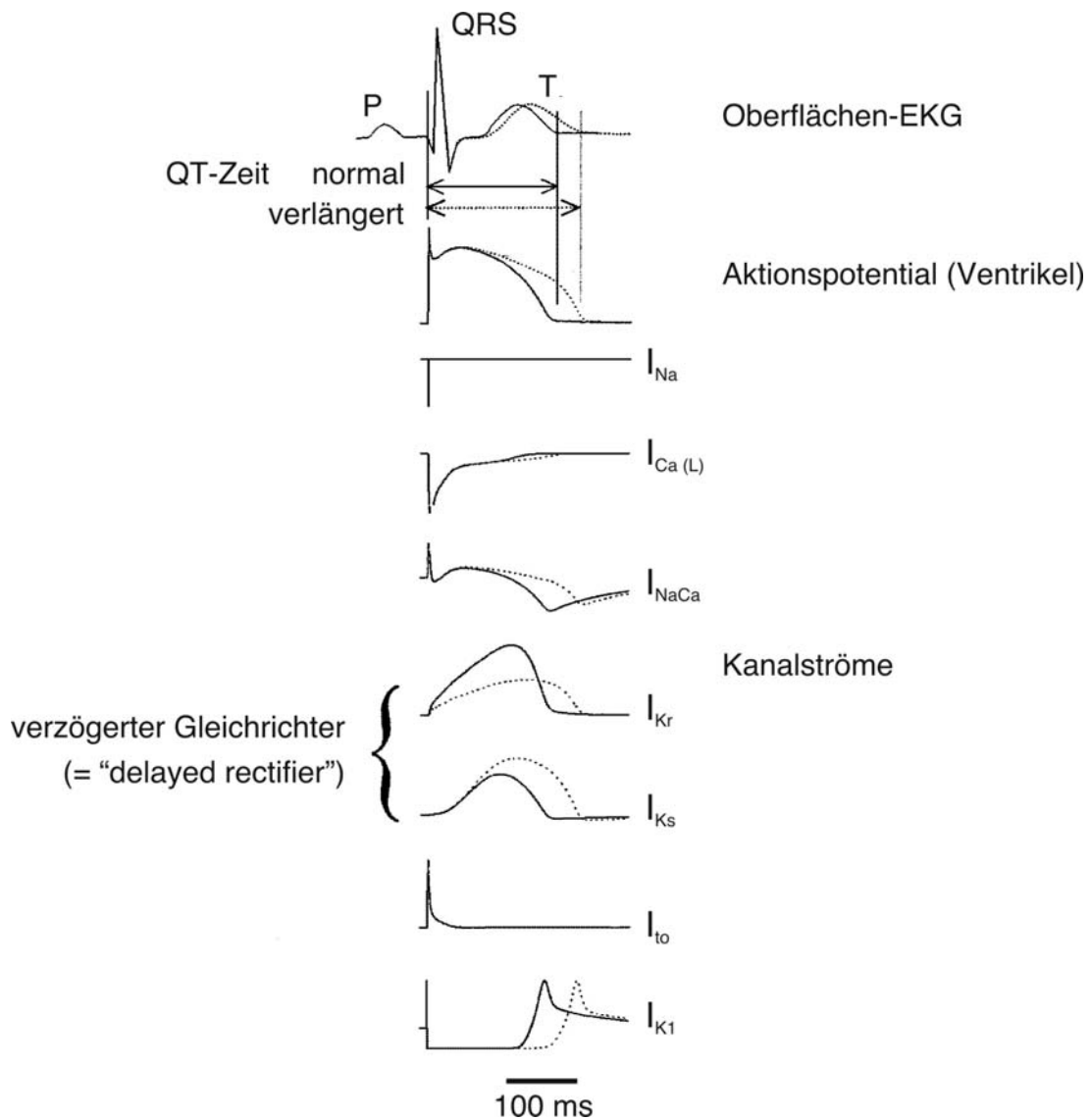


Abb.1:

Übersicht über die einzelnen Kanalstrompopulationen während des Herz-Aktionspotentials (Abb. modifiziert nach Roden *et al.*, 2002; die Zeichnung ist der Referenz entnommen). Die durchgezogenen Linien zeigen einen normalen Verlauf. Die gestrichelten Linien zeigen, wie bei einer Reduktion der Amplitude des I_{Kr} auf 50 % eine QT-Verlängerung entsteht. Die als verzögerte Gleichrichter gekennzeichneten Kaliumströme sind der I_{Kr} (h-erg1) und der I_{Ks} (KCNQ1 + KCNE1), die aufgrund ihrer repolarisierenden und das Ruhemembranpotential stabilisierenden Funktion besonders geeignet sind, bei Funktionseinbuße ein LQTS auszulösen.

Im Gegensatz zu seiner genauen molekularen Identität ist die Funktion des I_{Kr} im Herzen unstrittig: Die Repolarisation des Herz-Aktionspotentials und die Rückkehr zum Ruhepotential werden wesentlich durch die schnelle Erholung aus der Inaktivierung bei Repolarisation und die folgende Deaktivierung des I_{Kr} bewirkt. Bei gleichzeitiger Aktivierung des I_{Ks} kommt es zu großen K^+ -Auswärtsströmen und konsekutiv zu einer schnellen Repolarisation (s. Abb. 1).

Bei einer Reduktion des I_{Kr} -Stroms schwindet dieser Mechanismus und die Dauer des Herz-Aktionspotentials wird im Sinne eines Long QT-Syndroms (LQTS¹) verlängert, bei dem die Gefahr lebensgefährlicher ventrikulärer Torsades-de-pointes-Tachykardien deutlich gesteigert ist (Curran *et al.*, 1995). Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten Ströme, aus denen sich das Herz-Aktionspotential zusammensetzt. Das hereditäre LQTS wird nach dem betroffenen Genlocus eingeteilt: Bei LQTS-1 ist der KCNQ1-Kanal betroffen (Wang *et al.*, 1996), bei LQTS-2 der *erg1*-Kanal (Sanguinetti *et al.*, 1996A), bei LQTS-3 der kardiale Natriumkanal SCN-5A (Wang *et al.*, 1995). Der Genlocus des LQTS-4 konnte noch nicht identifiziert werden. LQTS-5 und LQTS-6 kommen durch Mutationen in den Genen der β -Untereinheiten KCNE1 und KCNE2 zustande. Das Zustandekommen des LQTS-5 bei Funktionsausfall von KCNE1 lässt sich leicht dadurch erklären, dass erst die Kombination des KCNQ1-Kanals mit der KCNE1 β -Untereinheit den funktionellen I_{Ks} -Strom ergibt (Sanguinetti *et al.*, 1996B). Die gemeinsame Oberflächenexpression von KCNE1 β -Untereinheiten mit KCNQ1 α -Untereinheiten ist essentiell für die langsame Aktivierung und hohe Amplitude dieses Stroms; in Abwesenheit von KCNE1 β -Untereinheiten produziert der KCNQ1-Kanal einen sehr viel kleineren, deutlich schneller aktivierenden Strom (Sanguinetti *et al.*, 1996B; s. auch Abb. 14). In Anlehnung an dieses Modell war von Abbott *et al.* (1999) das Konzept eines I_{Kr} -Heteromultimers aus *erg1* und KCNE2 als Erklärung für das LQTS-6 beschrieben worden.

Das LQTS-2 wird durch Mutationen im für *erg1* kodierenden Gen verursacht (Sanguinetti *et al.*, 1996A). Aber auch eine pharmakologische Blockade des *erg1*-Kanals kann dieselbe Symptomatik auslösen, eine zumeist unerwünschte Arzneimittelwirkung, die in der Praxis verhältnismäßig häufig auftritt. Experimentell wichtige, weil spezifisch den *erg*-Strom blockierende Pharmaka sind Klasse III-Antiarrhythmika wie die Methansulfonanilide E-4031, WAY-123,398 und Dofetilid (Sanguinetti *et al.*, 1995; Spector *et al.*, 1996;

¹ Der Name erklärt sich durch die Verlängerung der (frequenzadaptierten) QT-Zeit im Oberflächen-Elektrokardiogramm (EKG) bei verlängertem Herz-Aktionspotential (s. Abb.1).

Snyders & Chaudhary, 1996; Weinsberg *et al.*, 1997). Für die Klinik weitaus interessanter ist die große Zahl von Pharmaka, die den *erg*-Strom unspezifisch blockieren können, was eine durchaus nicht irrelevante Nebenwirkung dieser Medikamente darstellt. Als erstes Beispiel ist das in der Therapie komplizierter Arrhythmien besonders wichtige Amiodaron („Cordarex[®]“, Kiehn *et al.*, 1998) zu nennen, ebenfalls ein Klasse III-Antiarrhythmikum. Weitere klinisch relevante Pharmaka, die eine *erg*-blockierende Potenz besitzen, sind beispielsweise antiallergisch wirksame Histamin-Rezeptorantagonisten (Suessbrich *et al.*, 1996), Neuroleptika (Suessbrich *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2003B), der in der oralen Diabetes-Therapie häufig verwendete K^+ (ATP)-Kanal-Blocker Glibenclamid (Rosati *et al.*, 1998), Fungizide (Dumaine *et al.*, 1998), das malariawirksame Chemotherapeutikum Halofantrin (Tie *et al.*, 2000), der Phosphodiesterase-Inhibitor Sildenafil („Viagra[®]“, Geelen *et al.*, 2000), Kokain (O’Leary, 2002) und Makrolidantibiotika, vor allem Clarithromycin und Roxithromycin (Volberg *et al.*, 2002). Auch einige Antibiotika aus der Gruppe der Fluorochinolone sind potente *erg*-Kanal-Blocker (Bischoff *et al.*, 2000), wobei das in der Klinik und hausärztlich sehr häufig verwendete Chinolon Ciprofloxacin („Ciprobay[®]“) diese Eigenschaft nur in abgeschwächter Form aufweist (Kang *et al.*, 2001). Außerdem wurden kürzlich *erg*-blockierende Wirkungen für den selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitor Fluvoxamin (Milnes *et al.*, 2003) und das Antiöstrogen Tamoxifen (Thomas *et al.*, 2003A) beschrieben. Alle diese Medikamente können bei entsprechender Veranlagung des Patienten – diese Wirkung tritt keineswegs bei allen Patienten auf – eine Verlängerung der QT-Zeit auslösen, die aufgrund ihrer Gefährlichkeit als therapielimitierend einzuschätzen ist (Haverkamp *et al.*, 2002²).

Nicht nur im Herzen ist die wichtige Funktion des *erg*-Kanals bezüglich des Ruhemembranpotentials zu beobachten. Viele Myozyten, Neurone und endokrin aktive Zellen besitzen klassische einwärtsrektifizierende K^+ -Kanäle (I_{K1r}), die bei negativen Potentialen nicht inaktivieren und durch den ständigen K^+ -Ausstrom das Membranpotential in Richtung des K^+ -Gleichgewichtspotentials verschieben. Das Ruhemembranpotential dieser Zellen liegt dann bei $E = -60$ bis -80 mV. Einige Zelltypen aber besitzen anstelle dieser klassischen einwärtsrektifizierenden K^+ -Kanäle *erg*-Kanäle. Diese Zellen haben dann ein Ruhemembranpotential von etwa $E = -50$ mV, das durch den Beginn der Aktivierung der *erg*-Kanäle bei negativen Potentialen zustande kommt. In

² In diesem Artikel aus dem Deutschen Ärzteblatt findet sich eine Auflistung aller bisher beschriebenen medikamenten-induzierten QT-Verlängerungen. Da nicht alle durch Blockade des *erg*-Kanals verursacht sind, werden sie an dieser Stelle nicht weiter aufgezählt.

diesem Potentialbereich sind erregbare Zellen sehr sensibel für Reize, da die Auslösbarkeitsschwelle für Aktionspotentiale schneller erreicht wird.

Ein erg-Strom ist maßgeblich an der Regulation der TRH-abhängigen Prolaktin-Sekretion in der Adenohypophyse beteiligt (Bauer *et al.*, 1998). Die regulatorische Funktionalität der erg-Kanäle beruht hier vor allem auf feinen Veränderungen des Ruhemembranpotentials, wie es auch für die glatte Muskulatur verschiedener Organe beschrieben wurde (Bauer & Schwarz, 2001). In GH₃- und GH₃/B₆-Zellen (Bauer *et al.*, 1990; Barros *et al.*, 1992), beides Hypophysentumorzelllinien der Ratte, sowie in nativen laktotropen Zellen der Ratte (Corrette *et al.*, 1996; Schäfer *et al.*, 1999) wurde der Strom ursprünglich als Einwärts- gleichrichter beschrieben, der das Ruhemembranpotential stabilisiert und physiologisch durch TRH inhibiert wird. Diese Blockade führt zu einer Depolarisation mit darauffolgender Erhöhung der Aktionspotential-Frequenz (Barros *et al.*, 1997), die auch in anderen Zellen beobachtet wurde (F-11 DRG x Neuroblastoma Hybrid-Zellen: Chiesa *et al.*, 1997; β -Zellen des Pankreas: Rosati *et al.*, 2000). Der sich anschließende Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration erzeugt schließlich eine verstärkte Sekretion von Prolaktin. Die intrazelluläre Signalkaskade, die die Verringerung des erg-Stroms – vor allem durch eine Verschiebung der Aktivierungskurve in positivere Potentialbereiche – auslöst, ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Schledermann *et al.*, 2001).

In einigen nativen laktotropen Zellen und in MMQ-Zellen ist ein E-4031-sensitiver Strom nachgewiesen worden, der eine zusammengesetzte Deaktivierungskinetik aufweist (Rosati *et al.*, 1998; Schäfer *et al.*, 1999; Lecchi *et al.*, 2002), die aus variablen Anteilen einer schnellen und einer langsamen Stromkomponente besteht. Im Gegensatz dazu haben der E-4031-sensitive Strom in der GH₃/B₆-Zelllinie sowie der in CHO-Zellen heterolog exprimierte erg1-Strom eine konstant schnelle Deaktivierungskinetik. Die heterologe Expression der erg-Untereinheiten in CHO-Zellen ergab keinen Hinweis darauf, dass eine der drei bekannten erg-Untereinheiten (Shi *et al.*, 1997) für die langsame Komponente der Deaktivierung in laktotropen und MMQ-Zellen verantwortlich sein könnte (Wimmers *et al.*, 2001). Möglicherweise liegt dieser besonderen Eigenschaft auch die Existenz eines bisher unbekanntes Kanalproteins zugrunde, das einen erg-ähnlichen, langsam deaktivierenden Strom produziert und ebenfalls durch E-4031 geblockt werden kann (Lecchi *et al.*, 2002).

Erg1-Kanäle kommen in glatter Muskulatur vor. Akbarali *et al.* (1999) isolierten einen funktionellen erg-Strom in der Ringmuskulatur des Ösophagus vom Opossum. Ein pharmakologischer Block durch E-4031 führt hier zu einer Depolarisation, die spontane Akti-

onspotentiale und Kontraktionen zur Folge hat. Ein ähnliches Verhalten zeigt der erg-Strom in Myozyten der Pfortader (Ohya *et al.*, 2002). Weiterhin wurde – jeweils bei lokalem Nachweis von *erg1*-mRNA – ein funktioneller erg-Strom als E-4031-sensitiver Strom in glatter Muskulatur von Gallenblase und Jejunum isoliert (Parr *et al.*, 2003; Farrelly *et al.*, 2003; Lillich *et al.*, 2003). Die Feinregulation von Peristaltik oder Tonus beziehungsweise Widerstand unterliegt somit offenbar der Aktivität dieses Kanals. Das erklärt auch die bereits lange bekannte Wirksamkeit der prokinetisch wirksamen Substanz Cisaprid (Mohammad *et al.*, 1997; Lillich *et al.*, 2003)

Eine weitere wichtige Funktion für erg-Ströme scheint die K^+ -Homöostase im zentralen Nervensystem zu sein. Emmi *et al.* (2000) beschreiben eine bevorzugte immunhistochemische Anfärbarkeit hippocampaler Astrozyten für *erg1* im Gegensatz zu den Neuronen derselben Region. Die experimentelle Applikation von E-4031 in ein Hippocampus-Präparat verursachte hier eine Reduktion der Pufferung des erhöhten extrazellulären K^+ -Gehalts bei gesteigerter neuronaler Aktivität. Diese Funktion könnte demnach grundsätzlich durch erg-Kanäle übernommen werden, da vor allem *erg1* und *erg3* nach weiteren immunhistochemischen Daten im zentralen Nervensystem weit verbreitet zu sein scheinen (Saganich *et al.*, 2001). Auch für KCNE β -Untereinheiten ist eine Expression im ZNS bekannt, sogar eine funktionelle Interaktion mit KCNQ-Kanälen wurde bereits beschrieben (Tinel *et al.*, 2000A). Es erscheint als durchaus wahrscheinlich, dass es auch zu einer Interaktion von KCNE β -Untereinheiten mit erg-Kanälen kommen könnte.

Schließlich sind erg-Kanäle möglicherweise als O_2 -Sensoren aktiv. Overholt *et al.* (2000) haben an Glomuszellen des Kaninchens gezeigt, dass das Ruhemembranpotential, das im Bereich von $E = -40$ bis -65 mV liegt, von der Aktivität des erg-Stroms abhängig ist. Ein pharmakologischer Block bewirkt eine Depolarisation und einen Anstieg der Spike-Frequenz der afferenten Nerven, was der physiologischen Reaktion auf Hypoxie entspricht. Die im erg-Protein enthaltene PAS-Domäne ist auch in anderen Proteinen enthalten und dort bereits als O_2 -Sensor beschrieben worden (Pellequer *et al.*, 1999). Andererseits gibt es auch Hinweise, dass hochreaktive O_2 -Verbindungen („reactive oxygen species“, ROS) den erg-Strom beeinflussen (Tagliatela *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2003) und die sensorische Aktivität auch auf diese Weise regulieren.

Inwieweit erg-Kanäle funktionell mit dem Zellzyklus assoziiert sind, muss noch genauer geklärt werden. Dennoch: Es gibt Hinweise dafür, dass eine differentielle Expression in Abhängigkeit des Zellzyklus existiert und dass es gerade in bestimmten Tumorzelltypen

(Arcangeli *et al.*, 1995; Crociani *et al.*, 2003) zu charakteristischen Abweichungen in der Expression kommt. Die onkologisch-therapeutische Konsequenz dieser Erkenntnisse konnte bisher nicht klar formuliert werden. Da im Rahmen dieser Arbeit erg-Kanäle in passagierten und nicht in synchronisierten Zellen exprimiert wurden, muss ein möglicher Einfluss des Zellstadiums auf die Expression als Einflussgröße berücksichtigt werden.

Es lässt sich feststellen, dass es bei den vielfältigen Funktionen, die durch erg-Kanäle ausgeübt werden, vor allem im zentralen Nervensystem und dessen neuroendokrinen Gewebe sowie in Muskulatur (Herzmuskel, glatte Muskulatur) zu einer Kollokalisierung mit KCNE β -Untereinheiten kommen kann. Dem ist hinzuzufügen, dass bisher kaum Literatur vorliegt, die auf die mögliche Funktion der erg-Kanäle im zentralen Nervensystem eingeht.

Der erste Abschnitt dieser Arbeit (Kap. 4.1) befasst sich mit der Frage, welcher Faktor den Unterschied in der Kinetik des erg-Stroms der GH₃/B₆- und MMQ-Zellen ausmacht. Ob es sich bei diesem Faktor um eine KCNE β -Untereinheit handelt, wird im zweiten Abschnitt (Kap. 4.2 und 4.3) behandelt, der eine systematische Untersuchung der möglichen Interaktionen zwischen den erg1-3-Kanälen und den KCNE1-3 β -Untereinheiten beinhaltet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen auch erlauben, eine generelle Aussage für die Relevanz der KCNE β -Untereinheiten bezüglich der erg-K⁺-Kanalfamilie zu machen.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur und Molekularbiologie

3.1.1 Zelllinien

Alle Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO₂ in 50 ml Zellkulturflaschen (Nunc) gehalten. Der Wechsel des Mediums erfolgte alle 2-3 Tage; alle Zellen wurden mindestens einmal die Woche passagiert. Für die Mikroinjektion und die elektrophysiologischen Experimente wurden die Zellen auf mit Poly-D-Lysin (Sigma) beschichteten Glasplättchen (CELLocate[®], Eppendorf) in 35 mm-Kulturschälchen (Nunc) ausgesät. Diese Unterlage erleichterte aufgrund ihrer glatten Oberfläche die Injektion, ein eingezühtes Muster ermöglichte eine leichtere Lokalisation der injizierten Zellen.

Folgende Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

1. **GH₃/B₆-Zellen** (Gourdji *et al.*, 1979) sind ein Subklon der GH3-Zelllinie, die aus einem strahleninduzierten Hypophysenvorderlappentumor der Ratte gewonnen wurden (Tashijan *et al.*, 1968). Sie haben somatomammatrope Eigenschaften, d.h. sie sezernieren sowohl Prolaktin als auch Wachstumshormon.

Medium für GH₃/B₆-Zellen:

- 82 % Ham's F10 (Sigma)
- 15 % Pferdeserum (Roche)
- 2,5 % Fetales Kälberserum (Biother GmbH)
- 0,5 % L-Glutamin (Sigma)

2. **MMQ-Zellen** (Judd *et al.*, 1988) sind ebenfalls Klone eines Hypophysenvorderlappentumors der Ratte, die sich in ihren Kultur- und elektrophysiologischen Eigenschaften von GH₃/B₆-Zellen unterscheiden.

Medium für MMQ-Zellen:

- 90 % RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin (Gibco BRL)
- 7,5 % Pferdeserum (Roche)
- 2,5 % Fetales Kälberserum (Biother GmbH)

3. **CHO-Zellen** (Puck *et al.*, 1958) sind Klone eines Ovarialtumors des Chinesischen Hamsters (Chinese Hamster Ovary). Sie stellen eines der am häufigsten verwendeten Mammalier-Expressionssysteme für Ionenkanäle dar, da sie endogen nur sehr wenige Kanäle funktionell exprimieren.

Medium für CHO-Zellen:

- 89,5 % MEM alpha Medium (Gibco BRL)
- 10 % Fetales Kälberserum (Biother GmbH)
- 0,3 % L-Glutamin (Sigma)
- 1 U / ml Penicillin (Sigma)
- 1 µg / ml Streptomycin (Sigma)

3.1.2 Herstellung von MMQ- und GH₃/B₆-Zytoplasma-Präparationen

Um eine möglichst große Menge an reinem Zytoplasma zu erhalten, wurden zunächst große Mengen an Zellen angezchtet: Mindestens etwa fünf 200 ml-Zellkulturflaschen (Nunc) mussten konfluent bewachsen sein. Vor dem Aufschluss der Membranen wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS (s. 3.2.4 Lösungen und Chemikalien) gewaschen. Die Zellen wurden dann in Lysis-Puffer (s. 3.2.4 Lösungen und Chemikalien) suspendiert.

Unter Benutzung eines Glas-Teflon-Handhomogenisators wurden die Zellen mechanisch aufgeschlossen, Kerne und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (1000 x g, 10 min, 4 °C, Centrifuge 5415 C, Eppendorf) abgetrennt. Die Auftrennung in Membran- und Zytoplasmafraktion erfolgte durch eine weitere Zentrifugation (50000 x g, 90 min, 4 °C, Biofuge Stratos, Kendro).

Der Überstand wurde durch Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert (Millex-GV 0.22, Millipore).

Der Proteingehalt wurde nach der Lowry-Methode photometrisch bestimmt (DC Protein Assay, Bio-Rad) und betrug für den MMQ-Extrakt 4 mg / ml, für den GH₃/B₆-Extrakt 6,2 mg / ml.

3.1.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Standardvektoren waren pcDNA3 beziehungsweise pcDNA3.1 (beide von Invitrogen). Kennzeichnend für die Vektoren sind der CMV-Promoter sowie ein Ampicillin-Resistenz-Gen.

Tabelle 1: verwendete Plasmide

Plasmid	relevantes Merkmal	Referenz
r-erg1:pcDNA3	pcDNA3 mit r-erg1 (Acc.-Nr. Z96106)	Bauer <i>et al.</i> , 1998
r-erg2:pcDNA3	pcDNA3 mit r-erg2 (Acc.-Nr. AF016192)	Schledermann <i>et al.</i> , 2001
r-erg3:pcDNA3	pcDNA3 mit r-erg3 (Acc.-Nr. AF016191)	Schledermann <i>et al.</i> , 2001
h-erg1:pcDNA3	pcDNA3 mit h-erg1 (Acc.-Nr. U04270)	Schledermann <i>et al.</i> , 2001
r-KCNE1:pcDNA3	pcDNA3 mit r-KCNE1	Wimmers, 2001
r-KCNE2:pcDNA3	pcDNA3 mit r-KCNE2	Schledermann <i>et al.</i> , 2001
r-KCNE3:pcDNA3	pcDNA3 mit r-KCNE3	Burgarth, 2003
hKCNQ1:pcDNA3.1	pcDNA3 mit r-KCNQ1	Labor Prof. Jentsch
hKCNE1:pcDNA3.1/His	pcDNA3.1/His mit r-KCNE1	Burgarth, 2003
hKCNE2:pcDNA3.1/His	pcDNA3.1/His mit r-KCNE2	Burgarth, 2003
hKCNE3:pcDNA3.1/His	pcDNA3.1/His mit r-KCNE3	Burgarth, 2003
r-erg1:pcDNA3.1/V5-His	pcDNA3.1/V5-His mit r-erg1	Burgarth, 2003
r-erg1:pcDNA3.1/Myc-His	pcDNA3.1/Myc-His mit r-erg1	Burgarth, 2003
r-erg2:pcDNA3.1/V5-His	pcDNA3.1/V5-His mit r-erg2	Burgarth, 2003
r-erg2:pcDNA3.1/Myc-His	pcDNA3.1/Myc-His mit r-erg2	Burgarth, 2003
D77N-KCNE1:pcDNA3	pcDNA3 mit r-D77N-KCNE1	Wimmers, 2001
EGFP-N1:pcDNA3	Enhanced green-fluorescent protein	Fa. Clontech

3.2 Methoden

3.2.1 Heterologe Expression

Die Zellen wurden mit der in destilliertem Wasser gelösten cDNA injiziert. Hierfür stand ein Injektionsstand zur Verfügung, bestehend aus dem Transjector 5246 (Eppendorf) und einem inversen Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss). Außerdem wurden Glaspipetten für die Injektion (Femtotips, Eppendorf) sowie feine Kunststoffpipetten (Microloader, Eppendorf) für die Beschickung der Injektionspipetten verwendet.

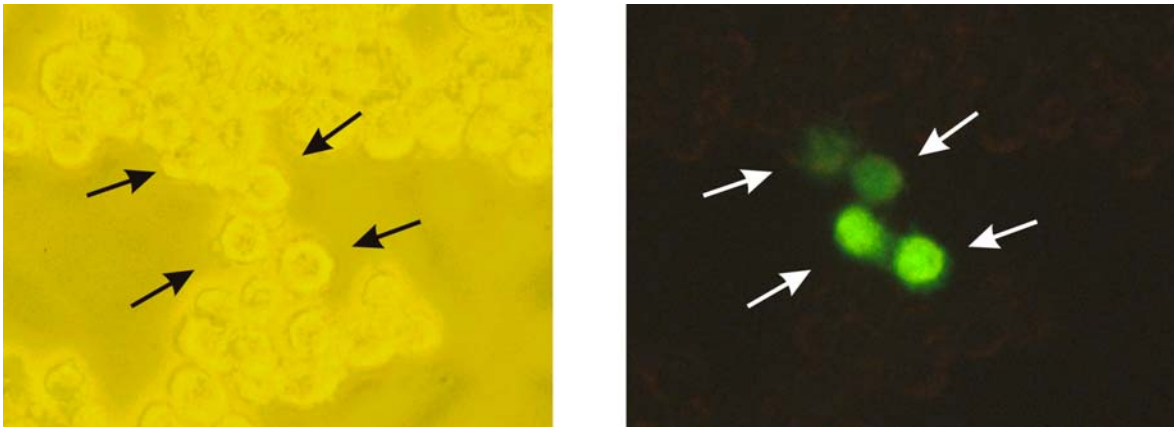


Abb.2:

MMQ-Zellen auf einem CELLocate[®], die mit EGFP-cDNA injiziert und 24 Stunden später unter dem Mikroskop fotografiert wurden. Das linke Bild zeigt die Zellen bei normaler Beleuchtung (Phasenkontrast). Das rechte Bild zeigt denselben Ausschnitt bei Beleuchtung mit gefiltertem UV-Licht (485 nm). Die erfolgreich injizierten Zellen (Pfeile) leuchten grün.

Die Injektionslösung wurde angesetzt, nachdem die frisch aufgetauten plasmidhaltigen Lösungen für 20 min bei 13.000 Upm und 4 °C in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 C, Eppendorf) zentrifugiert worden waren, da keine verklumpte DNA in die Injektionspipetten gelangen sollte. Die Endkonzentration an cDNA wurde durch Auffüllen mit gefiltertem und sterilisiertem destilliertem Wasser hergestellt. Jede fertige Injektionslösung enthielt zu 10 Vol.-% EGFP-cDNA-Lösung mit einer cDNA-Konzentration von 1 µg / µl. Die grüne Fluoreszenz dieses Proteins bei Bestrahlung mit UV-Licht (485 nm) erlaubte es, erfolgreich injizierte Zellen zu erkennen (s. Abb. 2). Für die Experimente, in denen α- und β-Untereinheiten (= UE) koexprimiert wurden, wurde das folgende molare Verdünnungsverhältnis gewählt: α-UE / β-UE = 1 / 8 - 1 / 9.

Die effektive Gesamtkonzentration an cDNA in der Injektionslösung lag zwischen 10 und 800 ng / μl . Die Konzentration der α -Untereinheiten bei Einfachexpression wurde nicht angehoben, um eine vergleichbare Menge an cDNA zu injizieren, wie bei den Experimenten mit Koexpression. Nach der Injektion wurden die Zellen 16 bis 30 Stunden unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Alle ausgewerteten Messungen wurden innerhalb dieses Zeitfensters unternommen.

3.2.2 Patch-Clamp-Technik (Hamill *et al.*, 1981).

Das Prinzip dieser elektrophysiologischen Messmethode besteht darin, mit Hilfe einer Glaspipette einen sehr kleinen Abschnitt der Zellmembran elektrisch von seiner Umgebung zu isolieren und gegebenenfalls einen elektrischen Zugang zum Zellinneren zu erhalten. Membranströme können entsprechend dem physikalischen Modell der Zellmembran (s. Abb. 3) gegen die geerdete Badlösung gemessen werden.

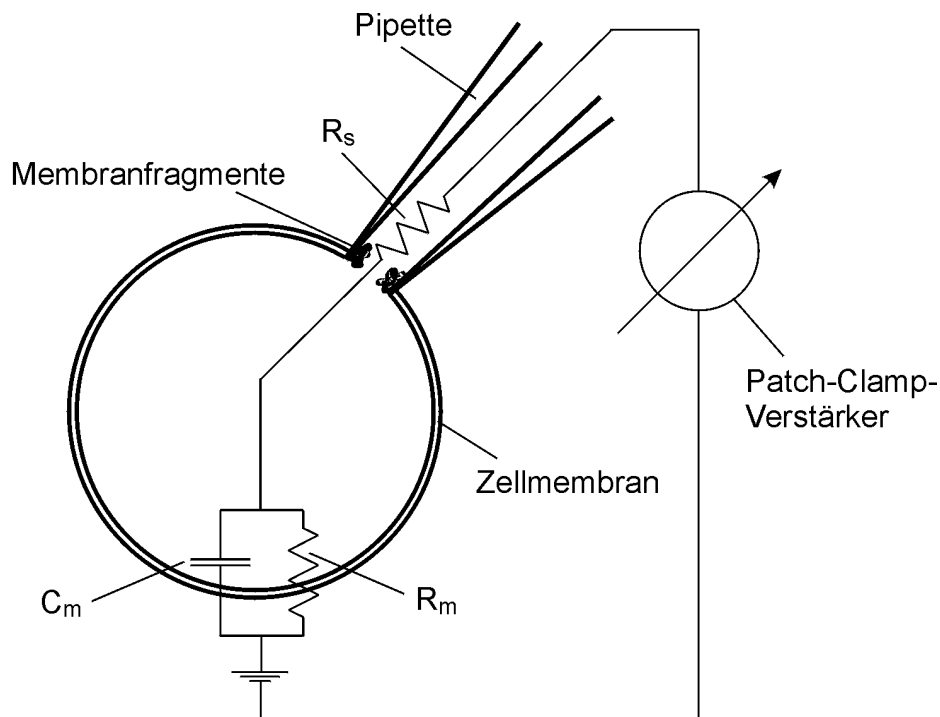


Abb. 3:

Das Ersatzschaltbild der Ganzzelleleitung enthält die wichtigsten Parameter der Patch-Clamp-Technik. Hierbei ist R_s der Serienwiderstand des Zugangs zur Zelle, der sich physikalisch durch Zellorganellen und Membranfragmente erklären lässt, C_m ist die Kapazität der Zellmembran, R_m deren elektrischer Widerstand, dieser ist gleich dem Kehrwert der Membranleitfähigkeit.

Als Messelektrode wird ein ausgezogenes dünnes Glasröhrchen verwendet: die Patchpipette (s. 3.3.3 Patchpipetten). Die Pipette wird mit einer definierten Lösung gefüllt und an dem Vorverstärker der Messeinrichtung befestigt. Es wird ein Überdruck angelegt, um die Pipettenspitze vor Verunreinigung zu schützen. Die Zellen befinden sich in der Messlösung in einer kleinen Petrischale auf dem Mikroskoptisch. Bei Kontakt der Pipette mit der Messlösung schließt sich der Stromkreis, der Pipettenwiderstand wird bestimmt, und das Offset-Potential, das an den Grenzflächen der Silber/Silberchlorid-Messelektrode entsteht, sowie die Pipettenkapazität müssen kompensiert werden. Durch vorsichtige Annäherung an die ausgewählte Zelle, Lösen des Überdrucks und gegebenenfalls leichtes Ansaugen erhält man eine mechanische Verbindung zwischen Zellmembran und Pipette, die einen sehr hohen elektrischen Widerstand besitzt (mindestens $1\text{ G}\Omega$), den Gigaseal. Man befindet sich nun in der Cell-attached-Konfiguration (s. Abb. 4 und 5).



Abb. 4:

Cell-attached-Konfiguration. Die Fotografie bei Phasenkontrastbeleuchtung zeigt mehrere CHO-Zellen auf einem CELLocate[®]. Von der rechten Seite her hat eine Patchpipette Kontakt zu der zentral gelegenen Zelle.

Von diesem Punkt ausgehend lassen sich verschiedene Messkonfigurationen herstellen (s. Abb. 5). Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden – soweit nicht anders angegeben – in der Whole-cell-Konfiguration durchgeführt. Diese erhält man, indem man nach erfolgreicher Herstellung des Gigaseals vorsichtig einen Unterdruck an der der Zellmembran aufsitzenden Pipette anlegt und damit das darunterliegende Membranstück zerreißt, so dass ein Zugang zum Zytoplasma entsteht. Zur Darstellung kommen dann die elektrischen Ereignisse auf der gesamten übrigen Membranfläche. Die Lösung in der

Pipette ist bei dieser Konfiguration direkt mit dem Zytoplasma der Zelle verbunden, so dass nach kurzer Zeit das Innere der Zelle mit der Pipettenlösung angefüllt ist. Die Pipette enthält daher in der Regel eine standardisierte intrazelluläre Lösung (s. 3.2.4 Lösungen und Chemikalien).

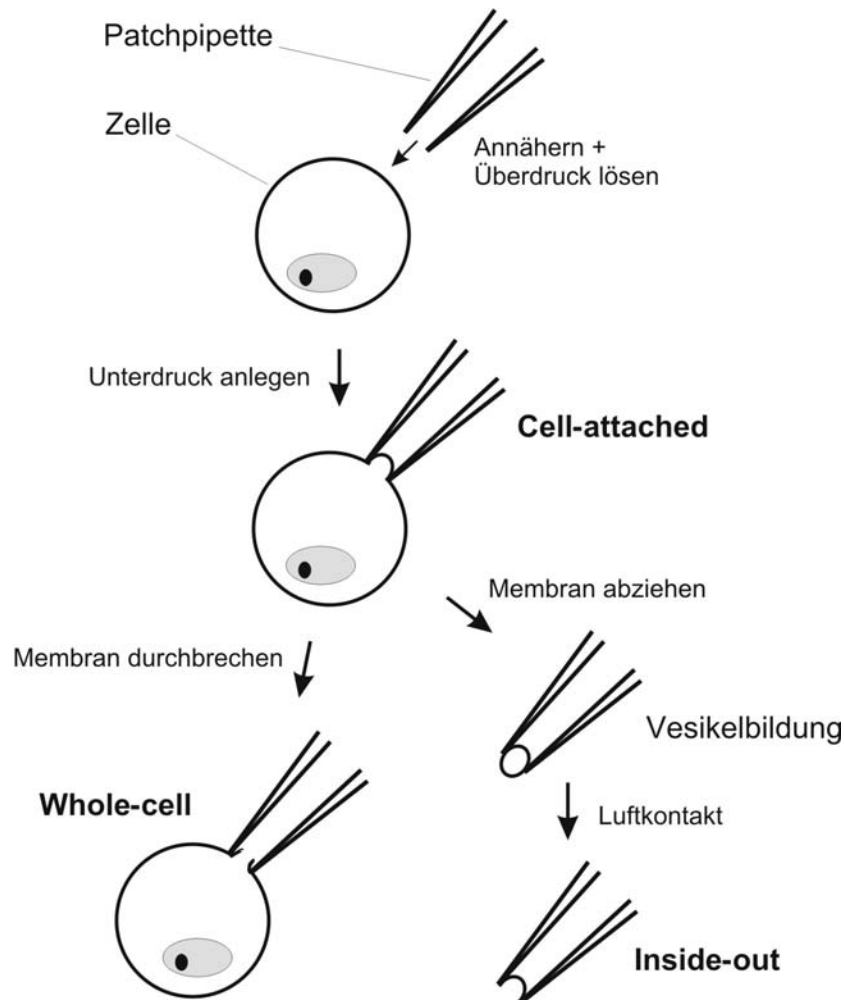


Abb. 5:

Schematische Darstellung der verwendeten Messkonfigurationen: Die Cell-attached-Konfiguration bildet den Ausgangspunkt für die Whole-cell- und die Inside-out-Konfiguration.

Ebenfalls zur Anwendung kamen die Cell-attached- und die Inside-out-Konfiguration (s. Abb. 5). In der Cell-attached-Konfiguration werden die Ströme gemessen, die über den isolierten Membranfleck fließen. Für die übrige Zellmembran wird eine ausreichend hohe konstante Leitfähigkeit vorausgesetzt. Diese Konfiguration bietet den Vorteil, dass das intrazelluläre Milieu nicht durch Auswaschen verändert wird. Außerdem kann man sie als Ausgangs- und Kontrollposition für weitere Messungen in der Inside-out-Konfiguration verwenden.

Die Inside-out-Konfiguration erlaubt es, Ströme unter verschiedenen, künstlich zu erzeugenden, „intrazellulären“ Milieus zu messen (s. Abb. 5). Durch eine axiale Bewegung mit dem Mikromanipulator zieht man die Patchpipette ausgehend von der Cell-attached-Konfiguration von der Zelle ab und erhält zunächst häufig einen kleinen Membranvesikel. Dieser ist an sich nicht erwünscht, da zur Eröffnung ein kurzer Luftkontakt benötigt wird, der die Membran leicht zerstören kann. Die Vesikelbildung ist dann von Vorteil, wenn ein Wechsel in ein zweites Kompartiment angestrebt wird. Das Platzen des Vesikels führt schließlich dazu, dass die Innenseite des Membranpatches nach außen zeigt.

Die Patch-Clamp-Technik erlaubt zwei grundsätzlich verschiedene Arten, Ströme und Spannungen von der Zellmembran abzuleiten:

1. Die **Spannungsklemme** (Voltage-Clamp). Bei dieser klassischen Konfiguration wird durch negative Rückkopplung im Verstärker ein Kompensationsstrom erzeugt, der das Membranpotential auf der Sollspannung hält, die vom Experimentierenden per Spannungsgenerator vorgegeben wird. Das Verhalten dieses Kompensationsstroms entspricht der Dynamik der Membranleitfähigkeit und somit dem Schaltverhalten der enthaltenen Ionenkanäle.

Der Messvorgang ist insoweit computerisiert, als dass die Zeit- und Spannungsvorgaben in Pulsprotokollen kombiniert werden, die jeweils einen bestimmten Spannungs- und Zeitbereich erfassen. Hierfür diente in dieser Arbeit die Pulse-Software (HEKA Elektronik).

2. Die **Stromklemme** (Current-Clamp). Diese Konfiguration dient der Registrierung des Membranpotentials im Zeitverlauf.

Sämtliche Experimente dieser Arbeit sind bei Raumtemperatur (22 - 25 °C) mit der Spannungsklemme durchgeführt worden. Der Widerstand des Seals in der Cell-attached-Konfiguration betrug immer mindestens 1 G Ω . Bei jeder Messung betrug der Serienwiderstand höchstens 10 M Ω , wobei der resultierende Spannungsabfall so weit wie möglich kompensiert wurde (70 - 90 %), ohne dass Oszillationen auftraten. Die schnelle Pipettenkapazität sowie die langsame Zellkapazität wurden vor jedem einzelnen Puls kompensiert. Eine rechnerische Korrektur des Diffusions-Potentialfehlers von ~4,3 mV (Ringer-Lösung) wurde nicht durchgeführt. Dieser Fehler entsteht regelmäßig, da der Korrekturparameter bei unterschiedlichen Ionenkonzentrationen in Pipetten- und Messlösung nach Erreichen der Cell-attached-Konfiguration beibehalten wird.

3.2.3 Patchpipetten

Die Pipetten wurden aus feinen Röhren aus Borosilikatglas hergestellt (Vitrex GB150T-8P, Science Products GmbH). Mit einem vollautomatischen Pipettenziehgerät (DMZ Universal Puller, Zeitz-Instrumente GmbH) wurden polierte Pipetten hergestellt, die beim Eintauchen in die Badlösung Widerstände zwischen 2 und 5 M Ω aufwiesen, dies entspricht einer Öffnung von etwa 1 μ m. Jede Pipette wurde nur einmal verwendet und jeweils am Tag der Herstellung verbraucht.

Vor dem eigentlichen Messvorgang wurde jede Pipette standardmäßig mit Sigmacote (Sigma) beschichtet, um zu verhindern, dass sich ein Wasserfilm am Schaft der Pipette hochzieht, was das kapazitive Rauschen erhöhen würde.

3.2.4 Lösungen und Chemikalien

Die elektrophysiologischen Messungen wurden in verschiedenen extrazellulären Lösungen durchgeführt (Angaben in mM, sofern nicht anders angegeben):

1. **Ringer-Lösung:** 140 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 2 HEPES, 5 Glucose
pH mit NaOH auf 7,3 eingestellt
2. **5 K⁺-Lösung:** 5 KCl, 135 NaCl, 4 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 Glucose, 10 HEPES, 2,5 EGTA, 0,2 NiCl₂, 500 nM TTX
pH mit NaOH auf 7,3 eingestellt, freie Ca²⁺-Konz. 75 nM (EQCAL, Biosoft)
3. **isotonische KCl-Lösung:** 140 KCl, 4 MgCl₂, 1 CaCl₂, 2,5 EGTA, 10 HEPES, 10 Glucose, 500 nM TTX
pH mit KOH auf 7,3 eingestellt, freie Ca²⁺-Konz. 75 nM (EQCAL, Biosoft)
4. **isotonische KCl mit Calcium:** 140 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 2 HEPES, 5 Glucose
pH mit KOH auf 7,3 eingestellt
5. **40 K⁺-Lösung:** 100 NaCl, 40 KCl, 4 MgCl₂, 1 CaCl₂, 2,5 EGTA, 10 HEPES
pH mit KOH auf 7,3 eingestellt

Sofern nicht anders angegeben, wurde bei allen Experimenten folgende Pipettenlösung (**intrazelluläre Lösung**) verwendet: 140 KCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 2,5 EGTA, 10 HEPES, pH mit KOH auf 7,3 eingestellt. Das freie Ca²⁺ errechnet sich auf 66 nM (EQCAL, Biosoft).

Alle weiteren bei den elektrophysiologischen Experimenten verwendeten Substanzen wurden manuell unter Benutzung einer Laborpipette (Eppendorf) in das Schälchen appliziert, wobei unter gleichzeitigem Absaugen die Endkonzentration erreicht wurde.

Appliziert wurden:

1. **E-4031** (Eisai), ein Klasse III-Antiarrhythmikum aus der Gruppe der Methansulfonanilide. Es ist als spezifischer Blocker für erg-Ströme beschrieben worden (Colatzky *et al.*, 1994; Trudeau *et al.*, 1995; Weinsberg *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurde E-4031 in einer Endkonzentration von 10 μ M eingesetzt, um in GH₃/B₆-, MMQ- und CHO-Zellen erg-Ströme als E-4031-sensitive Ströme zu isolieren.
2. **BeKm-1** (Korolkova *et al.*, 2001), das Toxin des Zentralasiatischen Skorpions (*Buthus eupeus*). Die Endkonzentration betrug 75 nM, die Lösung enthielt zu 0,1 % BSA (Bovines Serumalbumin, Sigma).

3.2.5 Zellextrakt

Zur Herstellung der MMQ- und GH₃/B₆-Zellextrakte wurden folgende Substanzen verwendet:

1. Lysis-Puffer:
 - 25 mM Tris HCl (Sigma), pH 7,2
 - 250 mM Sucrose (= Saccharose, Sigma)
 - 20 mM EDTA (Sigma),

im Lysis-Puffer gelöst folgende Proteinase-Inhibitoren (nach Hao *et al.*, 1999):

- 2 mg / ml Aprotinin (Sigma)
- 0,5 mg / ml Pepstatin A (Sigma)
- 10 mM Benzamidin (Sigma)
- 10 mg / ml Iodoacetamid (Sigma)
- 5 mg / ml Leupeptin (Sigma)
- 10 mM PMSF (Sigma)

2. PBS (Phosphate-buffered Saline, pH mit HCl auf 7,4 eingestellt):
- 137 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl
 - 10 mM Na₂HPO₄
 - 2 mM KH₂PO₄

Für die elektrophysiologischen Experimente wurde schließlich jeweils eine 1 / 5-Verdünnung des Extraktes mit der intrazellulären Lösung hergestellt.

3.2.6 Arbeitsplatz

Der Messplatz bestand aus einem inversen Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss), an dessen Tisch der Mikromanipulator (Patchman, Eppendorf) befestigt war. Das Mikroskop stand auf einem schwingungsgedämpften Tisch, der von einer Arbeitsplatte berührungsfrei abgedeckt und einem großen Faradaykäfig abgeschirmt wurde. Eine Quecksilberdampf Lampe mit einem Filtersatz für 485 nm (Filtersatz 08, Zeiss) diente der Detektion EGFP-exprimierender Zellen.

Den Aufbau des Messplatzes komplettierten der Patch-Clamp-Verstärker (EPC-9, HEKA Elektronik) und ein Macintosh-Computer (Apple Inc.).

3.3 Datenerfassung und Auswertung

Die Erfassung der elektrophysiologischen Daten erfolgte mit Hilfe der Pulse-Software (HEKA Elektronik). Zur Auswertung und Analyse wurden PulseFit (HEKA Elektronik), Excel (Microsoft Inc.) sowie SigmaPlot (SPSS Inc.) verwendet. Die Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Verfügbarkeit konnte in den meisten Fällen mit einer Boltzmannfunktion beschrieben werden:

$$f(I) = I_{\min} + I_{\max} / (1 + \exp(-(x - E_{1/2}) / S))$$

Hierbei entspricht I_{\min} der Abweichung der Kurve von 0 auf der Ordinate und I_{\max} der maximalen Amplitude der Kurve. $E_{1/2}$ ist das Potential, bei dem der halbmaximale Wert der Aktivierung bzw. der Verfügbarkeit des gemessenen Stroms vorliegt. S gibt die Steilheit der Kurve als den Bereich der Abszisse an, innerhalb dessen die Amplitude von $I_1 = 1 / e$

(~ 37 %) auf $I_2 = 1 - 1/e$ (~ 63 %) zunimmt. Diese auch als Steigungsfaktor (Slope) bezeichnete Variable beschreibt also den Kurvenverlauf im Bereich der größten Dynamik: Je größer der Wert für den Steigungsfaktor ist, desto flacher ist der Kurvenverlauf.

In einigen Fällen wurde für die Beschreibung der Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit die Summe aus zwei Boltzmannfunktionen verwendet (nach Schäfer *et al.*, 1999):

$$f(I) = I_{\min} + I_{\max, f} / (1 + \exp(-(x - E_{1/2, f}) / S_f)) \\ + I_{\max, s} / (1 + \exp(-(x - E_{1/2, s}) / S_s))$$

Hierbei wurde berücksichtigt, dass eine biphasische Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit vorliegt. Das f im Index beschreibt die schnelle Komponente der Deaktivierung des erg-Stroms, das s im Index steht für die langsame Komponente der Deaktivierung.

Die Bestimmung der Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung sowie der Deaktivierung erfolgte, indem die Stromspuren aus den Deaktivierungsprotokollen mit folgender Formel angeglichen wurden:

$$I(t) = I_{\text{stat}} + I_{\text{rec}} \exp(-t / \tau_{\text{rec}}) + I_{\text{fast}} \exp(-t / \tau_{\text{fast}}) + I_{\text{slow}} \exp(-t / \tau_{\text{slow}})$$

Hierbei entspricht I_{stat} der Amplitude des stationären Stroms, der am Ende des variablen Pulses gemessen wurde. I_{rec} ist die extrapolierte Amplitude der Stromkomponente der Erholung (= recovery) von der Inaktivierung. I_{fast} und I_{slow} entsprechen der jeweils extrapolierten Amplitude der schnellen und langsamen Komponente der Deaktivierung. τ_{rec} , τ_{fast} und τ_{slow} sind die Zeitkonstanten, die die Zu- oder Abnahme der jeweiligen Stromkomponenten über die Zeit beschreiben.

Zur Überprüfung signifikanter Änderungen wurde der t-Test für ungepaarte Stichproben mit ungleicher Varianz verwendet.

3.4 Herstellerverzeichnis

Apple Inc., Cupertino, Kalifornien – USA
Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80939 München
Biosoft, Cambridge, GB – United Kingdom
Biother GmbH, D-50933 Kelkheim
Carl Zeiss Jena GmbH, D-07745 Jena
Clontech, D-69126 Heidelberg
Eisai GmbH, D-60528 Frankfurt
Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, D-22083 Hamburg
Gibco BRL Life Technology GmbH, D-76131 Karlsruhe
HEKA Electronic, D-66466 Lambrecht
Invitrogen GmbH, D-76131 Karlsruhe
Kendro Laboratory Products GmbH, D-63505 Langenfeld
Microsoft Inc., Seattle, Washington – USA
Milipore GmbH, D-65824 Schwalbach
Nunc, D-65203 Wiesbaden
Roche Diagnostics GmbH, D-68305 Mannheim
Science Products GmbH, D-65719 Hofheim
Sigma, D-82041 Deisenhofen
SPSS Inc., Illinois – USA
Zeitz-Instrumente GmbH, D-81377 München

4 Ergebnisse

4.1 Der erg-Strom in GH₃/B₆- und MMQ-Zellen

Der erg-Strom zeigt ein ungewöhnliches Schaltverhalten: Die größten Stromamplituden in physiologischem Milieu zeigen sich bei rascher Hyperpolarisation nach einer Depolarisation, die allerdings zunächst notwendig ist, um den Kanal zu aktivieren. Da er aber zeitgleich – tatsächlich sogar schneller als er aktiviert – inaktiviert, fließt bei Depolarisation nur ein kleiner Strom. Der große Strom bei Repolarisation resultiert dann aus der Erholung aus der Inaktivierung, die sehr viel schneller abläuft als die darauf folgende Deaktivierung. Diese ungewöhnliche Kinetik führt dazu, dass man, um den Kanalstrom zu messen, ein recht kompliziertes Pulsprotokoll benötigt, wie es auf den folgenden Seiten zu sehen sein wird.

Die Isolierung des erg-Stroms in nativen laktotropen Zellen der Ratte als E-4031-sensitiven Strom ergibt einen charakteristischen Befund (Schäfer *et al.*, 1999): Bei Messung in isotonischer KCl-Lösung lassen sich eine langsam und eine schnell deaktivierende Komponente differenzieren, die zellspezifisch mit unterschiedlichen Anteilen an der Gesamtamplitude des Einwärtsstroms beteiligt sind.

Erg-Ströme mit ähnlichen Eigenschaften finden sich in der laktotropen MMQ-Zelllinie (Rosati *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu war die langsam deaktivierende Komponente des erg-Stroms in der somatomammotropen GH₃/B₆-Zelllinie konstant sehr klein (Schäfer *et al.*, 1999).

Dieser Abschnitt der Arbeit befasst sich zunächst mit der Charakterisierung der Differenz zwischen den beiden Zelllinien. Die weiteren Experimente dienen der Erklärung des molekularen Korrelats dieser elektrophysiologischen Eigenschaften.

4.1.1 Native Ströme

In der Ganzzell-Konfiguration wurden die Membranströme von GH₃/B₆- und MMQ-Zellen gemessen und mittels E-4031 spezifisch als erg-Ströme isoliert. Die Messungen fanden in isotonischer KCl-Lösung statt, da die Einwärtsströme in einem physiologischen extrazellulären Milieu eine zu kleine Amplitude hätten, um die Deaktivierung valide auswerten zu

können. Der geringe Gehalt an Ca^{2+} -Ionen unterdrückte zudem endogene Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanäle.

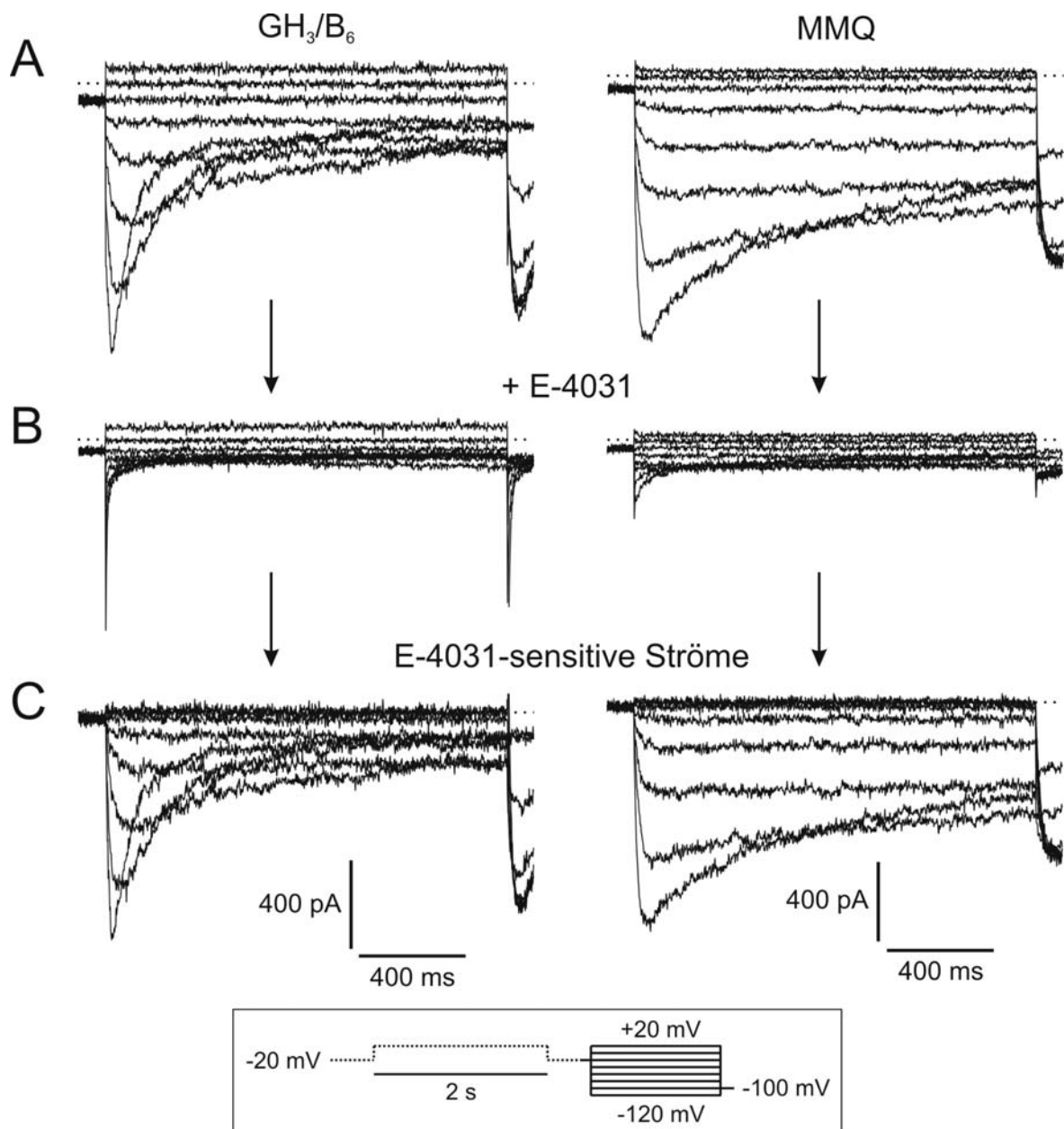


Abb. 6:

Vergleich der nativen E-4031-sensitiven Ströme von GH₃/B₆- und MMQ-Zellen.

A Membranströme von einer GH₃/B₆- und einer MMQ-Zelle, gemessen mit der Ganzzell-Konfiguration in isotonischer KCl-Lösung mit dem unten gezeigten Pulsprotokoll.

B Ströme nach Applikation von 10 μM E-4031.

C E-4031-sensitive Ströme als Differenz aus den jeweiligen Strömen in A und B.

Der charakteristische Unterschied zwischen GH₃/B₆- und MMQ-Zellen war zumeist bereits ohne pharmakologische Isolierung sichtbar (s. Abb 6). Der Zeitverlauf der Deaktivierung erwies sich bei MMQ-Zellen als sehr langsam.

Die Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit wurde mit dem in Abbildung 6 gezeigten Pulsprotokoll bestimmt. Durch einen (nicht aufgezeichneten) Vorpuls für 2 s auf +20 mV wurden die erg-Kanäle vollständig aktiviert und größtenteils inaktiviert. Danach wurde auf Potentiale zwischen +20 mV und -120 mV in Stufen von jeweils 20 mV repolarisiert, der erg-Strom erholte sich spannungsabhängig von der Inaktivierung und deaktivierte anschließend, ebenfalls in Abhängigkeit vom angelegten Potential. Nach den variablen Pulsen wurde ein kurzer Sprung (80 ms) auf -100 mV vorgenommen, um den nicht deaktivierten, also noch verfügbaren Strom zu messen und gegen das Vorpulspotential aufzutragen. Die Beschreibung dieses so genannten Tailstroms mittels einer Boltzmannfunktion (Bauer *et al.*, 1998) ist hervorragend geeignet, den Unterschied zwischen GH₃/B₆- und MMQ-Zellen darzustellen (Schäfer *et al.*, 1999).

Außerdem wurden in einem Rechenschritt die Zeitverläufe der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung während der variablen Spannungspulse mit der Summe dreier Exponentialfunktionen beschrieben (s. Tab. 4 und 5). Die Erholung von der Inaktivierung wurde dabei mit einer, die Deaktivierung mit zwei Funktionen belegt. Dieses Verfahren ergab als Parameter die jeweiligen Zeitkonstanten τ_x sowie die entsprechenden Amplituden I_x , die aufgrund der zeitlichen Überlagerung der verschiedenen Kanalzustände nicht den sichtbaren Amplituden der Stromspuren entsprachen, das Verhältnis aber korrekt darstellten (s. 2.3 Datenerfassung und Auswertung und Abb. 8).

Für die Auswertung der Verfügbarkeit des E-4031-sensitiven Stroms der MMQ-Zellen mussten wegen der großen zellabhängigen Variabilität der Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit (s. auch Schäfer *et al.*, 1999) die Spannungsschritte der variablen Pulse gegenüber dem Pulsprotokoll aus Abbildung 5 halbiert werden (s. Abb. 7) Es wurde außerdem bis -140 mV hyperpolarisiert.

Die Auswertung der Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit des E-4031-sensitiven Stroms von GH₃/B₆- und MMQ-Zellen bestätigte die augenscheinlichen Differenzen (s. Abb. 7). Die GH₃/B₆-Zellen verhielten sich sehr einheitlich (s. Tab. 2). Die normierten, gegen das Vorpuls-Potential aufgetragenen Tailstromamplituden konnten durch eine einfache Boltzmannfunktion beschrieben werden. Hierbei ergab sich für das Potential der halbmaximalen Verfügbarkeit ein Mittelwert von $E_{0,5} = -76,72 \pm 2,48$ mV ($n = 10$). Die

Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit des E-4031-sensitiven Stroms in MMQ-Zellen konnte für viele Zellen nur mit der Summe aus zwei Boltzmannfunktionen beschrieben werden (s. Tab. 3). Hierbei waren die Anteile der zwei Komponenten über die gesamte Spannweite der Möglichkeiten verteilt. Eine der drei repräsentativen Zellen (s. Abb. 7Ca) zeigte ein Verhalten des erg-Stroms, das sowohl bezüglich der Deaktivierung, als auch der Verfügbarkeit sehr an das Bild einer GH₃/B₆-Zelle erinnerte, wohingegen die beiden anderen gezeigten Zellen durch die sehr viel langsamere Deaktivierung auffielen. Diese Variabilität ließ sich graphisch nicht sinnvoll als Kurve durch Mittelwerte beschreiben (s. Abb. 7D und Tab. 3).

Während MMQ-Zellen mit vorwiegend schneller Deaktivierung (s. Abb. 7Ca) eine ähnliche spannungsabhängige Verfügbarkeitskurve wie GH₃/B₆-Zellen zeigten (im Folgenden E_{0,5} fast genannt), trat bei MMQ-Zellen mit zusätzlicher langsam deaktivierender Stromkomponente (s. Abb. 7Cb und 7Cc) eine zweite Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeitskurve auf, die deutlich zu negativeren Potentialen hin verschoben war (im Folgenden E_{0,5} slow genannt). Auch die Zeitverläufe der Deaktivierung waren deutlich unterschiedlich (s. Abb. 6 und 7). Durch Annäherung des Zeitverlaufs mit einer doppelt exponentiellen Funktion (s. Abb. 8) ließen sich in beiden Zelllinien bei Potentialen ab -80 mV zwei Komponenten der Deaktivierung voneinander trennen, wobei der jeweilige Anteil an der Gesamtamplitude klar Unterschiede zwischen den Zelllinien erkennen ließ. Außerdem kam bei beiden Zelllinien eine stationäre Stromkomponente vor, die insbesondere bei den langsam deaktivierenden MMQ-Zellen eine repräsentative Auswertung der Deaktivierungskinetik in Potentialbereichen positiver als -100 mV unmöglich machte.

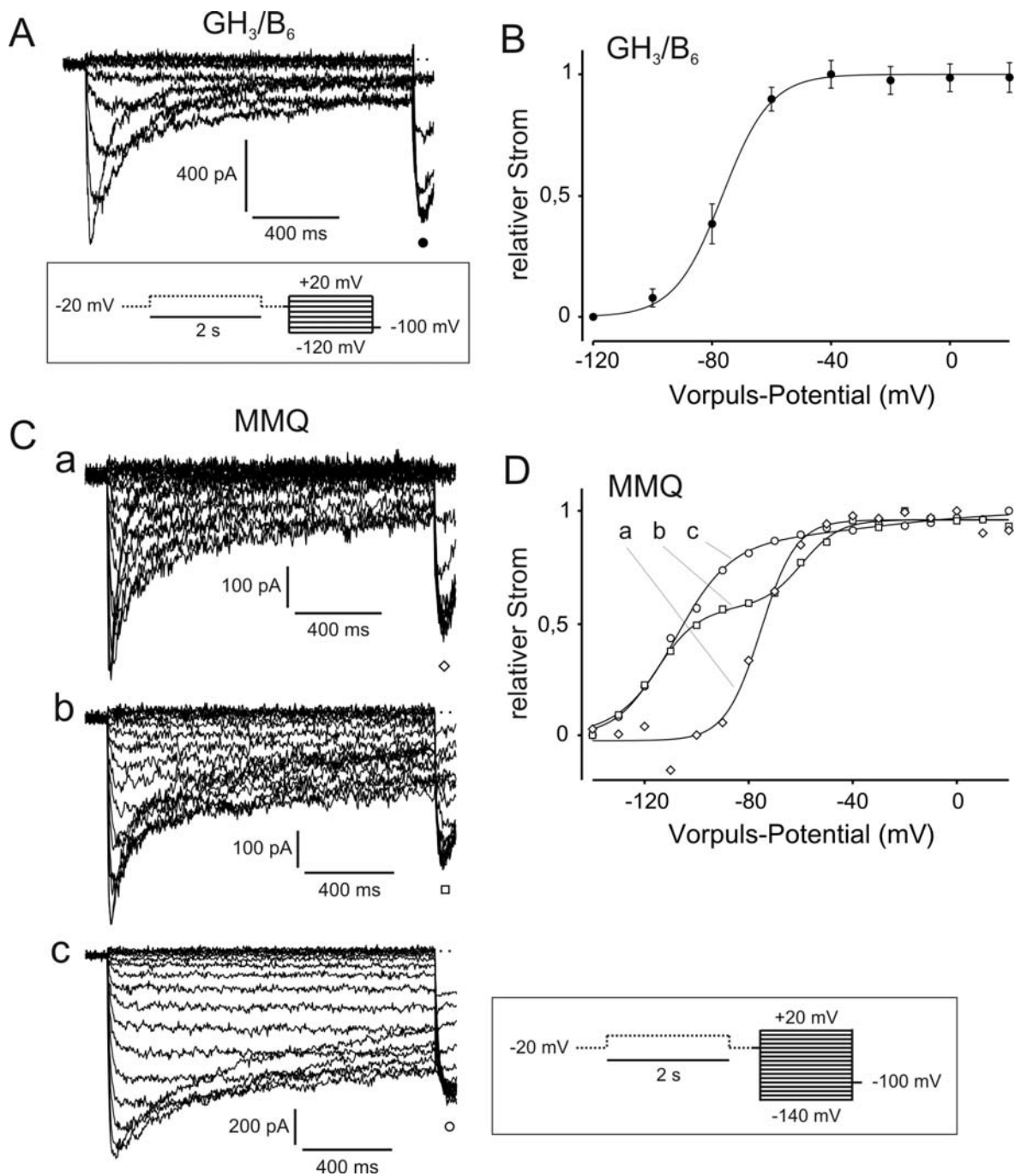


Abb. 7:

Vergleich der Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit der E-4031-sensitiven Ströme in GH_3/B_6 - und MMQ-Zellen.

A E-4031-sensitiver Strom einer GH_3/B_6 -Zelle mit dem benutzten Pulsprotokoll.

B Verfügbarkeit der erg-Ströme in GH_3/B_6 -Zellen: Auftragung des maximalen Einwärtsstroms beim Nachpuls auf -100 mV gegen das vorher angelegte Potential, die Punkte zeigen den Mittelwert \pm SD der normierten Ströme ($n = 10$).

C Ausgewählte E-4031-sensitive Ströme von drei MMQ-Zellen und das verwendete Pulsprotokoll. In **a** dominiert die schnelle Deaktivierung, in **b** sind die Anteile an schneller und langsamer Deaktivierung etwa gleich, in **c** dominiert die langsame Deaktivierung.

D Auftragung des normierten maximalen Einwärtsstroms beim Nachpuls von jeder einzelnen der drei in **C** gezeigten Stromfamilien gegen das vorher angelegte Potential.

Tabelle 2: $E_{0,5}$ -Werte für die Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit des E-4031-sensitiven Stroms der **GH₃/B₆**-Zellen (einfache Boltzmannfunktion, daher nur $E_{0,5}$ fast, entsprechend der schnellen Deaktivierung).

Zelle Nr.	$E_{0,5}$ fast (mV)	Slope (mV)
1	-76,9	8,8
2	-77,6	8,5
3	-73,4	10,1
4	-80,4	7,59
5	-75,1	8,2
6	-74,2	5,79
7	-78,9	8,28
8	-73,6	6,85
9	-78,5	7,8
10	-78,6	5,4
Mittelwert	-76,72	7,73
SD	2,48	1,41

Tabelle 3: $E_{0,5}$ -Werte für die Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit des E-4031-sensitiven Stroms der **MMQ**-Zellen (doppelte Boltzmannfunktion).

Zelle Nr.	$E_{0,5}$ fast (mV)	Slope (mV)	Ampl.-Anteil (%)	$E_{0,5}$ slow (mV)	Slope (mV)	Ampl.-Anteil (%)
1	-	-	0	-105,3	12,5	100
2	-55,7	11,96	23,7	-109,1	9,4	76,3
3	-78,7	17,90	39,5	-123,5	4,3	60,5
4	-59,9	7,20	41,0	-115,8	8,2	59,0
5	-56,9	18,98	49,2	-110,1	6,8	50,8
6	-71,1	7,90	61,3	-125,7	6,5	38,7
7	-67,4	6,40	81,0	-114,0	3,6	19,0
8	-78,2	9,48	100	-	-	0
Mittelwert	-66,84	11,40	-	-114,79	7,33	-
SD	9,65	5,14	-	7,54	3,05	-

Mit Hilfe von PulseFit wurden für die ausgewählten Potentiale (den ausgewählten Puls auf -80, -100 oder -120 mV, s. auch Abb. 8) nach der in Kapitel 3.3 (Datenerfassung und Auswertung) angegebenen Formel die auf den Zeitverlauf am besten passenden Parameter berechnet. Hierbei ergaben sich I_{stat} als stationäre Amplitude, I_{fast} als Amplitude der schnell deaktivierenden Stromkomponente, sowie I_{slow} als Amplitude der langsam deaktivierenden Stromkomponente. Für die Exponentialfunktionen ergaben sich τ_{recov} als Zeitkonstante der Erholung aus der Inaktivierung, sowie τ_{fast} und τ_{slow} als die entsprechenden Zeitkonstanten der Deaktivierung (s. Tab. 4 und 5). Die dargestellten Amplituden sind tatsächlich

theoretische Werte, wie sie aufgrund der Überlagerung der Prozesse der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung unter Messbedingungen niemals gesehen werden können.

Die unterschiedlichen Deaktivierungskinetiken wurden als Verhältnis der Amplitude der langsamen Komponente zur Summe aus den Amplituden der langsamen Komponente und der schnellen Komponente dargestellt (nach Schäfer *et al.*, 1999). Dies zeigt den relativen Anteil an der extrapolierten Gesamtamplitude des deaktivierenden Stroms. Die stationäre Stromkomponente wird hierbei nicht berücksichtigt. Bei den Werten für die Amplituden handelt es sich immer um die berechneten Werte aus der Funktion (s. Abb. 8). Dieser Quotient ermöglicht die einfache mathematische Beschreibung des charakteristischen Unterschiedes zwischen den Zelllinien.

Aus der Messreihe in isotonischer KCl-Lösung wurden die Zeitverläufe der Erholung von der Inaktivierung (einfache Exponentialfunktion) und der Deaktivierung (doppelte Exponentialfunktion) des E-4031-sensitiven Stroms von GH₃/B₆- und MMQ-Zellen bei den Potentialen -100 mV und -120 mV bestimmt. Aufgrund der Auswertungsfehler, die insbesondere im Bereich der Deaktivierung durch die bereits genannte stationäre Stromkomponente entstehen, wurden bevorzugt diese Potentialbereiche betrachtet. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in den Tabellen 4, 5 und 6 dargestellt. Weder bezüglich der Zeitkonstanten noch bezüglich der dazugehörigen Werte für die Amplitude ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien (s. Tab. 4 und 5), wengleich auch die Mittelwerte oftmals deutlich voneinander abwichen.

Im Gegensatz dazu gab es einen auffallend deutlichen Unterschied bei den relativen Anteilen der langsam deaktivierenden Stromkomponente (s. Tab. 6) an der extrapolierten Gesamtamplitude, der besonders bei den stark hyperpolarisierenden Potentialen auftrat. Dieser Anteil der langsam deaktivierenden Komponente des E-4031-sensitiven Stroms ist bei MMQ-Zellen signifikant höher als bei GH₃/B₆-Zellen ($p < 0,0005$). Während der E-4031-sensitive Strom der GH₃/B₆-Zellen bei einem Potential von $E = -120$ mV einen Wert von $I_{\text{slow}} / (I_{\text{fast}} + I_{\text{slow}}) = 0,24 \pm 0,05$ (Mittelwert \pm SD) aufwies, kam es bei den MMQ-Zellen zu einem Wert von $I_{\text{slow}} / (I_{\text{fast}} + I_{\text{slow}}) = 0,63 \pm 0,25$ (Mittelwert \pm SD). Die Signifikanz besteht trotz einer sehr stark ausgeprägten Variabilität der Ausprägung dieses Phänomens innerhalb der MMQ-Zellpopulation (s. auch Abb. 7).

Da die Unterschiede der Stromanteile zwischen dem E-4031-sensitiven Strom von GH_3/B_6 - und MMQ-Zellen bei -120 mV besonders deutlich sind, wurde in den folgenden Experimenten bevorzugt dieser Wert betrachtet.

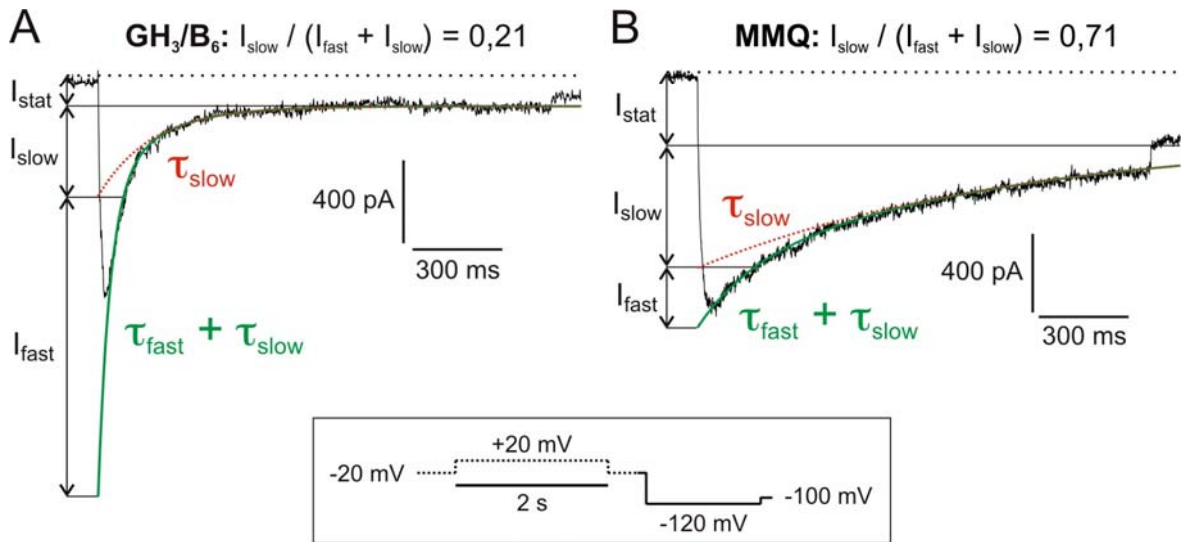


Abb. 8:

Das Prinzip der Auswertung der Deaktivierungskinetik ist die Benutzung der Summe zweier Exponentialfunktionen. Die Funktion für die langsame Komponente ist rot, die Summe aus beiden Funktionen grün dargestellt. I_{stat} ist die Amplitude des stationären Stroms. I_{slow} und τ_{slow} sind die Parameter für die Funktion, die die langsam deaktivierende Stromkomponente beschreibt. I_{fast} und τ_{fast} sind die entsprechenden Parameter für die schnell deaktivierende Stromkomponente.

A Hier ist der Zeitverlauf der Deaktivierung einer GH_3/B_6 -Zelle nach unten gezeigtem Pulsprotokoll in isotonischer KCl-Lösung gezeigt (gestrichelt: Nulllinie). Die Funktion gibt die Auswertung dieses Beispiels wieder. Der Quotient von $I_{\text{slow}} / (I_{\text{fast}} + I_{\text{slow}}) = 0,21$ ist typisch für eine GH_3/B_6 -Zelle.

B Hier ist der Zeitverlauf der Deaktivierung einer MMQ-Zelle nach unten gezeigtem Pulsprotokoll in isotonischer KCl-Lösung dargestellt (gestrichelt: Nulllinie). Die Funktion gibt die Auswertung dieses Beispiels wieder. Der Quotient von $I_{\text{slow}} / (I_{\text{fast}} + I_{\text{slow}}) = 0,71$ ist typisch für eine MMQ-Zelle.

Tabelle 4: Mittelwerte für den Zeitverlauf der Erholung von der Inaktivierung von GH_3/B_6 - und MMQ-Zellen nach Messung in isotonischer KCl-Lösung (s. Abb. 5 und 6, Mittelwerte \pm SD).

Potential (mV)	GH_3/B_6 (n = 14) τ (ms)	MMQ (n = 15) τ (ms)	p
-100	$16,4 \pm 3,3$	$14,3 \pm 4,4$	0,166
-120	$9,0 \pm 2,4$	$10,1 \pm 3,5$	0,358

Tabelle 5: Werte für den Zeitverlauf der Deaktivierung von GH₃/B₆- und MMQ-Zellen bei Messung in isotonischer KCl-Lösung (s. Abb. 5 und 6, Mittelwerte ± SD).

Potential (mV)	GH ₃ /B ₆ (n = 13)				MMQ (n = 13)			
	τ_{fast} (ms)	I_{fast} (pA)	τ_{slow} (ms)	I_{slow} (pA)	τ_{fast} (ms)	I_{fast} (pA)	τ_{slow} (ms)	I_{slow} (pA)
-100	218,0	-517,0	1084,3	-193,1	153,1	-120,4	1659,5	-128,8
	± 58,3	± 371,7	± 869,1	± 178,2	± 82,1	± 107,4	± 1496,7	± 90,8
-120	90,9	-764,3	979,3	-214,3	84,3	-207,4	1133,0	-320,4
	± 19,0	± 469,9	± 578,7	± 83,7	± 42,0	± 167,1	± 437,4	± 177,2

Tabelle 6: Dargestellt ist der relative Anteil der langsam deaktivierenden Stromkomponente des E-4031-sensitiven Stroms von GH₃/B₆- und MMQ-Zellen bei Messung in isotonischer KCl-Lösung (Mittelwerte ± SD).

Potential (mV)	GH ₃ /B ₆ (n = 14) $I_{\text{slow}} / (I_{\text{fast}} + I_{\text{slow}})$	MMQ (n = 13) $I_{\text{slow}} / (I_{\text{fast}} + I_{\text{slow}})$	p
-100	0,27 ± 0,15	0,56 ± 0,21	0.000698
-120	0,24 ± 0,05	0,63 ± 0,25	0.000105

Als Kontrolle für die darauffolgenden Experimente wurde der Anteilswert bei -120 mV in der 40 mM K⁺ enthaltenden extrazellulären Lösung erneut bestimmt: Für den E-4031-sensitiven Strom der GH₃/B₆-Zellen ergab sich bei einem Potential von -120 mV ein Wert von $I_{\text{slow}} / (I_{\text{fast}} + I_{\text{slow}}) = 0,12 \pm 0,042$ (Mittelwert ± SD, n = 11), der Anteil der langsam deaktivierenden Stromkomponente war reproduzierbar klein. Die MMQ-Zellen zeigten bezüglich dieses Parameters wiederum eine große Variabilität. Der relative Anteil der langsam deaktivierenden Stromkomponente schwankte stark um $I_{\text{slow}} / (I_{\text{fast}} + I_{\text{slow}}) = 0,50 \pm 0,171$ (Mittelwert ± SD, n = 20). Der Unterschied zwischen GH₃/B₆- und MMQ-Zellen blieb also auch unter Bedingungen niedrigerer extrazellulärer Kaliumkonzentration sehr deutlich (p < 0,0005).

4.1.2 Heterologe Expression von *erg1* in GH₃/B₆-, MMQ- und CHO-Zellen

Um herauszufinden, ob MMQ-Zellen einen Faktor enthalten, der den *erg*-Strom in seiner Kinetik beeinflussen kann, oder ob ein bisher unbekannter eigenständiger Ionenkanal oder eine Ionenkanal-Untereinheit für die Unterschiede zwischen MMQ- und GH₃/B₆-Zellen verantwortlich ist, wurde die Methode der Überexpression gewählt, i.e. ein endogen bereits enthaltenes Protein wird in vielfach erhöhter Konzentration exprimiert. Diese Methode ist bereits für GH₃/B₆-Zellen beschrieben (Schledermann *et al.*, 2001). Außerdem ist beschrieben, dass *erg1* in beiden Zelllinien exprimiert wird (Schäfer *et al.*, 1999; Wimmers *et al.*, 2001). Vor diesem Hintergrund wurde also *erg1*-cDNA in GH₃/B₆- und MMQ-Zellen injiziert, um einen vergrößerten E-4031-sensitiven Strom messen zu können (s. Abb. 9). Es sollte festgestellt werden, ob die überexprimierten Kanäle durch die spezifischen intrazellulären Milieus mit spezifischen Änderungen der Kinetik reagieren. So wäre auch zu differenzieren, ob die MMQ-typische langsam deaktivierende Stromkomponente durch einen bisher noch unbekanntem Ionenkanal, der ebenfalls E-4031-sensibel wäre, verursacht wird.

Als Kontrolle für die Eigenschaften des *erg1*-Stroms wurde der Klon außerdem in CHO-Zellen exprimiert, die über fast keine endogenen Ströme verfügen (s. Abb. 9). Alle Messungen wurden aufgrund der zu erwartenden hohen Amplitude der Ströme nicht in isotoni-scher KCl-Lösung durchgeführt, sondern in 40K⁺-Lösung (s. Kap. 3.2.4 Lösungen und Chemikalien). Die Artefakte durch unvollständige Potentialkontrolle bei zu hohen Amplituden hätten die Ergebnisse für die Auswertung der Deaktivierungskinetik verfälscht. Aufgrund des durch die mangelnden Kompensationsmöglichkeiten entstehenden Potentialfehlers wäre die Deaktivierung als zu langsam gemessen worden.

Der überexprimierte *erg1* zeigte in GH₃/B₆-Zellen keine wesentlichen Veränderungen gegenüber dem endogenen E-4031-sensitiven Strom (s. Abb. 10A, C). Der relative Anteil der Amplitude der langsam deaktivierenden Komponente lag im Mittel bei 10 %. In Abbildung 10A ist zu sehen, dass sich der Anteil der langsamen Stromkomponente in GH₃/B₆-Zellen auch bei sehr hoher Stromdichte nicht änderte. Der *erg1*-Strom in CHO-Zellen verhielt sich genauso wie in GH₃/B₆-Zellen (s. Abb. 10C).

Der Befund bei den MMQ-Zellen unterschied sich von dem der GH₃/B₆-Zellen (s. Abb. 10B, C). Bereits die Kontrollzellen, die in ihrer Gesamtamplitude des E-4031-sensitiven Stroms in 40 mM K⁺ nicht über 1 nA hinausgingen, hatten sehr unterschiedliche Verhältnisse der Amplitudenanteile. Der Anteil der langsam deaktivierenden Komponente variierte zwischen 20 % und 80 %. Wurde nun *erg1* in MMQ-Zellen überexprimiert, so stellten

sich die Gesamtamplituden in unterschiedlichem Ausmaß größer dar. Es vergrößerte sich aber nicht nur die durch *erg1* hervorgerufene, bevorzugt schnell deaktivierende Komponente: Auch die langsam deaktivierende Komponente erreichte eine Amplitude, die häufig weit über die Gesamtamplitude des endogen zu erwartenden E-4031-sensitiven Stroms hinausging. Hierbei blieb die Variabilität der Anteile innerhalb der Population erhalten.

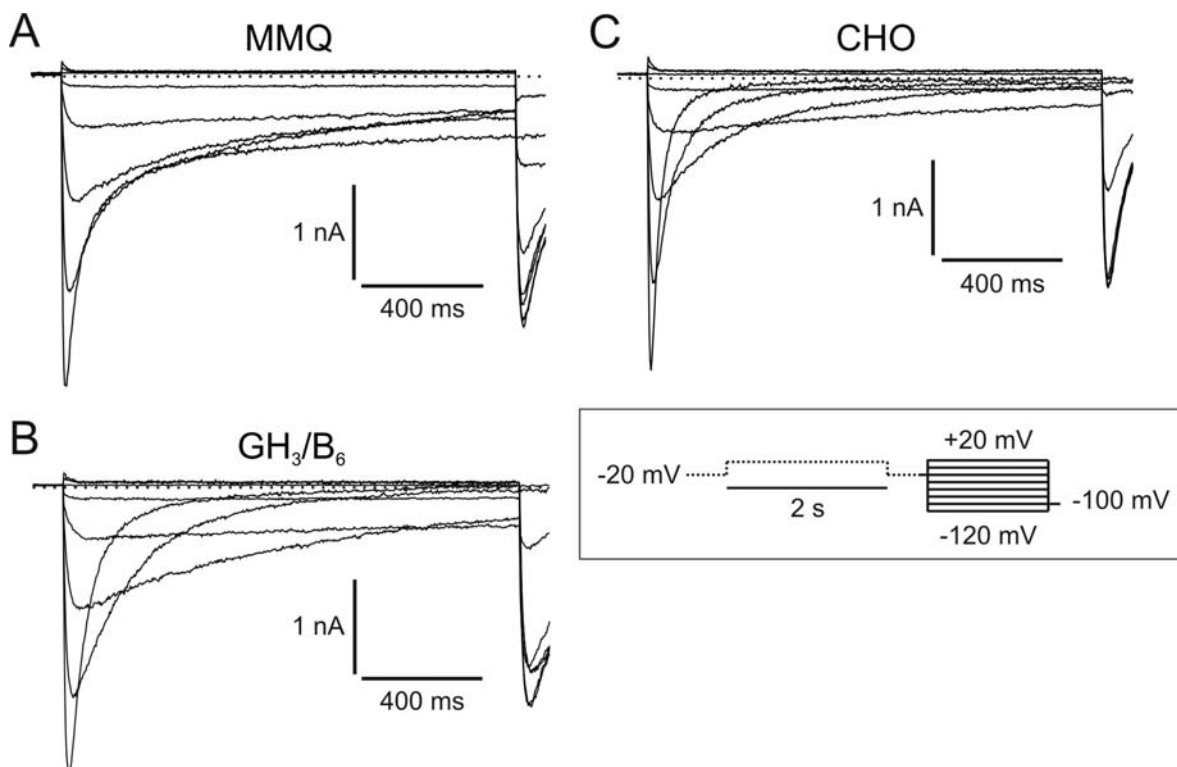


Abb. 9:

E-4031-sensitive Ströme nach heterologer Expression von *erg1* bei Messung in $40K^+$ -Lösung. Das Pulsprotokoll ist im Inset gezeigt, das Haltepotential lag bei $E = -20$ mV.

A Die Ableitung von einer MMQ-Zelle zeigt einen eindeutig zweiphasisch deaktivierenden Strom mit großer Amplitude.

B Die Ableitung von einer GH_3/B_6 -Zelle zeigt einen schnell deaktivierenden Strom mit ähnlich großer Amplitude.

C Die Ableitung von einer CHO-Zelle zeigt einen sehr schnell deaktivierenden Strom. Die Amplitude ist auch hier groß.

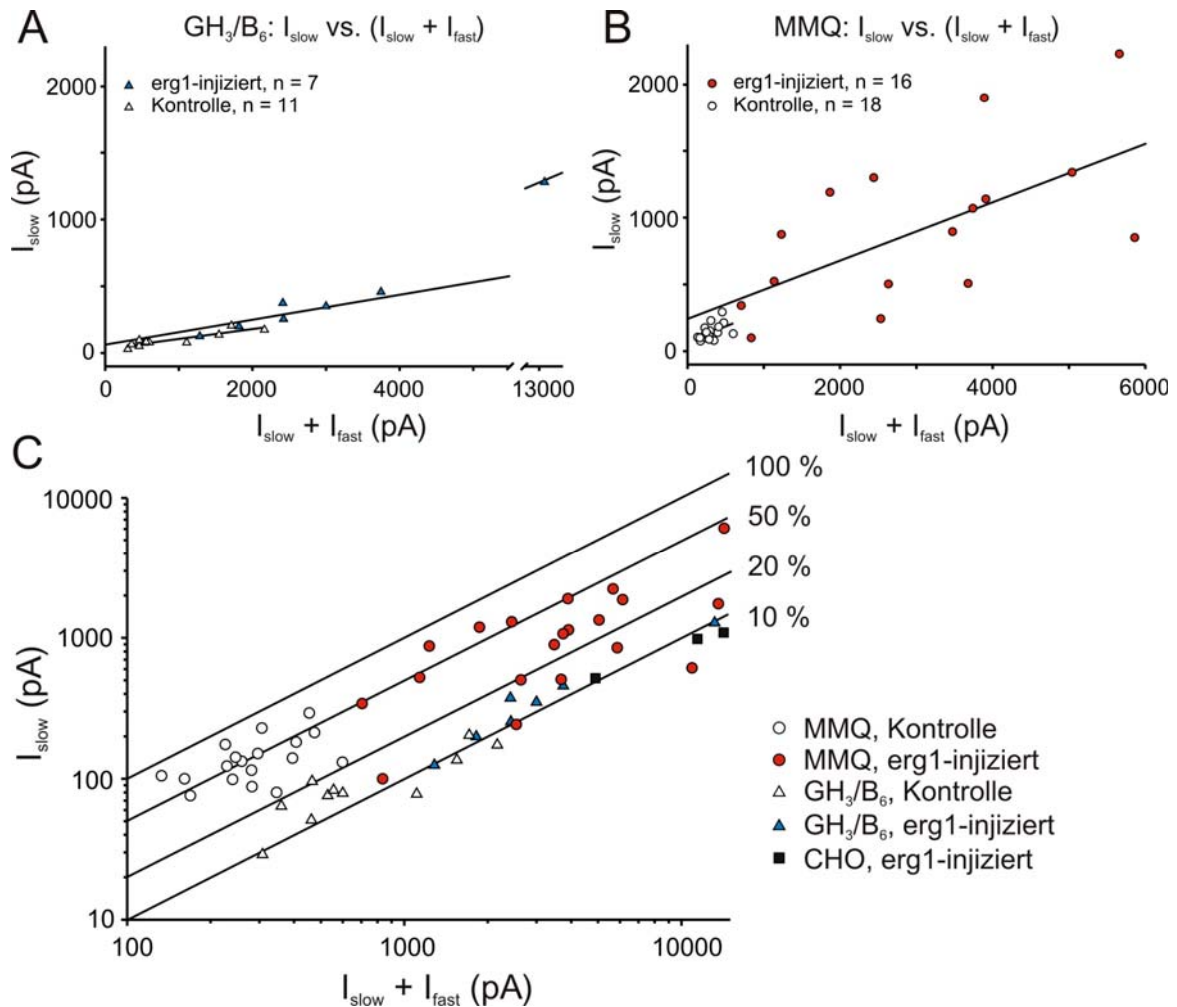


Abb. 10:

Auswertung E-4031-sensitiver Ströme; Kontrollen und Ströme nach Überexpression von *erg1*.

A Darstellung der Amplitude der langsam deaktivierenden Stromkomponente gegen die Summe aus den Amplituden der schnellen und der langsamen Stromkomponente von GH_3/B_6 -Zellen. Die kurze Regressionsgerade beschreibt die nativen Ströme ($r^2 = 0,80$), die lange Regressionsgerade die Ströme nach Überexpression ($r^2 = 0,98$).

B Zum Vergleich: dieselbe Darstellung wie in **A** für die Ergebnisse der MMQ-Zellen. Nicht alle ermittelten Daten sind enthalten, um in **A** und **B** denselben Maßstab beibehalten zu können. Die kurze Regressionsgerade beschreibt die nativen Ströme ($r^2 = 0,24$), die lange Regressionsgerade die Ströme nach Überexpression ($r^2 = 0,46$).

C Doppelt logarithmische Darstellung derselben Daten wie in **A** und **B**, außerdem sind die Daten für die CHO-Zellen enthalten. Die Prozentwerte geben den absoluten Anteil der Amplitude der langsam deaktivierenden Stromkomponente an der Gesamtamplitude an. Einzig die MMQ-Zellen zeigen vor wie auch nach Überexpression von *erg1* einen Anteilswert für die langsam deaktivierende Komponente, der sich variabel bis weit über 50 % hinausbewegt.

Die doppelt logarithmische Darstellung verdeutlicht die Einflüsse des intrazellulären Milieus der MMQ-Zellen (s. Abb. 10C). Während die GH₃/B₆- und die CHO-Zellen nie einen größeren Anteil des I_{slow} als 20 % zeigten, hatte die langsam deaktivierende Stromkomponente der MMQ-Zellen auch bei größten Amplituden einen Anteil von bis über 50 %. Die langsam deaktivierende Stromkomponente allein erzielte also Ströme, die die Gesamtamplitude der endogenen E-4031-sensitiven Ströme der MMQ-Zellen deutlich überschritten.

Dieser Befund führte zu der Annahme, dass es einen den MMQ-Zellen eigenen Faktor geben müsste, der diesen Effekt hervorruft. Auch die Möglichkeit einer Zunahme des Anteils von heteromultimeren Kanälen aus drei exogenen erg1 α -Untereinheiten und einer – entscheidenden – endogenen α -Untereinheit käme in Frage. Dies wäre mit der interzellulären Variabilität des Effekts vereinbar. Da keine deutliche Sättigung erfolgte, war es naheliegend, an ein zytoplasmatisches Signalmolekül zu denken. Der experimentelle Ansatz war nun, einen hochkonzentrierten Zytoplasmaextrakt aus MMQ-Zellen herzustellen, um hiermit möglicherweise eine Änderung der Eigenschaften der erg-Ströme in GH₃/B₆-Zellen herbeizuführen.

4.1.3 Experimente mit Zytoplasma-Präparationen

Zunächst wurde ein möglichst reiner und hochkonzentrierter Zytoplasmaextrakt aus GH₃/B₆- und MMQ-Zellen hergestellt. Der Proteingehalt des MMQ-Extraktes betrug 4 mg/ml, der des GH₃/B₆-Extraktes 6,2 mg/ml. Die erste Versuchsreihe bestand darin, den MMQ-Zellextrakt in die Pipettenlösung einzubringen und dann Whole-cell-Experimente an nativen GH₃/B₆-Zellen durchzuführen. Um ein möglichst weitgehendes Diffusionsgleichgewicht herbeizuführen, wurden die Zellen möglichst lange in der Whole-cell-Konfiguration gehalten. Alle 3 min wurde ein einfacher hyperpolarisierender Testpuls durchgeführt (s. Abb. 11).

Das Experiment zeigte außer unspezifischen Veränderungen keinen Effekt des Zytoplasma-Präparates (s. Abb. 11): Zunächst kam es zu einer zunehmenden Überlagerung des mutmaßlichen erg-Stroms mit einem I_H-Strom. Der I_H-Strom ist in GH₃/B₆-Zellen unregelmäßig vorhanden und wird durch einen HCN-Kanal getragen, der ein unselektiver Kationenkanal ist (Simasko & Sankaranarayanan, 1997). Er aktiviert spannungsabhängig bei Hyperpolarisation und produziert einen langsam aktivierenden K⁺-Einwärtsstrom. Außerdem kam es zu einer Abnahme der Amplitude des erg-Stroms („Rundown“); dies wurde durch die pharmakologische Isolierung am Schluss des Experimentes deutlich. Es kam in

keinem Experiment ($n = 5$) zu einer Verlangsamung der Deaktivierung, wie durch einen Effekt eines diffusiblen zytoplasmatischen Faktors aus den MMQ-Zellen möglicherweise zu erwarten gewesen wäre.

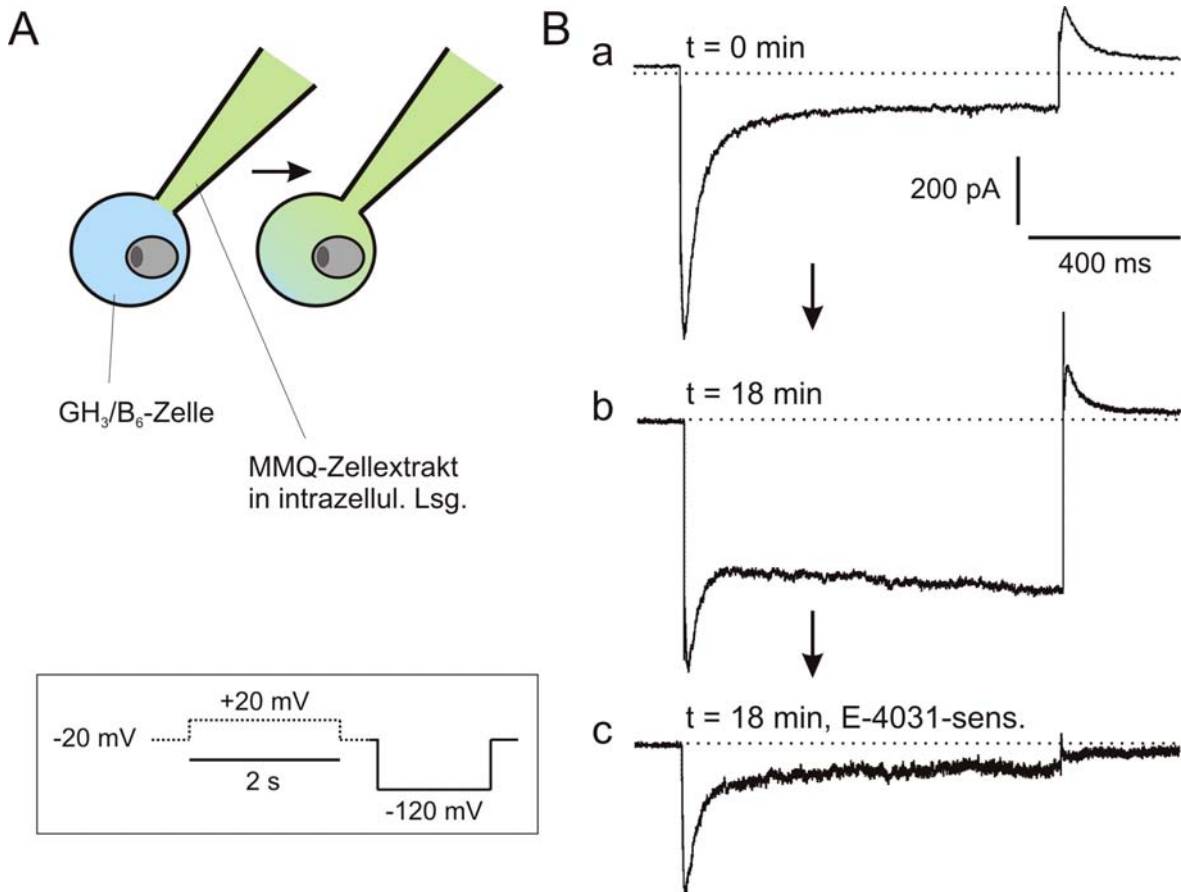


Abb. 11:

Gezeigt sind ausgewählte Stromspuren von einem Experiment mit einer GH_3/B_6 -Zelle in 40 K^+ -Lösung. Die Patchpipette enthielt in intrazellulärer Lösung gelösten MMQ-Zellextrakt, der in der Whole-cell-Konfiguration in die GH_3/B_6 -Zelle diffundieren sollte. Das Haltepotential lag bei $E = -20 \text{ mV}$.

A Schema zur Durchführung des Experiments, GH_3/B_6 : blau, MMQ: grün; sowie das verwendete Pulsprotokoll.

Ba Kontrollmessung zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$, $I_{\text{slow}} / (I_{\text{fast}} + I_{\text{slow}}) = 0,18$ (nicht E-4031-sensitiver Strom, deshalb nur approximativ), **b** Messung zum Zeitpunkt $t = 18 \text{ min}$, **c** Differenzstrom nach E-4031-Gabe zum Zeitpunkt $t = 18 \text{ min}$, $I_{\text{slow}} / (I_{\text{fast}} + I_{\text{slow}}) = 0,15$.

Das gleiche Experiment wurde auch in umgekehrter Anordnung durchgeführt ($n = 2$), i.e. Messung an MMQ-Zellen mit GH₃/B₆-Zytoplasma in der Pipette. Es ergab sich keine Änderung des Verhaltens des erg-Stroms über die Zeit.

Aufgrund der langen Diffusionszeiten in der Whole-cell-Konfiguration wurden außerdem Versuche in der Inside-out-Konfiguration durchgeführt, um einen ungehinderten Zugang des Zytoplasma-Extrakts zu den Kanälen zu ermöglichen. Ein Membranpatch von einer erg1 überexprimierenden GH₃/B₆-Zelle wurde in ein zweites Flüssigkeitskompartiment gebracht, das den MMQ-Zellextrakt in intrazellulärer Lösung gelöst (Verhältnis 1 / 5) enthielt.

Die einzelnen Messungen – wiederum einfache Testpulse auf -120 mV – wurden im Abstand von jeweils einer Minute durchgeführt (s. Abb. 12). Es war gut nachzuvollziehen, wie sich nach dem Abziehen der Pipette von der Zelle der Membranvesikel bildete (nur kapazitive Ströme). Dieser Vesikel wurde durch das Eintauchen in das zweite Kompartiment zum Platzen gebracht, und es war wieder ein erg-Strom messbar. Dieser zeigte mit der Zeit außer einem deutlichen Rundown keine weitere Veränderung. In keinem Experiment, das auf diese Weise durchgeführt wurde ($n = 5$), zeigte sich eine Verlangsamung der Deaktivierung, wobei die Membran nach 6 min meist bereits zerstört war. In diesem Setup war es, da in minimalen Volumina gemessen wurde, technisch nicht möglich, E-4031 zu applizieren. Dies wurde in Kauf genommen, da der erg-Strom sich auch ohne spezifische Isolierung in der isotonischen KCl-Lösung gut identifizieren ließ.

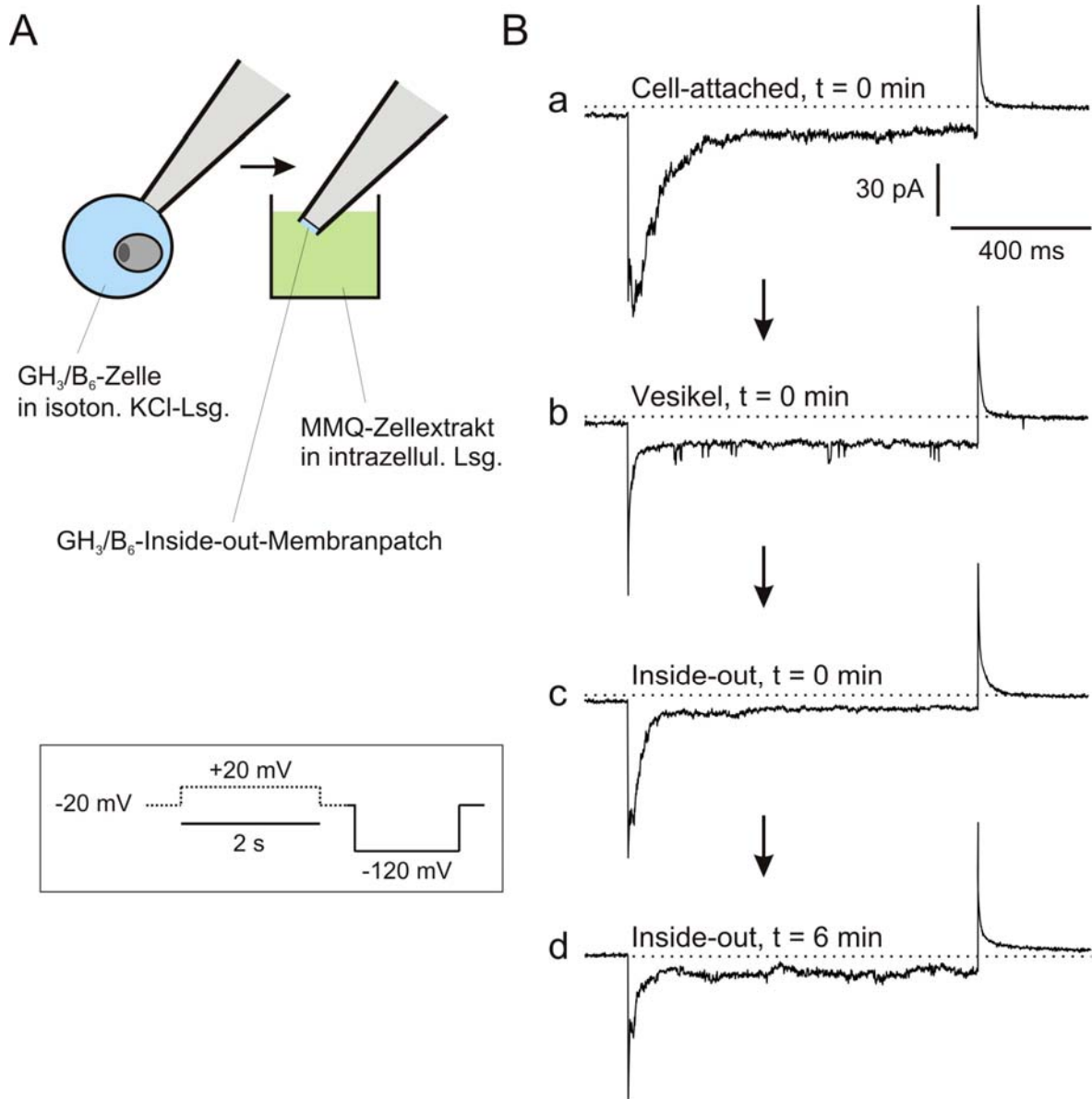


Abb. 12:

Experiment mit einer GH_3/B_6 -Zelle, bei Überexpression von *erg1*. Der MMQ-Zellextrakt befand sich im zweiten Kompartiment, gelöst in intrazellulärer Lösung. Das erste Kompartiment bestand aus isotonischer KCl-Lösung. Das Haltepotential zwischen den Pulsen betrug $E = -20$ mV

A Schema zur Durchführung des Experiments, GH_3/B_6 : blau, MMQ: grün; außerdem das verwendete Pulsprotokoll.

Ba Kontrollmessung in der Cell-attached-Konfiguration, **b** Messung nach Abziehen des Membranvesikels: nur kapazitive Ströme, **c** Messung in der Inside-out-Konfiguration nach Eintauchen in die MMQ-Zellextrakt-Lösung, $t = 0$ min, **d** Messung in der Inside-out-Konfiguration in der MMQ-Zellextrakt-Lösung, $t = 6$ min.

4.1.4 Inside-out-Experimente mit *erg1* in MMQ-Zellen

Diese Experimente dienten dazu, den *erg*-Strom der MMQ-Zellen weiter zu untersuchen. Falls ein löslicher zytoplasmatischer Faktor an der Innenseite der Zellmembran gebunden wäre, wäre denkbar, dass dieser abdiffundiert, sobald ein Membranfleck einer MMQ-Zelle in Messlösung getaucht wird (s. Abb. 13). Diese Experimente wurden wiederum in der Inside-out-Konfiguration durchgeführt ($n = 3$).

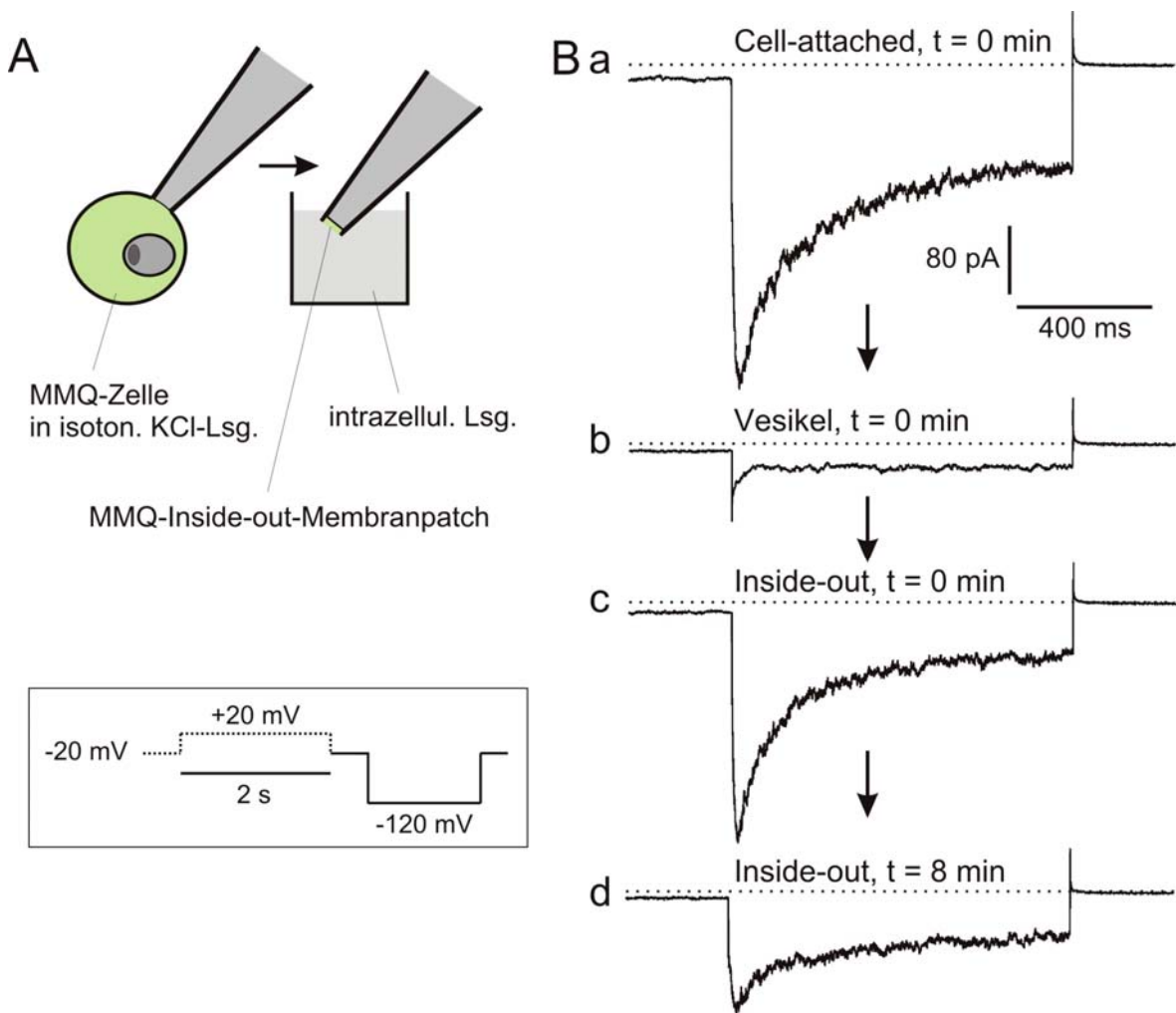


Abb. 13:

Experiment mit einer *erg1* überexprimierenden MMQ-Zelle. Im ersten Kompartiment befand sich isotonische KCl-Lösung, das zweite Kompartiment enthielt intrazelluläre Lösung, das Haltepotential lag bei $E = -20$ mV.

A Schema zur Durchführung des Experiments und das verwendete Pulsprotokoll.

Ba Kontrollmessung in der Cell-attached-Konfiguration, **b** Messung nach Abziehen des Membranvesikels: nur kapazitive Ströme, **c** Messung in der Inside-out-Konfiguration nach Eintauchen in die intrazelluläre Lösung, $t = 0$ min, **d** Messung in der Inside-out-Konfiguration bei $t = 8$ min. Es kommt zum Rundown, die Kinetik bleibt hierbei relativ konstant.

Die einzelnen Versuche ergaben nach maximal 3 min, 5 min und 8 min keine Beschleunigung der Deaktivierung des erg-Stroms. Wiederum kam es zu einem Rundown.

Diese Untersuchungen führten zu dem Schluss, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit kein löslicher zytoplasmatischer Faktor für die besondere Deaktivierungskinetik des E-4031-sensitiven Stroms der MMQ-Zellen verantwortlich ist. Aufgrund neuerer Untersuchungen (McDonald *et al.*, 1997; Abbott *et al.*, 1999; Schroeder *et al.*, 2000) schien es möglich zu sein, dass Proteine aus der Familie der KCNE K⁺-Kanal- β -Untereinheiten einen Einfluss auf das Schaltverhalten der erg-Kanäle haben könnten. Die Untersuchungen hierzu beschreibt der folgende zweite Abschnitt dieser Arbeit.

4.2 Koexpression des KCNQ1-Kanals mit KCNE β -Untereinheiten

Um die Einflüsse der KCNE1-3 β -Untereinheiten auf die Funktion der erg1-3-Kanäle zu untersuchen, wurden standardisierte Versuchsreihen nach Koinjektion in CHO-Zellen durchgeführt, die die Spannungsabhängigkeiten und Zeitverläufe von Aktivierung, Inaktivierung und Deaktivierung darstellen sollten. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abschnitt 4.3 dargestellt.

Als Positivkontrolle für die funktionelle Expression der KCNE β -Untereinheiten wurde der KCNQ1-Kanal ausgewählt, für den in der Literatur Interaktionen mit KCNE1, KCNE2 und KCNE3 (Tinel *et al.*, 2000B; Schroeder *et al.*, 2000) beschrieben wurden. Anhand eines Aktivierungsprotokolls, wie es auch Schroeder *et al.* (2000) verwendeten, ließen sich die Auswirkungen der KCNE β -Untereinheiten auf den KCNQ1-Kanal hervorragend darstellen.

Die Expression von KCNQ1 alleine ergab entsprechend der Literatur einen spannungsabhängig aktivierenden Strom, der im Rahmen der fünf Sekunden dauernden Depolarisation immer eine maximale Amplitude erreichte (s. Abb. 15). Die Deaktivierung bei -30 mV war relativ langsam (s. Abb. 14). Die Koexpression von KCNQ1 mit KCNE1 ergab einen Strom, der dem I_{Ks} -Strom des Herzens entspricht (Sanguinetti *et al.*, 1996B). Der Strom aktiviert spannungsabhängig, jedoch sehr viel langsamer und erst ab sehr viel höheren Potentialen als der durch Expression von KCNQ1 alleine erzeugte Strom (s. Abb. 14 und 15). Nach einer Pulsdauer von fünf Sekunden kam es nicht zu einer Absättigung der Stromamplitude (s. Abb. 14 und Tab. 7). Bei Koexpression von KCNQ1 mit KCNE2 war die Stromamplitude deutlich geringer. Alle gemessenen Zellen zeigten einen auffälligen Leckstrom, der aber weder eine nennenswerte Amplitude, noch eine Spannungsabhängigkeit aufwies (s. Abb. 14 und 15). Ein Zeitverlauf der Aktivierung ließ sich nicht darstellen (s. Abb. 15). Die Koexpression von KCNQ1 mit KCNE3 ergab einen Strom, der dem durch KCNQ1 alleine hervorgerufenen Strom zwar ähnlich sah, der aber doch deutliche Unterschiede aufwies (s. Abb. 14 und 15): Der Strom aktivierte sehr viel schneller als KCNQ1 alleine (s. Tab. 7). Die Amplituden, die erreicht wurden, waren sehr groß, ähnlich der Ergebnisse mit KCNE1. Anders als dort kam es jedoch mit KCNE3 zu einem schnellen Erreichen der Maximalamplitude (s. Abb. 15). Die Deaktivierung bei -30 mV war sehr schnell, wie auch bei Schroeder *et al.* (2000) beschrieben.

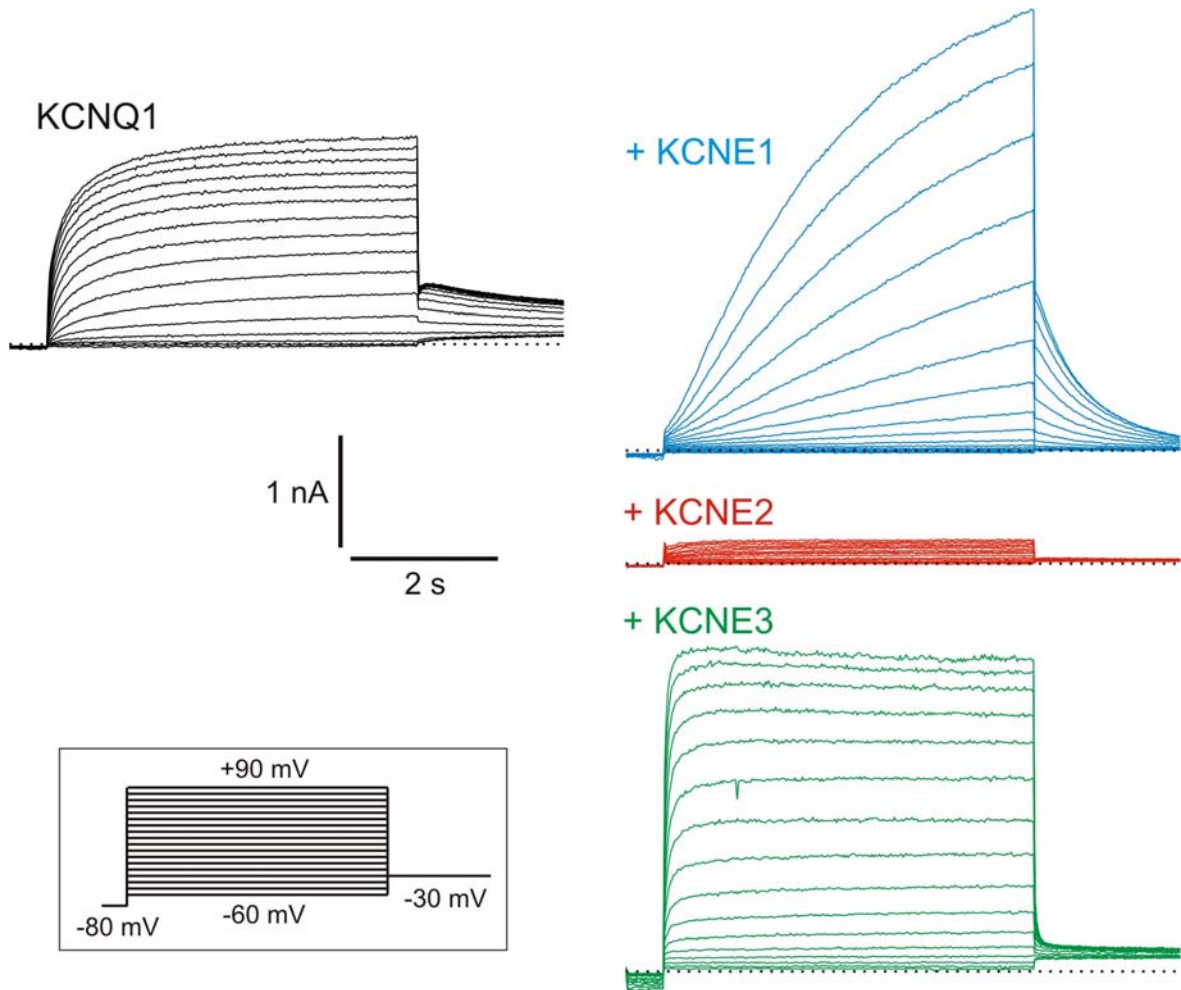


Abb. 14:

KCNQ1-Ströme bei Koexpression mit KCNE β -Untereinheiten in CHO-Zellen. Alle Messungen wurden mit dem im Inset gezeigten Pulsprotokoll in Ringer-Lösung durchgeführt, das Haltepotential war $E = -80$ mV. Die Zeitskala gilt für alle gezeigten Ströme, es sind repräsentative Amplituden ausgewählt worden.

Der KCNQ1-Kanal zeigte bei alleiniger Expression den bekannten spannungsabhängig aktivierenden Auswärtsstrom. Die Koexpression von KCNQ1 und KCNE1 ergab einen langsam aktivierenden Strom mit sehr großer Amplitude. Dies entspricht dem I_{Ks} im Myokard (Sanguinetti *et al.*, 1996B). Die Koexpression von KCNQ1 mit KCNE2 ergab keinen eindeutig zu charakterisierenden Strom. Die Koexpression von KCNQ1 und KCNE3 ergab einen sehr schnell aktivierenden Strom mit großer Amplitude, der außerdem sehr viel schneller deaktiviert als bei der Koexpression von KCNQ1 und KCNE1.

Tabelle 7: Darstellung des Zeitverlaufs der Aktivierung von KCNQ1 als die Zeit $t_{0,5}$, die bei einem Puls auf ein Potential von +70 mV vergeht, bis die halbmaximale Amplitude erreicht ist (Mittelwerte \pm SEM). Die Aktivierung von KCNQ1 bei Koexpression mit KCNE2 ließ sich aufgrund der geringen Amplitude nicht auswerten.

	n	$t_{0,5}$ (ms)
KCNQ1	9	$72,8 \pm 13,7$
KCNQ1 + KCNE1	12	$814,5 \pm 65,1$
KCNQ1 + KCNE2	-	-
KCNQ1 + KCNE3	4	$11,5 \pm 3,9$

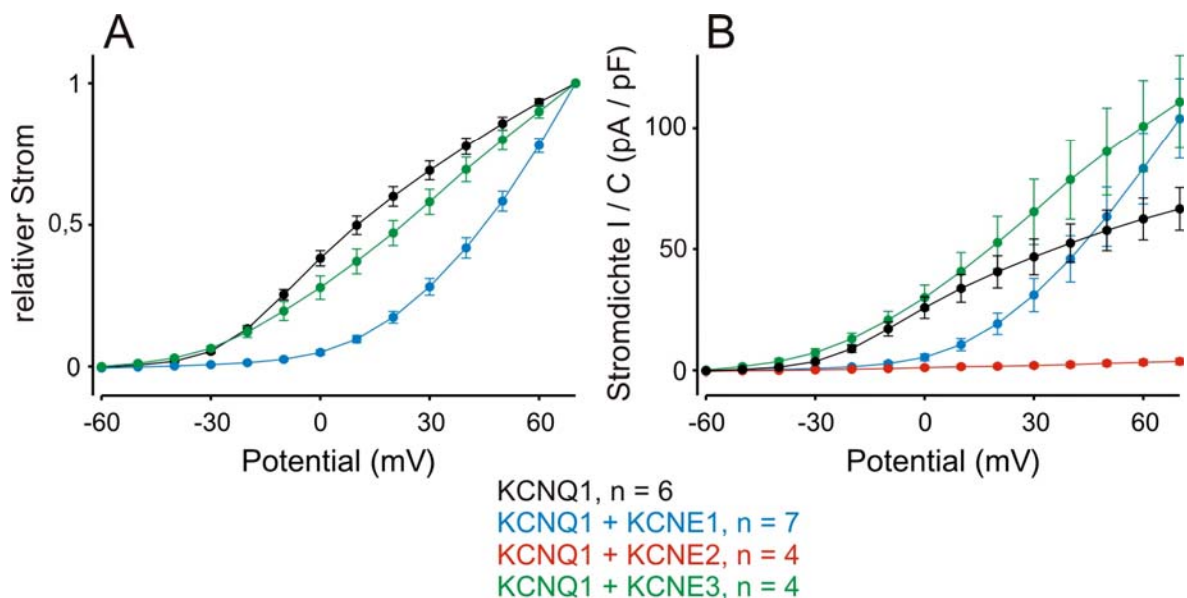


Abb. 15:

Der Einfluss der verschiedenen KCNE β -Untereinheiten auf den KCNQ1-Kanal (Mittelwerte \pm SEM).

A Hier sind die maximalen Stromamplituden zum Ende der depolarisierenden Pulse in Abhängigkeit vom angelegten Potential gezeigt, die auf die jeweils größte Amplitude normiert wurden. Da die Koexpression von KCNQ1 mit KCNE2 keinen deutlichen spannungsabhängigen Strom ergab, wurde diese Kombination nicht dargestellt.

B Die Berechnung der mittleren Stromdichte als I / C (pA / pF) zeigt nicht nur die Wirkung von KCNE2, sondern auch die verschiedenen Amplitudenverhältnisse (s. auch Abb. 14).

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass die verwendeten Klone der KCNE β -Untereinheiten in der Lage sind, unter den gegebenen Bedingungen mit dem KCNQ1-Kanal in Interaktion zu treten und Einfluss auf dessen Eigenschaften zu nehmen. Diese

Interaktionen entsprachen in jeder Hinsicht den Vorbefunden aus der angegebenen Literatur. Die Positivkontrolle für die Funktionalität der verwendeten KCNE-Klone ist somit als gelungen zu betrachten.

4.3 Koexpression von erg-Kanälen mit KCNE β -Untereinheiten

Die erg-Kanäle verhalten sich bei Depolarisation anders als der KCNQ1-Kanal. Da die Inaktivierung bei Depolarisation schneller abläuft als die Aktivierung (Shibasaki, 1987; Sanguinetti *et al.*, 1995), kann der Auswärtsstrom nicht alleine als Maß der Aktivierung verwendet werden. Das verwendete Pulsprotokoll enthält daher nach den variablen Pulsen einen Potentialsprung auf -100 mV, um den Einwärtsstrom nach Erholung aus der Inaktivierung zu bestimmen. Dieser Tailstrom fließt nur durch die vorher aktivierten Kanäle und stellt ein repräsentatives Maß für die spannungsabhängige Aktivierung der erg-Kanäle dar. Die normalisierten Mittelwerte dieser Tailströme wurden schließlich mit Boltzmannfunktionen angeglichen, denen die Werte für das Potential der halbmaximalen Aktivierung entnommen wurden. Alle Messungen wurden alleine mit dem jeweiligen erg-Kanal und in Kombination mit jeweils einer der KCNE β -Untereinheiten durchgeführt.

Experimente in Ringer-Lösung wurden grundsätzlich nur mit erg1 durchgeführt, die Messungen mit erg2 und erg3 hingegen nur in isotonischer KCl-Lösung. Hierfür gab es vor allem folgenden Grund: Es war bereits bekannt, dass die Amplituden der Ströme bei heterologer Expression von erg2 oder erg3 unter gleichen Bedingungen meist sehr viel kleiner ausfielen als die von erg1 (Wimmers *et al.*, 2001). Da die KCNE β -Untereinheiten im Überschuss koinjiziert werden sollten, konnte der Anteil der Kanal-cDNA in der Injektionslösung nicht in dem Maße gesteigert werden, wie es nötig gewesen wäre, um eine ausreichend hohe Menge an funktionell exprimiertem Kanalprotein zu erreichen. In der isotonischen KCl-Lösung ließen sich auch bei Koexpression ausreichend große erg2- und erg3-Ströme messen.

4.3.1 Aktivierung

Die Aktivierung von *erg1* wurde in Ringer- und isotonischer KCl-Lösung bestimmt (s. Abb. 16). Es zeigt sich, dass die extrazelluläre K^+ -Konzentration erwartungsgemäß einen deutlichen Einfluss auf die Richtung und die Kinetik des Stroms ausübte (s. auch Wimmers *et al.*, 2001). Die Koexpression mit den KCNE β -Untereinheiten dagegen verursachte keinen erkennbaren Effekt. In der isotonischen KCl-Lösung waren die Auswärtsströme bei Depolarisation deutlich reduziert, die Deaktivierung beim Testpuls auf -100 mV deutlich verlangsamt, in der Amplitude aber vergrößert. Außerdem war das Umkehrpotential von -70 mV in Ringer-Lösung nach ± 0 mV verschoben. Die Auswertung dieser Experimente (s. Abb. 18 und 19A) ergab bei Messung in Ringer-Lösung eine leichte, nicht signifikante Linksverschiebung der Aktivierungskurve von *erg1* bei Koexpression mit KCNE2 um gut 6 mV. Die mittleren Potentiale der halbmaximalen Aktivierung ergaben sich als $E_{0,5}$ (*erg1*, $n = 19$) = $-17,5 \pm 2,4$ mV und $E_{0,5}$ (*erg1* + KCNE2, $n = 13$) = $-24,2 \pm 2,5$ mV ($p = 0,066$). Dieser Effekt war bei der Messung in isotonischer KCl-Lösung nicht vorhanden (s. Abb. 19A). Bei Koexpression der anderen KCNE β -Untereinheiten war keine vergleichbare Änderung der Aktivierung von *erg1* zu beobachten.

Bei Testpulsen zur Messung der Aktivierung von *erg2*-Kanalströmen kam es bei Depolarisation zu einer extrem schnellen Inaktivierung, es flossen nur minimale Auswärtsströme (s. Abb. 17A). Die Deaktivierung hingegen verlief relativ langsam. Bei Koexpression mit den KCNE β -Untereinheiten änderten sich diese Eigenschaften nicht.

Die Aktivierung der *erg3*-Ströme verlief etwas anders (s. Abb. 17B). Die Inaktivierung war sehr viel langsamer, daher entstanden bei Depolarisation große Einwärtsströme. Demgegenüber war die Deaktivierung sehr schnell, was die Bestimmung der Maximalamplitude deutlich erschwerte. Die Koexpression mit den KCNE β -Untereinheiten veränderte auch die Kinetik der scheinbaren Aktivierung des *erg3*-Kanals nicht.

Die Auswertung der Aktivierung in isotonischer KCl-Lösung ist in Abbildung 19 zusammenfassend gezeigt. Es fällt auf, dass die Fehlerbalken teilweise recht groß sind. Das liegt zum einen daran, dass die Abtastrate bei der Aufzeichnung der schnellen Dynamik der Ströme – dies gilt insbesondere für *erg3* – nicht immer gerecht wurde. Dadurch entstand eine gewisse Unschärfe bei der Auswertung. Zum anderen gab es aber innerhalb aller gemessenen Zellpopulationen zusätzlich eine große Variabilität der Spannungsabhängigkeiten.

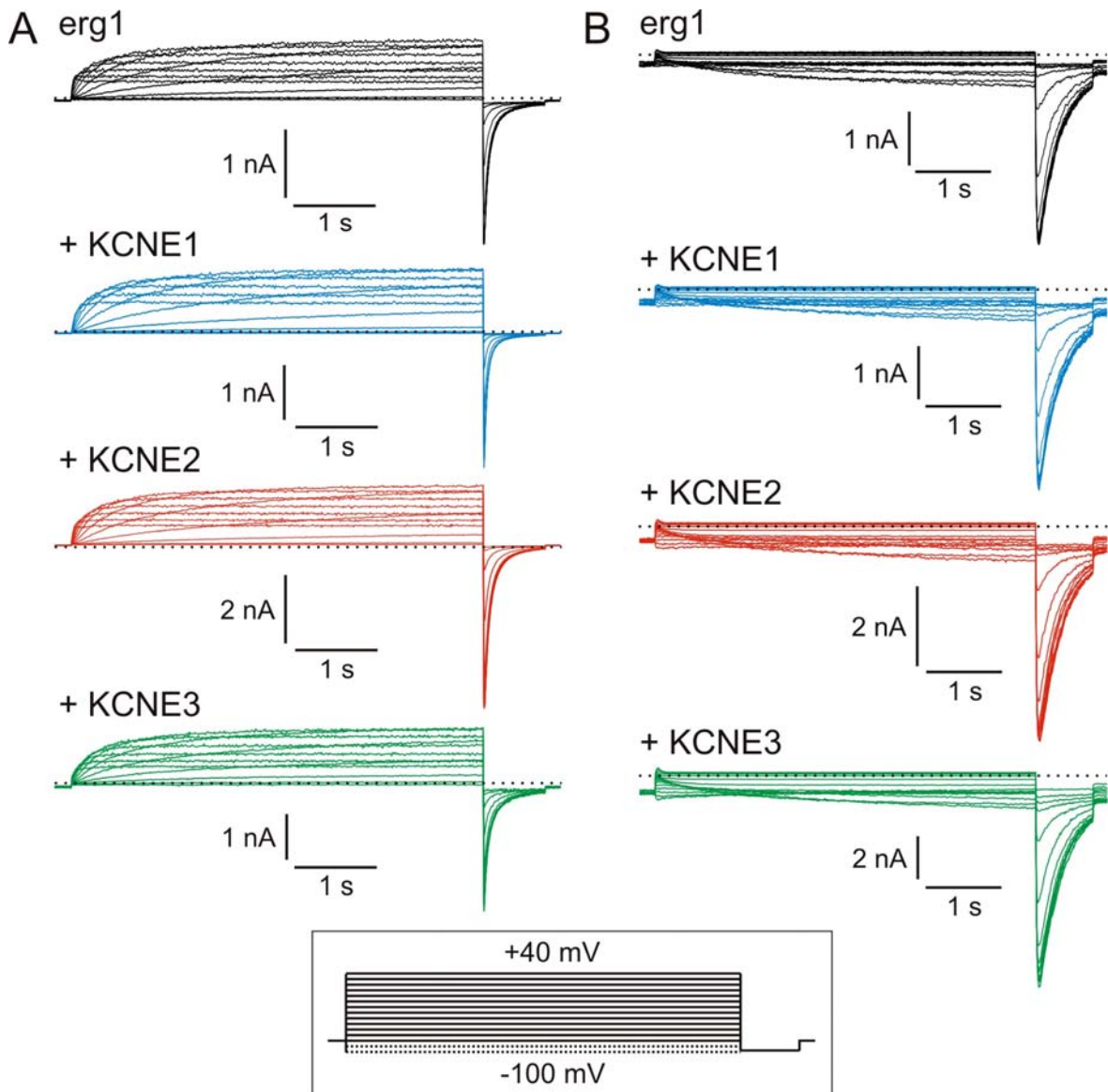


Abb. 16:

Die spannungsabhängige Aktivierung von erg1 wurde nach Injektion beziehungsweise Koinjektion mit KCNE1-3 in CHO-Zellen mit dem im Inset gezeigten Pulsprotokoll (Haltepotential: $E = -80$ mV) bestimmt. Die gepunkteten Linien im Pulsprotokoll zeigen Potentialbereiche an, die nur bei den Messungen in isotonischer KCl-Lösung angelegt wurden.

A Messungen in Ringer-Lösung: Die spannungsabhängige Aktivierung erzeugte einen Auswärtsstrom, der durch die überlagerte Inaktivierung reduziert wurde. Unterschiede im Zeitverlauf traten durch die Koexpression mit den KCNE β -Untereinheiten nicht auf.

B Messungen in isotonischer KCl-Lösung: Das positivere Umkehrpotential führte zu einer Änderung der Richtung des Stroms bei Depolarisation. Außerdem verlangsamte sich die Deaktivierung im Nachpuls auf -100 mV deutlich. Wiederum traten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf.

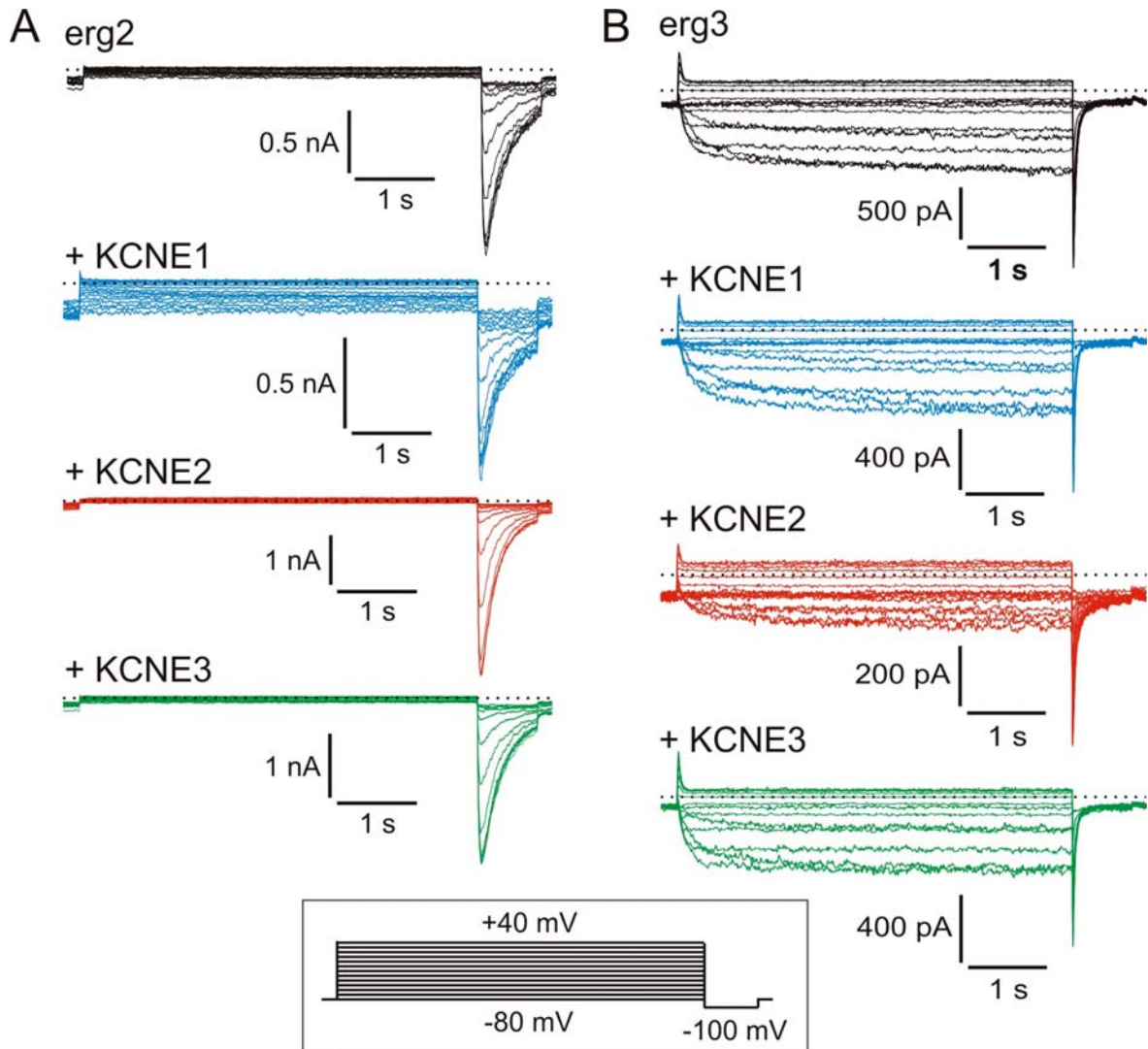


Abb. 17:

Die spannungsabhängige Aktivierung von erg2 und erg3 wurde in isotonischer KCl-Lösung bestimmt, um auch bei Koinjektion von großen Mengen KCNE-cDNA konstant ausreichend hohe Amplituden zu erreichen. Das Pulsprotokoll ist im Inset gezeigt, das Haltepotential lag wie bei erg1 bei $E = -80$ mV.

A Messungen von erg2: Die Amplituden waren etwas kleiner als bei erg1, die Inaktivierung von erg2 war sehr schnell, so dass bei Depolarisation nur geringe Ströme flossen. Dagegen verläuft die Deaktivierung im Nachpuls langsam. Aufgrund des sehr negativen Haltepotentials entstanden häufig Leckströme, wie vor allem in der Stromfamilie erg2 + KCNE1 zu sehen. Einflüsse der KCNE β -Untereinheiten waren nicht zu beobachten.

B Messungen von erg3: Die Amplituden waren auch hier klein, die Inaktivierung von erg3 aber ist langsamer als die von erg2, so dass bei Potentialen zwischen -20 mV und -80 mV große Einwärtsströme zu beobachten waren. Die KCNE β -Untereinheiten schienen keine wesentlichen Einflüsse auszuüben.

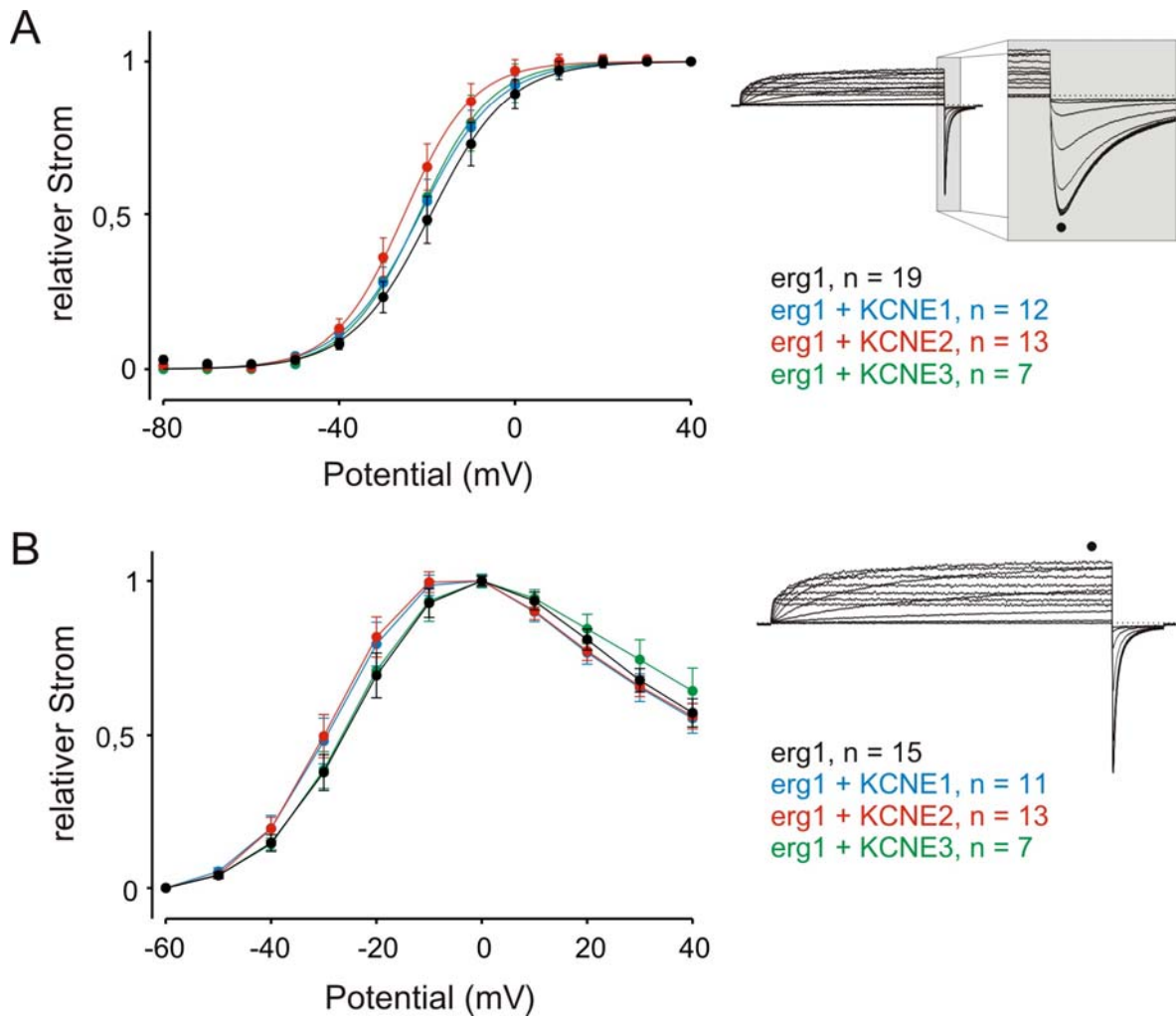


Abb. 18:

Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von erg1, gemessen in Ringer-Lösung. In den Insets auf der rechten Seite ist gezeigt, an jeweils welcher Stelle die Amplitude gemessen wurde. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

A Dargestellt sind die normierten Werte der maximalen Einwärtsströme (Tailstrom bei -100 mV) aus dem Aktivierungsprotokoll. Die Halbmaximalen (\pm SEM) lagen bei folgenden Werten: $E_{0,5}$ (erg1) = $-17,5 \pm 2,4$ mV; $E_{0,5}$ (erg1 + KCNE1) = $-21,0 \pm 2,4$ mV; $E_{0,5}$ (erg1 + KCNE2) = $-24,2 \pm 2,5$ mV; $E_{0,5}$ (erg1 + KCNE3) = $-20,4 \pm 3,4$ mV. Bemerkenswert ist die Linksverschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von erg1 bei der Koexpression mit KCNE2 ($p = 0,066$).

B Dargestellt sind die normierten Werte der maximalen Auswärtsströme bei Messung der Aktivierung. Dies beschreibt eine scheinbare Aktivierung, die durch die Überlagerung durch die bei hohen Potentialen zunehmende Inaktivierung und somit reduzierte Amplitude zustande kommt. Der Befund aus 18A ließ sich anhand dieses Parameters nicht nachvollziehen.

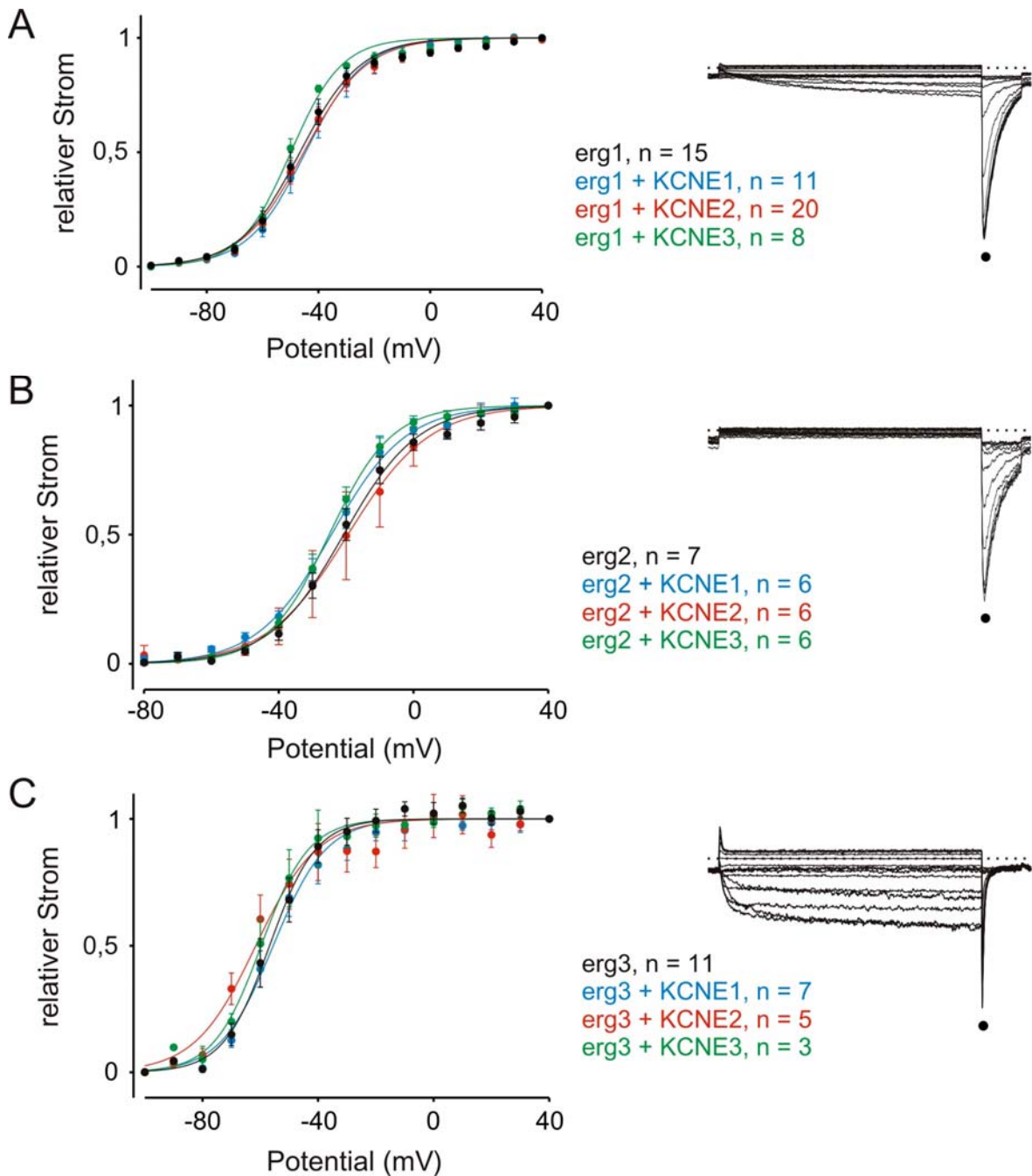


Abb. 19:

Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von erg1-3 in isotonischer KCl-Lösung.
 Die gezeigten Stromspuren geben den Punkt der Messung der maximalen Amplitude an.

A Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von erg1 ergab folgende halbmaximale Potentiale (\pm SEM): $E_{0,5}$ (erg1) = $-47,5 \pm 2,3$ mV; $E_{0,5}$ (erg1 + KCNE1) = $-43,8 \pm 3,0$ mV; $E_{0,5}$ (erg1 + KCNE2) = $-45,0 \pm 2,2$ mV; $E_{0,5}$ (erg1 + KCNE3) = $-51,1 \pm 1,5$ mV.

B Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von erg2 ergab: $E_{0,5}$ (erg2) = $-22,0 \pm 2,3$ mV; $E_{0,5}$ (erg2 + KCNE1) = $-23,7 \pm 1,9$ mV; $E_{0,5}$ (erg2 + KCNE2) = $-20,2 \pm 4,9$ mV; $E_{0,5}$ (erg2 + KCNE3) = $-25,2 \pm 1,9$ mV.

C Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von erg3 ergab: $E_{0,5}$ (erg3) = $-54,7 \pm 2,9$ mV; $E_{0,5}$ (erg3 + KCNE1) = $-54,1 \pm 3,1$ mV; $E_{0,5}$ (erg3 + KCNE2) = $-60,2 \pm 4,9$ mV; $E_{0,5}$ (erg3 + KCNE3) = $-57,9 \pm 3,9$ mV.

Um den Effekt, den KCNE2 auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von *erg1* in Ringer-Lösung hatte und der sich in isotonischer KCl-Lösung nicht reproduzieren ließ, näher zu untersuchen, wurden weitere Experimente zur Aktivierung durchgeführt. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden bisher benutzten Messlösungen war neben der Kalium- die Calciumkonzentration gewesen (75 nM Ca^{2+} in der isotonischen KCl-Lösung; 2 mM Ca^{2+} in der Ringer-Lösung).

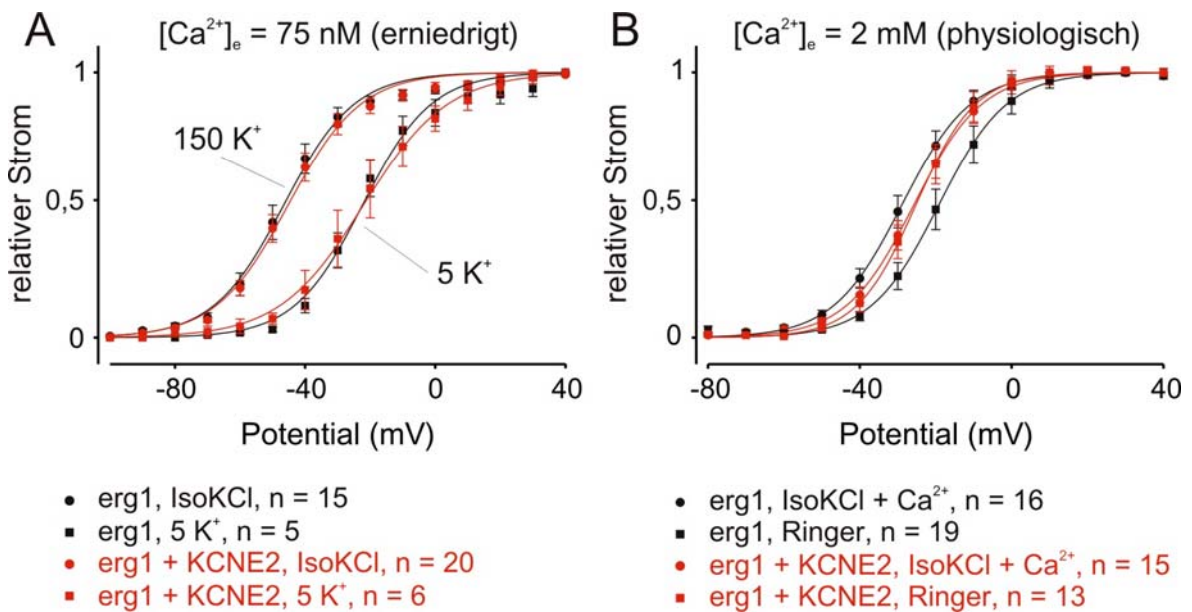


Abb. 20:

Die spannungsabhängige Aktivierung von *erg1* in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium- und Calciumkonzentration. Nur bei physiologischer extrazellulärer Calciumkonzentration zeigte sich ein Einfluss der koexprimierten KCNE2 β -Untereinheit.

A Eine Änderung der extrazellulären Kaliumkonzentration unter Calcium-armen Bedingungen führt zu einer starken Linksverschiebung der Aktivierungskurve von *erg1*. Die Koexpression von KCNE2 änderte an diesem Verhalten nichts (Mittelwerte \pm SEM): $E_{0,5}$ (*erg1* in 5 K^+) = $-23,5 \pm 2,8 \text{ mV}$; $E_{0,5}$ (*erg1* in IsoKCl) = $-47,5 \pm 2,3 \text{ mV}$; $E_{0,5}$ (*erg1* + KCNE2 in 5 K^+) = $-22,8 \pm 5,3 \text{ mV}$; $E_{0,5}$ (*erg1* + KCNE2 in IsoKCl) = $-45,0 \pm 2,2 \text{ mV}$.

B Eine Änderung der extrazellulären Kaliumkonzentration bei physiologischer Calciumkonzentration ergibt nur bei Nichtanwesenheit von KCNE2 eine Linksverschiebung (Mittelwerte \pm SEM): $E_{0,5}$ (*erg1* in Ringer) = $-17,6 \pm 2,4 \text{ mV}$; $E_{0,5}$ (*erg1* in IsoKCl + Ca^{2+}) = $-28,0 \pm 2,4 \text{ mV}$; $E_{0,5}$ (*erg1* + KCNE2 in Ringer) = $-24,2 \pm 2,5 \text{ mV}$; $E_{0,5}$ (*erg1* + KCNE2 in IsoKCl + Ca^{2+}) = $-24,7 \pm 2,2 \text{ mV}$.

Es wurden nun also Messungen in niedriger Calciumkonzentration und hoher Calciumkonzentration mit jeweils variierenden Kaliumkonzentrationen durchgeführt (s. Abb. 20), wobei immer Messreihen in gleichbleibenden Lösungen erstellt wurden. Messungen mit Lösungswechsel fanden nicht statt. Zusammen mit den vorherigen Experimenten zeigte sich, dass unter niedriger extrazellulärer Calciumkonzentration die Kaliumabhängigkeit der spannungsabhängigen Aktivierung sehr deutlich ausgeprägt war (s. Abb. 20A). Dieser Effekt ist bereits von Wimmers *et. al.* (2002) beschrieben worden. Die Koexpression von KCNE2 hatte auch in der Calcium-armen Lösung mit physiologischer Kaliumkonzentration ($5K^+$) keinen Einfluss auf die Aktivierung von *erg1*. Die Experimente in physiologischer extrazellulärer Calciumkonzentration dagegen zeigten folgende Tendenzen: Die Linksverschiebung der *erg1*-Aktivierungskurve bei Anhebung der extrazellulären Kaliumkonzentration war bereits ohne Koexpression mit KCNE2 deutlich geringer als in der Calciumreduzierten Lösung, mit Koexpression von KCNE2 entfiel dieser Effekt gänzlich. Möglicherweise führt die Koexpression von *erg1* mit KCNE2 dazu, dass die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des *erg1*-Kanals weniger empfindlich auf die extrazelluläre Kaliumkonzentration reagiert. Die Ergebnisse zu dem KCNE2-Effekt sind jedoch nicht signifikant.

4.3.2 Deaktivierung

Die Deaktivierung der *erg*-Kanäle wurde mit dem bereits in Abschnitt 3.1 beschriebenen Pulsprotokoll gemessen. Wiederum wurden alle drei *erg*-Kanal-Ströme in isotonischer KCl-Lösung gemessen. Mit *erg1* wurde eine zusätzliche Messreihe in Ringer-Lösung durchgeführt. Während die variablen Pulse zur Schonung der Zellen in der isotonischen KCl-Lösung mit 1,5 s sehr kurz gehalten wurden – gerade lange genug, um bei Potentialen negativer als -80 mV möglichst vollständige Deaktivierung zu erreichen –, so konnten in der physiologischen Ringer-Lösung längere (5 s dauernde) variable Pulse verwendet werden. Dies erlaubte einerseits eine genauere Beschreibung vor allem der langsam deaktivierenden Stromkomponente, andererseits konnte die funktionelle Einwärtsrektifizierung gut dargestellt werden (s. Abb. 23).

Die Daten aus den Verfügbarkeitskurven von *erg1* (s. Abb. 21A) zeigten die charakteristische funktionelle Einwärtsrektifizierung in Ringer-Lösung: Bei zunehmend positivem Potential resultiert ein kleiner Auswärtsstrom, dem ein großer Einwärtsstrom bei negativem Potential gegenübersteht (s. Abb. 23B). Unterschiede in der Deaktivierungskinetik von

erg1 sowie im Verhältnis der schnell deaktivierenden zur langsam deaktivierenden Stromkomponente ließen sich bei vorliegender Koexpression mit den KCNE β -Untereinheiten nicht feststellen. Der Anteil der langsam deaktivierenden Komponente lag bei $E = -120$ mV bei etwa 10 %. Die weiteren Daten hierzu sind in Tabelle 7 gezeigt. Auch die Zeitkonstanten der Erholung aus der Inaktivierung und der Deaktivierung wurden nicht signifikant verändert. Die Messungen in isotonischer KCl-Lösung (s. Abb. 21B) ergaben keine Unterschiede in der Wirkung der KCNE β -Untereinheiten in Zusammenhang mit dem extrazellulären Milieu. Die Unterschiede, die sich aufgrund der veränderten Ionenkonzentrationen einstellten, waren unabhängig von der jeweiligen Koexpression. In isotonischer KCl-Lösung kam es gegenüber der Ringer-Lösung zu einer Verlangsamung des Zeitverlaufs der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung. Der Anteil der langsam deaktivierenden Stromkomponente von erg1 bei $E = -120$ mV stieg auf 15-20 %. Die Daten hierzu zeigt ebenfalls Tabelle 7. Da die Annäherung der Kinetik durch die Summe aus drei Exponentialfunktionen bei der langsamen Deaktivierung schnell ungenau wurde, sind die in Tabelle 7 auffallenden geringen Unterschiede bei Koexpression (beispielsweise von erg1 mit KCNE3 in isotonischer KCl-Lösung) nicht deutlich genug, um signifikant zu sein.

Die Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit von erg1 wurde durch den kurzen Puls auf -100 mV bestimmt, der auf die variablen Pulse folgte (s. Abb. 23A). Das Potential der halbmaximalen Verfügbarkeit (\pm SEM) in Ringer-Lösung lag bei $E_{0,5}$ (erg1, $n = 9$) = $-46,4 \pm 1,7$ mV, $E_{0,5}$ (erg1 + KCNE1, $n = 11$) = $-51,8 \pm 1,8$ mV, $E_{0,5}$ (erg1 + KCNE2, $n = 9$) = $-49,3 \pm 1,5$ mV und $E_{0,5}$ (erg1 + KCNE3, $n = 8$) = $-50,0 \pm 1,8$ mV. Die Unterschiede in isotonischer KCl-Lösung (s. Abb. 24) waren ebenso minimal: $E_{0,5}$ (erg1, $n = 8$) = $-80,7 \pm 1,4$ mV; $E_{0,5}$ (erg1 + KCNE1, $n = 9$) = $-79,5 \pm 1,6$ mV; $E_{0,5}$ (erg1 + KCNE2, $n = 12$) = $-84,4 \pm 1,4$ mV; $E_{0,5}$ (erg1 + KCNE3, $n = 8$) = $-83,6 \pm 1,5$ mV. Hieran zeigt sich wiederum die starke $[K^+]_e$ - und $[Ca^{2+}]_e$ -Abhängigkeit der Verschiebung der Potentiale der halbmaximalen Verfügbarkeit nach links.

In Abbildung 23B sind die relativen Verhältnisse der mittleren maximalen erg1-Einwärtsströme zu den entsprechenden Auswärtsströmen in Ringer-Lösung dargestellt. Hier zeigt sich die bereits erwähnte Einwärtsrektifizierung, die sich in den Experimenten mit Koexpression der KCNE β -Untereinheiten unverändert darstellte.

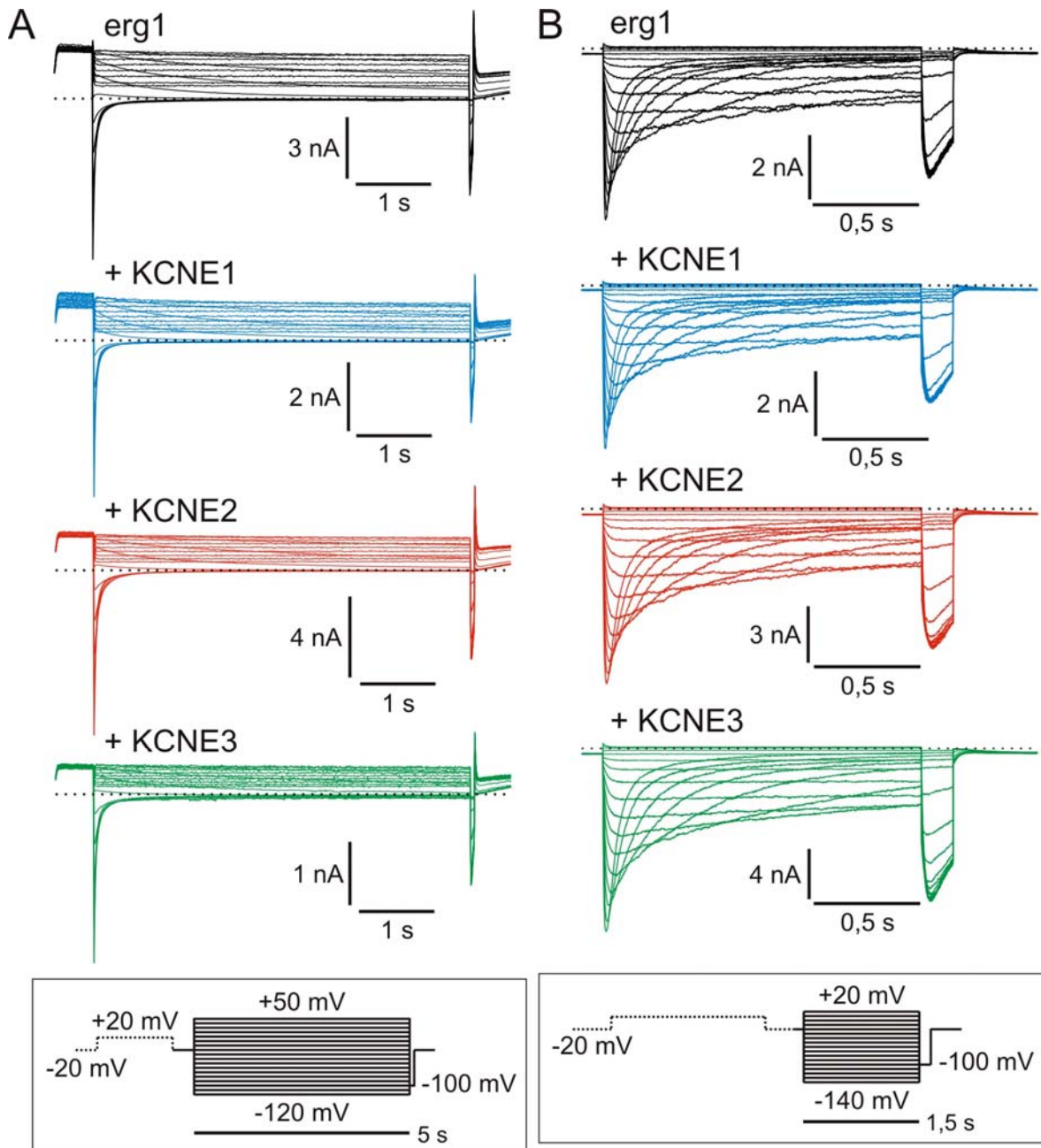


Abb. 21:

Die Deaktivierung von *erg1* wurde in Ringer- und in isotonischer KCl-Lösung gemessen. Die entsprechenden Pulsprotokolle sind in den Insets gezeigt. Das Haltepotential lag immer bei $E = -20$ mV.

A Messungen in Ringer-Lösung: Nach einem 2 s andauernden Vorpuls auf 20 mV, der alle Kanäle aktivieren sollte, wurden 5 s lange variable Potentiale angelegt, die ab etwa -60 mV zu spannungsabhängiger Deaktivierung führten. Die Einwärtsströme im Bereich ab -80 mV sind im Vergleich zu den Auswärtsströmen deutlich größer, hieran zeigt sich die funktionelle Einwärtsgleichrichtung des *erg1*-Kanals. Sichtbare Einflüsse der KCNE β -Untereinheiten ergaben sich nicht.

B Messungen in isotonischer KCl-Lösung: Die Einwärtsströme dominieren, die Deaktivierung verläuft im Vergleich mit **A** langsamer. Die Koexpression der KCNE β -Untereinheiten zeigte keinen sichtbaren Effekt auf den Verlauf der Deaktivierung.

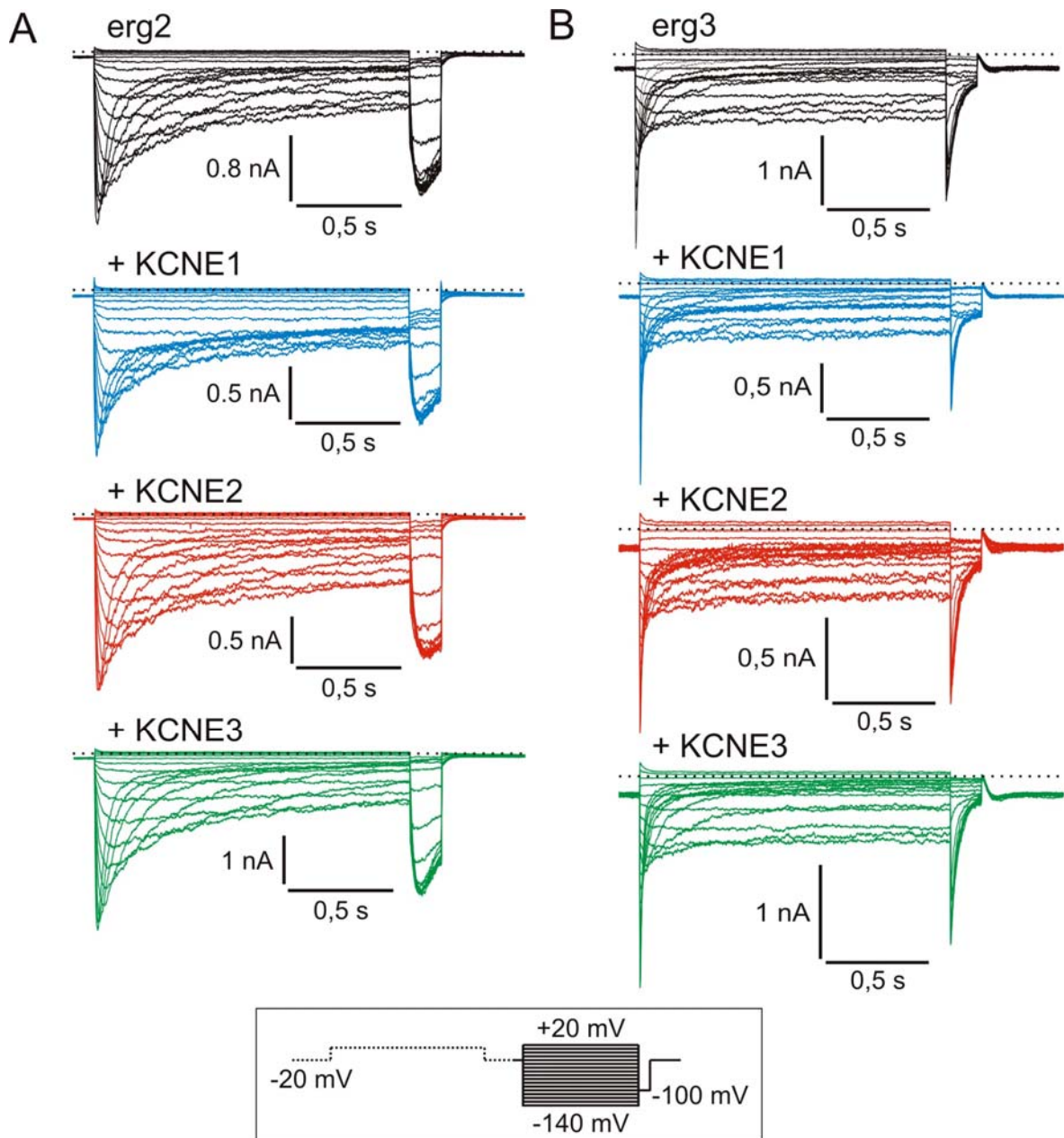


Abb. 22:

Die Deaktivierung von *erg2* und *erg3* wurde mit dem im Inset gezeigten Pulsprotokoll in isotonischer KCl-Lösung gemessen. Das Haltepotential lag bei $E = -20$ mV.

A Messungen von *erg2*-Strömen: Es zeigten sich langsam deaktivierende Ströme mit etwas kleineren Amplituden als bei *erg1*. Der Anteil der langsam deaktivierenden Stromkomponente war bei Koexpression mit KCNE1 tatsächlich etwas größer, wie die gezeigten Ströme bereits vermuten lassen (s. auch Tab. 8). Bei Koexpression von KCNE2 und KCNE3 war kein Effekt erkennbar.

B Messungen von *erg3*-Strömen: Es ergaben sich sehr schnell deaktivierende Ströme, die in jeder Kombination eine breite Palette an Variationen der Spannungsabhängigkeit der deaktivierenden Stromkomponenten zeigten. Die Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit war nicht nur schwer bestimmbar, sondern auch oftmals zweiphasisch (s. Abb. 24), also nur mit der Summe aus zwei Boltzmannfunktionen zu beschreiben. Deutliche Effekte der KCNE β -Untereinheiten ließen sich anhand der Deaktivierung nicht ausmachen.

Die Experimente zur Deaktivierung von *erg2* und *erg3* wurden in isotonischer KCl-Lösung durchgeführt (s. Abb. 22).

Der *erg2*-Kanal erzeugte mit dem typischen Pulsprotokoll Ströme, die eine dem *erg1*-Strom sehr ähnliche langsame Deaktivierungskinetik aufwiesen. Der mittlere Anteil der langsam deaktivierenden Stromkomponente war mit 20 % bei $E = -140$ mV (s. Tab. 8) relativ stabil. Die Koexpression mit KCNE1 führte zu einer nicht signifikanten Vergrößerung dieses Anteils auf 35 %. Bei Koexpression mit KCNE2 oder KCNE3 zeigte sich kein vergleichbarer Effekt (s. Tab. 8). Bezüglich der Zeitkonstanten der Erholung aus der Inaktivierung und der Deaktivierung ergaben sich ebenfalls keine wesentlichen Veränderungen. Die Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit des *erg2*-Kanals stellte sich bei Koexpression mit KCNE2 und KCNE3 nur gering unterschiedlich dar (s. Abb. 24). Einzig bei Koexpression mit KCNE1 ergab sich ein knapp signifikanter Unterschied ($p = 0,0467$). Die halbmaximalen Potentiale (\pm SEM) lagen bei: $E_{0,5}$ (*erg2*, $n = 19$) = $-82,6 \pm 1,3$ mV; $E_{0,5}$ (*erg2* + KCNE1, $n = 13$) = $-90,0 \pm 3,1$ mV; $E_{0,5}$ (*erg2* + KCNE2, $n = 10$) = $-87,5 \pm 2,1$ mV; $E_{0,5}$ (*erg2* + KCNE3, $n = 20$) = $-81,3 \pm 1,1$ mV. Somit wäre die KCNE1-Untereinheit am ehesten ein Kandidat für eine Interaktion mit dem *erg2*-Kanal.

Die Deaktivierungskinetik des *erg3*-Kanals weist im Gegensatz zu der von *erg1* und *erg2* einige Besonderheiten auf: Der Zeitverlauf der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung war in der isotonischen KCl-Lösung sehr schnell, was die Auswertung der maximalen Amplituden der Nachpulse und der Zeitkonstanten insofern erschwerte, als dass die einzelnen Stadien sich deutlich überlagerten (s. Abb. 22). Die Zeitkonstanten wurden dennoch bestimmt, sie sind in Tabelle 9 gezeigt. Der Anteil der langsam deaktivierenden Stromkomponente war durchweg bemerkenswert hoch: 19-26 % bei $E = -140$ mV und 28-38 % bei $E = -120$ mV. Die Experimente mit Koexpression der KCNE β -Untereinheiten zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zeitverläufe der Erholung aus der Inaktivierung und der Deaktivierung von *erg3*.

Tabelle 7: Zeitkonstanten der Erholung aus der Inaktivierung und der Deaktivierung sowie der Anteil der schnell deaktivierenden Stromkomponente von **erg1** bei Expression mit und ohne KCNE β -Untereinheiten. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

	Potential (mV)	erg1 n = 11	erg1 + KCNE1 n = 11	erg1 + KCNE2 n = 9	erg1 + KCNE3 n = 8
Ringer-Lösung					
τ_{recoV} (ms)	-90	5,11 \pm 0,52	6,17 \pm 0,31	5,39 \pm 0,62	4,27 \pm 0,54
	-100	4,02 \pm 0,28	5,04 \pm 0,30	4,00 \pm 0,39	3,78 \pm 0,40
	-110	3,03 \pm 0,16	3,79 \pm 0,24	3,39 \pm 0,31	3,03 \pm 0,32
	-120	2,46 \pm 0,15	3,02 \pm 0,17	2,64 \pm 0,24	2,50 \pm 0,21
τ_{fast} (ms)	-90	59,65 \pm 5,24	83,84 \pm 7,63	69,85 \pm 6,13	85,96 \pm 10,08
	-100	41,22 \pm 2,86	54,13 \pm 4,33	46,00 \pm 2,93	52,14 \pm 6,07
	-110	29,20 \pm 2,02	37,02 \pm 2,22	28,08 \pm 2,20	37,45 \pm 4,75
	-120	20,76 \pm 1,18	25,28 \pm 1,83	20,06 \pm 1,42	26,21 \pm 3,00
τ_{slow} (s)	-90	0,33 \pm 0,02	0,48 \pm 0,05	0,40 \pm 0,04	0,64 \pm 0,17
	-100	0,28 \pm 0,02	0,38 \pm 0,04	0,46 \pm 0,13	0,35 \pm 0,08
	-110	0,25 \pm 0,02	0,27 \pm 0,01	0,22 \pm 0,03	0,28 \pm 0,06
	-120	0,22 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01	0,19 \pm 0,03	0,19 \pm 0,03
$I_{\text{slow}} / (I_{\text{fast}} + I_{\text{slow}})$	-90	0,24 \pm 0,02	0,31 \pm 0,02	0,26 \pm 0,02	0,29 \pm 0,03
	-100	0,16 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01	0,25 \pm 0,02
	-110	0,11 \pm 0,01	0,17 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02	0,19 \pm 0,02
	-120	0,09 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02	0,11 \pm 0,01	0,17 \pm 0,02
isotonische KCl-Lösung					
τ_{recoV} (ms)	-100	13,13 \pm 0,54	12,73 \pm 1,29	14,71 \pm 0,57	16,55 \pm 1,84
	-110	10,55 \pm 0,56	10,98 \pm 1,61	13,22 \pm 0,86	13,30 \pm 0,41
	-120	8,66 \pm 0,42	8,72 \pm 1,08	9,49 \pm 0,40	10,90 \pm 0,33
	-130	6,75 \pm 0,52	6,64 \pm 1,09	7,40 \pm 0,53	8,11 \pm 0,36
	-140	4,88 \pm 0,35	4,98 \pm 0,62	5,37 \pm 0,44	6,34 \pm 0,08
τ_{fast} (ms)	-100	291,64 \pm 37,32	209,42 \pm 26,63	292,29 \pm 62,33	-
	-110	170,80 \pm 13,44	153,77 \pm 26,72	181,24 \pm 34,88	222,00 \pm 11,43
	-120	103,12 \pm 10,28	86,84 \pm 13,5	115,87 \pm 15,39	145,04 \pm 18,21
	-130	65,45 \pm 5,91	65,19 \pm 10,04	73,62 \pm 7,29	76,00 \pm 1,88
	-140	38,11 \pm 1,41	40,63 \pm 5,29	50,49 \pm 5,18	64,38 \pm 11,31
τ_{slow} (s)	-100	1,09 \pm 0,20	0,82 \pm 0,19	1,04 \pm 0,11	-
	-110	1,12 \pm 0,31	0,77 \pm 0,12	0,94 \pm 0,18	-
	-120	0,64 \pm 0,11	0,55 \pm 0,1	0,94 \pm 0,18	0,90 \pm 0,14
	-130	0,45 \pm 0,03	0,48 \pm 0,06	0,72 \pm 0,08	0,49 \pm 0,04
	-140	0,31 \pm 0,02	0,38 \pm 0,04	0,48 \pm 0,08	0,59 \pm 0,20
$I_{\text{slow}} / (I_{\text{fast}} + I_{\text{slow}})$	-100	0,34 \pm 0,06	0,34 \pm 0,08	0,31 \pm 0,09	-
	-110	0,24 \pm 0,03	0,19 \pm 0,04	0,25 \pm 0,07	0,14 \pm 0,01
	-120	0,22 \pm 0,02	0,20 \pm 0,03	0,20 \pm 0,04	0,14 \pm 0,01
	-130	0,21 \pm 0,02	0,14 \pm 0,02	0,18 \pm 0,03	0,15 \pm 0,004
	-140	0,19 \pm 0,04	0,14 \pm 0,02	0,18 \pm 0,04	0,10 \pm 0,02

Tabelle 8: Zeitkonstanten der Erholung aus der Inaktivierung und der Deaktivierung sowie der Anteil der schnell deaktivierenden Stromkomponente von **erg2** bei Expression mit und ohne KCNE β -Untereinheiten. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

	Potential (mV)	erg2 n = 17	erg2 + KCNE1 n = 9	erg2 + KCNE2 n = 6	erg2 + KCNE3 n = 17
isotonische KCl-Lösung					
τ_{recov} (ms)	-90	26,78 \pm 1,75	27,88 \pm 0,90	36,65 \pm 6,52	26,64 \pm 1,81
	-100	26,68 \pm 1,90	24,02 \pm 3,01	31,30 \pm 4,14	21,40 \pm 1,20
	-110	18,16 \pm 1,12	19,44 \pm 1,27	25,63 \pm 1,84	15,96 \pm 0,70
	-120	14,22 \pm 0,98	13,80 \pm 1,01	18,10 \pm 0,89	12,28 \pm 0,44
	-130	9,28 \pm 0,78	9,01 \pm 1,36	11,44 \pm 1,12	9,18 \pm 0,47
	-140	6,46 \pm 0,60	6,43 \pm 1,25	9,95 \pm 2,18	6,33 \pm 0,32
τ_{fast} (ms)	-90	190,43 \pm 27,75	311,98 \pm 108,40	207,46 \pm 67,96	197,86 \pm 26,00
	-100	155,04 \pm 19,69	206,71 \pm 36,74	179,7 \pm 48,52	175,79 \pm 25,07
	-110	135,56 \pm 16,08	200 \pm 47,62	123,83 \pm 28,28	134,74 \pm 12,09
	-120	92,54 \pm 11,81	129,53 \pm 21,55	93,45 \pm 17,60	81,73 \pm 6,52
	-130	48,34 \pm 3,66	120,74 \pm 34,04	66,13 \pm 3,78	54,52 \pm 3,37
	-140	37,43 \pm 1,36	76,64 \pm 21,63	39,05 \pm 7,74	38,58 \pm 1,56
τ_{slow} (s)	-90	1,11 \pm 0,11	1,08 \pm 0,09	1,54 \pm 0,20	1,15 \pm 0,12
	-100	0,91 \pm 0,13	1,23 \pm 0,19	1,14 \pm 0,20	0,76 \pm 0,08
	-110	0,75 \pm 0,11	1,03 \pm 0,16	0,83 \pm 0,20	0,63 \pm 0,08
	-120	0,76 \pm 0,22	0,84 \pm 0,13	0,45 \pm 0,10	0,63 \pm 0,10
	-130	0,33 \pm 0,03	0,73 \pm 0,15	0,50 \pm 0,03	0,42 \pm 0,07
	-140	0,35 \pm 0,03	0,60 \pm 0,14	0,30 \pm 0,05	0,4 \pm 0,03
$I_{\text{slow}} / (I_{\text{fast}} + I_{\text{slow}})$	-90	0,77 \pm 0,03	0,83 \pm 0,03	0,83 \pm 0,02	0,70 \pm 0,04
	-100	0,56 \pm 0,04	0,63 \pm 0,07	0,68 \pm 0,03	0,54 \pm 0,05
	-110	0,43 \pm 0,04	0,50 \pm 0,09	0,56 \pm 0,06	0,36 \pm 0,03
	-120	0,37 \pm 0,03	0,46 \pm 0,07	0,40 \pm 0,02	0,27 \pm 0,02
	-130	0,23 \pm 0,02	0,37 \pm 0,06	0,29 \pm 0,03	0,22 \pm 0,02
	-140	0,20 \pm 0,02	0,35 \pm 0,04	0,18 \pm 0,05	0,18 \pm 0,01

Tabelle 9: Zeitkonstanten der Erholung aus der Inaktivierung und der Deaktivierung sowie der Anteil der schnell deaktivierenden Stromkomponente von **erg3** bei Expression mit und ohne KCNE β -Untereinheiten. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

	Potential (mV)	erg3 n = 9	erg3 + KCNE1 n = 7	erg3 + KCNE2 n = 6	erg3 + KCNE3 n = 6
isotonische KCl-Lösung					
τ_{recoV} (ms)	-90	11,59 \pm 1,16	7,00 \pm 1,34	10,15 \pm 3,24	7,17 \pm 1,40
	-100	6,92 \pm 0,96	5,66 \pm 1,31	5,10 \pm 0,72	3,06 \pm 0,44
	-110	4,25 \pm 0,63	3,76 \pm 0,69	2,85 \pm 0,40	2,32 \pm 0,41
	-120	2,56 \pm 0,31	2,27 \pm 0,32	2,58 \pm 0,52	1,20 \pm 0,20
	-130	1,62 \pm 0,21	1,21 \pm 0,27	2,53 \pm 0,55	1,87 \pm 0,25
	-140	2,07 \pm 0,24	0,86 \pm 0,23	2,12 \pm 0,40	1,51 \pm 0,08
τ_{fast} (ms)	-90	53,58 \pm 3,41	60,38 \pm 10,04	56,38 \pm 8,06	47,05 \pm 4,70
	-100	44,18 \pm 4,31	36,20 \pm 4,95	35,14 \pm 4,93	44,17 \pm 7,83
	-110	31,06 \pm 3,27	27,87 \pm 5,52	22,59 \pm 1,42	37,84 \pm 7,49
	-120	23,32 \pm 2,01	21,49 \pm 4,50	18,66 \pm 2,89	36,25 \pm 10,28
	-130	20,22 \pm 3,48	17,47 \pm 3,04	10,04 \pm 1,02	28,34 \pm 7,26
	-140	14,55 \pm 2,34	11,64 \pm 2,21	8,22 \pm 0,86	30,66 \pm 6,20
τ_{slow} (s)	-90	0,40 \pm 0,08	0,89 \pm 0,18	1,04 \pm 0,20	0,35 \pm 0,04
	-100	0,49 \pm 0,08	0,65 \pm 0,11	0,76 \pm 0,22	0,40 \pm 0,06
	-110	0,35 \pm 0,04	0,67 \pm 0,11	0,49 \pm 0,07	0,36 \pm 0,04
	-120	0,26 \pm 0,03	0,42 \pm 0,10	0,46 \pm 0,09	0,30 \pm 0,06
	-130	0,19 \pm 0,02	0,23 \pm 0,04	0,36 \pm 0,18	0,22 \pm 0,04
	-140	0,14 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,11 \pm 0,02	0,25 \pm 0,06
$I_{\text{slow}} / (I_{\text{fast}} + I_{\text{slow}})$	-90	0,37 \pm 0,06	0,39 \pm 0,08	0,38 \pm 0,04	0,34 \pm 0,07
	-100	0,36 \pm 0,06	0,40 \pm 0,08	0,44 \pm 0,04	0,33 \pm 0,06
	-110	0,37 \pm 0,07	0,40 \pm 0,08	0,45 \pm 0,06	0,31 \pm 0,06
	-120	0,36 \pm 0,07	0,37 \pm 0,07	0,38 \pm 0,06	0,28 \pm 0,05
	-130	0,31 \pm 0,06	0,36 \pm 0,08	0,29 \pm 0,05	0,27 \pm 0,05
	-140	0,25 \pm 0,06	0,22 \pm 0,04	0,19 \pm 0,02	0,26 \pm 0,04

Tabelle 10: $E_{0,5}$ -Werte für die zweiphasische Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit des **erg3**-Stroms (doppelte Boltzmannfunktion, Mittelwerte \pm SD). Es sind nur die Zellen aufgeführt, die einen eindeutig zweiphasischen Kurvenverlauf ergaben.

	n	$E_{0,5}$ fast (mV)	$E_{0,5}$ slow (mV)
erg3	8	-59,11 \pm 8,37	-104,73 \pm 7,31
erg3 + KCNE1	5	-63,56 \pm 7,26	-104,45 \pm 5,58
erg3 + KCNE2	5	-73,75 \pm 4,98	-110,62 \pm 5,83
erg3 + KCNE3	6	-54,89 \pm 9,38	-99,87 \pm 7,32

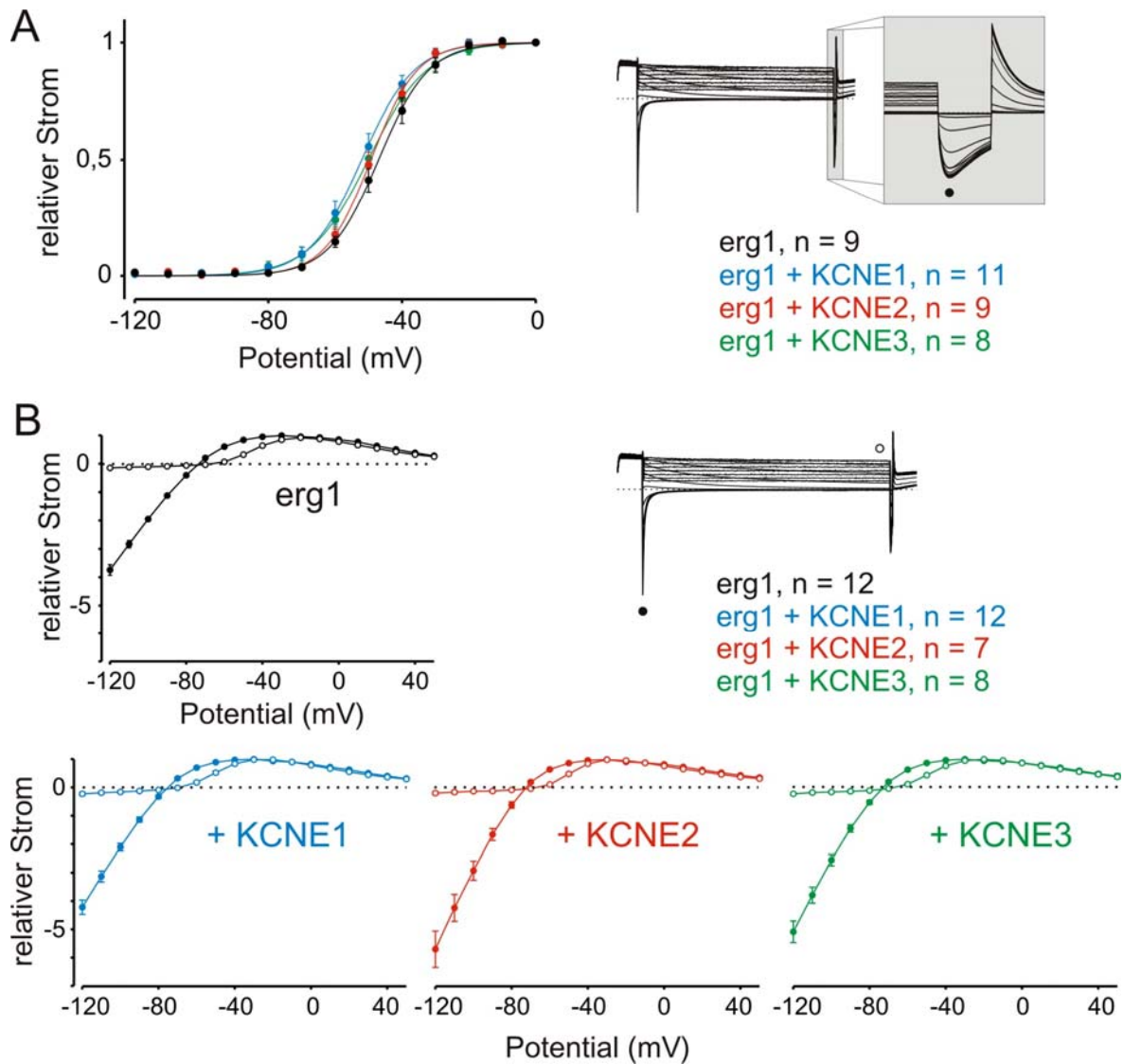


Abb. 23:

Die Auswertung der Deaktivierung von **erg1** in Ringer-Lösung ergibt die Darstellung der funktionellen Einwärtsrektifizierung sowie die Berechnung der spannungsabhängigen Verfügbarkeit nach Deaktivierung.

A Dargestellt sind die normierten Werte der maximalen Einwärtsströme aus dem Deaktivierungsprotokoll als Maß für die spannungsabhängige Verfügbarkeit des **erg1**-Kanals (s. Beispielstromspur). Die Halbmaximalen (Mittelwerte \pm SEM) lagen hier bei folgenden Werten: $E_{0,5}$ (**erg1**) = $-46,4 \pm 1,7$ mV; $E_{0,5}$ (**erg1** + **KCNE1**) = $-51,8 \pm 1,8$ mV; $E_{0,5}$ (**erg1** + **KCNE2**) = $-49,3 \pm 1,5$ mV; $E_{0,5}$ (**erg1** + **KCNE3**) = $-50,0 \pm 1,8$ mV.

B Hier ist die funktionelle Einwärtsrektifizierung von **erg1** gezeigt. Die Ströme sind als $I_{\text{früh}}$ und $I_{\text{spät}}$ bestimmt worden, wie die beispielhafte Stromspur demonstriert. Der maximale Auswärtsstrom, der immer bei $E = -40$ mV lag, wurde normiert, folglich zeigt sich der maximale Einwärtsstrom, der ab $E = -80$ mV begann, als Vielfaches von 1. Der limitierte Auswärtsstrom ist charakteristisch für die einwärtsgleichrichtende Funktion. Eine Veränderung dieser Kanaleigenschaft bei Koexpression der **KCNE** β -Untereinheiten war in keinem Fall erkennbar.

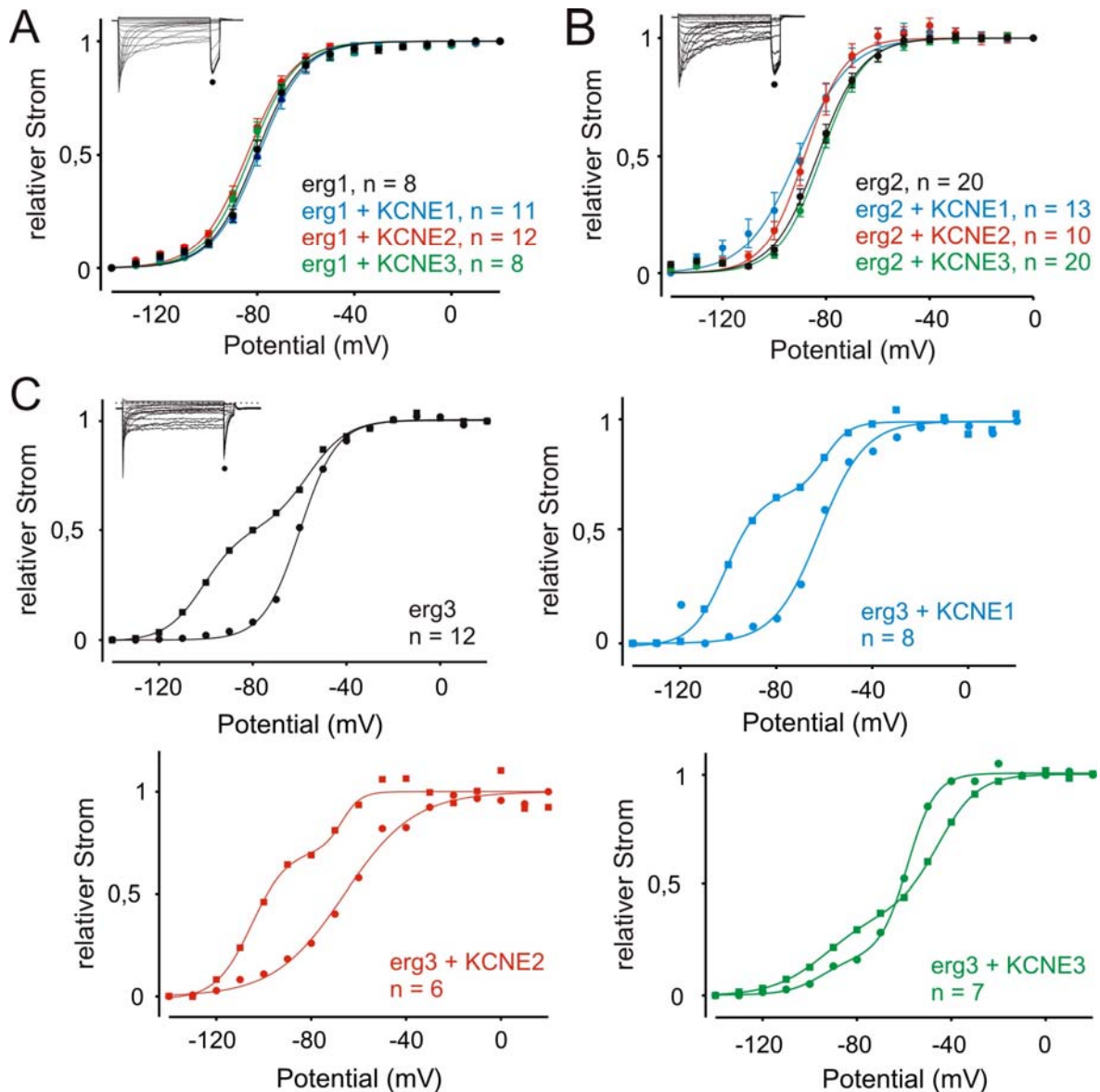


Abb. 24:

Die spannungsabhängige Verfügbarkeit von **erg1**, **erg2** und **erg3** wurde in isotoni-scher KCl-Lösung bestimmt. An den Stromspuren ist jeweils gezeigt, an welcher Stelle die maximale Amplitude bestimmt wurde; die Pulsdauer lag bei 1,5 s.

A Die Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit von **erg1** ergibt folgende Halbmaximalen (Mittelwerte \pm SEM): $E_{0,5}$ (**erg1**) = $-80,7 \pm 1,4$ mV; $E_{0,5}$ (**erg1** + **KCNE1**) = $-79,5 \pm 1,6$ mV; $E_{0,5}$ (**erg1** + **KCNE2**) = $-84,4 \pm 1,4$ mV; $E_{0,5}$ (**erg1** + **KCNE3**) = $-83,6 \pm 1,5$ mV.

B Die Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit von **erg2** ergibt folgende Halbmaximalen (Mittelwerte \pm SEM): $E_{0,5}$ (**erg2**) = $-82,7 \pm 1,3$ mV; $E_{0,5}$ (**erg2** + **KCNE1**) = $-90,0 \pm 3,1$ mV; $E_{0,5}$ (**erg2** + **KCNE2**) = $-87,5 \pm 2,1$ mV; $E_{0,5}$ (**erg2** + **KCNE3**) = $-81,3 \pm 1,1$ mV.

C Die Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit von **erg3** ist ungewöhnlich. Meist wurde die Summe aus zwei Boltzmannfunktionen für ihre Beschreibung benötigt. In der Abbildung sind jeweils die Daten zweier Zellen aus einer jeweiligen Gruppe einander gegenübergestellt. Die Anteile der einzelnen Komponenten waren unabhängig von der Koexpression, ebenso die halbmaximalen Potentiale, die zwar erheblich voneinander abwichen (s. Tab. 9, 10), dies aber bereits innerhalb jeder Gruppe (s. auch Abb. 25).

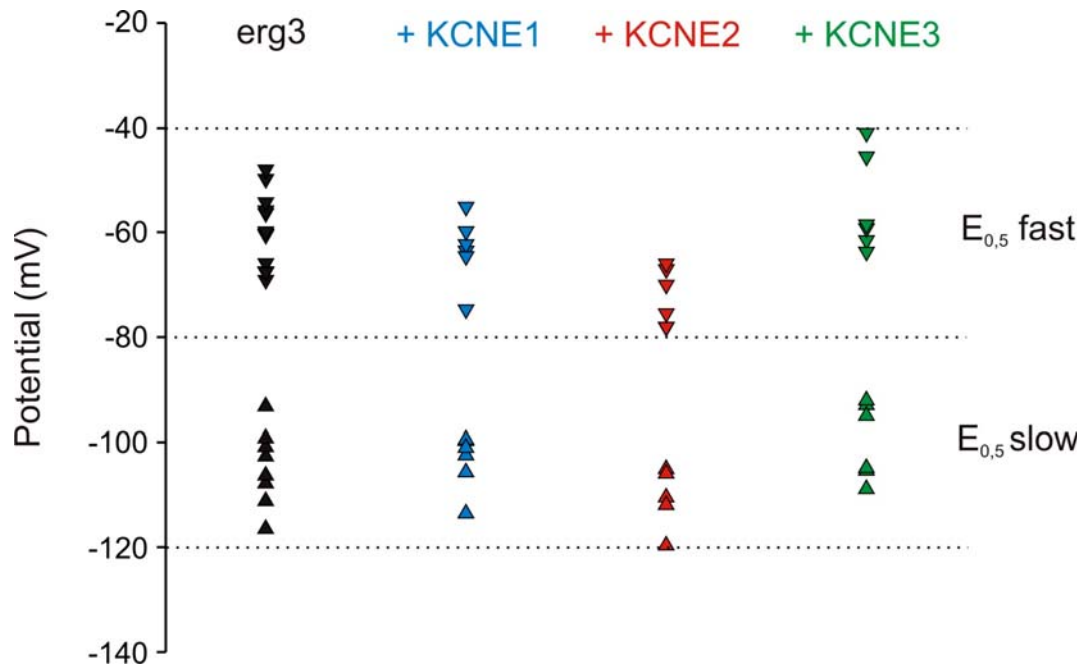


Abb. 25:

Bei *erg3* lässt sich der Abstand zwischen den einzelnen Halbmaximalen der Verfügbarkeit am besten graphisch darstellen. Jede Zelle wird durch ein Wertepaar repräsentiert. Der mittlere Abstand (\pm SD) beträgt im Einzelnen: *erg3*: $45,6 \pm 4,9$ mV, *erg3* + KCNE1: $40,88 \pm 2,6$ mV, *erg3* + KCNE2: $36,9 \pm 3,3$ mV, *erg3* + KCNE3: $45,0 \pm 5,6$ mV.

Die Darstellung der spannungsabhängigen Verfügbarkeit von *erg3* ergab jedoch einen gänzlich anderen Befund, als von *erg1* und *erg2* bisher gesehen. Der *erg3*-Kanal zeigte eine sehr große Variabilität bei der spannungsabhängigen Verfügbarkeit, die sich teilweise durch das für Fehler anfällige Bestimmen der maximalen Tailstrom-Amplituden erklärt, die andererseits aber auch eine genuine Eigenschaft des Kanals sein dürfte. Wie bereits bei dem E-4031-sensitiven Strom der MMQ-Zellen gesehen, kam es auch bei *erg3* in CHO-Zellen in etwa 90 % der Experimente zu einer biphasischen Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit mit in unterschiedlichen Anteilen an der Gesamtamplitude wiederkehrenden, etwa gleichen halbmaximalen Potentialen (s. Tab. 10). Typische Beispiele dieser Auswertung mit doppelten Boltzmannfunktionen sind für jede Gruppe in Abbildung 24C gezeigt. Eine graphische Darstellung der Daten zur Verfügbarkeit ergibt auch hier keinen signifikanten Einfluss der KCNE β -Untereinheiten. Die Tendenz zur biphasischen Verfügbarkeit bleibt bei Koexpression ebenfalls erhalten (s. Abb. 25), ebenso die große Schwankungsbreite bei relativ konstanten Abständen für die jeweils einzelne Zelle.

4.3.3 Inaktivierung

Nur für *erg1* wurde die spannungsabhängige Inaktivierung in Ringer-Lösung mit einem speziellen Pulsprotokoll bestimmt (s. Abb. 26). Die Kanäle wurden von einem Haltepotential von $E = -20$ mV ausgehend zunächst vollständig aktiviert. Die zeitgleich stattfindende Inaktivierung wurde dann durch eine kurze ($E = -100$ mV für 80 ms) Hyperpolarisierung wieder aufgehoben. Ein kleiner Anteil der Kanäle begann in diesem kurzen Zeitabschnitt bereits zu deaktivieren, dieser Teil musste bei der Bestimmung der Inaktivierung vernachlässigt werden. Durch die nun folgenden variablen Pulse wurde die einsetzende Deaktivierung – diese setzt bei negativen Potentialen ab -30 mV ein – unterbunden, und die *erg1*-Kanäle inaktivierten vor allem im positiven Potentialbereich spannungsabhängig (s. Abb. 26).

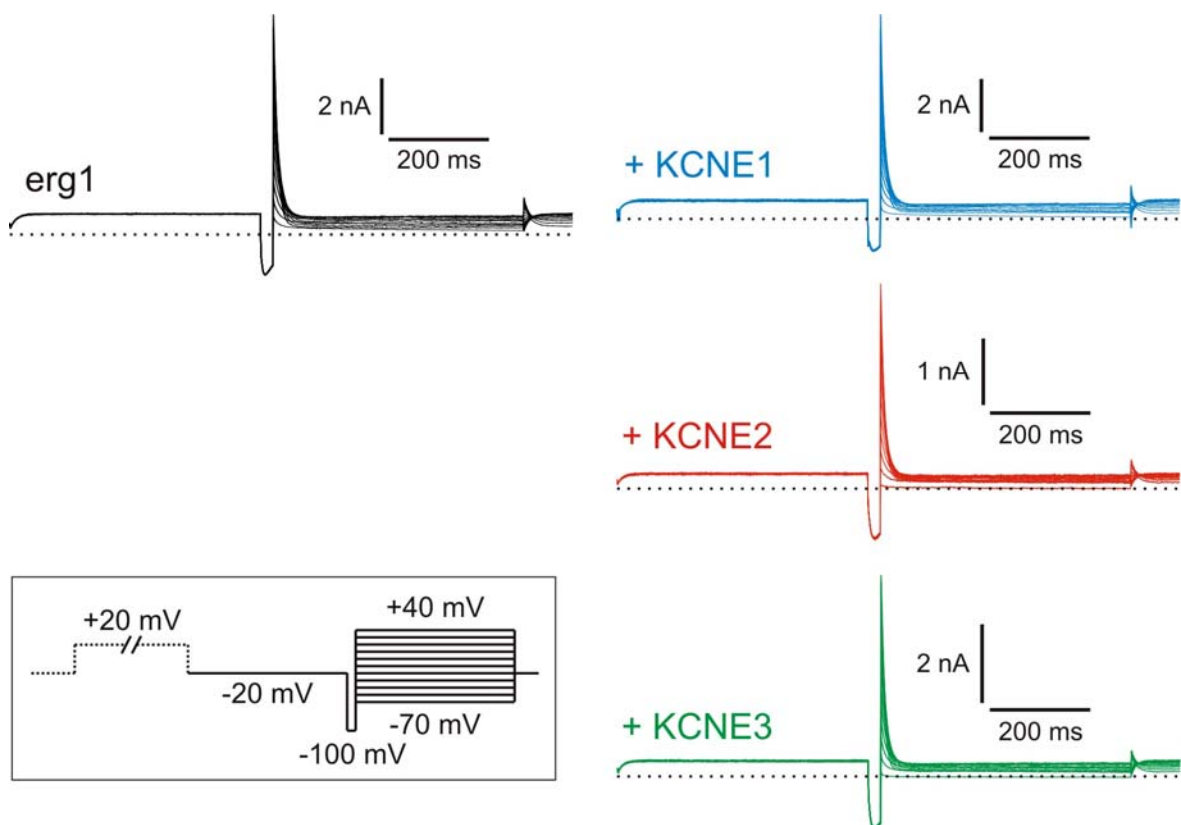


Abb. 26:

Bestimmung der spannungsabhängigen Inaktivierung von *erg1* in Ringer-Lösung. Durch den 2 s dauernden Vorpuls auf +20 mV und die kurzzeitige Hyperpolarisation auf -100 mV wurden die *erg*-Kanäle möglichst vollständig aktiviert und aus der gleichzeitigen Inaktivierung erholt. Danach wurde die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung durch variable Pulse zwischen +40 mV und -70 mV bestimmt. Das Haltepotential lag bei $E = -20$ mV.

Die Auswertung der Inaktivierung beruhte auf der Beschreibung des Zeitverlaufs durch eine Exponentialfunktion. Die Zeitkonstanten der Inaktivierung waren bei positiven Potentialen sehr schnell (s. Abb. 27) und nahmen gegen $E = -40$ mV fast linear ab. Außerdem wurde der Anteil der stationären Stromkomponente in Abhängigkeit vom angelegten Potential bestimmt. Dieser Anteil vergrößerte sich bei negativeren Potentialen. Die Koexpression der KCNE β -Untereinheiten hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Kinetik der Inaktivierung des *erg1*-Kanals in Ringer-Lösung. Die stationäre Komponente blieb ebenfalls unbeeinflusst.

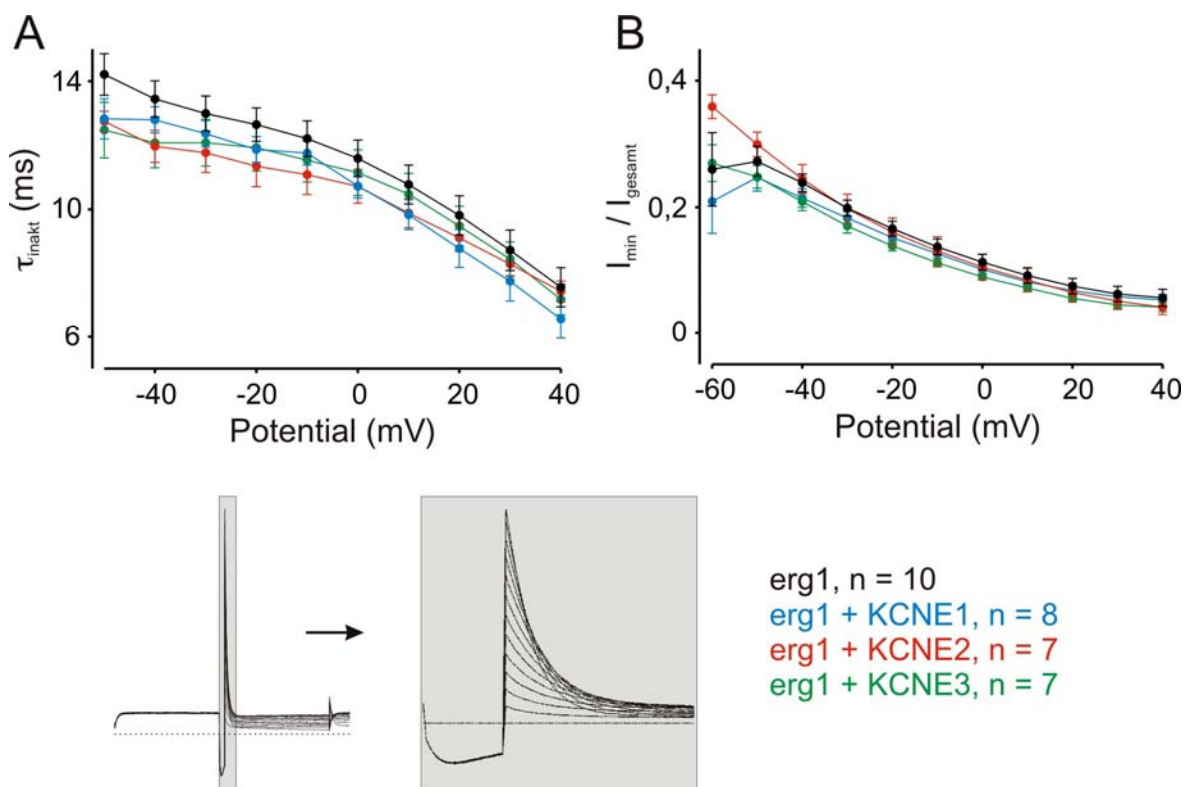


Abb. 27:

Auswertung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von *erg1* alleine, sowie bei Koexpression mit KCNE β -Untereinheiten in Ringer-Lösung. Das Inset zeigt eine Familie von Stromspuren. Der relevante Anteil ist grau hinterlegt und durch Vergrößerung hervorgehoben. Alle Daten sind Mittelwerte \pm SEM.

A Spannungsabhängigkeit des Zeitverlaufs der Inaktivierung, der mit einer Exponentialfunktion beschrieben werden konnte.

B Der Anteil der stationären Komponente der Inaktivierung an der Gesamtamplitude war abhängig vom Potential, änderte sich aber nicht signifikant bei Koexpression der KCNE β -Untereinheiten.

4.4 Einflüsse auf die Stromdichte

Die Stromdichte der *erg*-Ströme in den CHO-Zellen wurde in dieser Arbeit bisher noch nicht beschrieben, da hierzu einige zusätzliche Experimente durchgeführt worden sind. Die Berechnung der Stromdichte erfolgte durch Quotientenbildung aus dem maximalen K^+ -Einstrom, der bei einem Testpuls von 100 ms auf -100 mV bestimmt wurde, im Zähler und der kompensierten Kapazität der jeweiligen Zelle im Nenner. Die langsame Kapazität – im Gegensatz zur schnellen Pipettenkapazität – gilt als annähernd proportional zur Gesamtoberfläche der Zelle, so lässt sich die Bezeichnung Stromdichte rechtfertigen. In diesem Abschnitt der Arbeit werden außerdem Experimente dargestellt, die mit der Hyperkinetic β -Untereinheit (Chouinard *et al.*, 1995) und der D77N-KCNE1-Mutante (Takumi *et al.* 1991) durchgeführt wurden, da hier vor allem ein Einfluss auf den Einbau der *erg*-Kanäle in die Zellmembran und somit auf die Stromdichte zu erwarten war.

Die Koexpression von D77N-KCNE1 wurde in der Erwartung durchgeführt, einen weiteren Hinweis für eine mögliche Kolokalisation der *erg*-Kanäle mit den KCNE β -Untereinheiten in der Zellmembran zu erhalten. Hierzu wurde eine vollständige Versuchsreihe durchgeführt, um den zeitlichen Abstand zu den Kontrollversuchen möglichst gering (Stunden bis wenige Tage) zu halten. Das etwas andere Verhalten des KCNQ1-Stroms im Vergleich mit den vorherigen Experimenten (s. Abb. 15, 28) zeigt die Berechtigung dieser Vorgehensweise. Die Koexpression von D77N-KCNE1 mit KCNQ1 erbrachte ein Ergebnis, das mit den Daten aus der Literatur vereinbar war (s. Abb. 28): Die Stromdichte war tatsächlich verringert, wenn auch nicht nur als Folge einer Blockade des KCNQ1-Stroms, sondern vor allem als Folge einer ausgeprägten Rechtsverschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. Dies hatte zur Folge, dass nur in höchsten Potentialbereichen ab $E = 40$ mV Ströme gesehen werden konnten. Von einer Kolokalisation ist für diesen Fall definitiv auszugehen. Die Koexpression der D77N-KCNE1 β -Untereinheit mit den *erg*-Kanälen erbrachte kein eindeutiges Ergebnis (s. Tab. 12).

Die Stromdichte von *erg1*, *erg2* und *erg3*, die sich jedoch auch insgesamt als sehr variabel erwies, wurde bei den Messungen in isotonischer KCl-Lösung durch keine der KCNE β -Untereinheiten überzeugend beeinflusst. Als einzige native β -Untereinheit schien vor allem KCNE3 die Stromdichte von *erg1* in isotonischer KCl-Lösung zu verstärken ($p < 0,001$; s. Tab. 12), wobei dieser Effekt bei einigen Zellen besonders, bei anderen überhaupt nicht ausgeprägt war. Alle anderen Ergebnisse waren nicht signifikant.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei *erg1* in Ringer-Lösung (s. Tab. 13). Die KCNE β -Untereinheiten hatten keinen Effekt auf die Stromdichte. Die Hyperkinetic β -Untereinheit, die laut Literatur den *egag*-Strom deutlich vergrößerte (Wilson *et al.*, 1998), führte sogar eher zu einer Verringerung der Stromdichte von *erg1*.

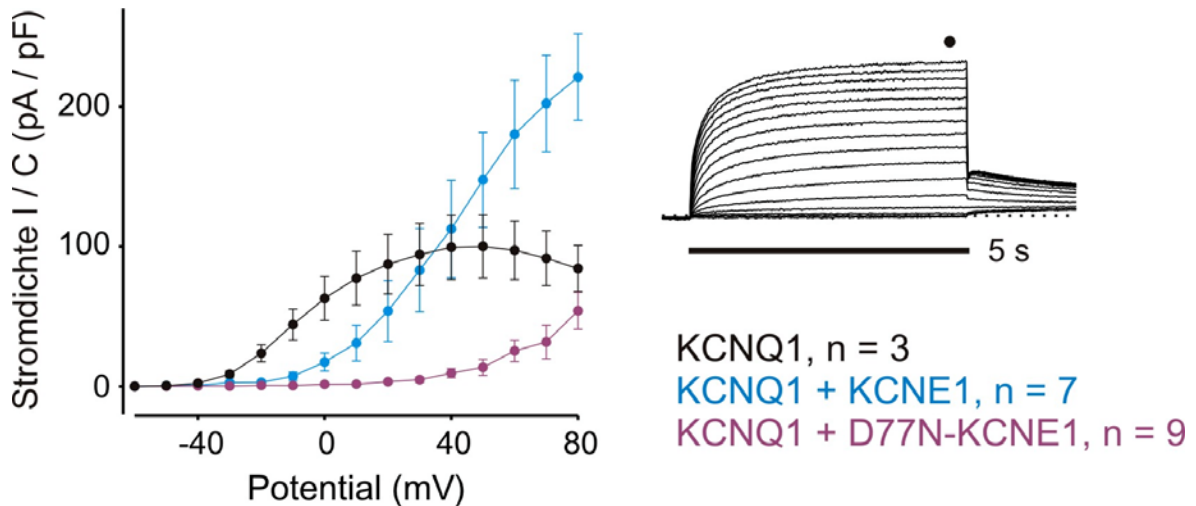


Abb. 28:

Der Einfluss von D77N-KCNE1 auf den KCNQ1-Strom wurde im Vergleich mit dem Einfluss der nativen KCNE1 β -Untereinheit besonders deutlich: Es zeigte sich eine deutliche Rechtsverschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung. Die Amplitude, dargestellt als Stromdichte (Mittelwerte \pm SEM), war im äußerst unphysiologischen Bereich von $E = 80$ mV noch sehr klein, während der KCNQ1-Strom hier seine maximale Amplitude erreichte und sogar einen Rundown zeigte (vergl. Abb. 15).

Tabelle 11: Darstellung des Zeitverlaufs der Aktivierung von KCNQ1 als die Zeit $t_{0,5}$, die bei +70 mV vergeht, bis die halbmaximale Amplitude erreicht ist (Mittelwerte \pm SEM). Die Rechtsverschiebung der Aktivierung durch D77N-KCNE1 gegenüber KCNE1 hatte keinen Einfluss auf den langsamen Zeitverlauf. KCNQ1 alleine aktivierte deutlich schneller.

	n	$t_{0,5}$ (ms)
KCNQ1	3	124,6 \pm 46,9
KCNQ1 + KCNE1	6	1992,2 \pm 305,7
KCNQ1 + D77N-KCNE1	7	1609,8 \pm 171,7

Tabelle 12: Die maximale Stromamplitude der erg-Ströme bei Koexpression mit **KCNE1, D77N-KCNE1, KCNE2 und KCNE3** wurde in isotonischer KCl-Lösung durch einen Testpuls auf -120 mV bestimmt. Daraus wurde die Stromdichte als Verhältnis zur Kapazität der gesamten Zelle berechnet. Die p-Werte im ungepaarten t-Test beziehen sich jeweils auf den Wert des einzeln exprimierten erg-Kanals.

	n	mittlere Stromdichte (pA/pF)	SEM	p
erg1	19	560	92,16	-
erg1 + KCNE1	20	415	64,69	0,2069
erg1 + D77N-KCNE1	8	701	158,71	0,4571
erg1 + KCNE2	13	358	81,44	0,1113
erg1 + KCNE3	8	1189	106,28	0,0003
erg2	21	261	55,14	-
erg2 + KCNE1	19	156	73,56	0,2612
erg2 + D77N-KCNE1	9	91,5	51,00	0,0333
erg2 + KCNE2	12	76,4	20,92	0,0044
erg2 + KCNE3	25	382	73,95	0,1979
erg3	19	190	45,01	-
erg3 + KCNE1	19	69,2	13,10	0,0179
erg3 + D77N-KCNE1	5	42,2	16,49	0,0057
erg3 + KCNE2	5	91,6	28,80	0,0814
erg3 + KCNE3	11	240	36,04	0,3909

Tabelle 13: Die maximale Stromamplitude der erg1-Ströme bei Koexpression mit den **KCNE β -Untereinheiten und der Hyperkinetic β -Untereinheit** wurde in Ringer-Lösung durch einen einfachen Testpuls auf -120 mV bestimmt. Daraus wurde die Stromdichte als Verhältnis zur Kapazität der gesamten Zelle berechnet. Die p-Werte im ungepaarten t-Test beziehen sich jeweils auf den Wert von erg1.

	n	mittlere Stromdichte (pA/pF)	SEM	p
erg1	19	128,31	22,38	-
erg1 + KCNE1	14	90,36	18,02	0,1963
erg1 + KCNE2	11	216,42	47,06	0,1121
erg1 + KCNE3	12	120,75	26,29	0,8284
erg1 + Hyperkinetic	3	45,66	21,88	0,0315

In einzelnen Experimenten konnte schließlich qualitativ reproduziert werden, dass das Toxin BeKm-1, das aus dem Gift des zentralasiatischen Skorpions *Buthus eupeus* gewonnen wurde (Korolkova *et al.*, 2001), in der Konzentration von 75 nM den erg1-Strom in CHO-Zellen nahezu vollständig blockierte. Der Effekt war irreversibel und trat mit einer Latenz von einigen Minuten auf. In gleicher Weise konnte diese Wirkung auch für erg2 und erg3 nachgewiesen werden.

4.5 Untersuchung von α - und β -Untereinheiten mit Antigen-Epitop

Um die Vorgänge der Kolo-kalisation immunhistochemisch untersuchen zu können, war es notwendig, die erg-Kanäle und die KCNE β -Untereinheiten mit Protein-„Tags“ zu versehen. Diese Tags sind Oligopeptide, die molekularbiologisch an den N-Terminus der Kanalproteine gesetzt wurden und als Epitope für Antikörper fungieren. Aufgrund dieser strukturellen Alteration der Kanalproteine konnte eine Einschränkung der Funktionalität nur elektrophysiologisch ausgeschlossen werden. Sämtliche molekularbiologischen und immunhistochemischen Experimente zu diesem Bereich sind von Silke Burgarth im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt worden (Burgarth, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich getestet, ob die Konstrukte in der Lage waren, elektrophysiologisch funktionell exprimiert zu werden.

Die mit dem His-Epitop getagten KCNE β -Untereinheiten wurden mit KCNQ1 koexprimiert (s. Abb. 29 und Tab. 14). Die entstandenen Ströme zeigen prinzipiell dieselben Eigenschaften wie die Kontrollströme mit den nativen KCNE β -Untereinheiten, so dass von einer funktionellen Expression ausgegangen werden kann. Der erg1- und der erg2-Kanal wurden jeweils mit dem V5A- und dem c-myc-Epitop versehen. Die Kanäle wurden einzeln exprimiert, und die Funktionalität wurde mit einem einfachen Testpuls bestimmt (s. Abb. 30). Alle getagten erg-Kanäle waren eindeutig funktionell und zeigten keine erkennbaren Unterschiede zu den nativen erg-Kanälen. Eine genauere Charakterisierung wurde nicht durchgeführt, da die Funktionalität im Sinne einer regelrechten Lokalisation die primäre Fragestellung darstellte.

Tabelle 14: Darstellung des Zeitverlaufs der Aktivierung von KCNQ1 als die Zeit $t_{0,5}$, die bei +70 mV vergeht, bis die halbmaximale Amplitude erreicht ist (Mittelwerte \pm SEM).

	n	$t_{0,5}$ (ms)
KCNQ1	6	$72,8 \pm 13,7$
KCNQ1 + KCNE1	6	$814,5 \pm 65,1$
KCNQ1 + His-KCNE1	3	$484,3 \pm 262,8$
KCNQ1 + KCNE3	4	$11,5 \pm 3,9$
KCNQ1 + His-KCNE3	3	$27,0 \pm 8,5$

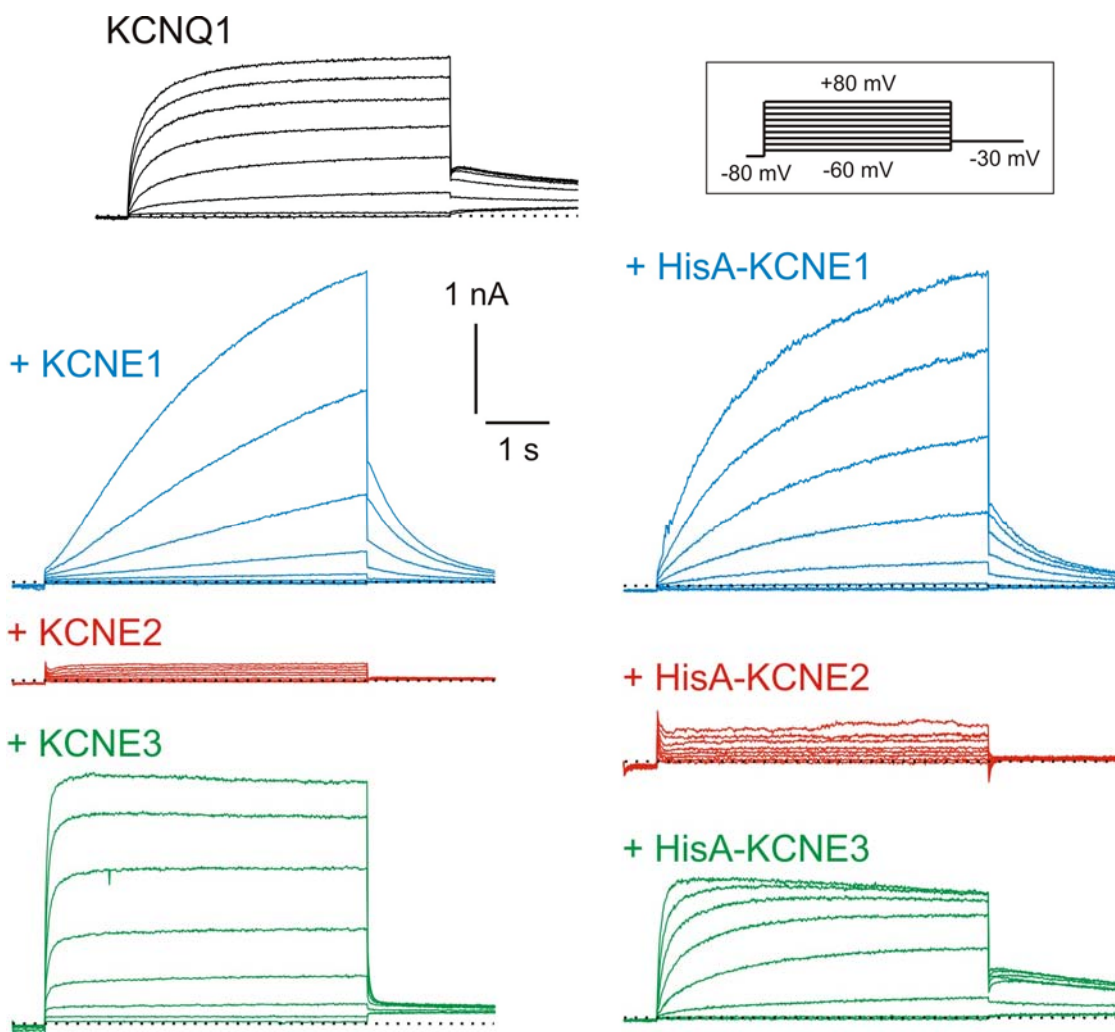


Abb. 29:

Koexpression von KCNQ1 mit „getagten“ KCNE β -Untereinheiten sowie den entsprechenden Positivkontrollen. Alle Messungen wurden bei einem Haltepotential von $E = -80$ mV mit dem im Inset gezeigten Pulsprotokoll in Ringer-Lösung durchgeführt. Der Maßstab ist für alle Ströme gleich.

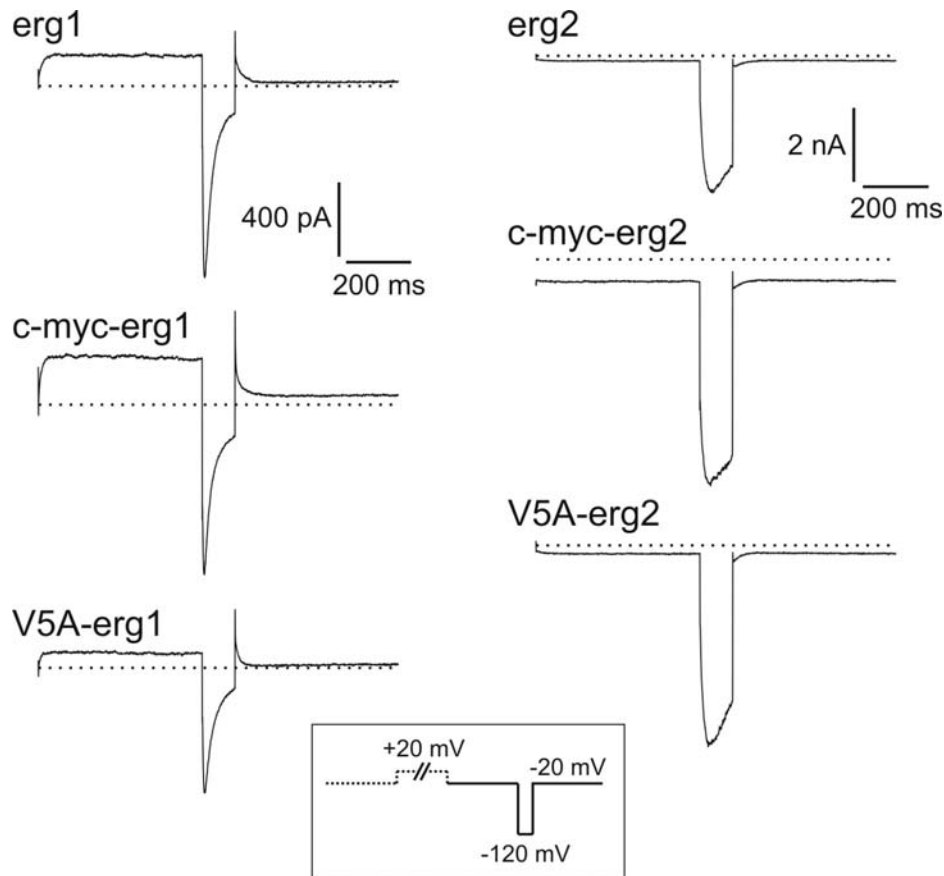


Abb. 30:

Expression von „getagten“ erg-Kanälen in CHO-Zellen und Bestimmung der Funktionalität durch einen Testpuls von 100 ms auf -120 mV nach 2 s Vordepolarisation auf 20 mV zur vollständigen Aktivierung. Das Haltepotential lag bei $E = -20$ mV.

Alle getagten Kanäle zeigen ein erg-typisches Schaltverhalten mit schneller Erholung aus der Inaktivierung und – in Abhängigkeit von Herkunftsklon und Messlösung (erg1: Ringer-Lösung, erg2: isotonische KCl-Lösung) – einer entsprechend schnelleren oder langsameren Deaktivierung.

5 Diskussion

5.1 Der E-4031-sensitive Strom in GH₃/B₆- und MMQ-Zellen

In dieser Arbeit wurde mit der Patch-Clamp-Technik versucht, durch heterologe Überexpression von *erg1* in GH₃/B₆- und MMQ-Zellen herauszufinden, ob es in den MMQ-Zellen einen Faktor – mutmaßlich ein Protein – gibt, der Einfluss auf die Kinetik des E-4031-sensitiven Stroms nimmt. Alternativ wäre ein neuer Kanal denkbar, der für die besonderen Eigenschaften der Deaktivierung zuständig ist. Mit der Methode der Überexpression eines physiologisch im System bereits vorhandenen Proteins war zuvor bereits die intrazelluläre Signalkaskade, die den *erg*-Strom in GH₃/B₆-Zellen reguliert, untersucht worden (Schleidermann *et al.*, 2001).

Tabelle 15: Vergleich der Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit des E-4031-sensitiven Stroms von nativen laktotropen Zellen und MMQ-Zellen bei Messung in isotonischer KCl-Lösung.

	n	E _{0,5} fast (mV) ± SD	E _{0,5} slow (mV) ± SD
laktotrope Zellen (aus Schäfer <i>et al.</i> , 1999)	11	-73,7 ± 1,9	-117,2 ± 1,5
MMQ-Zellen (s. Kap. 4.1.1, Tab. 3)	8	-66,8 ± 9,7	-114,8 ± 7,5

Zunächst konnten die Befunde von Schäfer *et al.* (1999) und Lecchi *et al.* (2002) nachvollzogen werden. Die GH₃/B₆-Zellen zeigten bei -120 mV einen stabilen Anteil der Amplitude der langsam deaktivierenden Komponente des E-4031-sensitiven Stroms an der Gesamtamplitude von etwa 10 %, wobei die Daten durch das Anlegen der Summe aus drei Exponentialfunktionen an die Stromspur gewonnen wurden; die Erholung aus der Inaktivierung wurde mit einer, die Deaktivierung mit zwei Exponentialfunktionen beschrieben (nach Schäfer *et al.*, 1999). Dieser Anteil schwankte bei den nativen MMQ-Zellen stark um einen Amplitudenanteil der langsam deaktivierenden Stromkomponente von 20 % bis weit über 50 %. Dies ähnelt sehr stark dem bei nativen laktotropen Zellen erhobenen Befund (Schäfer *et al.*, 1999). Eine weitere Ähnlichkeit zwischen MMQ-Zellen und nativen laktotropen Zellen ergab sich aus der Auswertung der Verfügbarkeit des E-4031-sensitiven

Stroms, die in MMQ-Zellen – wie auch bei Schäfer *et al.* (1999) in laktotropen Zellen – mit der Summe aus zwei Boltzmann-Funktionen beschrieben werden musste. Die für diesen Vergleich relevante Vorpulszeit war in beiden Untersuchungen bei 1,5 s festgelegt. Die Werte für $E_{0,5 \text{ fast}}$ und $E_{0,5 \text{ slow}}$ bei MMQ-Zellen und laktotropen Zellen sind nahezu identisch (s. Tab. 15), auch die extrem variable Verteilung der Amplitudenanteile kommt bei beiden Zelltypen vor.

5.2 Überexpression von *erg1* in GH₃/B₆-, MMQ- und CHO-Zellen

Die Ergebnisse der Experimente zeigen, dass der überexprimierte *erg1*-Strom in den GH₃/B₆-Zellen seine schnellen Deaktivierungseigenschaften bei jeder Stromamplitude behält, während bei den MMQ-Zellen noch weit über dem Niveau der nativen Stromamplituden ein übergroßer, nach wie vor variabler Anteil einer langsam deaktivierenden Stromkomponente vorhanden ist. Der relative Anteil der Amplitude der langsam deaktivierenden Stromkomponente liegt bei den mit *erg1* injizierten GH₃/B₆-Zellen gleichmäßig unter 20 % bei einem Regressionskoeffizienten von $r^2 = 0,98$ (s. Abb. 10 auf S. 33). Dieser Anteil schwankt bei den MMQ-Zellen unabhängig von der Gesamtamplitude des E-4031-sensitiven Stroms zwischen 10 und 80 %, hier ergibt sich ein deutlich kleinerer Regressionskoeffizient von $r^2 = 0,46$ (s. Abb. 10). Dieser Befund deutet darauf hin, dass es sich nicht um einen eigenen, unabhängigen Kanal handelt, der diesen Strom verursacht. Bei einem unabhängigen Kanal wäre ein Sättigungsverhalten anzunehmen, es sei denn, der Einbau des unbekanntes Kanals in die Zellmembran der MMQ-Zellen würde in Kopplung mit dem *erg*-Kanal erfolgen. Hier wäre ein Modell denkbar, bei dem die tetrameren Kanäle in von Zelle zu Zelle unterschiedlichem Ausmaß in einer 3+1-Konfiguration auftauchen, die den relevanten endogenen Kanal enthält. Die große Variabilität würde sich durch diese Heterotetramerenbildung erklären lassen. Dennoch ist denkbar, dass ein in den MMQ-Zellen in variierender Konzentration vorhandener Faktor den *erg1*-Strom moduliert und dadurch die deutlich größeren absoluten Amplituden der langsam deaktivierenden Stromkomponente entstehen können, die die Amplituden der endogenen E-4031-sensitiven Ströme in nativen MMQ-Zellen deutlich übertreffen.

Der E-4031-sensitive Strom bei Expression von *erg1* in CHO-Zellen hat unter gleichen Bedingungen die gleiche Deaktivierungskinetik wie bei Expression von *erg1* in GH₃/B₆-

Zellen. Dieser Befund stützt die Annahme, dass *erg1* das molekulare Korrelat des E-4031-sensitiven I_{Kir} in diesen klonierten Hypophysenzellen darstellt (Bauer *et al.*, 1998).

5.3 Annäherung an den spezifischen Faktor der MMQ-Zellen

Weitere Experimente mit einer Zytoplasma-Präparation aus MMQ-Zellen sollten nun differenzieren, welche Lokalisation der mögliche einflussnehmende MMQ-spezifische Faktor haben könnte. Das Zytoplasma wurde so gewonnen, dass möglichst wenige Membranbestandteile enthalten sein sollten. Die Proteinfraction wurde durch den Zusatz mehrerer Proteinase-Inhibitoren (nach Hao *et al.*, 1999) geschützt. Die Experimente wurden in der Whole-cell-Konfiguration mit hohem Anteil der Zytoplasma-Präparation in der Pipettenlösung, sowie in der Inside-out-Konfiguration mit Zytoplasma-Präparation in der Badlösung an GH₃/B₆-Zellen durchgeführt, die zuvor mit *erg1*-cDNA injiziert worden waren.

Da die Geschwindigkeit des Stoffaustauschs zwischen Patchpipette und Zelle vom Durchmesser der Pipettenspitze abhängt, muss für die Diffusion von Makromolekülen mit einer Zeit von mehreren Minuten gerechnet werden (Pusch & Neher, 1988; Numberger & Draguhn, 1996). Diffusionszeiten von bis zu 18 min in der Whole-cell-Konfiguration führten jedoch zu keiner Änderung der Deaktivierungszeit des *erg*-Stroms der GH₃/B₆-Zellen. Die Diffusionszeit in der Inside-out-Konfiguration ist deutlich kürzer (Pusch & Neher, 1988; Numberger & Draguhn, 1996), aber auch bei diesen Experimenten zeigte sich kein Einfluss des MMQ-Zytoplasmaextraktes. Diese Beobachtungen erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass in den MMQ-Zellen ein membranständiger oder zumindest mit der Membran assoziierter Faktor – mutmaßlich ein Protein – vorhanden ist, wie dies bereits von Schäfer *et al.* (1999) vermutet wurde.

Zusätzlich wurde mit Inside-out-Patches von MMQ-Zellen, die bei Überexpression von *erg1* einen großen Anteil der langsam deaktivierenden Komponente besaßen, versucht, den wahrscheinlich nicht zytoplasmatisch lokalisierten Faktor von der Membrannenseite „abzuwaschen“ und die Deaktivierung auf diese Weise zu beschleunigen. Da dies ebenfalls nicht gelang, liegt somit ein weiteres Indiz für eine feste Membranassoziation des unbekannten MMQ-spezifischen Faktors vor.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen also, dass es mit hoher Wahrscheinlichkeit einen MMQ-Zell-spezifischen Faktor gibt, der eine feste Verbindung mit der Zellmembran besitzt, und der in der Lage ist, die Deaktivierung der *erg1*-Kanäle auch in hoher Dichte deutlich zu beeinflussen. Die Tatsache, dass die Überexpression von *erg1* in MMQ-Zellen einen E-4031-sensitiven Strom ergibt, dessen langsam deaktivierende Komponente oftmals eine deutlich größere Amplitude aufweist als die langsam deaktivierende Komponente oder sogar der gesamte endogene E-4031-sensitive Strom, lässt vermuten, dass hier kein zweites („Erg_s“-) Kanalprotein vorliegt, wie es Lecchi *et al.* (2002) vorschlagen. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten erbringen allerdings nicht den Beweis der Nichtexistenz eines Erg_s-Kanals. Wenn dieser Kanal existierte, würde er wahrscheinlich Heteromultimere mit dem vorhandenen *erg1*-Protein bilden und so die Kinetik beeinflussen. Ein möglicher Kandidat wären demnach Splicevarianten des *erg*-Kanals. Für eine *erg1B*(-/-)-knockout-Maus (Lees-Miller *et al.*, 2003) wurde gezeigt, dass in bestimmten Altersstufen nur die schnell deaktivierende Komponente des I_{Kr} verschwindet, also die Oberflächenexpression zwar funktioniert, aber mit anderen Eigenschaften, da ein Bestandteil der heteromultimeren Kanäle fehlt. Hier wäre der gesuchte Faktor also ein Kanalprotein.

Ebensogut ist aber denkbar, dass es ein variabel im Überschuss vorhandenes membranständiges Protein gibt, das zwar kein Kanal ist, aber mit dem *erg*-Kanal assoziieren und seine Deaktivierungseigenschaften beeinflussen kann. Dieses Protein könnte zum Beispiel der Rezeptor für das selektiv die langsam deaktivierende Komponente blockierende Toxin ErgTx-2 sein (Lecchi *et al.*, 2002). Denkbar wäre auch eine Rolle des SUR-Rezeptors (Wulfsen *et al.*, 2000), für den ebenfalls Interaktionen mit *erg1*-Kanälen vermutet werden (Rosati *et al.*, 1998).

Wilson *et al.* (1998) haben eine Interaktion der K^+ -Kanal- β -Untereinheit Hyperkinetic aus *Drosophila* mit h-*erg1* beschrieben, die bei heterologer Expression mit h-*erg1* in *Xenopus*-Oozyten eine deutliche Vergrößerung der Stromamplitude sowie eine Verlangsamung der Deaktivierung zur Folge hatte. Außerdem wurde die Amplitude von *eag1* (Warmke *et al.*, 1991; Warmke & Ganetzky, 1994) deutlich vergrößert. Es wäre denkbar, dass ein verwandtes Protein der Ratte in MMQ-Zellen maßgeblichen Einfluss auf die *erg*-Kanäle nimmt. Zu einer ersten Überprüfung dieser Hypothese wurde deshalb die *Drosophila*-Variante der Hyperkinetic β -Untereinheit mit *erg1* in CHO-Zellen koexprimiert. Die Befunde von Wilson *et al.* (1998) bestätigten sich nicht, es kam sogar eher zu einer Verringerung der Stromdichte bei Koexpression. Der MMQ-spezifische Faktor ist demnach wahrscheinlich kein mit Hyperkinetic verwandtes Protein.

Andere mögliche Kandidaten für die Regulation der erg-Kanal-Deaktivierung sind die KCNE β -Untereinheiten, die im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht wurden.

5.4 Die kontrovers diskutierte Funktion der KCNE β -Untereinheiten

Erst kürzlich wurden für die KCNE β -Untereinheiten KCNE1 (MinK, IsK; Takumi *et al.*, 1988), KCNE2 (MiRP1; Abbott *et al.*, 1999) und KCNE3 (MiRP2; Abbott *et al.*, 1999) zunehmend mehr Interaktionen mit verschiedenen K^+ -Kanal α -Untereinheiten beschrieben. Das wohl am ehesten zu akzeptierende Konzept (Sanguinetti *et al.*, 1996B) erklärt das Zustandekommen des I_{Ks} im Herzen als Heteromultimer aus KCNQ1- und KCNE1-Untereinheiten. Auch eine Interaktion von KCNE1 mit h-erg1 wird vermutet (McDonald *et al.*, 1997; Cui *et al.*, 2000). Abbott *et al.* (1999) beschreiben eine funktionelle Interaktion zwischen h-erg1 und KCNE2, die sich vor allem beschleunigend auf die Deaktivierungskinetik auswirken soll und eine kleine Verschiebung der Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen hin beinhaltet. Beide Autoren sehen das molekulare Korrelat des I_{Kr} in Analogie zum I_{Ks} in ihrer jeweiligen Kombination aus KCNE β -Untereinheit mit h-erg1. Diese Befunde haben sich bisher in der Form von keiner Arbeitsgruppe nachvollziehen lassen (Cui *et al.*, 2001; Schledermann *et al.*, 2001; Weerapura *et al.*, 2002).

Weiterhin sind inzwischen Effekte von der KCNE2 β -Untereinheit auf HCN- K^+ -Kanäle (Yu *et al.*, 2001), auf Kv4.2- K^+ -Kanäle (Zhang *et al.*, 2001) und auch auf KCNQ1-Kanäle (Tinel *et al.*, 2000B) beschrieben worden. Die HCN-Kanäle besitzen eine wichtige Schrittmacher-Funktion, da sie bei negativen Potentialen einen langsam aktivierenden Einwärtsstrom produzieren. Sie sind vor allem im Sinusknoten lokalisiert und sorgen dort für die langsame diastolische Depolarisation; die KCNE2 β -Untereinheit spielt offenbar eine wichtige Rolle für den Expressionsgrad und das Schaltverhalten dieses Kanals. Der Kv4.2-Kanal trägt den I_{to} („transient outward current“) im Myokard, einen K^+ -Auswärtsstrom, der während der Plateauphase des Herzaktionspotentials aktiv ist. Alle diese Beobachtungen bezüglich der Funktion von KCNE2 konnten von Abbott & Goldstein (2002) nicht bestätigt werden. Gleichwohl ist es naheliegend zu vermuten, dass die KCNE2 β -Untereinheit wichtige Aufgaben in den Myokardiozyten erfüllt – das LQT-6 wird durch eine Mutation im KCNE2-Gen verursacht. Welcher Natur diese Aufgaben sind,

bleibt aber weiter unklar. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Interaktion von KCNE2 mit KCNQ1 im Rahmen der Kontrollversuche in Übereinstimmung mit dem publizierten Ergebnis (Tinel *et al.*, 2000B) reproduziert werden.

Schroeder *et al.* (2000) beschreiben eine deutliche Blockade des h-erg1 bei heterologer Koexpression mit KCNE3 in *Xenopus*-Oozyten. Abbott & Goldstein (2002) beschreiben unter vergleichbaren Bedingungen zwar eine Abnahme der Amplitude des Stroms um über 50 %, alle anderen Eigenschaften sollen jedoch erhalten bleiben. Diese Beobachtungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden, weder in den beschriebenen Experimenten mit r-erg1, noch in einigen Experimenten mit h-erg1 (Daten nicht gezeigt, s. auch folgendes Kapitel). Die KCNE3 β -Untereinheit spielt vor allem in Kolokalisation mit KCNQ1 eine Rolle in sekretorisch aktiven Epithelien, zum Beispiel in den Kolonkrypten (Schroeder *et al.*, 2000). Außerdem wird eine Interaktion von KCNE3 mit dem Kv3.4-K⁺-Kanal in Skelettmuskelzellen beschrieben, die in einem Zusammenhang mit hereditärer periodischer Lähmung stehen soll (Abbott *et al.*, 2001). Sternberg *et al.* (2003) bezweifeln allerdings diesen Zusammenhang aus klinischer Sicht.

Für die weiteren β -Untereinheiten aus der KCNE-Familie, KCNE4 und KCNE5, sind spezifische Interaktionen nur mit KCNQ1 beschrieben worden (Grunnet *et al.*, 2002; Angelo *et al.*, 2002). Die Untersuchungen in *Xenopus*-Oozyten haben keinen Hinweis auf funktionelle oder morphologische Beziehungen von KCNE4 und KCNE5 zu erg1 erbracht.

Vor kurzem sind die Lokalisationen der mRNAs für alle drei bekannten erg-Untereinheiten im ZNS der Ratte beschrieben worden (Saganich *et al.*, 2001; Papa *et al.*, 2003), vor allem erg3 scheint hier weit verbreitet zu sein. Eine Kolokalisation mit KCNE β -Untereinheiten ist nicht unwahrscheinlich, da diese ebenfalls im ZNS vorkommen (KCNE1: Wulfsen *et al.*, 2000; KCNE2: Tinel *et al.*, 2000A). Wichtig für diese Arbeit war vor allem auch, dass KCNE β -Untereinheiten in laktotropen Zellen, MMQ-Zellen und GH₃/B₆-Zellen unterschiedlich exprimiert werden. KCNE1 konnte in Hypophysengewebe nachgewiesen werden, in GH₃/B₆-Zellen dagegen jedoch nicht (Wulfsen *et al.*, 2000).

Da GH₃/B₆-Zellen außerdem nur erg1 und erg2 exprimieren (Wulfsen *et al.*, 2000) und die zusätzliche Expression von erg3 in MMQ-Zellen nicht sicher bestätigt ist (Wimmers *et al.*, 2001; Lecchi *et al.*, 2002), stand die Untersuchung dieses Kanals nicht bezüglich seiner Rolle in der Hypophyse im Vordergrund, sondern vor allem im Hinblick auf seine möglicherweise herausragende Rolle im ZNS.

5.5 Die Bedeutung der KCNE β -Untereinheiten für die erg K^+ -Kanäle

In dieser Arbeit wurde erstmals eine umfassende vergleichende elektrophysiologische Untersuchung der Einflüsse der rKCNE1-3 β -Untereinheiten auf alle drei bisher bekannten erg-Kanäle (r-erg1-3) durchgeführt, wobei als Expressionssystem mit CHO-Zellen eine Mammalier-Zelllinie eingesetzt wurde. *Xenopus*-Oozyten wären für die Experimente nicht geeignet gewesen. Sie besitzen einerseits endogen erg-Kanäle (Bauer *et al.*, 1996) und KCNE β -Untereinheiten (Anantharam *et al.*, 2003), die jeweils auch funktionell exprimiert werden, andererseits sind viele der bereits angesprochenen Befunde zur Interaktion von erg1 mit den KCNE β -Untereinheiten an ihnen erhoben wurden (Abbott *et al.*, 1999; Schroeder *et al.*, 2000; Abbott & Goldstein, 2002). Da also gerade das intrazelluläre Milieu bereits innerhalb einer Gruppe phylogenetisch eng verwandter Zelltypen, wie der GH₃/B₆- und der MMQ-Zellen, eine große Rolle für die Eigenschaften eines Stroms spielt, war diese Entscheidung von großer Bedeutung. Die HEK-293-Zelllinie wäre eine medizinisch interessante Alternative gewesen, da es sich um Zellen menschlichen Ursprungs handelt. Freeman *et al.* (1993) beschreiben aber einen Strom, der durch Expression von KCNE1 in HEK-293-Zellen verursacht wird und von der Kinetik dem I_{Ks} sehr ähnlich sieht, was auf endogene KCNQ1-Kanäle schließen lässt und diese Zelllinie für derartige Experimente disqualifiziert. Eine pharmakologische Isolierung der einzelnen Stromfamilien hätte einen nicht zu bewältigenden zeitlichen und materiellen Aufwand zur Folge gehabt, da die standardisiert durchführbare Blockade durch E-4031 zwar erg-hochspezifisch, aber nicht voll reversibel ist (Weinsberg *et al.*, 1997).

Es wurden also Messungen an CHO-Zellen durchgeführt, bei denen jeder einzelne erg-Klon mit jeweils einem KCNE-Klon koexprimiert wurde. Außerdem wurde jeder erg-Klon alleine exprimiert. Die cDNA wurde injiziert, EGFP-cDNA wurde immer als Kontrolle für Expression koinjiziert. Als Kontrolle für Funktionalität wurde jede KCNE β -Untereinheit außerdem mit KCNQ1 koexprimiert, wobei sich für jede Kombination die erwarteten, aus der Literatur bekannten, dramatischen Effekte auf die Aktivierungskinetik und die Stromdichte einstellten: KCNQ1 und KCNE1 erzielten einen großen, dem I_{Ks} sehr ähnlichen Strom (Sanguinetti *et al.*, 1996B), KCNQ1 und KCNE2 ergaben einen potentialunabhängigen „Leckstrom“ (Tinel *et al.*, 2000B), und KCNQ1 und KCNE3 erzeugten einen großen, potentialabhängig sehr schnell aktivierenden, schnell deaktivierenden Strom (Schroeder *et al.*, 2000).

Nach Koexpression von *erg1* mit den KCNE β -Untereinheiten wurden in Ringer- und isotonomischer KCl-Lösung (s. Kap. 3.3.4 Lösungen und Chemikalien) die Spannungsabhängigkeit von Aktivierung, Inaktivierung (nur *erg1*, nur in Ringer-Lösung) und Verfügbarkeit bestimmt. Außerdem wurden der spannungsabhängige Zeitverlauf der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung in einem Arbeitsschritt durch insgesamt drei Exponentialfunktionen beschrieben – davon eine für die Erholung von der Inaktivierung, zwei für die Deaktivierung. Nach Koexpression von *erg2* und *erg3* mit den KCNE β -Untereinheiten wurde nur in isotonomischer KCl-Lösung gemessen, da die wegen des regelmäßig auftretenden niedrigen Expressionsniveaus zu erwartenden geringen Stromdichten Messungen in physiologischer K^+ -Konzentration stark erschwert hätten. Hier wurden nun ebenfalls die Spannungsabhängigkeiten von Aktivierung und Verfügbarkeit und die Zeitverläufe der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung bestimmt.

Nach den Ergebnissen von Experimenten in *Xenopus*-Oozyten (Schroeder *et al.*, 2000) musste damit gerechnet werden, dass eine Koexpression von *erg1* mit KCNE3 den Strom unterdrücken würde. Dieser Effekt trat nicht ein. Auch einige Experimente mit h-*erg1* (Daten nicht aufgeführt; ansonsten wurde grundsätzlich r-*erg1* verwendet) zeigten diesen Effekt nicht, weder bei normaler, noch bei niedriger Inkubationstemperatur (37° C beziehungsweise 20° C, Daten nicht gezeigt).

Signifikante Änderungen der Stromdichten bei Koexpression eines *erg*-Kanals mit einer KCNE β -Untereinheit traten in zwei Fällen auf; es lag jedoch bei allen Kombinationen eine sehr große Variabilität vor, die eindeutig von der Koexpression mit den KCNE β -Untereinheiten unabhängig war. Die Kombinationen, bei denen sich in isotonomischer KCl-Lösung eine signifikante Änderung der Stromdichte ergab, waren die Koexpression von *erg1* mit der KCNE3 β -Untereinheit (Erhöhung um den Faktor 2,12; $p < 0,001$) und die Koexpression von *erg2* mit KCNE2 (Erniedrigung um den Faktor 0,29; $p < 0,005$). Diese Trends sind kritisch zu sehen, da einerseits in allen diesbezüglich durchgeführten Messreihen jeweils eine sehr große Zahl von Zellen diese Effekte nicht zeigte. Zusätzlich müsste man annehmen, dass die Koexpression von KCNE β -Untereinheiten eine Änderung der Einzelkanalleitfähigkeit herbeiführen würde ohne dabei die Kinetik zu beeinflussen (dies ist weder bei KCNE3 für *erg1*, noch bei KCNE2 für *erg2* der Fall). Dennoch: Einzig in der Kombination von *erg1* mit KCNE3 kam es bei etwa 40 % der Zellen zum Auftreten extrem hoher Stromamplituden von weit über 10 nA, die sich anders bisher nicht erklären lassen. Bei Messung in Ringer-Lösung war kein Effekt bezüglich der Stromdichte zu beobachten.

Die Aktivierung der in CHO-Zellen exprimierten erg-Kanäle war bei Koexpression mit den KCNE β -Untereinheiten nur minimal verändert. Die von Abbott *et al.* (1999) in *Xenopus*-Oozyten beschriebene deutliche Rechtsverschiebung der Aktivierungskurve von erg1 durch KCNE2 ließ sich nicht nachvollziehen. Im Gegensatz dazu kam es in Ringer-Lösung zu einer leichten Linksverschiebung, die in ähnlichem Verhältnis auch Cui *et al.* (2001) und Weerapura *et al.* (2002) beschrieben haben. Dieser Effekt ist nicht signifikant und entfällt bei Messung in isotonischer KCl-Lösung, was auf einen Einfluss der Ionenkonzentrationen auf eine mögliche Interaktion hinweisen könnte. Weitere Messungen in Ringer-Lösung „ohne“ Calcium und in isotonischer KCl-Lösung „mit“ Calcium (s. Kap. 3.3.4) zeigten folgende Tendenz: Es bestätigte sich einerseits die deutliche Abhängigkeit der Aktivierung des erg1-Kanals von der extrazellulären Kaliumkonzentration (Wimmers *et al.*, 2002), die bei hohem extrazellulärem Kalium eine deutliche Linksverschiebung der Aktivierungskurve bewirkt. Andererseits scheint dieser Effekt in Calcium-armer Lösung ($\Delta E = 24,23$ mV) sehr viel ausgeprägter zu sein als in einer Lösung mit physiologischem Calciumgehalt ($\Delta E = 9,73$ mV). Bei Koexpression mit KCNE2 war praktisch kein Unterschied vorhanden ($\Delta E = 0,54$ mV). So könnte eine Interaktion von erg1 mit KCNE2 sehr viel weniger in der Einstellung der Kinetik zu finden sein, als vielmehr in der Stabilisierung der Beziehung des erg-Stroms zur extrazellulären Kaliumkonzentration. Dieses mögliche Zusammenspiel von erg1 und KCNE2 könnte eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit dem Entstehen kardialer Komplikationen bei Störungen der extrazellulären K^+ -Konzentration – die ja der K^+ -Konzentration im Serum entspricht – spielen.

Die Messungen mit erg2 und erg3 wurden nur in isotonischer KCl-Lösung durchgeführt, daher können zu einem ähnlichen Verhalten, wie es erg1 und KCNE2 zeigen, keine Aussagen gemacht werden. Es ergaben sich unter den gegebenen Bedingungen keine anderen Hinweise auf einen Einfluss der koexprimierten KCNE β -Untereinheiten auf die Aktivierung der erg-Kanäle.

Die Einflüsse der KCNE β -Untereinheiten auf das Deaktivierungsverhalten der drei erg-Kanäle waren insgesamt sehr gering. Die Auswertung der Deaktivierung umfasste die Bestimmung der Zeitverläufe von Erholung aus der Inaktivierung (eine Exponentialfunktion) und Deaktivierung (Summe aus zwei Exponentialfunktionen). Der Befund von Abbott *et al.* (1999), der eine deutliche Beschleunigung der Deaktivierung von erg1 bei Koexpression mit KCNE2 in *Xenopus*-Oozyten beschreibt, bestätigte sich nicht. Der von Lu *et al.* (2003) für CHO-Zellen beschriebene Einfluss der KCNE2-Mutanten T8A, Q9E and M54T

auf die Aktivierung von *erg1* lässt sich mit den Befunden dieser Arbeit durchaus vereinbaren; der Einfluss des KCNE2-Wildtyps auf den *erg1*-Kanal wird auch bei Lu *et al.* (2003) als sehr gering eingeschätzt.

Eine Tendenz für einen Einfluss auf das Deaktivierungsverhalten ergab sich dagegen bei *erg2*, der bei Koexpression mit KCNE1 in sehr negativen Potentialbereichen (-120 mV bis -140 mV) einen deutlich höheren Anteil an langsamer Deaktivierung aufwies (s. Abb. 21, Tab. 8). Die Bedeutung dieses Befundes ist aufgrund des unphysiologischen Potentialbereichs als gering einzuschätzen. Zusätzlich ergab sich nur in dieser Kombination eine schwach signifikante ($p < 0,05$) Verschiebung der Verfügbarkeitskurve um 7,4 mV in den negativeren Potentialbereich. Eine Interaktion insbesondere dieser beiden Proteine ist somit denkbar, da gerade im zentralen Nervensystem mit einer Kolo-kalisation dieser zu rechnen sein müsste (Shi *et al.*, 1997; Tinel *et al.*, 2000; Saganich *et al.*, 2001; Papa *et al.*, 2003). Obwohl die genannten Befunde bei Koexpression von *erg2* mit KCNE1 an das Deaktivierungsverhalten des E-4031-sensitiven Stroms der MMQ-Zellen denken lassen, bestehen doch noch deutliche Unterschiede. So liegt die biphasische halbmaximale Verfügbarkeit dieses Stroms in gänzlich anderen Potentialbereichen ($E_{0,5\text{fast}} = -66,8$ mV und $E_{0,5\text{slow}} = -114,8$ mV in MMQ-Zellen gegenüber $E_{0,5} = -90,0$ mV bei *erg2* + KCNE1); auch der Anteil der langsam deaktivierenden Stromkomponente ist in MMQ-Zellen durchschnittlich doppelt so groß wie bei *erg2* + KCNE1.

Tabelle 16: Vergleich der Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit des E-4031-sensitiven Stroms von nativen laktotropen Zellen, MMQ-Zellen und dem *erg3*-Strom nach Injektion der *erg3*-cDNA in CHO-Zellen bei Messung in isotonischer KCl-Lösung.

	n	$E_{0,5\text{ fast}} \text{ (mV)} \pm \text{SD}$	$E_{0,5\text{ slow}} \text{ (mV)} \pm \text{SD}$
laktotrope Zellen (aus Schäfer <i>et al.</i> , 1999)	11	$-73,7 \pm 1,9$	$-117,2 \pm 1,5$
MMQ-Zellen (s. Kap. 4.1.1, Tab. 3)	8	$-66,8 \pm 9,7$	$-114,8 \pm 7,5$
<i>erg3</i> in CHO-Zellen (s. Kap. 4.3.2, Tab. 10)	8	$-59,11 \pm 8,37$	$-104,73 \pm 7,31$

Die Spannungsabhängigkeit der Verfügbarkeit nach Deaktivierung unterscheidet sich bei den drei *erg*-Kanälen deutlich, dies entspricht den Befunden aus der Literatur (Shi *et al.*, 1997, Wimmers *et al.*, 2001). Ein Einfluss der KCNE β -Untereinheiten war jedoch bei keiner Kombination zu erkennen.

Neu ist der Befund einer zweiteiligen Verfügbarkeitskurve für *erg3*, die in vielen Eigenschaften an die der laktotropen Zellen und der MMQ-Zellen erinnert (Schäfer *et al.*, 1999). Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 16 einander gegenübergestellt. Auch der *erg3*-Kanal besitzt in isotonischer KCl-Lösung und mit demselben Pulsprotokoll gemessen zwei unterschiedlich verfügbare Stromkomponenten, deren Anteile stark variieren. Dies spiegelt sich aber im Gegensatz zu den laktotropen Zellen und den MMQ-Zellen nicht so deutlich in den Deaktivierungszeitkonstanten wieder. Das Gegenteil ist der Fall: Der *erg3*-Kanal deaktiviert sehr viel schneller als der E-4031-sensitive Strom der MMQ-Zellen der laktotropen Zellen (Schäfer *et al.*, 1999). Auch der Anteil der langsam deaktivierenden Stromkomponente an der extrapolierten Gesamtamplitude bei $E = -120$ mV ist mit 36 % sehr viel näher an den GH_3/B_6 -Zellen (24 %) als an den MMQ-Zellen (63 %). Außerdem scheint die Expression von *erg3* in den MMQ-Zellen nur einen sehr geringen Anteil an der *erg*-Gesamtpopulation zu haben (Wimmers *et al.*, 2001), so dass diese Gemeinsamkeit bezüglich der Verfügbarkeit der Kanäle wohl einen anderen, noch aufzudeckenden Hintergrund hat.

5.6 Die LQT-5-Mutante D77N-KCNE1

Die Punktmutation D77N im KCNE1-Gen der Ratte entspricht der D76N-Mutation im menschlichen KCNE1-Gen und ist als eine Ursache für das LQTS-5 beschrieben (Splawski *et al.*, 1997). Die D77N-KCNE1 β -Untereinheit hat folgende Besonderheiten: Sie soll bei Koexpression mit KCNQ1 den Strom blockieren (Takumi *et al.*, 1991; Bianchi *et al.*, 1999), beziehungsweise die Aktivierungskurve nach rechts verschieben (Splawski *et al.*, 1997). Außerdem soll sie die Stromdichte von *erg1* nicht in dem Maße verändern wie die native Variante KCNE1 (McDonald *et al.*, 1997, Bianchi *et al.*, 1999). Die Koexpression von D77N-KCNE1 mit den *erg*-Kanälen und dem KCNQ1-Kanal wurde als weitere Möglichkeit durchgeführt, einen Nachweis für eine Kolokalisation der *erg*-Kanäle mit den KCNE β -Untereinheiten in der Zellmembran zu erhalten. Die Koexpression von D77N-KCNE1 mit KCNQ1 erbrachte ein Ergebnis, das mit den Daten aus der Literatur vereinbar war (s. Abb. 26): Die Stromdichte war tatsächlich verringert, und zwar nicht nur als Folge einer Blockade des KCNQ1-Stroms, sondern vor allem als Folge einer ausgeprägten Rechtsverschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (s. Abb. 26; vergl.

Splawski *et al.*, 1997). Daraus folgte, dass nur in höchsten Potentialbereichen ab $E = 40$ mV Ströme gesehen werden konnten. Eine Kollokalisierung ist für KCNQ1 und D77N-KCNE1 mit Sicherheit anzunehmen. Auf die erg-Kanäle hatte D77N-KCNE1 keine deutlichen Effekte. McDonald *et al.* (1997) beschreiben eben dies, während KCNE1 den erg-Strom vergrößern soll. Dieser Effekt, der an stabil mit h-erg1 transfizierten CHO-Zellen gezeigt wurde, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden.

5.7 Ausblick

Alle durchgeführten Experimente führten gleichermaßen zu dem Ergebnis, dass sich in CHO-Zellen bei Koexpression durch Mikroinjektion auf elektrophysiologischer Ebene keine stabile funktionelle Interaktion zwischen KCNE β -Untereinheiten und erg-Kanälen feststellen lässt. Daran anschließend können folgende Ergebnisse dieser Arbeit benannt werden:

1. Die Kinetik des erg1-Stroms hängt stark davon ab, in welchem biologischen System der Kanal exprimiert wird. Unterschiede werden bereits zwischen eng verwandten Zelllinien wie GH₃/B₆- und MMQ-Zellen deutlich.
2. Die langsam deaktivierende Stromkomponente des E-4031-sensitiven Stroms in laktotropen und MMQ-Zellen resultiert wahrscheinlich nicht aus der Präsenz eines komplett neuen Kanalproteins, sondern entsteht durch Modifikation der vorhandenen erg-Kanäle durch einen bisher unbekanntem Faktor, der im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden konnte, der aber höchstwahrscheinlich eng mit der Zellmembran assoziiert ist.
3. Die Präsenz von KCNE β -Untereinheiten alleine erklärt das Verhalten des erg-Stroms in laktotropen Zellen und in MMQ-Zellen nicht.
4. Eine Interaktion von erg1 mit KCNE2 erklärt nicht die Unterschiede zwischen heterolog exprimiertem h-erg1 und dem I_{Kr} in Myokardiozyten.

Aus diesen Ergebnissen folgt: Die KCNE β -Untereinheiten spielen für die Familie der erg-Kanäle keine so große Rolle wie bisher angenommen. Eine Interaktion der Untereinheiten in Zellen mit gemeinsamem Expressionsmuster ist jedoch durchaus möglich. So könnte

beispielsweise der Einfluss von KCNE2 auf die Abhängigkeit des erg1-Kanals von der extrazellulären Kaliumkonzentration eine bisher unbekannte Aufgabe für eine K⁺-Kanal β -Untereinheit sein. Ob diese bezüglich der Bewertung von Hypo- und Hyperkaliämien klinisch interessante Eigenschaft tatsächlich funktionell relevant ist, sollte in weiteren Experimenten oder Studien untersucht werden.

6 Literatur

- Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA (1999). *MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia*. Cell 97: 175-87.
- Abbott GW, Goldstein SA (2002). *Disease-associated mutations in KCNE potassium channel subunits (MiRPs) reveal promiscuous disruption of multiple currents and conservation of mechanism*. FASEB J 16: 390-400.
- Akbarali HI, Thatte H, He XD, Giles WR, Goyal RK (1999). *Role of HERG-like K(+) currents in opossum esophageal circular smooth muscle*. Am J Physiol 277: C1284-90.
- Anantharam A, Lewis A, Panaghie G, Gordon E, McCrossan ZA, Lerner DJ, Abbott GW (2003). *RNA interference reveals that endogenous Xenopus MinK-related peptides govern mammalian K⁺ channel function in oocyte expression studies*. J Biol Chem 278: 11739-45.
- Arcangeli A, Bianchi L, Becchetti A, Faravelli L, Coronello M, Mini E, Olivotto M, Wanke E (1995). *A novel inward-rectifying K⁺ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells*. J Physiol 489: 455-71.
- Bauer CK, Falk T, Schwarz JR (1996). *An endogenous inactivating inward-rectifying potassium current in oocytes of Xenopus laevis*. Pflugers Arch 432: 812-20.
- Bauer CK, Engeland B, Wulfsen I, Ludwig J, Pongs O, Schwarz JR (1998). *RERG is a molecular correlate of the inward-rectifying K current in clonal rat pituitary cells*. Receptors Channels 6: 19-29.
- Bauer CK, Schwarz JR (2001). *Physiology of EAG K⁺ channels*. J Membr Biol 182: 1-15. Review.
- Bianchi L, Shen Z, Dennis AT, Priori SG, Napolitano C, Ronchetti E, Bryskin R, Schwartz PJ, Brown AM (1999). *Cellular dysfunction of LQT5-minK mutants: abnormalities of IKs, IKr and trafficking in long QT syndrome*. Hum Mol Genet: 1499-507.
- Bischoff U, Schmidt C, Netzer R, Pongs O (2000). *Effects of fluoroquinolones on HERG currents*. Eur J Pharmacol 406: 341-3.

- Burgarth S (2003). *Immunzytochemische Untersuchung der funktionellen Expression von erg (ether-à-gogo related gene) Kaliumkanälen mit KCNE-Untereinheiten der Ratte in CHO-Zellen*. Med. Dissertation. Universität Hamburg.
- Brandts BK, Pott L (2000). *Kaliumströme und die Repolarisation des Herzaktionspotentials*. Physiologie 15: 10-22.
- Chouinard SW, Wilson GF, Schlimgen AK, Ganetzky B (1995). *A potassium channel beta subunit related to the aldo-keto reductase superfamily is encoded by the Drosophila hyperkinetic locus*. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 6763-7.
- Colatsky TJ, Argentieri, TM (1994). *Potassium channel blockers as antiarrhythmic drugs*. Drug Dev Res 33:235-49.
- Crociani O, Guasti L, Balzi M, Becchetti A, Wanke E, Olivotto M, Wymore RS, Arcangeli A (2003). *Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells*. J Biol Chem 278: 2947-55.
- Cui J, Melman Y, Palma E, Fishman GI, McDonald TV (2000). *Cyclic AMP regulates the HERG K(+) channel by dual pathways*. Curr Biol 10: 671-4.
- Cui J, Kagan A, Qin D, Mathew J, Melman YF, McDonald TV (2001). *Analysis of the cyclic nucleotide binding domain of the HERG potassium channel and interactions with KCNE2*. J Biol Chem 276: 17244-51.
- Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT (1995). *A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome*. Cell 80: 795-803.
- Dumaine R, Roy ML, Brown AM (1998). *Blockade of HERG and Kv1.5 by ketoconazole*. J Pharmacol Exp Ther 286: 727-35.
- Emmi A, Wenzel HJ, Schwartzkroin PA, Taglialatela M, Castaldo P, Bianchi L, Nerbonne J, Robertson GA, Janigro D (2000). *Do glia have heart? Expression and functional role for ether-a-go-go currents in hippocampal astrocytes*. J Neurosci 20: 3915-25.
- Farrelly AM, Ro S, Callaghan BP, Khoiyi MA, Fleming N, Horowitz B, Sanders KM, Keef KD (2003). *Expression and function of KCNH2 (HERG) in the human jejunum*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 284: G883-95.

- Finley MR, Li Y, Hua F, Lillich J, Mitchell KE, Ganta S, Gilmour RF Jr, Freeman LC (2002). *Expression and coassociation of ERG1, KCNQ1, and KCNE1 potassium channel proteins in horse heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283: H126-38.
- Freeman LC, Kass RS (1993). *Expression of a minimal K⁺ channel protein in mammalian cells and immunolocalization in guinea pig heart*. Circ Res 73: 968-73.
- Geelen P, Drolet B, Rail J, Berube J, Daleau P, Rousseau G, Cardinal R, O'Hara GE, Turgeon J (2000). *Sildenafil (Viagra) prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current*. Circulation 102: 275-7.
- Gourdji D, Bataille D, Vauclin N, Grouselle D, Rosselin G, Tixier-Vidal A (1979). *Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates prolactin (PRL) release and cAMP production in a rat pituitary cell line (GH3/B6). Additive effects of VIP and TRH on PRL release*. FEBS Lett 104: 165-8.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981). *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflugers Arch 391: 85-100.
- Hao LY, Kameyama A, Kameyama M (1999). *A cytoplasmic factor, calpastatin and ATP together reverse run-down of Ca²⁺ channel activity in guinea-pig heart*. J Physiol 514: 687-99.
- Haverkamp W, Haverkamp F, Breithardt G (2002). *Medikamentenbedingte QT-Verlängerung und Torsade de pointes*. Deutsches Ärzteblatt: A1972-79.
- Judd AM, Login IS, Kovacs K, Ross PC, Spangelo BL, Jarvis WD, MacLeod RM (1988). *Characterization of the MMQ cell, a prolactin-secreting clonal cell line that is responsive to dopamine*. Endocrinology 123: 2341-50.
- Kang J, Wang L, Chen XL, Triggle DJ, Rampe D (2001). *Interactions of a series of fluoroquinolone antibacterial drugs with the human cardiac K⁺ channel HERG*. Mol Pharmacol 59: 122-6.
- Kiehn J, Thomas D, Karle CA, Schols W, Kubler W (1999). *Inhibitory effects of the class III antiarrhythmic drug amiodarone on cloned HERG potassium channels*. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 359: 212-9.

- Korolkova YV, Kozlov SA, Lipkin AV, Pluzhnikov KA, Hadley JK, Filippov AK, Brown DA, Angelo K, Strobaek D, Jespersen T, Olesen SP, Jensen BS, Grishin EV (2001). *An ERG channel inhibitor from the scorpion Buthus eupeus*. J Biol Chem 276: 9868-76.
- Lecchi M, Redaelli E, Rosati B, Gurrola G, Florio T, Crociani O, Curia G, Cassulini RR, Masi A, Arcangeli A, Olivotto M, Schettini G, Possani LD, Wanke E (2002). *Isolation of a long-lasting eag-related gene-type K⁺ current in MMQ lactotrophs and its accommodating role during slow firing and prolactin release*. J Neurosci 22: 3414-25.
- Lees-Miller JP, Guo J, Somers JR, Roach DE, Sheldon RS, Rancourt DE, Duff HJ (2003). *Selective knockout of mouse ERG1 B potassium channel eliminates I(Kr) in adult ventricular myocytes and elicits episodes of abrupt sinus bradycardia*. Mol Cell Biol 23: 1856-62.
- Lillich JD, Rakestraw PC, Roussel AJ, Finley MR, Ganta S, Freeman LC (2003). *Expression of the ether-a-go-go (ERG) potassium channel in smooth muscle of the equine gastrointestinal tract and influence on activity of jejunal smooth muscle*. Am J Vet Res 64: 267-72.
- Lu Y, Mahaut-Smith MP, Huang CL, Vandenberg JI (2003). *Mutant MiRP1 subunits modulate HERG K⁺ channel gating: a mechanism for pro-arrhythmia in long QT syndrome type 6*. J Physiol 551: 253-62.
- McDonald TV, Yu Z, Ming Z, Palma E, Meyers MB, Wang KW, Goldstein SA, Fishman GI (1997). *A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr)*. Nature 388: 289-92.
- Milnes JT, Crociani O, Arcangeli A, Hancox JC, Witchel HJ (2003). *Blockade of HERG potassium currents by fluvoxamine: incomplete attenuation by S6 mutations at F656 or Y652*. Br J Pharmacol 139: 887-98.
- Mohammad S, Zhou Z, Gong Q, January CT (1997). *Blockage of the HERG human cardiac K⁺ channel by the gastrointestinal prokinetic agent cisapride*. Am J Physiol 273: H2534-8.
- Numberger M, Draguhn A (1996). *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford.
- O'Leary ME (2002). *Inhibition of HERG potassium channels by cocaethylene: a metabolite of cocaine and ethanol*. Cardiovasc Res 53: 59-67.

- Ohya S, Horowitz B, Greenwood IA (2002). *Functional and molecular identification of ERG channels in murine portal vein myocytes*. Am J Physiol Cell Physiol 283: C866-77.
- Overholt JL, Ficker E, Yang T, Shams H, Bright GR, Prabhakar NR (2000). *Chemosensing at the carotid body. Involvement of a HERG-like potassium current in glomus cells*. Adv Exp Med Biol 475: 241-8.
- Parr E, Pozo MJ, Horowitz B, Nelson MT, Mawe GM (2003). *ERG K⁺ channels modulate the electrical and contractile activities of gallbladder smooth muscle*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 284: G392-8.
- Pellequer JL, Brudler R, Getzoff ED (1999). *Biological sensors: More than one way to sense oxygen*. Curr Biol 9: R416-8. Review.
- Puck TT, Cieciora SJ, Robinson A (1958). *Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects*. J Exp Med 108: 945-56.
- Pusch M, Neher E (1988). *Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette*. Pflugers Arch 411: 204-11.
- Roden DM, Balsler JR, George AL Jr, Anderson ME (2002). *Cardiac ion channels*. Annu Rev Physiol 64: 431-75. Review.
- Rosati B, Rocchetti M, Zaza A, Wanke E (1998). *Sulfonylureas blockade of neural and cardiac HERG channels*. FEBS Lett 440: 125-30.
- Saganich MJ, Machado E, Rudy B (2001). *Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K⁺ channels in brain*. J Neurosci 21: 4609-24.
- Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK (1990). *Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents*. J Gen Physiol 96: 195-215.
- Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995). *A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel*. Cell 81: 299-307.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Spector PS, Keating MT (1996A). *Spectrum of HERG K⁺-channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia*. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 2208-12.

- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT (1996B). *Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel*. Nature 384: 80-3.
- Schäfer R, Wulfsen I, Behrens S, Weinsberg F, Bauer CK, Schwarz JR (1999). *The erg-like potassium current in rat lactotrophs*. J Physiol 518: 401-16.
- Schledermann W, Wulfsen I, Schwarz JR, Bauer CK (2001). *Modulation of rat erg1, erg2, erg3 and HERG K⁺ currents by thyrotropin-releasing hormone in anterior pituitary cells via the native signal cascade*. J Physiol 532: 143-63.
- Schroeder BC, Waldegger S, Fehr S, Bleich M, Warth R, Greger R, Jentsch TJ (2000). *A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3*. Nature 403: 196-9.
- Shi W, Wymore RS, Wang HS, Pan Z, Cohen IS, McKinnon D, Dixon JE (1997). *Identification of two nervous system-specific members of the erg potassium channel gene family*. J Neurosci 17: 9423-32.
- Shibasaki T (1987). *Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart*. J Physiol 387: 227-50.
- Simasko SM, Sankaranarayanan S (1997). *Characterization of a hyperpolarization-activated cation current in rat pituitary cells*. Am J Physiol 272: E405-14.
- Snyders DJ, Chaudhary A (1996). *High affinity open channel block by dofetilide of HERG expressed in a human cell line*. Mol Pharmacol 49: 949-55.
- Spector PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC (1996). *Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K⁺ channel. Open-channel block by methanesulfonanilides*. Circ Res 78: 499-503.
- Sternberg D, Tabti N, Fournier E, Hainque B, Fontaine B (2003). *Lack of association of the potassium channel-associated peptide MiRP2-R83H variant with periodic paralysis*. Neurology 61: 857-859.
- Suessbrich H, Waldegger S, Lang F, Busch AE (1996). *Blockade of HERG channels expressed in Xenopus oocytes by the histamine receptor antagonists terfenadine and astemizole*. FEBS Lett 385: 77-80.

- Suessbrich H, Schönherr R, Heinemann SH, Attali B, Lang F, Busch AE (1997). *The inhibitory effect of the antipsychotic drug haloperidol on HERG potassium channels expressed in Xenopus oocytes*. Br J Pharmacol 120: 968-74.
- Taglialatela M, Castaldo P, Iossa S, Pannaccione A, Fresi A, Ficker E, Annunziato L (1997). *Regulation of the human ether-a-gogo related gene (HERG) K⁺ channels by reactive oxygen species*. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 11698-703.
- Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S (1988). *Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current*. Science 242: 1042-5.
- Takumi T, Moriyoshi K, Aramori I, Ishii T, Oiki S, Okada Y, Ohkubo H, Nakanishi S (1991). *Alteration of channel activities and gating by mutations of slow ISK potassium channel*. J Biol Chem 266: 22192-8.
- Tashjian AH Jr, Yasumura Y, Levine L, Sato GH, Parker ML (1968). *Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone*. Endocrinology 82: 342-52.
- Thomas D, Gut B, Karsai S, Wimmer AB, Wu K, Wendt-Nordahl G, Zhang W, Kathofer S, Schoels W, Katus HA, Kiehn J, Karle CA (2003A). *Inhibition of cloned HERG potassium channels by the antiestrogen tamoxifen*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 368: 41-8.
- Thomas D, Wu K, Kathofer S, Katus HA, Schoels W, Kiehn J, Karle CA (2003B). *The antipsychotic drug chlorpromazine inhibits HERG potassium channels*. Br J Pharmacol 139: 567-74.
- Tie H, Walker BD, Singleton CB, Valenzuela SM, Bursill JA, Wyse KR, Breit SN, Campbell TJ (2000). *Inhibition of HERG potassium channels by the antimalarial agent halofantrine*. Br J Pharmacol 130: 1967-75.
- Tinel N, Diochot S, Lauritzen I, Barhanin J, Lazdunski M, Borsotto M (2000A). *M-type KCNQ2-KCNQ3 potassium channels are modulated by the KCNE2 subunit*. FEBS Lett 480: 137-41.
- Tinel N, Diochot S, Borsotto M, Lazdunski M, Barhanin J (2000B). *KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel*. EMBO J 19: 6326-30.

- Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA (1995). *HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family*. Science 269: 92-5.
- Volberg WA, Koci BJ, Su W, Lin J, Zhou J (2002). *Blockade of human cardiac potassium channel human ether-a-go-go-related gene (HERG) by macrolide antibiotics*. J Pharmacol Exp Ther 302: 320-7.
- Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT (1996). *Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias*. Nat Genet 12: 17-23.
- Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT (1995). *SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome*. Cell 80: 805-11.
- Warmke J, Drysdale R, Ganetzky B (1991). *A distinct potassium channel polypeptide encoded by the Drosophila eag locus*. Science 252: 1560-2.
- Warmke JW, Ganetzky B (1994). *A family of potassium channel genes related to eag in Drosophila and mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 3438-42.
- Weerapura M, Nattel S, Chartier D, Caballero R, Hebert TE (2002). *A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link?* J Physiol 540: 15-27.
- Weinsberg F, Bauer CK, Schwarz JR (1997). *The class III antiarrhythmic agent E-4031 selectively blocks the inactivating inward-rectifying potassium current in rat anterior pituitary tumor cells (GH3/B6 cells)*. Pflugers Arch 434: 1-10.
- Wilson GF, Wang Z, Chouinard SW, Griffith LC, Ganetzky B (1998). *Interaction of the K channel beta subunit, Hyperkinetic, with eag family members*. J Biol Chem 273: 6389-94.
- Wimmers S, Wulfsen I, Bauer CK, Schwarz JR (2001). *Erg1, erg2 and erg3 K channel subunits are able to form heteromultimers*. Pflugers Arch 441: 450-5.
- Wimmers S (2001). *Heteromultimerenbildung bei erg-Kaliumkanälen der Ratte (rattus norvegicus)*. Biol. Dissertation. Universität Hamburg.
- Wimmers S, Bauer CK, Schwarz JR (2002). *Biophysical properties of heteromultimeric erg K⁺ channels*. Pflugers Arch 445: 423-30.

- Wulfsen I, Hauber HP, Schiemann D, Bauer CK, Schwarz JR (2000). *Expression of mRNA for voltage-dependent and inward-rectifying K channels in GH3/B6 cells and rat pituitary*. J Neuroendocrinol 12: 263-72.
- Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J, Pan Z, Wang H, Shi W, Robinson RB, El-Maghrabi MR, Benjamin W, Dixon J, McKinnon D, Cohen IS, Wymore R (2001). *MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation*. Circ Res 88: E84-7.
- Zhang M, Jiang M, Tseng GN (2001). *minK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as beta subunit of cardiac transient outward channel?* Circ Res 88: 1012-9.
- Zhang Y, Han H, Wang J, Wang H, Yang B, Wang Z (2003). *Impairment of human ether-a-go-go-related gene (HERG) K⁺ channel function by hypoglycemia and hyperglycemia. Similar phenotypes but different mechanisms*. J Biol Chem 278: 10417-26.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, worin die Ursache für die unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften des erg-K^+ -Stroms in verschiedenen Expressionssystemen bestehen könnte.

Hintergrund und Vorarbeit dieser Untersuchungen war die Entdeckung einer neuen und bisher ungeklärten variablen Deaktivierungskinetik des mit E-4031 spezifisch pharmakologisch isolierten erg -Stroms in laktotropen Zellen der Ratte und in der MMQ-Hypophysenzelllinie (Schäfer *et al.*, 1999; Lecchi *et al.*, 2002). Der E-4031-sensitive Strom dieser Zellen besitzt eine langsam deaktivierende Komponente, die charakteristischerweise von Zelle zu Zelle unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Der E-4031-sensitive Strom in der GH_3/B_6 -Hypophysenzelllinie und der in der CHO-Zelllinie heterolog exprimierte erg1 -Strom verhalten sich anders: Auch hier gibt es diese langsam deaktivierende Stromkomponente, allerdings ist sie konstant klein. Die Hypothese war nun, dass es einen definierten Faktor geben könnte, der – expressionssystem-spezifisch – in der Lage wäre, die Deaktivierungskinetik (und eventuell auch weitere biophysikalische Eigenschaften) der erg -Kanäle zu beeinflussen.

Der erste Abschnitt dieser Arbeit beschreibt Experimente, die zu dem Ergebnis führten, dass es höchstwahrscheinlich einen membrangebundenen Faktor gibt, der in MMQ- und laktotropen Zellen vorkommt, in GH_3/B_6 - und CHO-Zellen jedoch nicht. Dieser Faktor scheint in unterschiedlichem Ausmaß funktionell aktiv zu sein und führt zu einer Verlangsamung der Deaktivierung des E-4031-sensitiven Stroms. Die Möglichkeit der Lokalisation des Faktors im Zytoplasma erscheint aufgrund der durchgeführten Experimente unwahrscheinlich.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit sind die darauffolgenden Experimente gezeigt. Aus der Literatur ergaben sich klare Hinweise für die Möglichkeit, dass insbesondere die K^+ -Kanal β -Untereinheiten aus der KCNE-Familie einen Einfluss auf das Schaltverhalten der erg -Kanäle nehmen könnten (McDonald *et al.*, 1997; Abbott *et al.*, 1999; Schroeder *et al.*, 2000). Diese Vermutung hat sich insofern nicht bestätigt, als dass der erwartete Effekt auf die Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik gänzlich ausblieb. Weder auf den erg1 -Kanal, noch auf die insbesondere im Nervensystem verbreiteten erg2 - und erg3 -Kanäle ergab sich ein klarer Effekt durch die Koexpression mit einer der KCNE1-3 β -Untereinheiten.

Als Positivkontrolle wurde der KCNQ1-Kanal verwendet, der mit den erg-Kanälen strukturell und funktionell eng verwandt ist (Brandts & Pott, 2000). Die für KCNQ1 beschriebenen Interaktionen mit den KCNE1-3 β -Untereinheiten (Tinel *et al.*, 2000B; Schroeder *et al.*, 2000) ließen sich anhand der durchgeführten Experimente vollständig reproduzieren.

Abschließend lässt sich feststellen, dass der Einfluss der KCNE β -Untereinheiten auf die Familie der erg K^+ -Kanäle nicht so groß zu sein scheint, wie bisher nach der Arbeit von Abbott *et al.* (1999) oftmals angenommen wurde. Auch für die Ausbildung der langsam deaktivierenden erg-Stromkomponente, wie sie in MMQ- und laktotropen Zellen vorkommt, sind sie höchstwahrscheinlich nicht verantwortlich.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne „Danke“ sagen. Mein Dank geht an alle, die mir – auf welche Art und Weise auch immer – helfend in Rat und Tat zur Seite gestanden haben, um diese Arbeit voranzubringen und abzuschließen.

Insbesondere danke ich:

- Herrn Prof. Dr. J. R. Schwarz dafür, dass er es mir ermöglicht und mich dabei unterstützt hat, in seiner Abteilung wissenschaftlich zu arbeiten und zu promovieren,
- Frau PD Dr. Christiane K. Bauer, Frau Dr. Wiebke Schledermann, Frau Dr. Iris Wulfen, Herrn Dr. Günter Glassmeier, Herrn Dr. Michael Hauber und Herrn Dr. Sönke Wimmers für das Einarbeiten in die Patch-Clamp-Technik sowie Hilfe in allen erdenklichen Laborlebenslagen,
- Frau Christiane Reissmann und Frau Waltraud Krüger für die Hilfe bei der Betreuung der Zellkultur,
- Herrn Dipl.-Ing. Thorsten Homfeldt für kompetente Hilfestellung in Soft- und Hardwarefragen,
- meiner Familie für lebhaftes Interesse an meiner Arbeit und für finanzielle Unterstützung,
- Jan Buchholz M.A. für seine Leidenschaft, sich als Geisteswissenschaftler für die Naturwissenschaften zu interessieren und beim Korrekturlesen behilflich zu sein,
- Kristin Maleck.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten	Jan-Hendrik Florian Buhk geboren am 26.09.1976 in Hamburg, ledig
Schulbildung	1983 - 1987 Hermann-Löns-Schule Ellerbek (Grundschule) 1987 - 1996 Johannes-Brahms-Gymnasium Pinneberg 1996 Abitur
Zivildienst	01.07.1996 - 31.07.1997, Lebenshilfe Pinneberg für Behinderte gGmbH, Werkstatt Eichenkamp
Studium	Medizinstudium in Hamburg seit 1997 Ärztliche Vorprüfung im Herbst 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Herbst 2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Frühjahr 2003 <u>Famulaturen:</u> Innere Medizin, Orthopädie/Chirurgie, Neuroradiologie, Pathologie, Neurologie <u>Praktisches Jahr:</u> 04/2003 - 08/2003: Innere Medizin Allgemeines Krankenhaus Altona 08/2003 - 12/2003: Chirurgie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf 12/2003 - 03/2004: Neuroradiologie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Promotion	2000 - 2004: experimentelle Arbeit mit dem Thema: „Einflüsse von Expressionssystem und β -Untereinheiten auf erg-Kaliumkanäle“ (Institut für Angewandte Physiologie, Universität Hamburg) 10/2000 - 06/2002: Stipendiat des DFG-Graduiertenkollegs 255 „Neurale Signaltransduktion und deren pathologische Störungen“
Sprachkenntnisse	Englisch, Norwegisch (Bokmål)
EDV-Kenntnisse	Betriebssysteme: Windows, Macintosh Programme: MS Office, SPSS SigmaPlot, CorelDraw, Adobe PhotoShop, HEKA Pulse + PulseFit

10 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und sie 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.

Hamburg, den ____ . ____ . _____

Jan-Hendrik Buhk

11 Eigene Publikationen

Buhk JH, Burgarth S, Wulfsen I, Schwarz JR, Bauer CK (2002). *Coexpression studies of erg K⁺ channel subunits with KCNE β subunits in CHO cells*. Pflugers Arch 443 Supp: 278. Abstract.

Buhk JH, Bauer CK, Schwarz JR (2002). *Erg1 current properties depend on the type of expression system*. Pflugers Arch 443 Supp: 278. Abstract.