

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie
Martinistraße 52
20246 Hamburg

Direktor:
Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

Eigenschaften des transienten Auswärtsstroms (I_{to}) in dissoziierten ventrikulären Myozyten von Wildtyp- und KChIP2- defizienten Mäusen

Dissertation

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

vorgelegt von:
Lara Katharina Heike Waldschmidt
aus Lemgo

Hamburg 2017

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27.04.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Torsten Christ

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 5 |
| 1.1 Erregungsbildung und -ausbreitung im Herzen | 5 |
| 1.2 Aktionspotentiale und Ionenströme im Herzen | 5 |
| 1.3 Der transiente Kaliumauswärtsstrom (I_{to}) und seine molekularen Korrelate..... | 7 |
| 1.4 Das KCHIP2-Knockout-Mausmodell | 9 |
| 1.5 Die Auswertung der Kaliumauswärtsströme..... | 11 |
| 1.6 Zielsetzung der Arbeit..... | 14 |
| 2. Material und Methoden | 15 |
| 2.1 Zucht, Haltung und Genotyp der verwendeten Mäuse | 15 |
| 2.2 Kardiomyozytenpräparation..... | 16 |
| 2.2.1 Präparationslösungen | 16 |
| 2.2.2 Material für Myozytenpräparation | 17 |
| 2.2.3 Ablauf der Myozytenpräparation | 18 |
| 2.3 Elektrophysiologische Messungen | 20 |
| 2.3.1 Die Patch-Clamp-Technik | 21 |
| 2.3.2 Messlösungen | 23 |
| 2.3.3 Ausstattung des Messstandes | 23 |
| 2.3.4 Ablauf des Patch-Clamp-Experiments | 25 |
| 2.3.5 Verwendete Pulsprotokolle | 26 |
| 2.4 Datenauswertung und Statistik | 29 |
| 2.4.1 Auswertung des Vorpuls-Subtraktions-Protokolls | 29 |
| 2.4.2 Auswertung des 5s-Protokolls | 30 |
| 2.4.3 Auswertung des Recovery-Protokolls | 30 |
| 2.4.4 Auswertung des variablen Vorpulsprotokolls | 31 |
| 2.4.5 Statistik | 31 |
| 3. Ergebnisse | 33 |
| 3.1 Isolierung des I_{to} durch das Vorpuls-Subtraktions-Protokoll | 33 |
| 3.1.1 I_{to} -Amplitude und -Dichte..... | 33 |
| 3.1.2 Inaktivierungskinetik der isolierten Stromkomponente..... | 35 |
| 3.2 Charakterisierung des I_{to} über die Inaktivierung des Gesamtauswärtsstroms..... | 35 |
| 3.2.1 Anwendung einer zweifach-exponentiellen Funktion | 36 |
| 3.2.2 Anwendung einer dreifach-exponentiellen Funktion | 37 |
| 3.3 Abhängigkeit des I_{to} vom KCHIP2-Genotypen | 40 |
| 3.3.1 Homozygoter KCHIP2-Knockout ($KCHIP2^{-/-}$) | 40 |

| | |
|---|----|
| 3.3.2 Quantifizierung eines Gen-Dosis-Effekts auf I_{to} anhand des heterozygoten KChIP2-Genotyps (KChIP2 ^{+/-})..... | 43 |
| 3.3.3 Die Erholung von der Inaktivierung..... | 45 |
| 3.3.4 Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung | 48 |
| 3.3.5 Zusammenfassung der Parameter für männlichen Myozyten | 49 |
| 3.4 Abhängigkeit der I_{to} -Parameter vom Geschlecht..... | 51 |
| 3.4.1 I_{to} -Parameter in weiblichen und männlichen Wildtyp-Myozyten..... | 51 |
| 3.4.1.1 I_{to} -Inaktivierungskinetik..... | 51 |
| 3.4.1.2 Die Erholung von der Inaktivierung..... | 53 |
| 3.4.1.3 Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung | 53 |
| 3.4.1.4 Zusammenfassung des Geschlechtervergleichs im Wildtyp..... | 54 |
| 3.4.2 I_{to} -Parameter in weiblichen Myozyten mit unterschiedlichem KChIP2-Genotyp | 55 |
| 3.4.2.1 I_{to} -Inaktivierungskinetik..... | 55 |
| 3.4.2.2 Die Erholung von der Inaktivierung..... | 58 |
| 3.4.2.3 Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung | 59 |
| 3.4.2.4 Zusammenfassung der Parameter für weibliche Myozyten | 59 |
| 4. Diskussion..... | 61 |
| 4.1 Vergleich der Auswertemethoden für I_{to} | 61 |
| 4.2 Einfluss des KChIP2-Genotyps auf I_{to} | 65 |
| 4.3 Einfluss des Geschlechts auf I_{to} | 70 |
| 4.4 Klinischer Bezug und Ausblick | 73 |
| 5. Zusammenfassung..... | 77 |
| 5.1 Abstract | 78 |
| 6. Literaturverzeichnis | 79 |
| 6.1 Veröffentlichungen..... | 84 |
| 7. Anhang..... | 85 |
| 7.1 Abkürzungsverzeichnis..... | 85 |
| 8. Danksagung | 86 |
| 9. Lebenslauf..... | 87 |
| 10. Eidesstattliche Versicherung..... | 88 |

1. Einleitung

1.1 Erregungsbildung und -ausbreitung im Herzen

Die Kontraktion des Herzens wird durch ein genau abgestimmtes System aus Erregungsbildung und Erregungsausbreitung ausgelöst. Eine gleichmäßige Kontraktion ist essenziell für die Pumpfunktion des Herzens. An der Ausbildung und Weiterleitung einer Erregung sind spezialisierte und autonome Herzmuskelfasern beteiligt. Die der Herzaktion zugrunde liegende Erregungsform ist das Herzaktionspotential. Die Entstehung einer Erregung findet normalerweise im Sinusknoten, dem Schrittmacher des Herzens, statt. Der Sinusknoten befindet sich im rechten Vorhof zwischen der oberen Hohlvene und dem rechten Herzohr. Nach der Ausbreitung der Erregung über die beiden Vorhöfe erreicht sie über den Atrioventrikular-Knoten (AV-Knoten) die beiden Kammern. Der AV-Knoten hat zusätzlich die Funktion, die Erregung zu verzögern; so kann eine koordinierte Kontraktion - zuerst in den Vorhöfen und anschließend in den Kammern - gewährleistet werden. Außerdem dient der AV-Knoten als Frequenzfilter, damit das Ventrikelmyokard vor zu hohen Vorhof-Frequenzen geschützt wird. Im Anschluss an den AV-Knoten folgt das spezifische Erregungsleitungssystem in Form des His'schen-Bündels und des rechten und linken Kammerschenkels. Die Endaufzweigung des Erregungsleitungssystems sind die Purkinje-Fasern, welche eine schnelle Weiterleitung der Erregung auf das Arbeitsmyokard gewährleisten. Die Kontraktion des Myokards als Folge der elektrischen Erregung folgt ebenso einem festgelegten Schema. Sie breitet sich beginnend von endo- nach epikardial und von der Herzspitze (Apex) zur Basis hin aus.

1.2 Aktionspotentiale und Ionenströme im Herzen

Das vom Sinusknoten ausgehende Schrittmacherpotential besitzt kein konstantes Ruhepotential, da schon bei einer Repolarisation auf -60mV ein früher Na^+ -Einstrom aktiviert wird, welcher die weitere Depolarisation bis ca. -50mV erreicht. Von diesem Potential aus wird der Ca^{2+} -Einstrom aktiviert, zunächst durch T-Typ- und danach L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, welcher die Depolarisation über den Nullwert hinaus (*Overshoot*) fortsetzt. Die Repolarisation erfolgt durch einen K^+ -Ausstrom. Das Aktionspotential des Arbeitsmyokards (Vorhöfe bzw. Ventrikel) unterscheidet sich in seiner Form vom Schrittmacherpotential. Im Folgenden werden die Phasen des Aktionspotentials im Ventrikelmyokard erläutert.

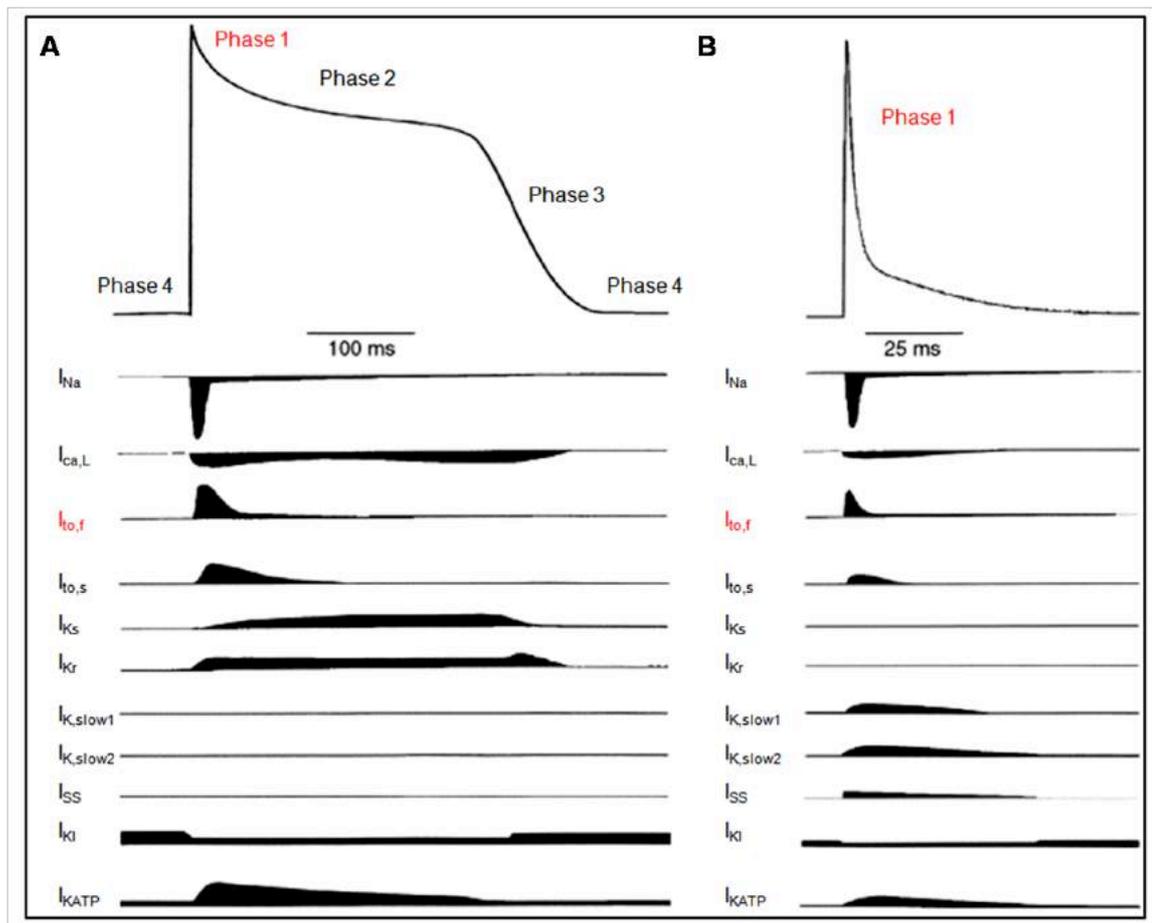


Abbildung 1: Aktionspotential des Ventrikelsmyokards von Mensch und Maus. A. Humanes Aktionspotential des Arbeitsmyokards; dargestellt sind die Phasen des Aktionspotentials mit dazugehörigen Ionenströmen. B. Murines Herzaktionspotential mit dazugehörigen Stromkomponenten (modifiziert nach (Nerbonne 2004). Erläuterungen im Text.

Das Aktionspotential des Ventrikelsmyokards beim Menschen lässt sich in fünf Phasen unterteilen (Abb. 1A), die durch verschiedene Ionenströme vermittelt werden. Ausgehend von einem Ruhemembranpotential von ca. -90mV (Phase 4) wird durch einen schnellen Na^+ -Einstrom (I_{Na}) eine rasche Depolarisation bis hin zum *Overshoot* auf ungefähr $+30\text{mV}$ erreicht (Phase 0). Danach folgt die Repolarisation, die sich in drei Phasen unterteilen lässt. In der initialen Phase (Phase 1) finden drei Vorgänge statt: die in Phase 0 aktivierten Na^+ -Kanäle inaktivieren, der L-Typ Ca^{2+} -Strom ($I_{\text{Ca,L}}$), der bedeutendste depolarisierende Strom in Phase 1 und 2, wird aktiviert und es kommt zu einer Aktivierung des transienten Kaliumauswärtsstrom I_{to} (mit zwei Komponenten $I_{\text{to,f}}$ und $I_{\text{to,s}}$; siehe unten). Die zweite Phase der Repolarisation im menschlichen Myokard ist durch ein Plateau gekennzeichnet, welches vor allem durch den langen Ca^{2+} -Einwärtsstrom ($I_{\text{Ca,L}}$) vermittelt wird. Die Höhe dieses Plateaus wird nicht nur von $I_{\text{Ca,L}}$, sondern auch von I_{to} bestimmt. Die Plateauphase ist für das Ventrikelsmyokard des Menschen von besonderer Bedeutung. In der kardiovaskulären Forschung kommen oft Mausmodelle zum Einsatz, obwohl die Aktionspotentiale im Ventrikelsmyokard von

Mäusen anders aussehen als beim Menschen. Die Plateauphase ist im Myokard der Maus schwächer ausgeprägt (Abb. 1B). Denn dort spielt die Repolarisation durch den I_{to} eine sehr viel größere Rolle. Die anschließende und letzte Phase der Repolarisation ist die Phase 3. Sie wird im menschlichen Ventrikelmyokard durch den Kaliumauswärtsstrom I_K , welcher sich aus unterschiedlichen Komponenten zusammensetzt (I_{Kr} und I_{Ks} ; Abb 1A), vermittelt. Im murinen Ventrikelmyokard wird die Rolle von I_{Kr} und I_{Ks} durch die Komponenten $I_{K,slow1}$ und $I_{K,slow2}$ übernommen (Abb. 1B). Anschließend folgt wieder die Ruhephase (Phase 4), die hauptsächlich durch den einwärts rektifizierenden Kaliumstrom I_{K1} vermittelt wird (Nerbonne 2004).

1.3 Der transiente Kaliumauswärtsstrom (I_{to}) und seine molekularen Korrelate

Das molekulare Korrelat des I_{to} wird durch einen spannungsgesteuerten Kalium(Kv)-Kanal gebildet („v“ für voltage). Die Familie der Kv-Kanäle ist die größte innerhalb der kaliumselektiven Ionenkanäle. Das Charakteristikum dieser Kanäle ist, dass sie durch Membrandepolarisierung aktiviert werden. Durch die Klonierung des *Shaker*-Kanals aus *Drosophila melanogaster*, zur Familie der Taefliegen gehörend, konnten die Kv-Kanäle charakterisiert werden. Der *Shaker*-Kanal (Kv1) war der erste dieser Kanäle, der in einer *Drosophila* Mutante entdeckt wurde (Tempel *et al.* 1987; Kamb *et al.* 1988; Pongs *et al.* 1988). Weitere Gene, die in ihrer Sequenz ähnlich sind, wurden ebenfalls in *Drosophila* gefunden und beinhalteten die Isoformen Kv2 (*Shab*), Kv3 (*Shaw*) und Kv4 (*Shal*), die größtenteils homolog zu den humanen und murinen Kv-Kanälen sind (Baldwin *et al.* 1991; Pak *et al.* 1991; Salkoff *et al.* 1992). Später hat man weitere Isoformen gefunden, sodass nun zwölf Unterklassen (Kv1-Kv12; (Gutman *et al.* 2005)) zu dieser Gruppe gehören.

Der I_{to} wird in der neueren Literatur meistens in zwei Komponenten aufgeteilt: $I_{to,f}$ (fast, schnell) und $I_{to,s}$ (slow, langsam). Diese beiden Komponenten aktivieren und inaktivieren beide schnell, unterscheiden sich aber vor allem in der Dauer der Erholung von der Inaktivierung. Verantwortlich für den $I_{to,f}$ im Herzen ist die Untergruppe Kv4 (Dixon and McKinnon 1994; Fiset *et al.* 1997; Johns *et al.* 1997; Nakamura *et al.* 1997), die aus drei Subgruppen besteht (Kv4.1, Kv4.2 und Kv4.3, mit zwei Spleißvarianten Kv4.3L und Kv4.3S; (Serodio and Rudy 1998; Isbrandt *et al.* 2000). Eine physiologische Relevanz haben die Kv4-Kanäle im Herzen und im Gehirn. Im Ventrikelmyokard aller Spezies werden als molekulares Korrelat für $I_{to,f}$ die Subklassen Kv4.2 und Kv4.3 angenommen. Wohingegen das Korrelat für $I_{to,s}$ durch die Subklasse Kv1.4 beschrieben wird (Nerbonne 2000; Bassani 2006). Wie alle Kv-Kanäle bestehen die Kv4-Kanäle aus vier porenbildenden α -Untereinheiten und akzessorischen β -Untereinheiten. Eine Kv4- α -

Untereinheit besteht aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und besitzt einen zytoplasmatischen N- und C-Terminus. Der Spannungssensor wird durch positiv geladene Aminosäuren in der Domäne S4 gebildet (Abb. 2A). Über die T-Domäne, die sich am N-Terminus befindet, lagern sich vier Kv4- α -Untereinheiten zusammen. Der Kv4-Kanal kann vier β -Untereinheiten aus der Familie der *K channel interacting proteins* (KChIPs) binden (Abb. 2B+C). KChIPs sind kleine intrazellulär liegende Proteine, die zur Gruppe der Neuronalen Calcium Sensoren (NCS) gehören (An *et al.* 2000). Die NCS-Proteine bilden eine Gruppe von molekularen Calcium-abhängigen Schaltproteinen. Von den insgesamt vier Gengruppen und 16 Isoformen der KChIPs spielen im Herzen nur die KChIP2-Isoformen eine Rolle (An *et al.* 2000; Holmqvist *et al.* 2002; Burgoyne 2007). Die KChIP2-Unterformen besitzen vier EF-Hand-Motive und können drei Calcium-Ionen binden (An *et al.* 2000; Burgoyne and Weiss 2001). Es sind verschiedene Spleißvarianten von KChIP2 bekannt (KChIP2 a-f; Kuo *et al.* 2001; Decher *et al.* 2004; Patel *et al.* 2004) von denen vor allem die Isoformen KChIP2a und KChIP2b im Ventrikel des murinen Herzens vorkommen (Kuo *et al.* 2001).

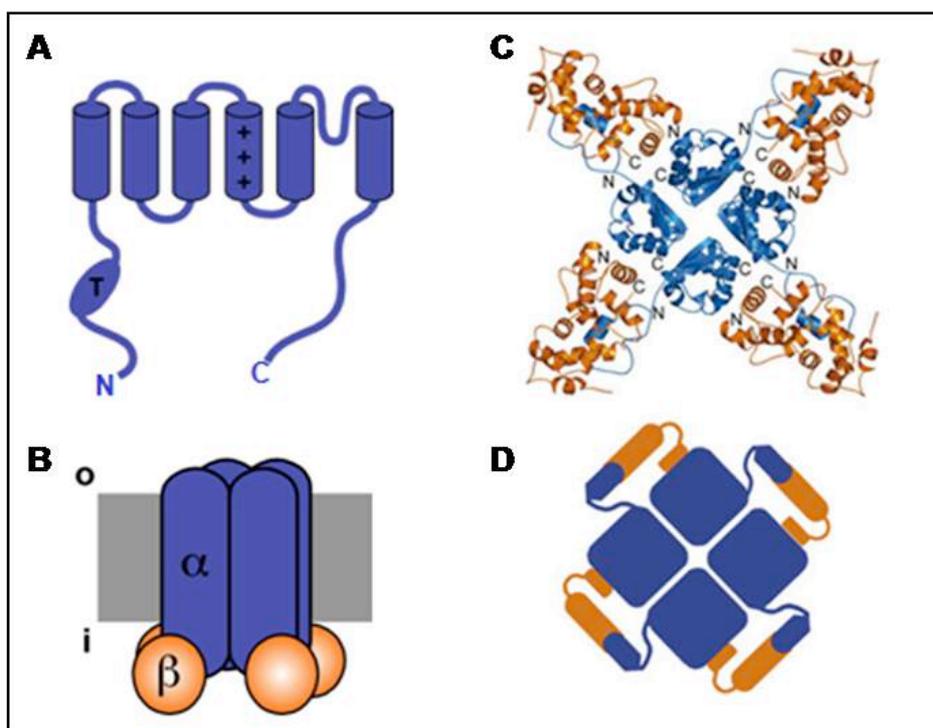


Abbildung 2: Der Kv4/KChIP-Kanalkomplex. A. Sechs Transmembrandomänen der α -Untereinheit; das N- und C-terminale Ende liegen intrazellulär. B. Anordnung der Untereinheiten zur Kanalpore (o=extrazellulär; i=intrazellulär). C. Kristallstruktur eines oktameren Kv4.3/KChIP1-Komplexes (Aufsicht). D. Schematische Darstellung von C. (Wang *et al.* 2007)

Es konnte in heterologen Zellen gezeigt werden, dass KChIP2 die Kv4- Kanalexpression in der Plasmamembran stimuliert (An *et al.* 2000; Bähring *et al.* 2001; Foeger *et al.* 2010) und die Kinetik der Ströme verändert. In elektrophysiologischen Messungen

wurde bei Koexpression von KChIP2 ein deutlicher Anstieg der Stromdichte des Kv4-Stroms festgestellt (Bähring *et al.* 2001). Es konnten ebenso ein verlangsamtes Einsetzen der makroskopischen Inaktivierung, eine beschleunigte Erholung von der Inaktivierung und eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu positiveren Werten festgestellt werden (Bähring *et al.* 2001). Außerdem ist bekannt, dass der I_{to} -Gradient zwischen Epi- und Endokard im linken Ventrikel (unter anderem) des Menschen (LV epi > LV endo) nicht mit der Kv4.3 mRNA-Expression korreliert, sondern mit der von KChIP2 (Rosati *et al.* 2001; Patel and Campbell 2005; Teutsch *et al.* 2007). In linken Ventrikel von Mäusen ist der I_{to} -Gradient hingegen auf die heterogene Expression von Kv4.2 bei gleichmäßiger KChIP2-Verteilung zurückzuführen (Patel and Campbell 2005).

Da die Bedeutung von I_{to} vor allem darin besteht, das Membranpotential in der frühen Phase der Repolarisation zu setzen, bei dem der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle beginnt, hat I_{to} einen herausragenden Einfluss sowohl auf die Dauer des Aktionspotentials als auch auf die elektro-mechanische Kopplung im Herzen.

Die Tatsache, dass in den meisten Spezies ein transmuraler Gradient von I_{to} in der freien ventrikulären Wand besteht und dieser Gradient mit KChIP2 und nicht mit der mRNA-Menge von Kv4 korreliert, führt zu der Schlussfolgerung, dass KChIP2 in bedeutender Weise an der Kanalexpression von Kv4.2 und seiner Stabilität in der Membran beteiligt ist (siehe oben).

1.4 Das KChIP2-Knockout-Mausmodell

Eine weitere Beobachtung führte zu der Schlussfolgerung, dass KChIP2 eine essenzielle Rolle in der Ausbildung des nativen I_{to} im Herzen spielt: Es wurde berichtet, dass in KChIP2-Knockout-Mäusen ($KChIP2^{-/-}$) der Verlust von KChIP2 zu einem selektiven und vollständigen Verlust des I_{to} im Herzen führt (Kuo *et al.* 2001; Thomsen *et al.* 2009). Des Weiteren wurde publiziert, dass in heterozygoten Mäusen ($KChIP2^{+/-}$) eine fünfzig-prozentige Reduktion des I_{to} -Stroms vorliegt (Kuo *et al.* 2001). Dies deutet an, dass KChIP2 einen quantitativen Einfluss auf die Regulierung von I_{to} hat und somit ein Gen-Dosis-Effekt vorliegen könnte.

Das Fehlen von KChIP2, und somit von I_{to} , führe zu einer signifikanten Reduktion der Peakamplitude des Gesamtauswärtsstroms in den $KChIP2^{-/-}$ -Myozyten sowie zu einer verlangsamten Inaktivierungszeitkonstante der schnellen, ersten Komponente des Gesamtauswärtsstroms (Foeger *et al.* 2013). Ebenso sei die Recovery-Zeitkonstante der

ersten Stromkomponente signifikant langsamer in KChIP2^{-/-}-Myozyten (Foeger *et al.* 2013; Grubb *et al.* 2014). Kontrovers diskutiert wird die These, dass die Aktionspotentialdauer (APD) in KChIP2^{-/-}-Myozyten verlängert und die Anfälligkeit für ventrikuläre Tachykardien durch das Fehlen von I_{to} erhöht seien. Kuo *et al.* (2001) haben in KChIP2^{-/-}-Mäusen einen vollständigen Verlust von I_{to}, eine verlängerte APD und eine erhöhte Induzierbarkeit von ventrikulären Tachykardien beschrieben. Nach Provokation durch elektrische Stimulation zeigten diese Mäuse *Torsades de pointes*-ähnliche Tachykardien (Kuo *et al.* 2001). In diesen Knockout-Mäusen wurde eine signifikant verlängerte ST-Strecke festgestellt, welche möglicherweise Ursache der erhöhten Anfälligkeit für tachykarde Arrhythmien sein kann (Kuo *et al.* 2001). Foeger *et al.* (2013) beobachteten hingegen keine längere APD in KChIP2^{-/-}-Mäusen, da elektromechanisches Remodeling zu einem Erhalt des physiologischen Herzaktionspotentials führe. Interessanterweise lagen bei den I_{to}-defizienten Mäusen keine morphologischen Veränderungen am Herzen vor (Barry *et al.* 1998; Kuo *et al.* 2001).

Es gibt außerdem verschiedene Meinungen darüber, durch welche Mechanismen in KChIP2^{-/-}-Myozyten der Verlust von I_{to} ausgeglichen wird. Thomsen *et al.* (2009) haben beschrieben, dass der Verlust von I_{to,f} durch eine Erhöhung von I_{K,slow} ausgeglichen wird. Hingegen gehen Foeger *et al.* (2013) von einer Kompensation durch Hochregulierung von I_{to,s} aus. Grubb *et al.* (2014) beobachteten dagegen eine Hochregulierung von beiden, sowohl I_{to,s} als auch I_{Kur} (I_{K,slow1}).

1.5 Die Auswertung der Kaliumauswärtsströme

Die Isolierung nur einer bestimmten K^+ -Stromkomponente bei Messungen an nativen Myozyten stellt eine Herausforderung dar. Im Falle des I_{to} macht man sich dabei zunutze, dass die Stromantwort bei starker Depolarisation (z.B. +40 mV) eine vollständige Inaktivierung zeigt.

In der Literatur wurden für die Isolierung des I_{to} aus dem Gesamtauswärtsstrom der ventrikulären Kardiomyozyten unterschiedliche Auswertemethoden beschrieben: Die drei gängigsten sind die Vorpuls-Subtraktions-Methode, die Anwendung einer dreifach-exponentiellen Funktion und die Anwendung einer zweifach-exponentiellen Funktion. Es zeigte sich in der Vergangenheit, dass verschiedene Auswertemethoden die I_{to} -Eigenschaften unterschiedlich darstellen.

Bei der Verwendung der Vorpuls-Subtraktions-Methode werden zwei aufeinanderfolgende Testpulse appliziert, wobei einem der beiden Testpulse ein inaktivierender Vorpuls vorausgeht. Man macht sich bei dieser Methode zunutze, dass I_{to} durch einen ausreichend langen Vorpuls auf -40mV vollständig inaktiviert. Der erste Testpuls bildet den Gesamtauswärtsstrom ab. Der zweite Testpuls, mit einem Vorpuls auf -40mV, bildet den Auswärtsstrom, abzüglich des I_{to} , ab. Nach Verrechnung der beiden Protokolle erhält man die isolierte I_{to} -Komponente (siehe auch Material und Methoden, 2.3.5.1). Bei der Auswertung der Vorpuls-Subtraktions-Protokolle wurden in der Literatur verschiedene Vorpulsdauern angewendet (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung verschiedener Puls-Potentiale und -Dauern in der Literatur, sowie den daraus resultierenden Stromdichten und Zeitkonstanten der Inaktivierung für I_{to} . X bedeutet, dass kein Vorpuls angewendet wurde. I_{to} -Werte sind angegeben als Mittelwert (ohne Standardabweichung) für männliche (M) bzw. weibliche (W) linksventrikuläre KChIP2^{+/+}-Myozyten.

| Veröffentlichung (Erstautor) | Publikationsjahr | Haltepotential [mV] | Vorpuls-Potential [mV] | Vorpuls-Dauer [ms] | Testpuls-Potential [mV] | I_{to} -Dichte M [pA/pF] | I_{to} -Dichte W [pA/pF] | $\tau_{inact} I_{to}$ [ms] |
|------------------------------|------------------|---------------------|------------------------|--------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Vorpuls-Subtraktion: | | | | | | | | |
| Tozakidou | 2009 | -80 | -40 | 120 | +40 | 25.0* | | 52 |
| Brouillette | 2004 | -80 | -40 | 100 | +30 | 35.0 | | 28 |
| Kuo | 2001 | -80 | -40 | 75 | +30 | 25.7 | | X |
| Trépanier-Boulay | 2001 | -80 | -40 | 100 | +50 | 28.9 | 23.6 | X |
| 2-fach-exponentiell: | | | | | | | | |
| Foeger | 2013 | -70 | X | X | +40 | 24.7 | | 78 |
| Thomsen | 2009 | -70 | -20** | 25** | +40 | 9 | | 198 |
| Marionneau | 2008 | -70 | X | X | +40 | 27.1* | | 84 |
| Guo | 2005 | -70 | X | X | +40 | 31.5 | | 72 |
| Brunet | 2004 | -70 | X | X | +40 | 35.0 | 30.1 | 73(M)/ 76(W) |
| Guo | 1999 | -70 | -20** | 25** | +40 | 34.5 | | X |
| 3-fach-exponentiell: | | | | | | | | |
| Liu | 2011 | -80 | X | X | +60 | 24.2 | | 54 |
| Liu | 2015 | -80 | X | X | +60 | 28.4 | | 58 |

*Sham chronic

** um Na⁺-Kanäle zu inaktivieren

Der Gesamtauswärtsstrom zeigt eine multiexponentielle Inaktivierung, die Idee ist, dass eine dieser Komponenten I_{to} ist. Um die verschiedenen Komponenten des Stroms vollständig darstellen zu können, wendet man einen langen, depolarisierenden Puls an. In der Literatur wurden Pulsdauern zwischen 4 und 5 Sekunden (Xu *et al.* 1999; Zhou *et al.* 2003; Costantini *et al.* 2005; Guo *et al.* 2005; Niwa *et al.* 2008; Thomsen *et al.* 2009; Haim *et al.* 2010) und 20 Sekunden beschrieben (Liu *et al.* 2011). Durch einen mehrfach-exponentiellen Fit kann über die Amplitude der schnellen Zeitkonstante der Inaktivierung (τ_1) die I_{to} -Komponente isoliert werden (siehe auch Material und Methoden, 2.3.5.2 und 2.4.2). Es wurden in der Literatur sowohl zweifach- als auch dreifach-exponentielle Funktionen angewendet. Die Anwendung einer zweifach-exponentiellen Funktion wurde für die Charakterisierung von Kaliumauswärtsströmen in linksventrikulären Myozyten vom Wildtyp und $Kv4.2^{-/-}$ mehrfach verwendet (Guo *et al.* 1999; Xu *et al.* 1999; Brunet *et al.* 2004; Guo *et al.* 2005). In jüngster Literatur wurde diese Auswertemethode auch für die Verwendung in linksventrikulären $KChIP2^{-/-}$ -Zellen bei Raumtemperatur beschrieben (Foeger *et al.* 2013). In Wildtyp-Zellen wird beschrieben, dass der Amplitude von τ_1 $I_{to,f}$ zugeordnet werden könne und der Amplitude von τ_2 $I_{K,slow}$. In $KChIP2^{-/-}$ -Zellen dagegen könne der Amplitude von τ_1 $I_{to,s}$ zugeordnet werden und der Amplitude von τ_2 $I_{K,slow}$ (Foeger *et al.* 2013).

Die Anwendung einer dreifach-exponentiellen Funktion geht von mindestens drei Stromkomponenten aus. Die Anwendung dieser Methode ist bisher vor allem für interventrikuläre Septumzellen von Wildtyp-Myozyten gängig (Xu *et al.* 1999; Brunet *et al.* 2004; Foeger *et al.* 2013). Die Aufteilung der Komponenten von Septumzellen wird so beschrieben, dass bei Vorhandensein von $I_{to,f}$, der Amplitude von τ_1 die Komponente $I_{to,f}$, der Amplitude von τ_2 die Komponente $I_{to,s}$ und der Amplitude von τ_3 $I_{K,slow}$ zugeordnet werden kann (Brunet *et al.* 2004; Foeger *et al.* 2013). Anderen Überzeugungen nach können auch die linksventrikulären Myozyten durch eine dreifach exponentielle Funktion beschrieben werden. Dann spiegeln die einzelnen Funktionsanteile am ehesten die Komponente $I_{to,f}$ (oder $I_{to,s}$ bei $KChIP2^{-/-}$ -Myozyten) und die zwei Komponenten $I_{K,slow1}$ und $I_{K,slow2}$ wider (Liu *et al.* 2011; Foeger *et al.* 2013). Bisher wurde diese Methode vor allem für 20s-lange Pulse verwendet.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

(1) In dieser Arbeit sollten die Eigenschaften des transienten Kaliumauswärtsstroms ($I_{to,f}$) in linksventrikulären Myozyten der Maus durch die Anwendung der verschiedenen in der Literatur beschriebenen Auswertemethoden erarbeitet werden. Nach systematischem Vergleich der drei am meisten angewendeten Methoden, dem Vorpuls-Subtraktions-Protokoll und dem zwei- bzw. dreifach-exponentiellen Fit, sollte die am besten geeignete Auswertemethode als Grundlage für die weiteren Untersuchungen herangezogen werden.

(2) Zur Untersuchung der Abhängigkeit des $I_{to,f}$ vom KChIP2-Genotyp wurden die drei möglichen Genotypen ($KChIP2^{+/+}$, $KChIP2^{+/-}$, $KChIP2^{-/-}$) in einem Mausmodell verwendet. Dabei wurde besonderer Wert auf die Eigenschaften des $I_{to,f}$ in $KChIP2^{+/-}$ gelegt, da dies der am wenigsten untersuchte Genotyp ist. Des Weiteren sollte ein möglicher Gen-Dosis-Effekt von KChIP2 auf $I_{to,f}$ untersucht werden.

(3) In der Literatur wurden zur Untersuchung des $I_{to,f}$ in der Regel männliche Mäuse verwendet. In der vorliegenden Arbeit sollten auch die Eigenschaften des $I_{to,f}$ in Myozyten aus weiblichen Mäusen untersucht werden, um einen geschlechtsabhängigen Effekt von KChIP2 zu überprüfen.

2. Material und Methoden

2.1 Zucht, Haltung und Genotyp der verwendeten Mäuse

Für diese Arbeit wurden zehn bis zwölf Wochen alte C57BL/6-Mäuse aus der Zentralen Forschungstierhaltung (FTH) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) verwendet. Die Versorgung der Tiere wurde durch das Fachpersonal der FTH gewährleistet. Die FTH ist durch das Gesetz zum Europäischen Übereinkommen vom 18. März 1986 und durch die EU-Richtlinien EWG geregelt. Die Haltung erfolgte artgerecht bei 25°C Raumtemperatur sowie einem Hell-Dunkel-Zyklus von jeweils zwölf Stunden. Es war stets freier Zugang zu Wasser und Futter gewährleistet.

Die KChIP2^{-/-}-Mäuse für die Initialisierung der Zucht wurden von Morten B. Thomsen vom *Danish Arrhythmia Research Centre (DARC)* der Universität Kopenhagen bereitgestellt. Sie stammen ursprünglich von Dr. Masahiko Hoshijima (University of California, San Diego, California) und Dr. Kenneth Chien (Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts). Zur Zucht eigener Mäuse mit KChIP2-defizientem Genotyp wurden zu Beginn Wildtyp und KChIP2^{-/-}-Mäuse verwendet, wodurch die Zucht der drei Genotypen KChIP2^{+/+}, KChIP2^{+/-} und KChIP2^{-/-} gelang. Die Genotypisierung wurde durch die Zentrale Tierhaltung des UKE aus der Schwanzspitze durchgeführt und wurde nach Verwendung der Mäuse im Experiment durch eine Typisierung aus einem Ohrstück wiederholt. Bei der Myozytenpräparation aus Mäuseherzen handelte es sich um eine „Tötung mit Organentnahme“ nach §4 des Tierschutzgesetzes (Organentnahme-Nummer der Stadt Hamburg: ORG 349).

2.2 Kardiomyozytenpräparation

2.2.1 Präparationslösungen

| | | |
|-----------------------|-----------------------------------|--|
| Stocklösungen | 10 mM CaCl ₂ -Lsg. | 10 mM CaCl ₂ |
| | 100 mM CaCl ₂ -Lsg. | 100 mM CaCl ₂ |
| Pufferlösungen | Perfusionspuffer | 113 mM NaCl |
| | | 4,7 mM KCl |
| | | 0,6 mM KH ₂ PO ₄ |
| | | 0,6 mM Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O |
| | | 1,2 mM MgSO ₄ -7 H ₂ O |
| | | 12 mM NaHCO ₃ |
| | | 10 mM KHCO ₃ |
| | | 10 mM HEPES |
| | | 30 mM Taurin |
| | | pH 7,46 mit NaOH |
| | Perfusionspuffer, aufgefrischt | Zugabe von 5,5 mM Glucose |
| | Digestionspuffer | 35 ml Perfusionspuffer mit 2,5 mg Liberase TH Research Grade (Roche, Schweiz) |
| | Stop1-Lösung | 12,5 µl der 10 mM CaCl ₂ -Stocklösung und 2 ml FCS (<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum) in 20 ml Perfusionspuffer |
| | Stop2-Lösung | 12,5 µl der 10 mM CaCl ₂ -Stocklösung und 1 ml FCS in 20 ml Perfusionspuffer |

2.2.2 Material für Myozytenpräparation

- Wecker
- Kork-Unterlage
- Stereomikroskop
- drei Präparationsnadeln
- Präparationsbesteck:
 - große Schere
 - kleine Schere
 - zwei gebogene Pinzetten (stumpf und spitz, Größe 7)
 - zwei feine Pinzetten (Größe 5)
 - zwei extra feine Pinzetten (Größe 5SF)
 - feine Pinzettenschere
- Bindfaden mit Knotenansatz
- Elektrische Pipettierhilfe mit 25 ml und 2 ml Einwegpipetten
- Manuelle Pipettierhilfen (2-20 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l) mit autoklavierten Pipettenspitzen (1000 μ l und 100 μ l)
- Pasteurpipette mit Gummibalg
- ein 15 ml und zwei 50 ml Reaktionsgefäße
- 35 mm \varnothing Kulturschälchen
- Präparationskanüle (abgeschnitten und stumpf)
- Dreiwegehahn
- Petrischale mit Knetmasse
- Wärmebad mit Umlaufpumpe
- Peristaltikpumpe
- Langendorff-Apparatur

2.2.3 Ablauf der Myozytenpräparation

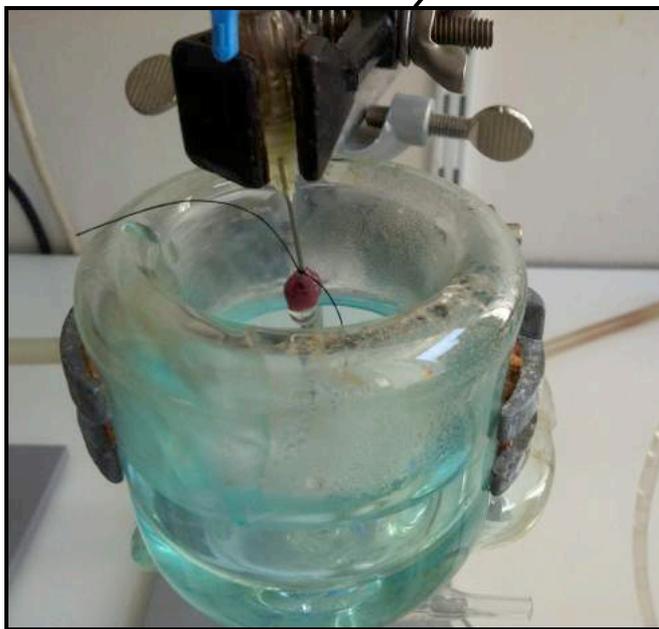
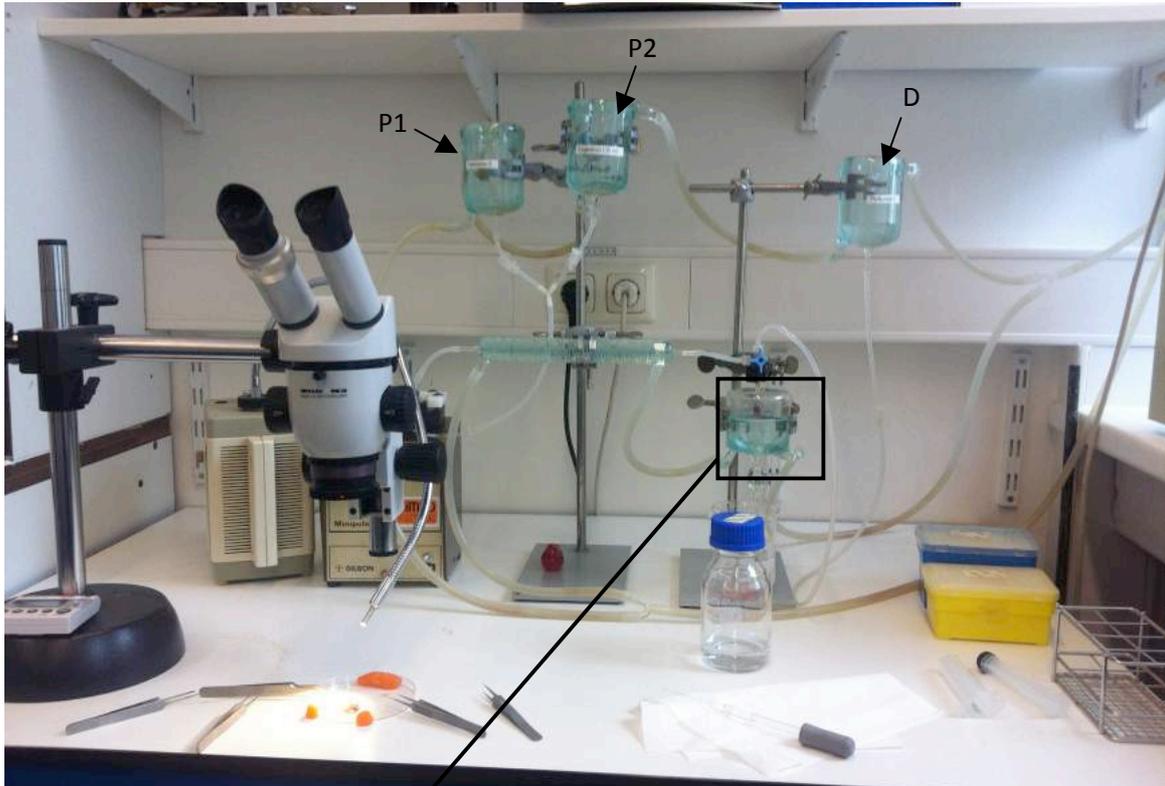


Abbildung 3: Die Langendorff-Apparatur und ihre Komponenten

Oben: Langendorff-Apparatur zentral im Hintergrund, links im Vordergrund das Mikroskop zur Präparation der Aorta und zur Entnahme der epikardialen Zellschicht. Bestandteile der Langendorff-Apparatur: P1: Perfusion 1, P2: Perfusion 2, D: Digestion. **Links:** Nahaufnahme der Halterung für das Mäuseherz.

Versuchsvorbereitung

Vor der Präparation wurden die benötigten Lösungen vorbereitet. Dafür wurden 250 ml Perfusions-Puffer wie oben beschrieben mit 248 mg Glucose (5,5 mM) aufgefrischt. Von dem aufgefrischten Perfusions-Puffer wurden je 20 ml in die zwei 50 ml Reaktionsgefäße gegeben und die Gefäße mit „Stop1“ und „Stop2“ beschriftet. Zu den

Lösungen „Stop1“ und „Stop2“ wurden außerdem 12,5 µl der 10 mM CaCl₂-Stocklösung, sowie FCS in unterschiedlichen Mengen hinzugegeben.

Ablauf der Präparation

Vor der Benutzung wurde die Langendorff-Apparatur mit destilliertem Wasser gespült, die Peristaltikpumpe mit Heizung wurde auf 37°C eingestellt und angeschaltet. Daraufhin wurde der Behälter „Perfusion 2“ mit aufgefrischem Perfusionspuffer gefüllt. Währenddessen war die Schlauchklemme für den Behälter „Digestion“ geschlossen. Die Peristaltikpumpe wurde auf 680 U/min eingestellt, das Ventil „Digestion“ wurde kurz geöffnet, bis der Puffer bis zum Grund des Behälters aufgestiegen war. Danach wurde das Ventil wieder zugezogen. Nun wurden 35 ml des Perfusionspuffers in den Behälter „Digestion“ gegeben. Der Behälter „Perfusion 1“, an dem die Kanüle für die Aorta angeschlossen war, wurde ebenso mit ca. 20 ml Perfusionspuffer gefüllt. Daraufhin wurde das Ventil geöffnet und so viel Puffer in das System gefüllt, bis Schlauch und Präparationskanüle luftfrei mit dem Puffer gefüllt waren. Die Kanüle wurde in die Petrischale mit Knetmasse gelegt und in der Knetmasse festgedrückt, um späteres Verrutschen zu verhindern. Der vorbereitete Bindfaden mit Knotenansatz wurde um die Kanüle gelegt. Der Puffer aus dem Behälter „Perfusion 2“ lief solange durch das gesamte System der Langendorff-Apparatur bis alle Schläuche restlos mit Puffer gefüllt waren. Die Pumpe wurde nun ausgestellt und es wurde mit der Präparation begonnen.

Die Maus wurde mittels Isofluran-Narkose betäubt und in tiefer Anästhesie dekapitiert. Der Körper wurde anschließend auf der Korkunterlage befestigt. Daraufhin wurde der Thorax mit einer kleinen gebogenen Schere eröffnet, nach oben geklappt und mit einer Präparationsnadel befestigt. Unter dem Stereomikroskop wurde nun mit den feinen Pinzetten der Thymus entfernt und die Aorta freipräpariert. Im nächsten Schritt wurde die Aorta möglichst weit vom Herzen mit der feinen Pinzettenschere gerade durchtrennt. Es wurden alle übrigen Gefäße vom Herzen mit der feinen Pinzette vorsichtig entfernt. Das Herz wurde nun in die vorbereitete Petrischale mit der Kanüle gelegt. Um das Austrocknen des Herzens zu vermeiden, wurde etwas Perfusionspuffer über das Herz gegeben. Es wurde unter dem Mikroskop sichergestellt, dass der linke Ventrikel oben lag. Mit den beiden extra feinen Pinzetten wurde unter dem Binokular die Öffnung der Aorta aufgefunden, sie wurde mit den Pinzetten aufgehoben und über die Präparationskanüle gestülpt. Nun wurde der Bindfaden über den Gefäßstumpf gelegt und vorsichtig mit den feinen gebogenen Pinzetten festgezogen. Der Dreiwegehahn wurde nun mit dem an der Präparationskanüle hängenden Herzen an der Langendorff-Apparatur angebracht. Dabei wurde die seitliche Öffnung luftfrei angeschraubt. Der

Hahn wurde aufgedreht und die Pumpe angestellt. Das Herz wurde nun vier bis fünf Minuten lang mit Perfusionspuffer durchspült. Jetzt wurden bereits 0,5 ml des Liberase-Enzyms in den Behälter „Digestion“ gegeben (Digestionspuffer, siehe 2.2.1). Nach dem Durchspülen des Herzens wurde der Digestionshahn aufgedreht und „Perfusion 2“ zugeleitet. Während der Digestions-Puffer durch die Apparatur lief, wurden 1,5 ml von diesem Puffer entnommen und in das kleine Kulturschälchen (35 mm Ø) gegeben. Der Digestionspuffer wurde fast vollständig aufgebraucht, dann wurde der Dreiwegehahn zugeleitet, die Pumpe ausgestellt und die Schlauchklemmen geschlossen.

Der Dreiwegehahn mit Kanüle wurde vorsichtig von der Langendorff-Apparatur entfernt und in die Präparationsschale gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Orientierung die gleiche war wie zuvor, um mit Sicherheit den linken Ventrikel auffinden zu können. Mit der gebogenen, spitzen Pinzette wurden ca. 2 mm³ epikardiales Gewebe des linken Ventrikels abgetragen und in das kleine Schälchen mit Digestions-Puffer gegeben. Das Gewebe wurde mit den extra feinen Pinzetten zerkleinert. Zu den 1,5ml Zellsuspension wurden 3,5ml der „Stop1“-Lösung gegeben. Die 5ml Zellsuspension wurden mit der 1000µl Pipette in das kleine (15ml) Reaktionsgefäß gegeben und die Zellsuspension wurde mit der Pasteurpipette trituriert. Die Suspension wurde kurz (ca. 2 min) zentrifugiert, sodass sich eine sichtbare Zellschicht absetzte. Der Überstand wurde abgenommen und durch 5ml der Lösung „Stop2“ ersetzt. Die Zellen wurden durch Schwenken des Reaktionsgefäßes verteilt. Daraufhin wurden nacheinander, wie nachfolgend aufgelistet, definierte Mengen der CaCl₂-Stocklösungen hinzugegeben:

- + 25 µl 10 mM CaCl₂, schwenken (immer ca. 20 s),
- + 25 µl 10 mM CaCl₂, schwenken,
- + 50 µl 10 mM CaCl₂, schwenken,
- + 15 µl 100 mM CaCl₂, schwenken,

bis zum Erreichen einer Ca²⁺-Konzentration von ungefähr 0,5 mM. Jetzt konnten die isolierten Myozyten für die elektrophysiologischen Messungen verwendet werden.

2.3 Elektrophysiologische Messungen

Alle elektrophysiologischen Messungen wurden mit der *Patch-Clamp*-Methode bei Raumtemperatur (20 - 22°C) durchgeführt.

2.3.1 Die Patch-Clamp-Technik

Die *Patch-Clamp*-Technik ist eine besondere Form der Spannungsklemme (*Voltage-Clamp*) und eine der bedeutendsten elektrophysiologischen Messmethoden. Sie wurde ursprünglich entwickelt, um Einzelkanal-Ströme in einer Zellmembran darstellen zu können (Neher and Sakmann 1976).

Bei der *Patch-Clamp*-Technik wird ein kleines Membranareal (*Patch*) unter einer Pipettenöffnung während der Strommessung auf definierte Potentialwerte geklemmt. Ein chlorierter Silberdraht, der in die mit Elektrolytlösung gefüllte Pipette getaucht wird, ist dabei gleichzeitig die Kommando- und Messelektrode. Die Öffnung der Pipette hat einen Durchmesser von ca. 1 μm und es bildet sich eine elektrisch dichte Verbindung zwischen dem Glasrand der Pipette und der Zelloberfläche. Die Verbindung hat einen Widerstand von einigen $\text{G}\Omega$ und nennt sich daher *Giga-seal*. Die *Giga-seal*-Bildung kann durch leichten Unterdruck am Schlauch, der mit der Pipette verbunden ist, begünstigt werden. Nach der Bildung des *Seals* liegt die *Cell-attached*-Konfiguration vor (Abbildung 4). Bei den meisten Zellen wird nun durch erneutes stärkeres Saugen an dem Schlauch die Membran der Zelle durchbrochen. Bei Myozyten wird hingegen durch Anlegen eines Überdrucks die Membran der Zelle eröffnet und es liegt die *Whole-Cell*-Konfiguration vor (Abbildung 4). Dadurch ist es möglich die Ionenströme der gesamten Zellmembran zu messen. Bei der *Whole-Cell*-Konfiguration äquilibriert sich das Innere der Zelle mit der Elektrolytlösung. So kann durch die Pipettenlösung die Ionenzusammensetzung im Zellinneren kontrolliert werden. Ein Nachteil ist allerdings, dass das Zytoplasma der Zelle und damit möglicherweise auch wichtige Modulatoren der Kanalproteine ausgewaschen werden.

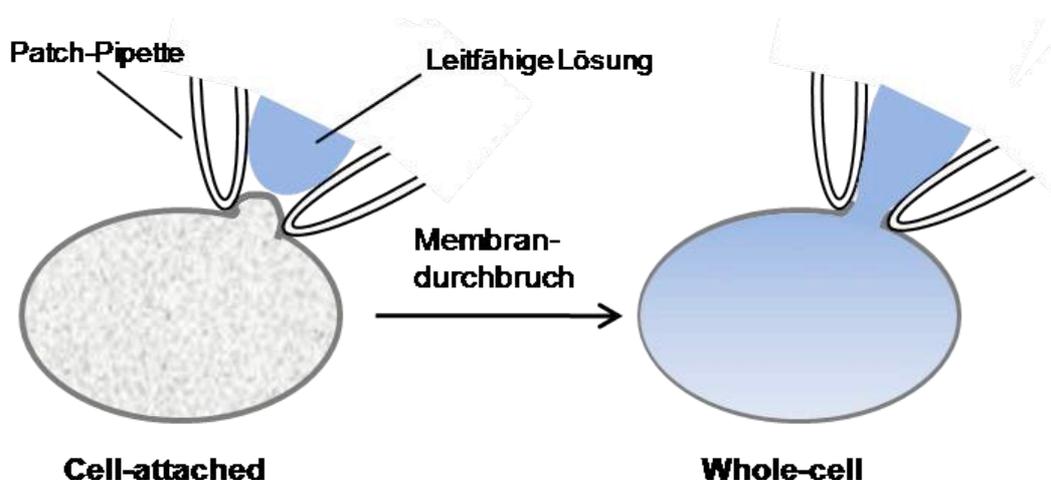


Abbildung 4: Patch-Clamp-Konfigurationen.
Dargestellt sind links die *Cell-attached*- und rechts die *Whole-Cell*-Konfiguration.

Die Spannungsklemme (*Voltage-Clamp*) zielt darauf ab, das Membranpotential auf einem vorgegebenen Wert (U_{soll}) zu halten. Die Besonderheit der *Patch-Clamp*-Technik ist, dass durch eine einzige Elektrode sowohl Spannung gemessen wird, als auch Strom appliziert wird. Dies wird über einen speziellen Schaltkreis (Abbildung 5) erreicht. Der sogenannte Vorverstärker, der aus einem Operationsverstärker (OPA) und einem Rückkopplungswiderstand (R_f) besteht, stellt einen Strom-Spannungs-Wandler dar. Er misst die eingehende Spannung der Membran U_m und vergleicht sie mit der am Eingang des OPAs angelegten Sollspannung U_{soll} . Bei einer Abweichung zwischen den beiden Werten, wird ein entgegengesetzter Strom in die Zelle injiziert, der proportional zur Differenz ist, aber um einiges verstärkt. Dieser Kompensationsstrom wird in *Patch-Clamp*-Experimenten gemessen, da er Aussagen über die Leitfähigkeit der Membran zulässt, welche durch die Ionenkanäle produziert wird (Numberger and Draguhn 1996).

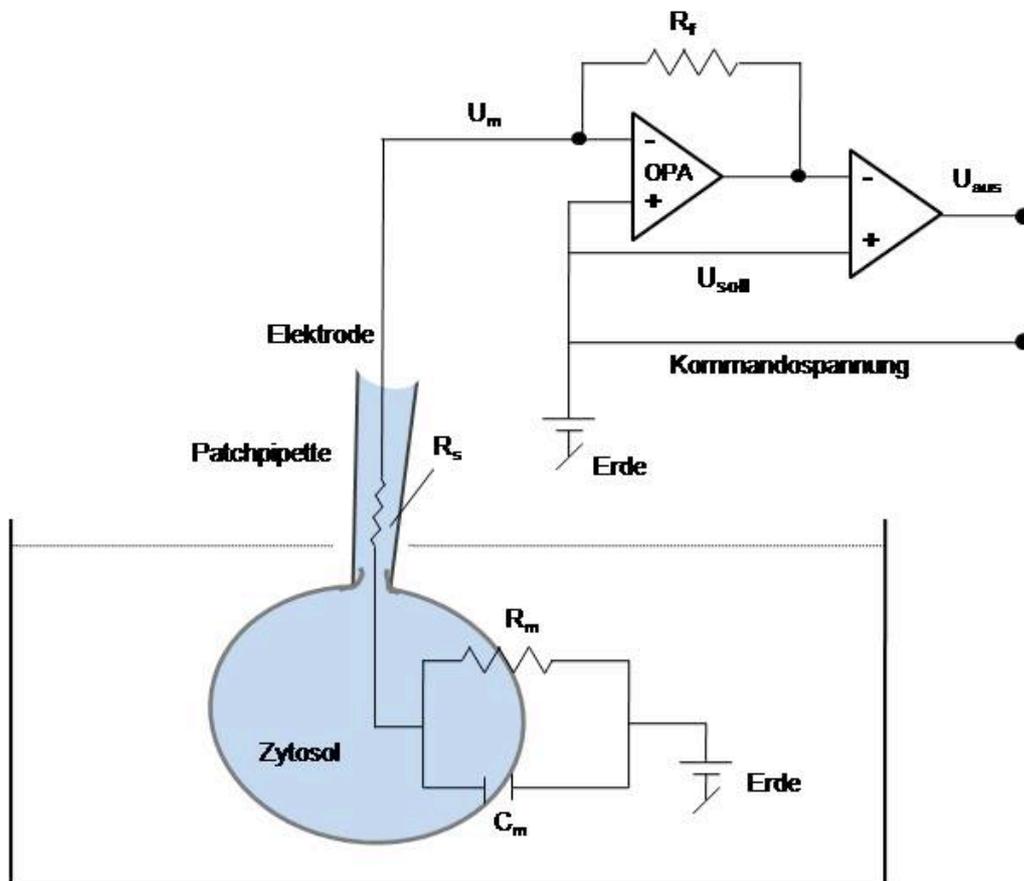


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung eines Patch-Clamp-Schaltkreises bei einer *Whole-Cell*-Ableitung. OPA: Operationsverstärker; R_f : Rückkopplungswiderstand; R_s : Serienwiderstand; U_m : Membranspannung; U_{aus} : Ausgangsspannung; U_{soll} : Sollspannung; R_m : Membranwiderstand; C_m : Membrankapazität. Modifiziert und erweitert nach (Numberger and Draguhn 1996).

2.3.2 Messlösungen

| | |
|-----------------------------|---|
| Intrazellulär-Lösung | 120 mM L-Glutamat |
| (laborintern: ic23) | 10 mM KCl |
| | 2 mM MgCl ₂ |
| | 10 mM EGTA |
| | 10 mM HEPES |
| | pH 7,2 mit KOH einstellen |
| | 10 ml ic23 mit 2 mM K ₂ -ATP |
| Direkt vor der Messung: | pH 7,2 mit KOH einstellen |

| | |
|-----------------------------|--|
| Extrazellulär-Lösung | 138 mM NaCl |
| (laborintern: ec21) | 4 mM KCl |
| | 1 mM CaCl ₂ |
| | 2 mM MgCl ₂ |
| | 0,33 mM NaH ₂ PO ₄ |
| | 10 mM HEPES |
| | 10 mM Glucose |
| | pH 7,3 mit NaOH einstellen |

2.3.3 Ausstattung des Messstandes

Der Messplatz

Der Messplatz muss für die *Patch-Clamp*-Technik frei von Erschütterungen und elektrischen Störsignalen sein. Um dies zu erreichen wurde ein spezieller schwingungsgedämpfter Tisch benutzt. Umgeben war der Messstand von einem geerdeten Faraday-Käfig, um das Hintergrundrauschen und die Wechselstrom-Schwingungen zu vermindern. Die optische Kontrolle während des Patch-Clamp-Experiments wurde durch ein inverses Mikroskop (*Axiinvert*, Zeiss) mit bis zu 400-facher Vergrößerung gewährleistet. Als Lichtquelle wurde Weißlicht verwendet. Um das Mikroskop herum waren die anderen Komponenten der Messapparatur angeordnet. Die mit dem Vorverstärker direkt verbundene Patchpipette konnte über einen motorisierten Mikromanipulator (Eppendorf) bewegt werden. Zur Erzeugung von Über- bzw. Unterdruck in der Pipette diente ein einfacher Silikonschlauch, der über einen Zweiwegehahn mit einem wassergefüllten U-Rohr verbunden war (Über- bzw. Unterdruck in cm H₂O quantifizierbar). In dem Mikroskoptisch war eine passende Vertiefung für die Kulturschälchen (35mm Ø) eingebaut. Die Badlösung der Zellen wurde

durch ein schwerkraftgetriebenes Superfusionssystem ausgetauscht. Dies bestand aus einer 50 ml Einwegspritze, die mit Extrazellulär-Lösung (ec21) gefüllt war und über einen Schlauch Badlösung in das Kulturschälchen perfundierte. Auf der gegenüberliegenden Seite wurde die Lösung mit Hilfe einer Membranpumpe abgesaugt und somit ständig erneuert.

Messelektroden und Patchpipetten

Die Pipetten wurden an jedem Versuchstag neu hergestellt. Dafür wurde ein Pipettenzieh-Gerät (DMZ Universal puller, Zeitz) verwendet, welches die Patchpipetten in zwei Schritten aus Borosilikatglas (GB150-8P, Science Products GmbH) fertigte. Im ersten Schritt wurden aus einem Borosilikatglas-Röhrchen durch Hitzeeinwirkung und gleichzeitiges Auseinanderziehen des Röhrchens zwei Pipetten gefertigt. Die Pipettenöffnungen wurden anschließend im zweiten Schritt „hitzegepoliert“, d.h. der Glasrand der Öffnung wurde abgerundet. Das Hitzegepolieren war notwendig, um später eine feste Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran herstellen zu können. In die fertige Pipette wurde die Intrazellulär-Lösung (ic23) mit Hilfe einer Spritze und einer Glasfaser-Kanüle gefüllt. Die Intrazellulär-Lösung wurde vor dem Befüllen der Pipette mit einem sterilen Filter (Porendurchmesser 0,2 μm) filtriert. Die gefüllte Pipette wurde daraufhin über die Elektrode, die mit dem Vorverstärker verbunden war, geführt und in einer Halterung befestigt. Die Elektroden bestanden aus einem mit Silberchlorid (AgCl) beschichteten Silberdraht. Der Bad-Widerstand der im Versuch verwendeten Pipetten lag zwischen 2 und 3 M Ω . Die Referenzelektrode, die in die Badlösung eingetaucht war, bestand aus einem Silber/Silberchlorid-Pellet.

Verstärker und Datenerfassung

Die Kontrolle des OPAs und die Verstärkung und Registrierung der Messsignale erfolgte durch einen Hauptverstärker (EPC-9, HEKA, Lambrecht). Die Steuerung des Hauptverstärkers, sowie die Digitalisierung der gemessenen Signale erfolgten durch den im Hauptverstärker integrierten ITC16-AD/DA-Wandler. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm PULSE (HEKA, Lambrecht). Die Digitalisierung erfolgte mit einer Aufnahmefrequenz zwischen 0,2 und 20 kHz und einer Auflösung von 16 bit. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Daten auf dem Computer gespeichert.

2.3.4 Ablauf des Patch-Clamp-Experiments

Am Versuchstag wurden zu 10 ml ic23-Lösung 12 mg K_2 -ATP zugegeben und vermischt. Der pH-Wert wurde mit 1M KOH auf 7,2 eingestellt. Die ic23-Lösung wurde bis zur weiteren Benutzung in einem Eisbad gelagert. Nun wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette einige Milliliter ec21-Lösung in das 35 mm Kulturschälchen gegeben und ca. 100-200 μ l aus der Myozyten-Zellsuspension hinzugegeben. Nachdem die Zellen auf den Grund abgesunken waren, wurde das Kulturschälchen in die Vertiefung auf dem Mikroskopisch eingesetzt.

Direkt vor Beginn der Messungen, wurde im Programm PULSE der Wert für das *Liquid junction*-Potential (LJ) definiert. In der Extrazellulär-Lösung befand sich hauptsächlich Na^+ und Cl^- und in der Intrazellulär-Lösung K^+ und Glutamat $^-$. Insbesondere die beiden Anionen unterscheiden sich in ihrer freien Beweglichkeit aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe. Dies führt dazu, dass sie unterschiedlich schnell diffundieren, was zur Entstehung eines elektrischen Potentials führt. Im vorliegenden Fall betrug das Potential 13 mV. Dieses Potential würde nach der Sealbildung entfallen und der Nullpunkt um den Wert des Übergangspotentials verfälscht sein. Daher wird dieser Wert vor Beginn der Messungen mit umgekehrtem Vorzeichen (also -13 mV) als LJ-Potential eingestellt.

Anschließend wurde mit den Vorbereitungen für die Messung begonnen. Zuerst wurde eine Pipette luftblasenfrei mit Intrazellulär-Lösung gefüllt. Die Pipette wurde über den Silberchlorid-Draht geführt und in die Pipettenhalterung gespannt. Nun wurde mit Hilfe des Schlauchs und des Zweiwegehahns am U-Rohr ein leichter Überdruck angelegt (ca. 2 cm H_2O). Der Überdruck sollte verhindern, dass die Pipette beim Eintauchen in die Badlösung verstopft oder Badlösung in die Pipette eindringt. Beim Eintauchen in die Badlösung konnte man auf dem Monitor eine rechteckförmige Stromantwort, den sogenannten Pipettenstrom, sehen (kontinuierliche Spannungspulse von 5 mV). Der Rechteckstrom gab direkte Auskunft über den Pipettenwiderstand ($R=U/I$). Direkt nach dem Eintauchen der Pipette in die Badlösung wurde das *Offset*-Potential korrigiert. Unter optischer Kontrolle wurde eine Zelle ausgesucht und die Pipette wurde mit Hilfe des Mikromanipulators nahe an die Zelle herangefahren. Auf dem Monitor konnte man bei Annäherung an eine Zelle eine Reduktion der Rechteck-Stromantwort (Widerstandserhöhung der Pipettenöffnung) beobachten. Nun durfte man nicht näher an die Zelle heranfahren, um die Membran nicht zu beschädigen. Es wurde nun der zuvor angelegte Überdruck abgelassen und stattdessen durch leichten Unterdruck an der

Pipette ein *Giga-Seal* (siehe Kap. 2.3.1) gebildet. Dies zeigte sich am Monitor durch ein gänzlich Verschwinden der Rechteck-Stromantwort. Die kapazitiven Ströme, die durch Umladeprozesse an der Pipettenwand entstanden, wurden kompensiert. Es wurde nun bereits eine negative Haltespannung von -60mV angelegt. Daraufhin wurde durch leichten Überdruck an der Pipette oder durch eine kurze hochfrequente, hochamplitudige Wechsellspannung (*Zap-Modus*), das Membranstück unter der Pipette durchbrochen, sodass die *Whole-Cell*-Konfiguration vorlag. Das Durchbrechen der Membran konnte am Monitor durch größere und langsamere kapazitative Ströme am Anfang und am Ende des Spannungspulses erkannt werden. Vor dem Beginn der Messungen wurde, zur Optimierung der Ableitung, der Serienwiderstand (R_s) kompensiert. Dies ist nötig, da schon ein Teil der angelegten Kommandospannung am Serienwiderstand abfällt (siehe Kap. 2.3.1, Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung eines Patch-Clamp-Schaltkreises). Um zu verhindern, dass eine zu geringe Spannung im Zellinneren aufgebaut wird, kann durch die R_s -Kompensations-Funktion der Aufnahme-Software ein Teil des erwarteten Spannungsverlusts ausgeglichen werden. Das Membranpotential wurde nun auf -80 mV geklemmt und die Messung mit den Pulsprotokollen begonnen.

2.3.5 Verwendete Pulsprotokolle

2.3.5.1 Vorpuls-Subtraktions-Protokoll

Die verwendeten Puls-Protokolle wurden mit dem Programm PULSE definiert. Zur Isolierung des $I_{to,f}$ in den Kardiomyozyten wurde unter anderem ein Vorpuls-Subtraktions-Protokoll angewendet. Das Protokoll diente der direkten Ermittlung der Amplitude (bzw. Dichte) von $I_{to,f}$ sowie der Zeitkonstante der Inaktivierung. Das Protokoll bestand aus zwei Einzelprotokollen, die im Nachhinein verrechnet wurden. Im ersten, sogenannten Testpuls-Protokoll, wurde ausgehend von einem negativen Potential von -80 mV für 500 ms auf ein positives Potential von +40 mV gepulst. Vor dem positiven Puls wurde zusätzlich ein 8 ms langer Puls auf -50 mV eingefügt. Dieser Puls sollte den Na^+ -Kanal inaktivieren, um zu verhindern, dass der schnell aktivierende Natriumstrom in die Kinetik des $I_{to,f}$ verfälschen könnte (siehe Abbildung 6A). Das zweite, sogenannte Vorpuls-Protokoll, enthielt einen 160 ms langen Vorpuls auf -40 mV. Die Dauer und Spannung des Vorpulses orientierte sich an bekannten, in der Literatur beschriebenen Werten (Trepanier-Boulay *et al.* 2001; Brouillette *et al.* 2004; Tozakidou *et al.* 2009). Der Vorpuls sollte den $I_{to,f}$ inaktivieren. Danach folgte wieder ein 500 ms langer Testpuls auf +40 mV (siehe Abbildung 6B). In der Auswertung wurden die Stromantworten der beiden Puls-Protokolle miteinander verrechnet (siehe Kap. 2.4.1).

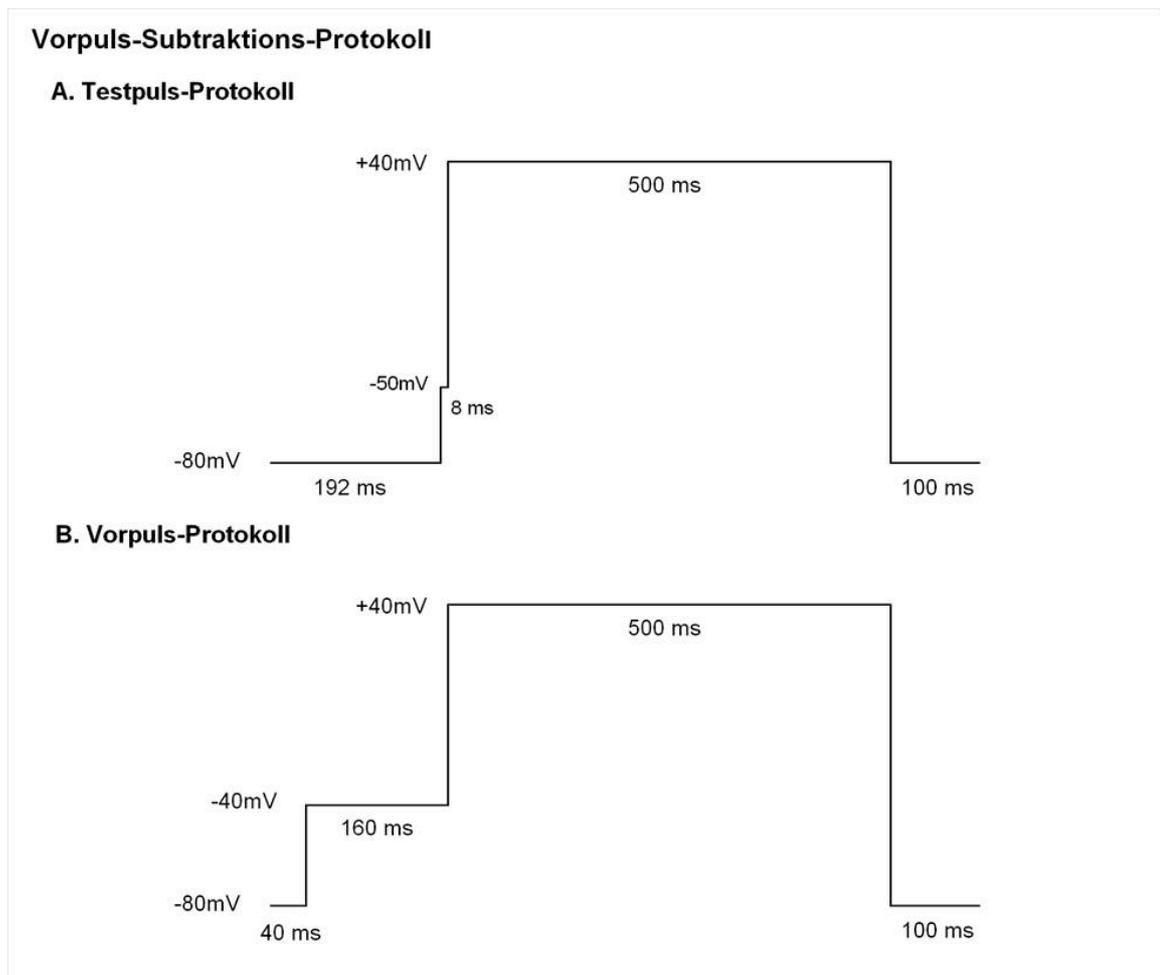


Abbildung 6: Das Vorpuls-Subtraktions-Protokoll; bestehend aus zwei Einzelprotokollen. **A.** Testpuls-Protokoll mit einem 500 ms langen Testpuls von -80mV auf +40mV. Zusätzlich 8ms langer Zwischenpuls auf -50mV, um die schnellen Na^+ -Kanäle zu inaktivieren. **B.** Vorpuls-Protokoll, welches zusätzlich zum Testpuls einen 160ms langen Vorpuls auf -40 mV enthält. Weitere Erläuterungen im Text.

2.3.5.2 5s-Protokoll

Um die Inaktivierung des Gesamtauswärtsstroms darzustellen, wurde ausgehend von -80 mV ein 5s langer Rechteckpuls auf +40 mV ausgelöst. Ebenso wie im Testpuls-Protokoll (siehe 2.3.5.1) wurde ein kurzer, hier auch 8 ms andauernder, Vorpuls eingefügt, um die Natriumkanäle zu inaktivieren (Abbildung 7). In der Auswertung wurde zur indirekten Bestimmung der $I_{\text{to},\text{f}}$ -Amplitude (bzw. -Dichte) eine doppelt-exponentielle oder dreifach-exponentielle Funktion an die Stromantwort angeglichen (Fit; siehe 2.4.2).

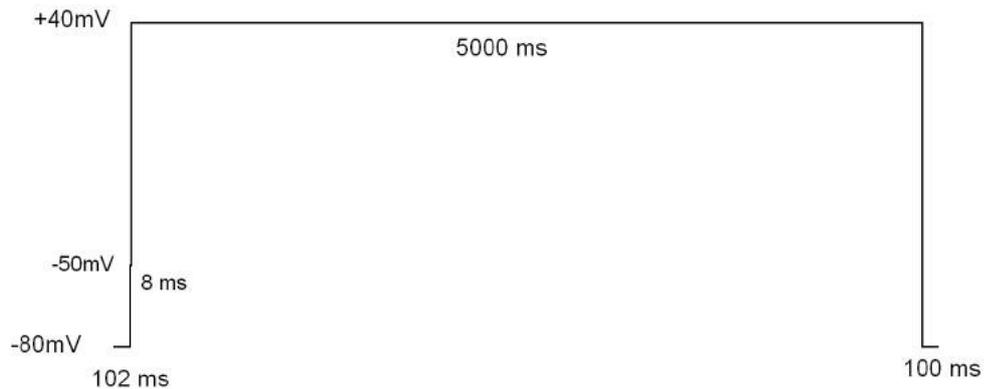
5s-Protokoll

Abbildung 7: Das 5s-Protokoll. Erläuterungen im Text.

2.3.5.3 Recovery-Protokoll

Die Erholung von der Inaktivierung (*Recovery*) ist der Vorgang, bei dem Kanäle aus dem inaktivierten Zustand wieder in einen aktivierbaren Zustand übergehen. Dabei ist interessant, wie lange die Kanäle für diesen Vorgang benötigen. Vom Haltepotential (-80 mV) ausgehend wurde ein Spannungssprung auf +40 mV (V_{contr}) appliziert, welcher zwei Sekunden dauerte. Nach unterschiedlich langer Zeitdauer (Δt) bei -80 mV, wurde dann erneut auf +40 mV (V_{test}) gepulst. Dieser Zeitabstand Δt , zwischen dem ersten und zweiten Spannungssprung auf +40 mV, wurde im Pulsprotokoll jeweils verdoppelt. In dem angewendeten Protokoll lag die Zwischenpulsdauer Δt zwischen 6 ms und 6,1 s. Wie in Abbildung 8 dargestellt, betrug die Dauer des zweiten Pulses (V_{test}) stets 50 ms.

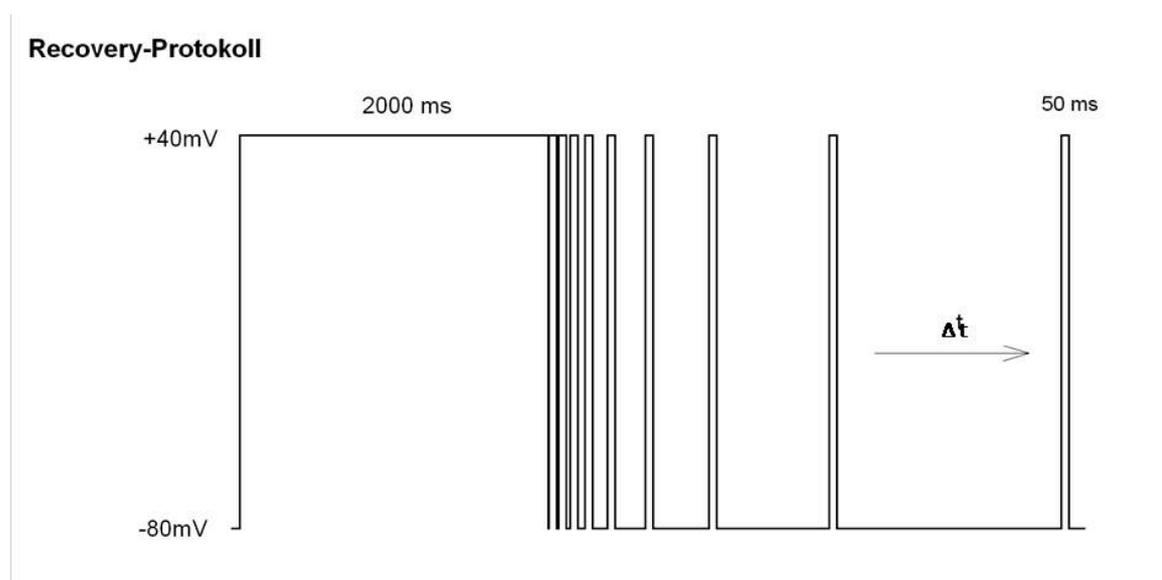


Abbildung 8: Das Recovery-Protokoll. Erläuterungen im Text.

2.3.5.4 Variables Vorpulsprotokoll

Um die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu untersuchen, wurde das in Abbildung 9 dargestellte Protokoll verwendet. Das Protokoll bestand aus mehreren Durchgängen. Dabei wurde ausgehend vom Haltepotential (-80 mV) eine Sekunde lang zunächst auf -100 mV gepulst und anschließend für 25 Millisekunden ein Spannungssprung auf +40 mV appliziert. Der eine Sekunde lange konditionierende Puls wurde in weiteren Durchgängen, ausgehend von -100 mV, in 10 mV Schritten in Richtung positiverer Werte bis zum Wert von maximal -10 mV verändert.

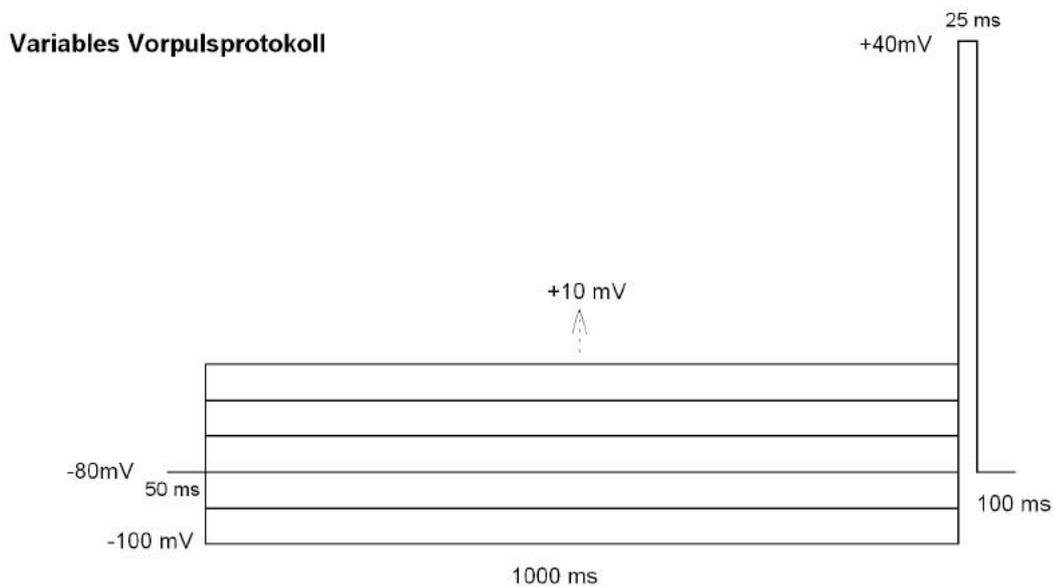


Abbildung 9: Das variable Vorpulsprotokoll. Erläuterungen im Text.

2.4 Datenauswertung und Statistik

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm PulseFit (HEKA Elektronik, Deutschland) und die weitere Analyse mit KaleidaGraph (Synergy, USA).

2.4.1 Auswertung des Vorpuls-Subtraktions-Protokolls

Bei der Auswertung der Daten des Vorpuls-Subtraktions-Protokolls wurde die Stromantwort des Vorpuls-Protokolls von der Stromantwort des Testpuls-Protokolls subtrahiert (siehe 2.3.5.1), um so den Stromverlauf des $I_{to,f}$ isoliert darzustellen. Die $I_{to,f}$ -Amplitude konnte so direkt ermittelt werden. Um die Kinetik des Stroms zu beschreiben, wurde eine einfach-exponentielle Funktion zur Ermittlung der Zeitkonstante τ der

Inaktivierung verwendet. Die Zeitkonstante τ gibt an, wieviel Zeit eine absinkende exponentielle Funktion benötigt, um auf $1/e$ (36,8 %) ihrer Ausgangsgröße, abzusinken. Für vergleichende Analysen der Kanalexpression wird oft die Stromdichte herangezogen, also die Stromstärke pro Membranfläche. Dabei dient die Membrankapazität als Maß für die Membranfläche, da die Kapazität von Biomembranen als relativ konstant angenommen werden kann ($\sim 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$). In der vorliegenden Arbeit wurde die Amplitude des Subtraktionsstroms durch die Ganzzellkapazität geteilt. Die daraus resultierende $I_{\text{to,r}}$ -Dichte ist im Folgenden in pA/pF ($\text{pA} \cdot \text{pF}^{-1}$) angegeben.

2.4.2 Auswertung des 5s-Protokolls

Für die Auswertung des Gesamtauswärtsstroms wurden die fünf Sekunden langen Stromkurven auf zwei unterschiedliche Arten ausgewertet. An einem zuvor definierten Zeitintervall (zw. 0,2 und 99% der Stromantwort bei +40mV) wurde mit Hilfe des Programms PulseFit eine zweifach-exponentielle oder eine dreifach-exponentielle Funktion angepasst. Nachfolgend sind die Gleichungen der Exponentialfunktionen angegeben.

Zweifach-exponentielle Funktion:

$$I = A_0 + A_1 e^{\frac{-t}{\tau_1}} + A_2 e^{\frac{-t}{\tau_2}}$$

Dreifach-exponentielle Funktion:

$$I = A_0 + A_1 e^{\frac{-t}{\tau_1}} + A_2 e^{\frac{-t}{\tau_2}} + A_3 e^{\frac{-t}{\tau_3}}$$

I entspricht der Amplitude des Gesamtstroms, t beschreibt die Zeit in ms, A_x ist die Amplitude des Anteils des Abfalls, für den die jeweilige Zeitkonstante der Inaktivierung verantwortlich ist: A_0 entspricht der nicht inaktivierenden Komponente des Gesamtauswärtsstroms I_{ss} .

2.4.3 Auswertung des Recovery-Protokolls

Die Auswertung der Erholung von der Inaktivierung bezieht sich ebenfalls auf den Gesamtauswärtsstrom. Zunächst wurde von den ermittelten Spitzenamplituden der Ströme des ersten und zweiten Pulses die mittlere Stromamplitude des nicht inaktivierenden Stroms I_{ss} (A_0) subtrahiert. Im Folgenden wurden nur die von I_{ss} bereinigten Werte verwendet. Es wurde daraufhin die Amplitude des zweiten, kurzen Testpulses I_{test} auf die maximale Amplitude des ersten Kontrollpulses I_{contr} normiert. Der Wert des Quotienten $I_{\text{test}}/I_{\text{contr}}$ liegt zwischen 0 und 1, wobei 1 für die vollständige Erholung von der Inaktivierung steht, da die Stromstärke I_{test} wieder den ursprünglichen Wert der Stromstärke, I_{contr} , erreicht hat. Diese Werte wurden gegen die Dauer des

Zwischenpulses aufgetragen und es wurde eine zweifach-exponentielle Funktion an die Daten angepasst:

$$\frac{I_{test}}{I_{contr}} = (1 - a) * \left(1 - e^{\frac{-t}{\tau_{rec}(1)}}\right) + a * \left(1 - e^{\frac{-t}{\tau_{rec}(2)}}\right)$$

$\frac{I_{test}}{I_{contr}}$ ist der Wert für die Erholung von der Inaktivierung, $1 - a$ beschreibt den Anteil des Terms von $\tau_{rec}(1)$ an der Gesamtfunktion, a ist der Anteil des Terms von $\tau_{rec}(2)$ an der Gesamtfunktion, t ist die Zwischenpulsdauer und $\tau_{rec}(1)$ und $\tau_{rec}(2)$ sind die Zeitkonstanten für die Erholung von der Inaktivierung.

2.4.4 Auswertung des variablen Vorpulsprotokolls

Für die Auswertung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung wurden die Amplituden der Ströme des Pulses auf +40 mV (direkt im Anschluss an den langen konditionierenden Puls) herangezogen. Diese Werte wurden daraufhin auf den größten im selben Experiment erreichten Peakstrom I_{max} normiert. Der Quotient I/I_{max} wurde gegen die Spannung des konditionierenden Pulses V aufgetragen. Die Spannungsabhängigkeit von Messparametern wird meist mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion ausgewertet. In der vorliegenden Arbeit hat sich eine einfache Boltzmann-Funktion als nicht ausreichend erwiesen, sodass die Summe aus zwei Boltzmann-Funktionen zur Beschreibung der Daten benutzt wurde:

$$\frac{I}{I_{max}} = \frac{1 - a}{1 + e^{\frac{V - V_{1/2}(1)}{k_1}}} + \frac{a}{1 + e^{\frac{V - V_{1/2}(2)}{k_2}}}$$

$\frac{I}{I_{max}}$ ist die maximale Testpulsamplitude normiert auf die größte erreichte Peakstrom-Amplitude, $1 - a$ ist der Anteil der Funktion von $V_{1/2}(1)$ an der Gesamtfunktion, a ist der Anteil der Funktion von $V_{1/2}(2)$ an der Gesamtfunktion. V ist das Membranpotential, $V_{1/2}(1)$ ist das Membranpotential bei halbmaximaler Inaktivierung des ersten Anteils und k_1 beschreibt den Steigungsfaktor des ersten Terms der Funktion, $V_{1/2}(2)$ beschreibt die Spannung der halbmaximalen Inaktivierung des zweiten Anteils und k_2 ist der Steigungsfaktor des zweiten Terms der Funktion.

2.4.5 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*) angegeben. Für die Darstellung der Daten der Erholung von der Inaktivierung und der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung sind die Mittelwerte als Punkte und die Standardfehler in beide Richtungen aufgetragen. Bei Balkendiagrammen gibt die Höhe

des Balkens die Höhe des Mittelwertes an und der Standardfehler ist nur in eine Richtung aufgetragen.

Für die Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde das Programm KaleidaGraph verwendet. Bei dem Vergleich von zwei Gruppen (z.B. KChIP2^{+/+} Männlich vs. KChIP2^{+/+} Weiblich) wurde der ungepaarte *t-Test nach Student* angewendet. Beim Vergleich der RMS-Werte der zweifach- gegenüber der dreifach-exponentiellen Auswertung des Gesamtauswärtsstroms einer einzelnen Myozyte wurde ein gepaarter *t-Test nach Student* angewendet. Lag eine größere Anzahl von Vergleichsgruppen vor, wurde zunächst eine *One-Way-ANOVA* (Varianzanalyse) durchgeführt und anschließend der Signifikanztest nach *Tukey's HSD (Honestly Significant Differences)* angewendet. Das Signifikanzniveau wurde entsprechend $p < 0,05$ festgelegt. Die Möglichkeit einer Gesamtanalyse mittels Zwei-Faktoren-ANOVA mit insgesamt sechs Gruppen bestand, wurde aber aufgrund der zunächst isolierten Betrachtung des männlichen Geschlechts - und der dadurch bestehenden Gefahr der Verfälschung des männlichen Genotypenvergleichs durch die Streuung der weiblichen Daten - abgelehnt. Ebenso verhielt es sich umgekehrt, bei Untersuchung der weiblichen Genotypen-abhängigen Unterschiede. Auf diese Weise entstand keine Verfälschung des Genotypenvergleichs innerhalb eines Geschlechts durch geschlechtsabhängige Unterschiede und umgekehrt keine Verfälschung des Geschlechtsvergleiches durch unterschiedlichen Einfluss des Genotyps.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst verschiedene Methoden zur Isolierung von I_{to} -Eigenschaften (Vorpuls-Subtraktion, zweifach-exponentielle Funktion und dreifach-exponentielle Funktion) vergleichend angewendet. Es werden außerdem Daten von drei KChIP2-Genotypen verglichen. Diese Daten wurden sowohl für männliche als auch für weibliche Myozyten generiert. Zunächst werden die Ergebnisse der Daten für männliche Myozyten gezeigt und im Anschluss mit den weiblichen Myozyten verglichen. Insgesamt ergaben sich daraus sechs Vergleichsgruppen. Neben der absoluten Amplitude und der Inaktivierungskinetik des I_{to} , wurden weitere Inaktivierungsparameter für den Gesamtauswärtsstrom untersucht. Dies waren die Erholung von der Inaktivierung und die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung.

3.1 Isolierung des I_{to} durch das Vorpuls-Subtraktions-Protokoll

Im Testpulsprotokoll wurde ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV für 500 ms auf +40 mV gepulst. Damit wurde eine Stromantwort erzeugt, die aus einer inaktivierenden und einer nicht-inaktivierenden Komponente bestand (Abbildung 10, Stromkurve 1). Beim Vorpulsprotokoll wurde vor dem Spannungssprung auf +40 mV noch ein 160 ms langer Zwischenpuls auf -40 mV eingefügt um den I_{to} zu inaktivieren. Die resultierende Stromantwort zeigte eine langsame Form der Inaktivierung (Abbildung 10, Stromkurve 2). Durch Subtraktion der Vorpuls-Protokoll-Stromantwort von der Testpuls-Stromantwort entstand eine Stromantwort mit schneller und vollständiger Inaktivierung, die dem I_{to} zugeordnet wurde (Abbildung 10, Stromkurve 1-2).

3.1.1 I_{to} -Amplitude und -Dichte

Aus der isolierten Stromkurve wurde die Amplitude des I_{to} bestimmt. Die Amplitude in männlichen Wildtyp-Zellen lag zwischen 1.4 und 4.7 nA und betrug im Mittel 3.10 ± 0.28 nA ($n = 15$). Durch Normierung der Amplitude auf die Ganzzellkapazität (bzw. Zellgröße) der jeweiligen Zelle, konnte die I_{to} -Dichte bestimmt werden. Sie betrug in männlichen Wildtyp-Myozyten 17.9 ± 1.9 pA/pF ($n = 15$).

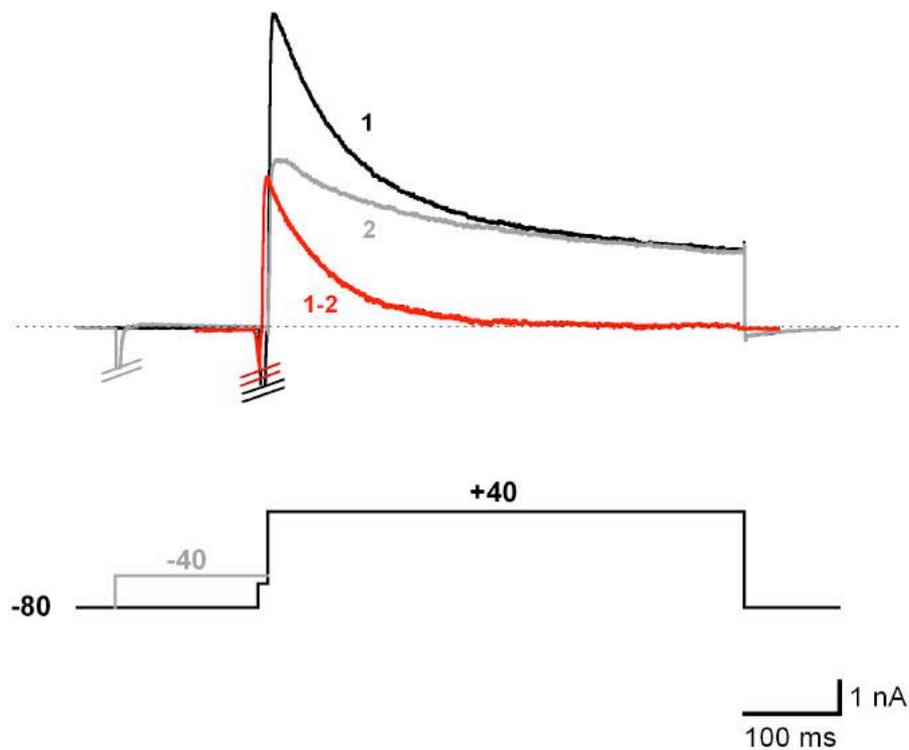


Abbildung 10: Anwendung des Vorpuls-Subtraktions-Protokolls.

Repräsentative Stromkurven einer männlichen Wildtyp-Myozyte bei Anwendung des Vorpuls-Subtraktions-Protokolls. Kurve 1 (schwarz) ist der Gesamtauswärtsstrom, Kurve 2 (grau) ist der Reststrom nach einem inaktivierenden Vorpuls auf -40mV . Kurve 1-2 (rot) zeigt die isolierte Stromkomponente nach Subtraktion. Unter den Stromkurven befinden sich die Spannungssprünge aus dem Pulsprotokoll in mV angegeben. Die gepunktete Linie stellt die Nulllinie dar. (Der schnelle Natrium-Einwärtsstrom wurde für die Darstellung bei allen Stromkurven abgeschnitten.)

3.1.2 Inaktivierungskinetik der isolierten Stromkomponente

Neben der Amplitude und Stromdichte, konnte aus der isolierten Komponente auch eine Zeitkonstante der Inaktivierung (τ_{inact}) bestimmt werden. Dies geschah, indem der abfallenden Kurve eine einfach-exponentielle Funktion angelegt wurde und daraus die Zeitkonstante ermittelt wurde. Die Werte für τ_{inact} in männlichen Wildtyp-Myozyten lagen zwischen 47.3 und 72.8 ms und der Mittelwert betrug 62.2 ± 1.9 ms ($n = 15$).

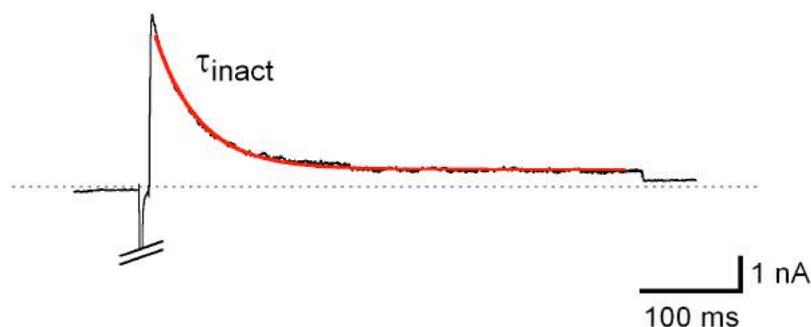


Abbildung 11: Die Kinetik der isolierten Komponente in männlichen Wildtyp-Myozyten.

Repräsentative Stromkurve einer männlichen Wildtyp-Myozyte nach Anwendung der Vorpuls-Subtraktionsmethode (Kurve „1-2“ aus Abbildung 10). Einfach-exponentieller Fit als rote, durchgezogene Linie dargestellt. Die gepunktete Linie stellt die Nulllinie dar. (Der schnelle Natrium-Einwärtsstrom wurde abgeschnitten.)

Tabelle 2: Daten für die isolierte Stromkomponente (I_{to}) in männlichen Wildtyp-Myozyten nach Anwendung der Vorpuls-Subtraktions-Methode.

| ♂ | KChIP2 ^{+/+} |
|---------------------|-----------------------|
| τ (ms) | 62.2 ± 1.9 |
| Amplitude (nA) | 3.10 ± 0.28 |
| Stromdichte (pA/pF) | 17.9 ± 1.9 |
| | (n= 15) |

3.2 Charakterisierung des I_{to} über die Inaktivierung des Gesamtauswärtsstroms

Die Eigenschaften des I_{to} lassen sich auch basierend auf der komplexen Inaktivierungskinetik des Gesamtauswärtsstroms beschreiben. Dabei wird dem Abfall des Gesamtauswärtsstroms eine mehrfach-exponentielle Funktion angeglichen und den jeweiligen Stromkomponenten ein Anteil am Gesamtauswärtsstrom zugeschrieben. Für diese Methode muss ein längerer depolarisierender Puls als im Vorpuls-Subtraktionsprotokoll angewendet werden, damit der Abfall des Gesamtauswärtsstroms möglichst vollständig abgebildet wird. Da in der vorliegenden Arbeit besonderer Wert auf den schnell inaktivierenden Kaliumauswärtsstrom I_{to} gelegt wurde, wurden

Pulsprotokolle von fünf Sekunden Länge als ausreichend befunden. Für die Generierung der Daten wurde ausgehend von -80 mV fünf Sekunden lang auf $+40$ mV depolarisiert (siehe Abb. 12). Die fünf Sekunden langen Kurven zeigten eine sehr schnelle und mindestens eine langsame Komponente der Inaktivierung (Abb. 12). Es wurden zweifach- und dreifach-exponentielle Funktionen verwendet, deren Parameter im Folgenden beschrieben werden. Der kleinsten Zeitkonstante und ihrer Amplitude wurde die I_{to} -Komponente zugeordnet.

3.2.1 Anwendung einer zweifach-exponentiellen Funktion

Die Anwendung einer zweifach-exponentiellen Fit-Funktion ist in Abbildung 12 für die Stromantwort einer männlichen Wildtyp-Myozyte gezeigt. Aus der zweifach-exponentiellen Funktion konnten zwei Stromkomponenten mit den Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 und ihre absoluten Amplituden A_1 und A_2 ermittelt werden. Zusätzlich ist der prozentuale Anteil, den die Amplitude der jeweiligen Stromkomponente am Gesamtstromabfall hatte, jeweils in Klammern hinter der Inaktivierungszeitkonstante angegeben. Die absoluten Amplituden-Werte wurden auf die Zellgröße normiert und man erhielt dadurch die Stromdichte (in pA/pF) der Komponenten.

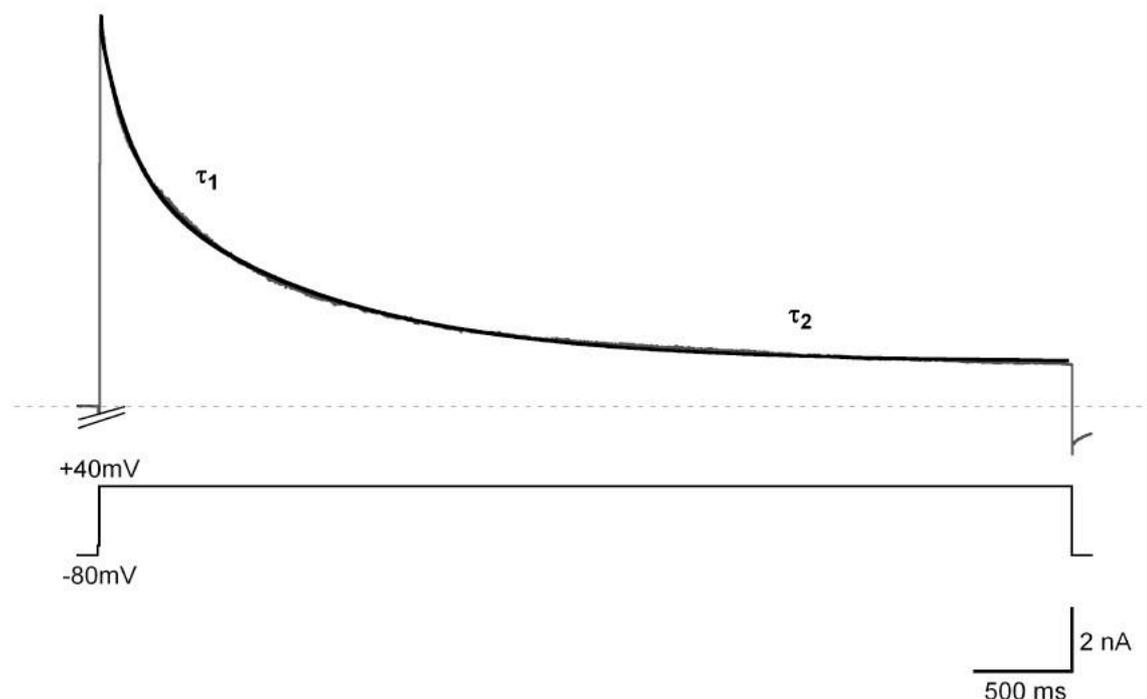


Abbildung 12: Inaktivierung des Gesamtauswärtsstroms in männlichen Wildtyp-Myozyten mit Anwendung eines zweifach-exponentiellen Fits.

Repräsentative Stromkurve einer männlichen Wildtyp-Myozyte bei Anwendung des 5s-Protokolls. Unter den Stromkurven befinden sich die Spannungssprünge aus dem Pulsprotokoll. Die schwarze durchgezogene Linie repräsentiert die zweifach-exponentielle Funktion zur Beschreibung der Kinetik des Stromabfalls. τ_1 und τ_2 sind die Zeitkonstanten der Inaktivierung der Stromkomponenten. Die gepunktete Linie stellt die Nulllinie dar.

Für die schnelle Komponente der Inaktivierung wurde eine Zeitkonstante von $\tau_1 = 158 \pm 22$ ms (47 ± 3 %; $n = 13$) ermittelt. Die aus der Fit-Funktion ermittelten Amplituden der schnellen Komponente lagen zwischen 2 und 6 nA und ergaben im Mittel einen Wert von 4.11 ± 0.36 nA ($n = 13$). Die Stromdichte der schnellen Komponente lag zwischen 13 und 38 pA/pF und ergab einen Mittelwert von 22.4 ± 1.9 pA/pF ($n = 13$). Die langsame Stromkomponente hatte eine Inaktivierungszeitkonstante von $\tau_2 = 1219 \pm 50$ ms (53 ± 3 %; $n = 13$). Die Amplitude der langsamen Komponente lag zwischen 2 und 8 nA mit einem Mittelwert von 4.69 ± 0.52 nA. Die Stromdichte der langsamen Komponente betrug im Mittel 25.4 ± 2.5 pA/pF. Die Ergebnisse der Anwendung einer zweifach-exponentiellen Funktion an der Stromantwort männlicher Wildtyp-Myozyten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Daten für männliche Wildtyp-Myozyten durch Anpassung einer zweifach-exponentiellen Funktion an den Gesamtauswärtsstrom. Zusätzlich ist der RMS-Wert (Root Mean Square, Quadratisches Mittel) der zweifach-exponentiellen Auswertung angegeben.

| ♂ | KCHIP2 ^{+/+} |
|---------------------------------|-----------------------|
| τ_1 (ms) | 158 ± 22 |
| τ_2 (ms) | 1219 ± 50 |
| A_1 (nA) | 4.11 ± 0.36 |
| A_2 (nA) | 4.69 ± 0.52 |
| A_0 (nA) | 0.93 ± 0.08 |
| % A_1 | 47 ± 3 |
| % A_2 | 53 ± 3 |
| Cap (pF) | 186 ± 12 |
| D_1 (pA/pF) | 22.4 ± 1.9 |
| D_2 (pA/pF) | 25.4 ± 2.5 |
| D_0 (pA/pF) | 5.0 ± 0.3 |
| D_{gesamt} (pA/pF) | 53.9 ± 3.7 |
| $\text{RMS}_{2\text{exp}}$ (pA) | 52.4 ± 4.3 |
| | (n= 13) |

3.2.2 Anwendung einer dreifach-exponentiellen Funktion

Die Fit-Funktion der zweifach-exponentiellen Auswertung schnitt mehrmals den Verlauf der Stromkurve (siehe Abb. 12). Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die Fit-Funktion nicht gut an die Stromkurve anpasst. Der RMS-Wert für den zweifach-exponentiellen Fit, welcher die Güte des Fits angibt, betrug 52.4 ± 4.3 pA. Anschließend wurde auch eine dreifach-exponentiellen Funktion an den Abfall des Gesamtauswärtsstroms angepasst. Die Fit-Funktion des dreifach-exponentiellen Fits schmiegte sich besser dem Gesamtauswärtsstrom an. Dies ließ sich ebenfalls in dem signifikant besseren RMS-

Wert bestätigen (25.8 ± 1.5 pA, $p \leq 0.0001$). Die Anwendung der dreifach-exponentiellen Auswertung ergab drei Zeitkonstanten der Inaktivierung (τ_1 , τ_2 und τ_3) mit ihren Amplituden A_1 , A_2 und A_3 . Aus diesen Amplituden und der Ganzzellkapazität wurden wiederum die Stromdichten (D_1 , D_2 und D_3) der einzelnen Komponenten bestimmt.

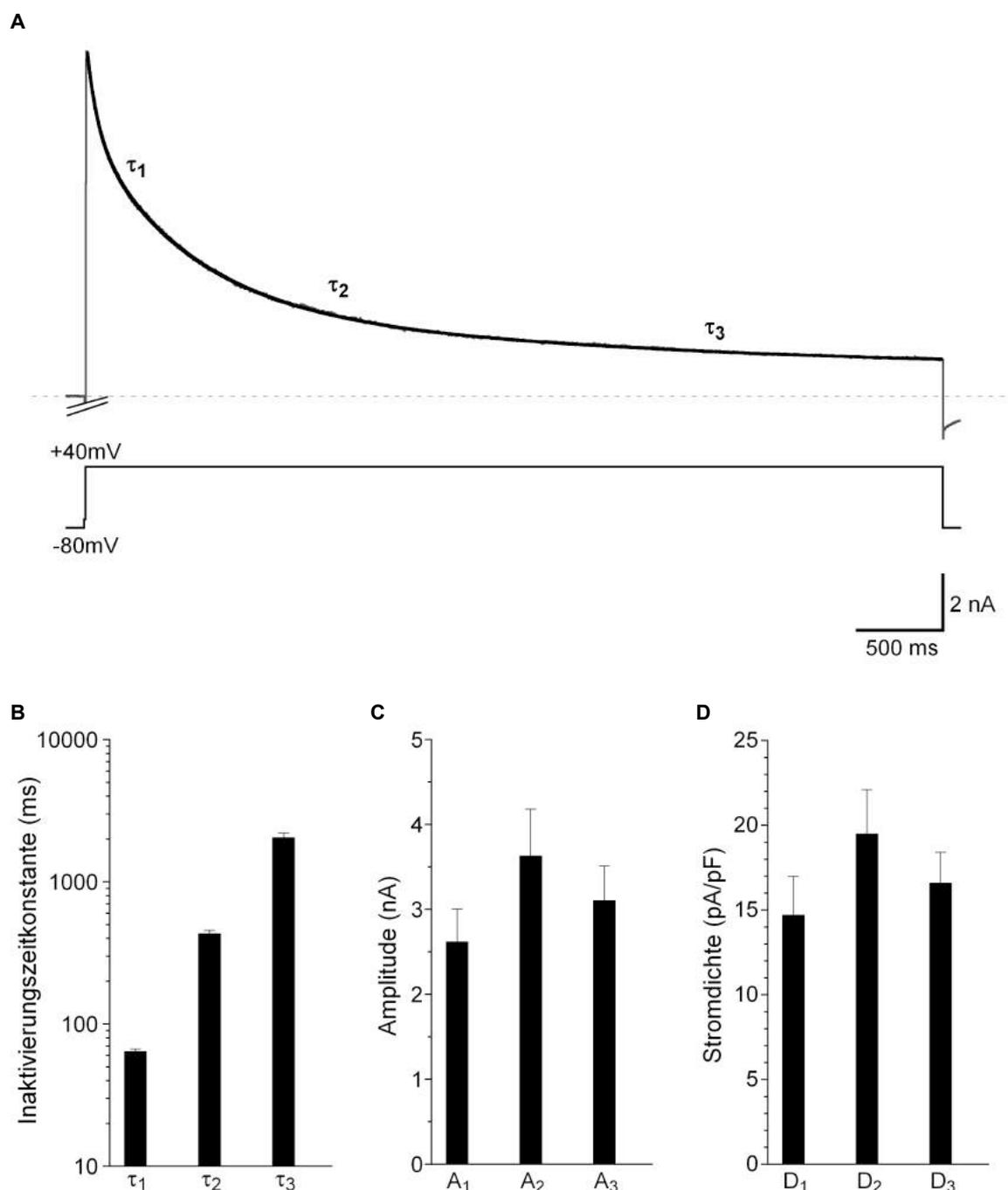


Abbildung 13: Inaktivierung des Gesamtauswärtsstroms in männlichen Wildtyp-Myozyten mit Anwendung eines dreifach-exponentiellen Fits.

A. Repräsentative Stromkurve einer männlichen Wildtyp-Myozyte bei Anwendung des 5s-Protokolls. Die schwarze durchgezogene Linie repräsentiert die 3-fach-exponentielle Funktion zur Beschreibung der Kinetik des Stromabfalls. τ_1 - τ_3 beschreiben die Komponenten des Stroms. Die gepunktete Linie stellt die Nulllinie dar. **B.** Zeitkonstanten der Inaktivierung der Komponenten τ_1 - τ_3 . **C.** Die dazugehörigen Stromamplituden der drei Stromkomponenten A_1 - A_3 . **D.** Die Stromdichten der Komponenten D_1 - D_3 . Wildtyp ♂: $n = 13$.

Die schnelle Stromkomponente des Gesamtauswärtsstroms ergab eine Zeitkonstante der Inaktivierung von $\tau_1 = 64.2 \pm 2.4$ ms (29 ± 5 %, $n = 13$). Die ermittelten Amplituden für die schnelle Komponente lagen zwischen 0.5 und 5 nA und ergaben einen Mittelwert von 2.62 ± 0.39 nA. Die Stromdichte betrug 14.7 ± 2.3 pA/pF für die schnelle inaktivierende Komponente D_1 . Die Zeitkonstante der mittleren Stromkomponente betrug $\tau_2 = 432 \pm 24$ ms (37 ± 4 %). Die dazugehörigen Amplituden lagen zwischen 1 und 7 nA und ergaben im Mittel 3.63 ± 0.55 nA. Der Stromdichte-Wert der mittleren Komponente D_2 betrug 19.5 ± 2.6 pA/pF. Die langsame Stromkomponente hatte einen Mittelwert der Inaktivierungszeitkonstante von $\tau_3 = 2048 \pm 157$ ms (34 ± 3 %). Die dazugehörigen Amplituden lagen zwischen 1 und 6 nA und hatten einen Mittelwert von 3.10 ± 0.41 nA. Die Stromdichte D_3 betrug im Mittel 16.6 ± 1.8 pA/pF. Alle beschriebenen Mittelwerte sind in Tabelle 4 aufgetragen.

Tabelle 4: Daten für männliche Wildtyp-Myozyten durch Anpassung einer dreifach-exponentiellen Funktion an den Gesamtauswärtsstrom. Zusätzlich ist der RMS-Wert (Root Mean Square, Quadratisches Mittel) der zwei- und dreifach-exponentiellen Auswertung angegeben.

| σ | KChIP2 ^{+/+} |
|-----------------------------|-----------------------|
| τ_1 (ms) | 64.2 ± 2.4 |
| τ_2 (ms) | 432 ± 24 |
| τ_3 (ms) | 2048 ± 157 |
| A_1 (nA) | 2.62 ± 0.39 |
| A_2 (nA) | 3.63 ± 0.55 |
| A_3 (nA) | 3.10 ± 0.41 |
| A_0 (nA) | 0.60 ± 0.10 |
| % A_1 | 29 ± 5 |
| % A_2 | 37 ± 4 |
| % A_3 | 34 ± 3 |
| Cap (pF) | 186 ± 12 |
| D_1 (pA/pF) | 14.7 ± 2.3 |
| D_2 (pA/pF) | 19.5 ± 2.6 |
| D_3 (pA/pF) | 16.6 ± 1.8 |
| D_0 (pA/pF) | 3.1 ± 0.5 |
| D_{gesamt} (pA/pF) | 53.9 ± 3.7 |
| RMS _{3exp} (pA) | 25.8 ± 1.5 |
| RMS _{2exp} (pA) | 52.4 ± 4.3 |
| | ($n = 13$) |

Neben dem oben bereits beschriebenen Vorteil, dass die Güte der dreifach-exponentiellen Fit-Funktion signifikant besser war als mit der zweifach-exponentiellen,

ergab die Auswertung mit der dreifach-exponentiellen Funktion eine sehr ähnliche Zeitkonstante für τ_1 , wie das Vorpuls-Subtraktions-Protokoll (vgl. 3-fach-exp.: 64.2 ± 2.4 ms ($n = 13$) vs. Vorpuls-Subtraktion: 62.2 ± 1.9 ms ($n = 15$)). Aber, im Gegensatz zur Vorpuls-Subtraktions-Methode, läuft man bei der dreifach-exponentiellen Auswertung des Gesamtstroms nicht Gefahr, mit dem Vorpuls-Protokoll, I_{t_0} unvollständig zu inaktivieren und somit eine zu kleine absolute Amplitude für I_{t_0} zu erhalten. Insbesondere wenn sich die Eigenschaften der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung ändern. Aufgrund der offensichtlichen Vorteile der dreifach-exponentiellen Auswertung wurden die nachfolgenden Ergebnisse basierend auf dieser Methode ermittelt.

3.3 Abhängigkeit des I_{t_0} vom KChIP2-Genotypen

Um den Einfluss des KChIP2-Genotyps auf die Eigenschaften des I_{t_0} beurteilen zu können, wurden zusätzlich Daten von KChIP2^{+/-}- und KChIP2^{-/-}-Myozyten gemessen und mit den Wildtyp-Daten verglichen. Zunächst werden die Daten aus den KChIP2^{-/-}-Myozyten den Wildtyp-Daten gegenübergestellt. Im Anschluss werden auch die Daten der KChIP2^{+/-}-Myozyten hinzugenommen.

3.3.1 Homozygoter KChIP2-Knockout (KChIP2^{-/-})

Die generierten Daten aus den KChIP2^{-/-}-Myozyten zeigten kinetische Unterschiede zu den Wildtyp-Myozyten. Für die Auswertung der Inaktivierung des Gesamtauswärtsstroms wurde bei den KChIP2^{-/-}-Myozyten zunächst auch eine dreifach-exponentielle Funktion angewendet. Diese erbrachte aber nur bei 19 von insgesamt 26 KChIP2^{-/-}-Myozyten verwertbare Ergebnisse. Bei den übrigen 7 von 26 KChIP2^{-/-}-Myozyten ließ sich nur die zweifach-exponentielle Auswertemethode anwenden. Die Daten aus der Auswertung mit der dreifach-exponentiellen Fit-Funktion sind in Abbildung 14 vergleichend mit dem Wildtyp abgebildet. Die Auswertung in den sieben KChIP2^{-/-}-Myozyten mit der zweifach-exponentiellen Funktion ergab für beide Inaktivierungszeitkonstanten Werte, die mit denen für τ_2 und τ_3 aus der dreifach-exponentiellen Auswertung übereinstimmen (siehe Tabelle 5). Die Werte, sowohl für die zweifach- als auch die dreifach-exponentielle Auswertung sind in Tabelle 5 aufgetragen und den Daten der Wildtyp-Myozyten aus der dreifach-exponentiellen Auswertung gegenübergestellt.

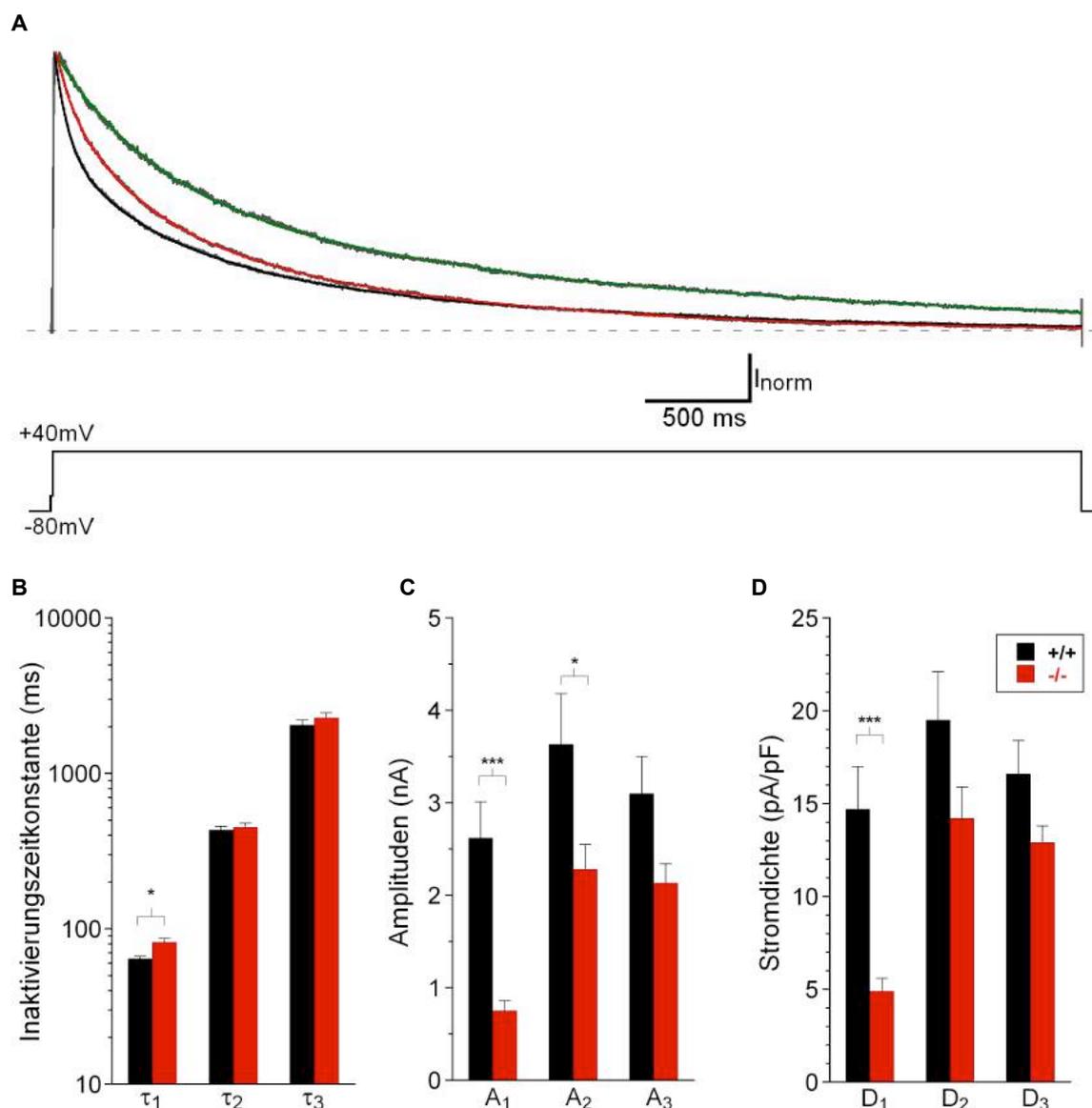


Abbildung 14: Inaktivierung des Gesamtauswärtsstroms in männlichen Myozyten der Genotypen KChIP2^{+/+} und KChIP2^{-/-} bei Anwendung des 5s-Protokolls.

A. Repräsentative Stromkurven der Genotypen KChIP2^{+/+} in schwarz und KChIP2^{-/-} in rot bei Anwendung des dreifach-exponentiellen Fits. Repräsentative Stromkurve mit Fit-Funktion einer KChIP2^{-/-}-Myozyte, die sich nur durch zweifach exponentiellen Fit auswerten ließ, in grün. Nicht-inaktivierende Stromkomponenten (unterhalb der gestrichelten Linie) sind nicht dargestellt. Die Stromkurven wurden normiert. **B.** Inaktivierungszeitkonstanten bei dreifach-exponentieller Auswertung der drei Stromkomponenten (τ_1 - τ_3) für KChIP2^{+/+} (n = 13) und KChIP2^{-/-} (n = 19). **C.** Amplituden der einzelnen Stromkomponenten (A₁-A₃). **D.** Stromdichtewerte der einzelnen Stromkomponenten (D₁-D₃). *p < 0.05, ** p ≤ 0.001, ***p ≤ 0.0001

Vergleich man die Daten aus der dreifach-exponentiellen Auswertung in Wildtyp- und KChIP2^{-/-}-Myozyten untereinander, so zeigte sich, dass die Werte der drei Stromkomponenten sowohl in ihrer Amplitude, als auch Kinetik von den Wildtyp-Werten zu unterscheiden waren. Makroskopisch zeigte sich eine verlangsamte schnelle Komponente der Inaktivierung (siehe Abb. 14A). Die Inaktivierungszeitkonstante τ_1 betrug in KChIP2^{-/-} 81.7 ± 4.9 ms (n = 19). Sie war damit signifikant größer (p = 0.02)

als im Wildtyp (siehe Abb. 14B und Tabelle 5). Die dazugehörige Amplitude von A_1 betrug in den KChIP2^{-/-}-Myozyten 0.75 ± 0.11 nA ($n = 19$). Dieser Wert war verglichen mit dem Wildtyp signifikant kleiner ($p \leq 0.0001$, siehe Abb. 14C und Tabelle 5). Der prozentuale Anteil der Amplitude A_1 an der Gesamtstrom-Amplitude war auch signifikant kleiner in KChIP2^{-/-}-Myozyten ($15 \pm 2\%$) verglichen mit dem Wildtyp ($29 \pm 5\%$; $p = 0.004$). Die Stromdichte D_1 ergab in KChIP2^{-/-} einen Mittelwert von 4.9 ± 0.7 pA/pF. Dieser Wert war, ebenfalls wie die Amplitude, signifikant kleiner als in den Wildtyp-Myozyten und betrug nur noch knapp ein Drittel der Stromdichte D_1 im Wildtyp ($p \leq 0.0001$, siehe Abb. 14D und Tabelle 5). Die Zeitkonstante der mittleren Stromkomponente in KChIP2^{-/-}-Myozyten betrug im Mittel $\tau_2 = 451 \pm 26$ ms ($42 \pm 2\%$) und war in der Größenordnung vergleichbar mit der vom Wildtyp (siehe Tabelle 5). Die dazugehörige Amplitude ergab im Mittel 2.28 ± 0.27 nA und war signifikant kleiner als im Wildtyp ($p = 0.05$, siehe Abb. 14C und Tabelle 5). Der Mittelwert der Stromdichte der mittleren Komponente betrug 14.2 ± 1.7 pA/pF. Die Stromdichte war zwar kleiner als im Wildtyp, aber nicht signifikant unterschiedlich (siehe Abb. 14D und Tabelle 5). Die langsame Stromkomponente des Gesamtauswärtsstroms im KChIP2^{-/-}-Genotyp hatte eine Inaktivierungszeitkonstante τ_3 von 2274 ± 177 ms ($42 \pm 2\%$). Die dazugehörige Amplitude ergab 2.13 ± 0.21 nA und die Stromdichte betrug im Mittel 12.9 ± 0.9 pA/pF. Die Werte der langsamen Stromkomponente waren nicht signifikant unterschiedlich verglichen mit dem Wildtyp.

Es konnte also gezeigt werden, dass sich der Verlust von KChIP2 selektiv auf die Kinetik der schnellen Stromkomponente τ_1 auswirkt und nicht auf die langsamen Komponenten der Inaktivierung. Die Daten der sieben von insgesamt 26 KChIP2^{-/-}-Myozyten, die sich nicht mit dem dreifach-exponentiellen Fit auswerten ließen, sind in Tabelle 5 vergleichend aufgeführt (KChIP2^{-/-} 2exp). Die Inaktivierungszeitkonstante der schnellen Stromkomponente dieser sieben KChIP2^{-/-}-Myozyten betrug 444 ± 29 ms und war vergleichbar mit den Werten für die zweite Komponente der dreifach-exponentiellen Auswertung. Ebenso verhielt es sich mit der Amplitude bzw. der Dichte der schnellen Stromkomponente, diese betragen 3.32 ± 0.53 nA bzw. 19.7 ± 2.8 pA/pF ($n = 7$). Der Wert für die Inaktivierungszeitkonstante der langsamen Stromkomponente betrug 2154 ± 274 ms und die dazugehörige Amplitude war 2.72 ± 0.32 nA bzw. die Dichte war 16.3 ± 1.7 pA/pF. Diese Werte waren in ihrer Größenordnung ebenfalls vergleichbar mit den Werten für die dritte Stromkomponente aus der dreifach-exponentiellen Auswertung (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Daten für männliche Myozyten durch Anwendung der dreifach-exponentiellen Auswertung in KChIP2^{+/+} sowie zweifach- und dreifach-exponentiellen Auswertung in KChIP2^{+/-}. Signifikanzen: *p < 0.05, **p ≤ 0.001, *** p ≤ 0.0001, jeweils verglichen mit KChIP2^{-/-} 3exp (Signifikanz-Bestimmung mit One Way ANOVA). §§p ≤ 0.001, §§§p ≤ 0.0001, RMS_{3exp} verglichen mit RMS_{2exp} (t-Test nach Student). ~19 bzw. 7 von insgesamt 26 KChIP2^{+/-}-Myozyten.

| ♂ | KChIP2 ^{+/+} 3exp | KChIP2 ^{+/-} 3exp | KChIP2 ^{-/-} 2exp |
|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Inaktivierung bei +40mV | | | |
| τ ₁ (ms) | 64.2 ± 2.4* | 81.7 ± 4.9 | - |
| τ ₂ (ms) | 432 ± 24 | 451 ± 26 | 444 ± 29 |
| τ ₃ (ms) | 2048 ± 157 | 2274 ± 177 | 2154 ± 274 |
| A ₁ (nA) | 2.62 ± 0.39*** | 0.75 ± 0.11 | - |
| A ₂ (nA) | 3.63 ± 0.55* | 2.28 ± 0.27 | 3.32 ± 0.53 |
| A ₃ (nA) | 3.10 ± 0.41 | 2.13 ± 0.21 | 2.72 ± 0.32 |
| A ₀ (nA) | 0.60 ± 0.10 | 0.30 ± 0.06 | 0.55 ± 0.11 |
| %A ₁ | 29 ± 5* | 15 ± 2 | - |
| %A ₂ | 37 ± 4 | 42 ± 2 | 54 ± 3 |
| %A ₃ | 34 ± 3 | 42 ± 2 | 46 ± 3 |
| Cap (pF) | 186 ± 12 | 170 ± 13 | 166 ± 6 |
| D ₁ (pA/pF) | 14.7 ± 2.3*** | 4.9 ± 0.7 | - |
| D ₂ (pA/pF) | 19.5 ± 2.6 | 14.2 ± 1.7 | 19.7 ± 2.8 |
| D ₃ (pA/pF) | 16.6 ± 1.8 | 12.9 ± 0.9 | 16.3 ± 1.7 |
| D ₀ (pA/pF) | 3.1 ± 0.5 | 2.0 ± 0.4 | 3.2 ± 0.5 |
| D _{gesamt} (pA/pF) | 53.9 ± 3.7** | 33.9 ± 2.9 | 39.2 ± 4.6 |
| RMS _{3exp} (pA) | 25.8 ± 1.5§§§ | 20.0 ± 0.9§§ | 21.2 ± 1.5 |
| RMS _{2exp} (pA) | 52.4 ± 4.3 | 25.8 ± 1.3 | 25.9 ± 3.1 |
| | (n = 13) | (n = 19~) | (n = 7~) |

3.3.2 Quantifizierung eines Gen-Dosis-Effekts auf I_{to} anhand des heterozygoten KChIP2-Genotyps (KChIP2^{+/-})

Anschließend wurden die bereits beschriebenen Ergebnisse um die Daten des KChIP2^{+/-}-Genotyps erweitert. Es sollte überprüft werden, ob die Inaktivierungskinetik, die Stromamplituden und die -dichten der heterozygoten Myozyten sich von denen der beiden anderen Genotypen (KChIP2^{+/+} und KChIP2^{-/-}) unterscheiden. Dafür wurden die oben beschriebenen Datenwerte für die dreifach-exponentielle Auswertung um die der KChIP2^{+/-}-Myozyten erweitert (siehe Abb. 15).

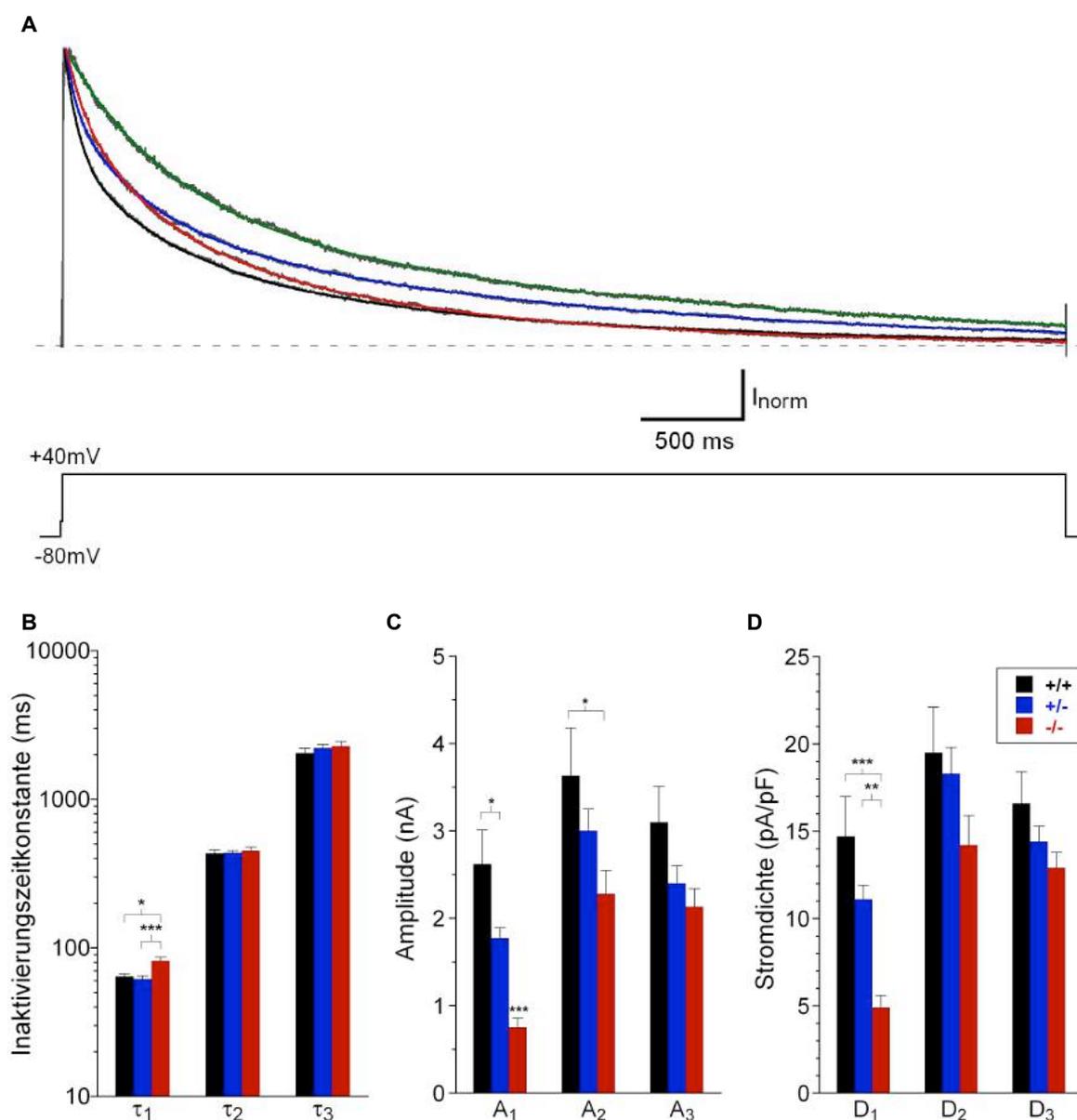


Abbildung 15: Inaktivierung des Gesamtauswärtsstroms in männlichen Myozyten der Genotypen KChIP2^{+/+}, KChIP2^{+/-} und KChIP2^{-/-} bei Anwendung des 5s-Protokolls.

A. Repräsentative Stromkurven jeweils einer Myozyte der Genotypen KChIP2^{+/+} in schwarz, KChIP2^{+/-} in blau und KChIP2^{-/-} in rot bei Anwendung des dreifach-exponentiellen Fits. Repräsentative Stromkurve mit Fit-Funktion einer KChIP2^{-/-}-Myozyte, die sich nur durch den zweifach-exponentiellen Fit auswerten ließ, in grün. Nicht-inaktivierende Stromkomponenten (unterhalb der gestrichelten Linie) sind nicht dargestellt. Die Stromkurven wurden normiert. **B.** Inaktivierungszeitkonstanten der drei Stromkomponenten in den Genotypen KChIP2^{+/+} (n = 13, schwarz), KChIP2^{+/-} (n = 38, blau) und KChIP2^{-/-} (n=19, rot). **C.** Amplituden der einzelnen Stromkomponenten (A₁-A₃). **D.** Stromdichtewerte der einzelnen Stromkomponenten (D₁-D₃). *p < 0.05, ** p ≤ 0.001, ***p ≤ 0.0001

Die Inaktivierungszeitkonstante τ_1 in KChIP2^{+/-}-Myozyten war mit einem Mittelwert von 61.7 ± 3.0 ms (26 ± 2 %, n = 38) nahezu identisch verglichen mit dem Wildtyp (siehe Abb. 15B und Tabelle 5). Die Inaktivierungszeitkonstante des Wildtyps und die des KChIP2^{+/-}-Genotyps waren aber signifikant kleiner als die des KChIP2^{-/-}-Genotyps (81.7 ± 4.9 ms, n = 19, vs. KChIP2^{+/+}: p = 0.02, vs. KChIP2^{+/-}: p = 0.0005, siehe Tabelle 6).

Der Wert für A_1 ergab in KChIP2^{+/-}-Myozyten 1.77 ± 0.12 pA ($n = 38$) und war signifikant kleiner als im Wildtyp ($p = 0.006$) sowie signifikant größer als in den KChIP2^{-/-}-Myozyten ($p = 0.0001$, siehe Tabelle 6). Die Stromdichte D_1 betrug in KChIP2^{+/-}-Myozyten 11.1 ± 0.8 pA/pF ($n = 38$) und war auch signifikant größer als im homozygoten Knockout ($p \leq 0.0001$), aber nicht signifikant unterschiedlich zu D_1 der Wildtyp-Myozyten (siehe Tabelle 6). Die Inaktivierungszeitkonstante der Stromkomponente τ_2 lag in KChIP2^{+/-}-Myozyten bei 436 ± 15 ms ($n = 38$), die dazugehörige Stromamplitude betrug 3.00 ± 0.25 nA und D_2 betrug im Mittel 18.3 ± 1.5 pA/pF. Weder τ_2 , A_2 noch D_2 zeigten signifikante Unterschiede zu den Wildtyp- oder den KChIP2^{-/-}-Myozyten (siehe Tabelle 6). Die Zeitkonstante der Inaktivierung τ_3 in KChIP2^{+/-}-Myozyten betrug 2218 ± 115 ms ($n = 38$), die Amplitude der dritten Stromkomponente ergab 2.42 ± 0.18 nA und die dazugehörige Stromdichte hatte einen Mittelwert von 14.4 ± 0.9 pA/pF. Diese Werte waren ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich zu den Wildtyp- und KChIP2^{-/-}-Daten (siehe Tabelle 6).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl Wildtyp, als auch KChIP2^{+/-}, signifikante Unterschiede bezüglich der schnellen Stromkomponente verglichen mit KChIP2^{-/-} zeigten. Die Inaktivierungszeitkonstante τ_1 war signifikant größer in KChIP2^{-/-} verglichen mit Wildtyp und KChIP2^{+/-}. Zwischen dem Wildtyp und KChIP2^{+/-} zeigten sich hingegen nahezu identische Werte für die Inaktivierungszeitkonstante τ_1 . Zwar war die Amplitude der schnellen Komponente (A_1) in KChIP2^{+/-}-Myozyten signifikant kleiner als im Wildtyp (siehe oben), allerdings ließ sich keine signifikante Reduktion der Stromdichte D_1 nachweisen (siehe Tabelle 6). Es waren zwischen allen drei Genotypen keine signifikanten Unterschiede in den Stromkinetiken der zwei langsameren Stromkomponenten τ_2 und τ_3 festzustellen (siehe Abb. 15B-D).

3.3.3 Die Erholung von der Inaktivierung

Die Erholung von der Inaktivierung wurde für den Gesamtauswärtsstrom in allen drei Genotypen (KChIP2^{+/+}, KChIP2^{+/-} und KChIP2^{-/-}) untersucht. Die Daten wurden mit dem Recovery-Protokoll erzeugt (siehe Kapitel 2.2.5.3, Abbildung 8). Dieses Protokoll generierte mit jeder Messung zwei Stromstärken-Werte I_{test} und I_{contr} , aus denen ein Quotient erzeugt wurde, welcher zwischen den Werten null und eins lag. Diese Werte wurden anschließend semi-logarithmisch gegen die Zwischenpulsdauer in einem Graphen aufgetragen. An die aus den Datenpunkten entstehende Kurve wurde eine zweifach-exponentielle Funktion angepasst (siehe Kapitel 2.3.3), welche durch zwei Zeitkonstanten, $\tau_{\text{rec}1}$ und $\tau_{\text{rec}2}$, beschrieben wurde. Im Folgenden sind die Ergebnisse für die Erholung von der Inaktivierung in männlichen Myozyten dargestellt. Abbildung 16 zeigt repräsentative Stromfamilien für die unterschiedlichen KChIP2-Genotypen.

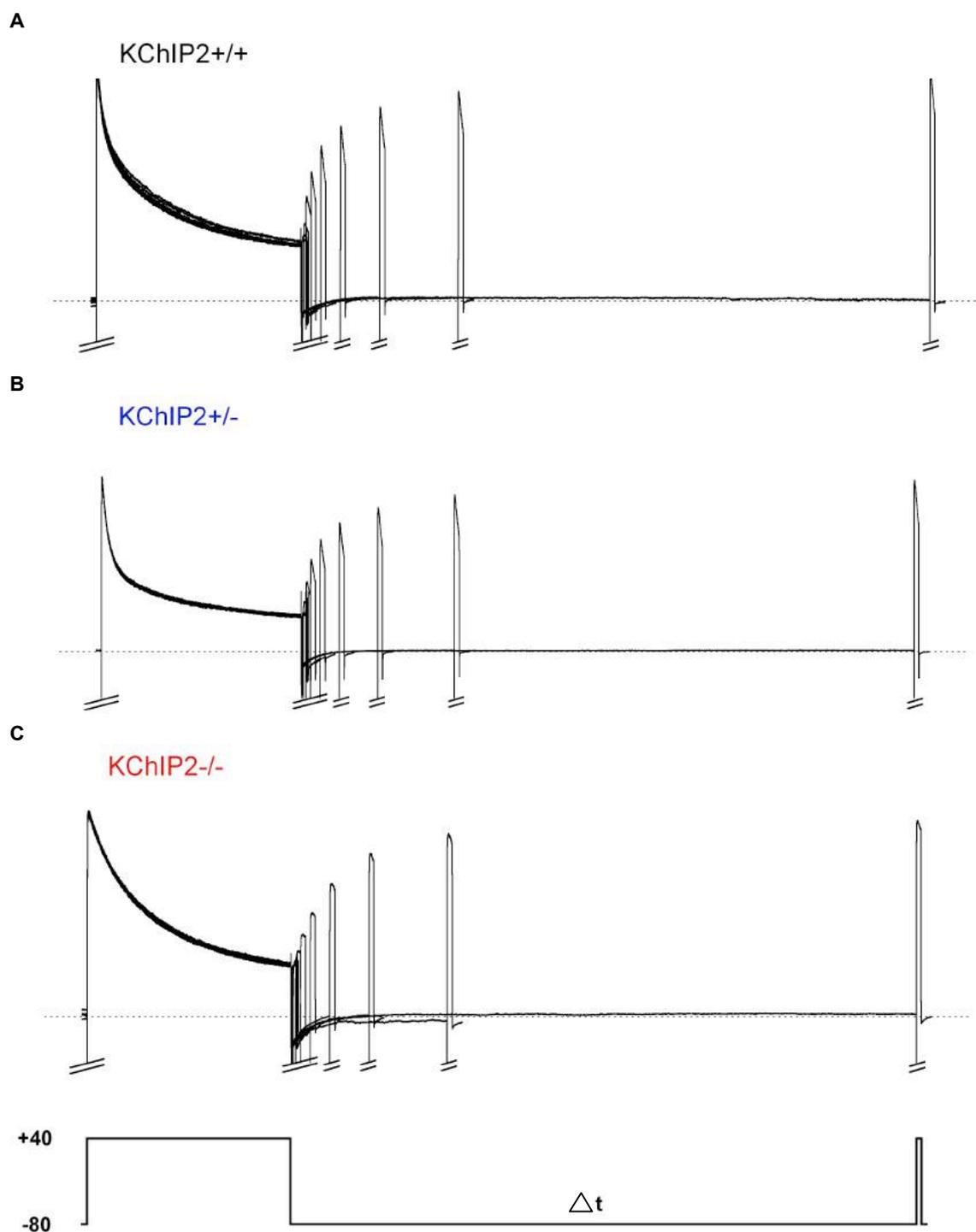


Abbildung 16: Repräsentative Stromkurven von männlichen KCHIP2^{+/+}- (A), KCHIP2^{+/-}- (B) und KCHIP2^{-/-}- Myozyten (C), die mit dem Recovery-Protokoll evoziert wurden.

Abbildung 17 zeigt die unterschiedlichen Kinetiken in semi-logarithmischer Auftragung und nach Anpassung einer zweifach-exponentiellen Funktion an die Daten. In den KCHIP2^{-/-}-Myozyten zeigte sich eine deutlich verlangsamt Erholung von der Inaktivierung (Abbildung 17). Die durch die zweifach exponentielle Funktion ermittelten Werte für $\tau_{\text{rec}1}$ und $\tau_{\text{rec}2}$ waren beide größer, als die der anderen beiden Genotypen. Die

Zeitkonstante $\tau_{\text{rec}1}$ im Knockout betrug 381 ± 43 ms (58 ± 2 %; $n = 11$) und war signifikant langsamer verglichen mit dem Wildtyp ($p \leq 0.0001$) und dem heterozygoten Genotyp ($p \leq 0.0001$, siehe Tabelle 6). Der Wert für $\tau_{\text{rec}1}$ war zwar in KChIP2^{+/-}-Myozyten etwas schneller als im Wildtyp, es bestand aber kein signifikanter Unterschied. Der prozentuale Anteil von $\tau_{\text{rec}1}$ an der Gesamtfunktion war nicht signifikant unterschiedlich in den drei beschriebenen Genotypen (siehe Tabelle 6). Die langsame Recovery-Zeitkonstante in den KChIP2^{-/-}-Myozyten war mit $\tau_{\text{rec}2} = 2296 \pm 215$ ms (42 ± 3 %; $n = 11$) ebenso deutlich langsamer verglichen mit den beiden anderen Genotypen (vs. KChIP2^{+/+}: $p = 0.0004$; vs. KChIP2^{+/-}: $p \leq 0.0001$). Auch $\tau_{\text{rec}2}$ war etwas schneller in KChIP2^{+/-} verglichen mit KChIP2^{+/+}, dieser Unterschied war aber nicht statistisch signifikant (siehe Tabelle 6). Für die KChIP2^{-/-}-Myozyten, die sich nur mit einer zweifach-exponentiellen Funktion auswerten ließen (siehe Kapitel 3.3.1), sind die Werte für die Erholung von der Inaktivierung separat in Tabelle 6 aufgeführt. Aufgrund einer geringen Zellanzahl ($n = 2$) wurden keine Mittelwerte gebildet, sondern die beiden Einzelwerte aufgeführt. Sie sind in ihrer Größenordnung aber vergleichbar mit den $\tau_{\text{rec}1}$ - und $\tau_{\text{rec}2}$ -Werten der dreifach-exponentiell auswertbaren KChIP2^{-/-}-Myozyten (siehe Tabelle 6).

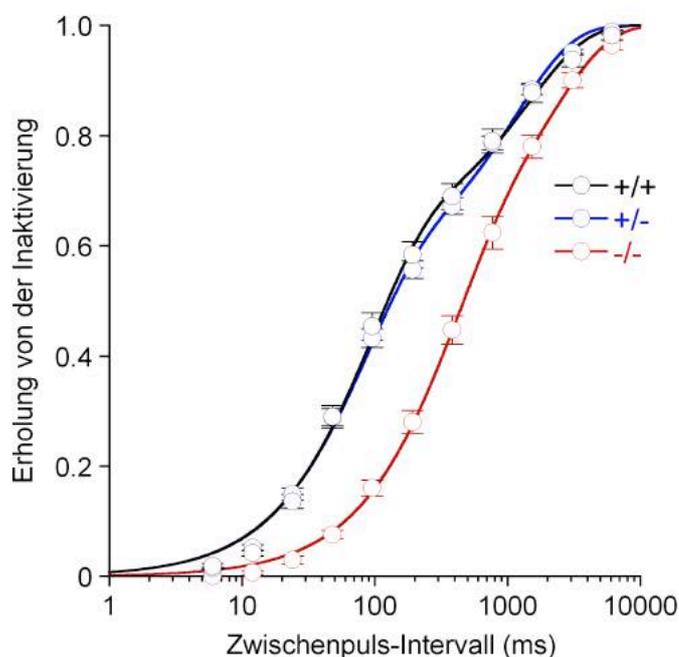


Abbildung 17: Die Erholung von der Inaktivierung in männlichen Myozyten.

Semi-logarithmische Darstellung der Daten bei Anwendung des Recovery-Protokolls. Die durchgezogene Linie ist eine zweifach-exponentielle Funktion zur Darstellung der Kinetik. -○- KChIP2^{+/+} ($n = 9$); -○- KChIP2^{+/-} ($n = 36$); -○- KChIP2^{-/-} ($n = 11$).

3.3.4 Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung

Als nächstes wurde die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung untersucht. Dafür wurde das variable Vorpulsprotokoll verwendet (siehe Material und Methoden, 2.3.5.4). Die Daten wurden mit einer zweifachen Boltzmann-Funktion ausgewertet, sodass sich jeweils zwei Werte für das Membranpotential der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung ergaben. $V_{1/21}$ und $V_{1/22}$ definieren die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung für zwei Stromkomponenten. Makroskopisch war der Kurvenverlauf der zweifachen Boltzmann-Funktion der KChIP2^{-/-}-Daten deutlich von den Kurven der KChIP2^{+/+}- und KChIP2^{+/-}-Myozyten zu unterscheiden (Abbildung 18D). Die ermittelten Werte für $V_{1/21}$ ergaben im Wildtyp -52.8 ± 1.4 mV (63 ± 8 %, $n = 11$) und in KChIP2^{+/-}-Myozyten -54.1 ± 0.8 mV (52 ± 4 %, $n = 31$). Im Vergleich dazu war der ermittelte $V_{1/21}$ -Wert von KChIP2^{-/-} mit $-69.7 \text{ mV} \pm 5.4 \text{ mV}$ (10 ± 1 %, $n = 11$) signifikant negativer als in den anderen beiden Genotypen (vs. KChIP2^{+/+}: $p = 0.0002$, vs. KChIP2^{+/-}: $p \leq 0.0001$). Ebenso war der relative Anteile der Komponente $V_{1/21}$ signifikant größer im Wildtyp und KChIP2^{+/-} als in den KChIP2^{-/-}-Myozyten (siehe Tabelle 6). Die ermittelten Werte für $V_{1/22}$ zeigten keinen Unterschied zwischen den Genotypen. Sie ergaben für die Wildtyp-Zellen einen Mittelwert von -36.1 ± 3.5 mV, für die KChIP2^{+/-}-Myozyten einen Wert von -34.1 ± 0.9 mV und für die KChIP2^{-/-}-Myozyten einen Wert von -34.9 ± 1.4 mV. Der Vergleich der zugehörigen Steigungsfaktoren der beiden $V_{1/2}$ -Werte, ergab lediglich für k_1 einen signifikant höheren Wert in KChIP2^{-/-}-Myozyten mit 23.5 ± 7.4 mV verglichen mit den beiden anderen Genotypen (KChIP2^{+/+}: 8.5 ± 0.9 mV, $p = 0.02$; KChIP2^{+/-}: 9.8 ± 0.5 mV; $p = 0.02$). Die Werte für k_2 waren in allen drei Genotypen nicht signifikant unterschiedlich voneinander (siehe Tabelle 6).

Für die KChIP2^{-/-}-Myozyten, die sich nur mit einer zweifach-exponentiellen Funktion auswerten ließen (siehe Kapitel 3.3.1), sind die Werte für die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung separat in Tabelle 6 aufgeführt (KChIP2^{-/-} 2exp). Diese Zellen ließen sich außerdem auch nicht durch eine zweifache Boltzmann-Funktion auswerten, sondern lediglich durch eine einfache. Der Wert für $V_{1/2}$ betrug -33.0 ± 2.8 mV und der Wert für den Steigungsfaktor k betrug 6.1 ± 0.4 mV ($n = 3$). Diese Werte waren nahezu identisch verglichen mit den Werten von $V_{1/22}$ der anderen Genotypen (siehe Tabelle 6).

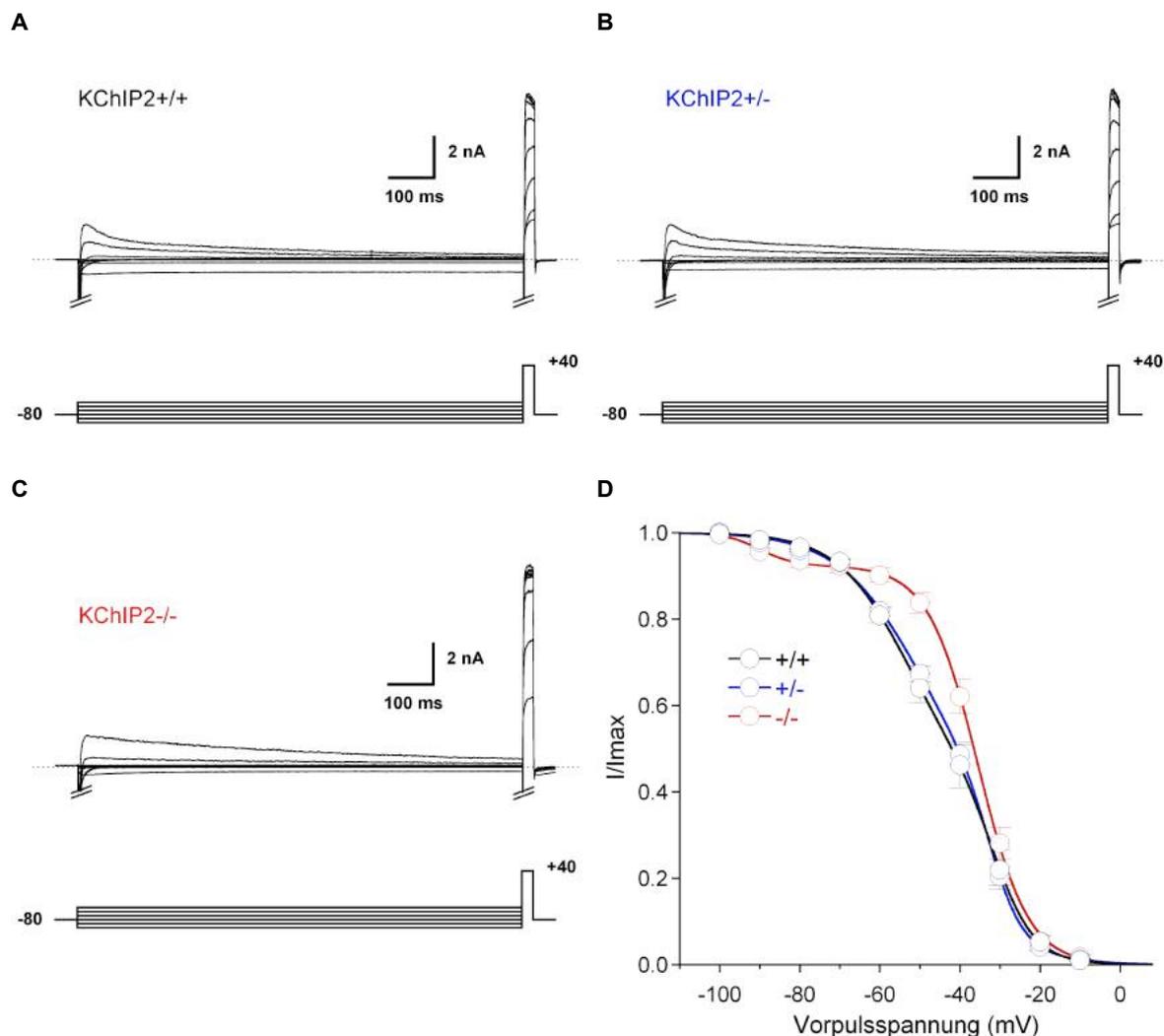


Abbildung 18: Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung in männlichen Myozyten.

A.-C. Repräsentative Stromkurven männlicher Myozyten der Genotypen KChIP2^{+/+}, KChIP2^{+/-} und KChIP2^{-/-}, die durch das variable Vorpuls-Protokoll evoziert wurden. **D.** Geplottete Daten zur Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung. -○-KChIP2^{+/+} (n = 11); -○-KChIP2^{+/-} (n = 31); -○-KChIP2^{-/-} (n = 11).

3.3.5 Zusammenfassung der Parameter für männlichen Myozyten

Der Genotypenvergleich zeigte signifikante Unterschiede bezüglich der schnellen Stromkomponente des Gesamtauswärtsstroms zwischen allen drei Genotypen. Die Inaktivierungszeitkonstante τ_1 war signifikant langsamer in KChIP2^{-/-}-Myozyten verglichen mit dem Wildtyp und KChIP2^{+/-}, in denen sie nahezu gleich groß war. Die Amplitude der schnellen Komponente A_1 war in allen drei Genotypen signifikant unterschiedlich. Die Stromdichte D_1 war hingegen nur in KChIP2^{-/-}-Myozyten signifikant kleiner. Die Recovery-Kinetik und die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung waren ebenfalls signifikant unterschiedlich in den KChIP2^{-/-}-Myozyten verglichen mit den anderen beiden Genotypen. Zwischen den Wildtyp- und KChIP2^{+/-}-Myozyten zeigten sich dort hingegen keine signifikanten Unterschiede. Die beschriebenen Parameter sind in Tabelle 6 gegenübergestellt.

Tabelle 6: Alle Daten für männliche Myozyten. Signifikanzen: *p < 0.05, ** p ≤ 0.001, *** p ≤ 0.0001, jeweils verglichen mit KChIP2^{-/-} 3-exp (Signifikanz-Bestimmung mit One Way ANOVA). °p < 0.05, °°p ≤ 0.001, °°°p ≤ 0.0001, jeweils verglichen mit KChIP2^{+/+} (Signifikanz-Bestimmung mit One Way ANOVA). §p < 0.05, §§p ≤ 0.001, §§§p ≤ 0.0001, RMS_{3exp} verglichen mit RMS_{2exp} (t-Test nach Student). ~19 bzw. 7 von insgesamt 26 KChIP2^{-/-}-Myozyten.

| ♂ | KChIP2 ^{+/+} 3-exp | KChIP2 ^{+/-} 3-exp | KChIP2 ^{-/-} 3-exp | KChIP2 ^{-/-} 2-exp |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Inaktivierung bei +40mV | | | | |
| τ ₁ (ms) | 64.2 ± 2.4* | 61.7 ± 3.0** | 81.7 ± 4.9 | - |
| τ ₂ (ms) | 432 ± 24 | 436 ± 15 | 451 ± 26 | 444 ± 29 |
| τ ₃ (ms) | 2048 ± 157 | 2218 ± 115 | 2274 ± 177 | 2154 ± 274 |
| A ₁ (nA) | 2.62 ± 0.39*** | 1.77 ± 0.12***/° | 0.75 ± 0.11 | - |
| A ₂ (nA) | 3.63 ± 0.55* | 3.00 ± 0.25 | 2.28 ± 0.27 | 3.32 ± 0.53 |
| A ₃ (nA) | 3.10 ± 0.41 | 2.42 ± 0.18 | 2.13 ± 0.21 | 2.72 ± 0.32 |
| A ₀ (nA) | 0.60 ± 0.10 | 0.25 ± 0.05°° | 0.30 ± 0.06° | 0.55 ± 0.11 |
| %A ₁ | 29 ± 5* | 26 ± 2* | 15 ± 2 | - |
| %A ₂ | 37 ± 4 | 40 ± 2 | 42 ± 2 | 54 ± 3 |
| %A ₃ | 34 ± 3 | 34 ± 1 | 42 ± 2 | 46 ± 3 |
| Cap (pF) | 186 ± 12 | 169 ± 8 | 170 ± 13 | 166 ± 6 |
| D ₁ (pA/pF) | 14.7 ± 2.3*** | 11.1 ± 0.8** | 4.9 ± 0.7 | - |
| D ₂ (pA/pF) | 19.5 ± 2.6 | 18.3 ± 1.5 | 14.2 ± 1.7 | 19.7 ± 2.8 |
| D ₃ (pA/pF) | 16.6 ± 1.8 | 14.4 ± 0.9 | 12.9 ± 0.9 | 16.3 ± 1.7 |
| D ₀ (pA/pF) | 3.1 ± 0.5 | 1.4 ± 0.3° | 2.0 ± 0.4 | 3.2 ± 0.5 |
| D _{gesamt} (pA/pF) | 53.9 ± 3.7** | 45.2 ± 2.3* | 33.9 ± 2.9 | 39.2 ± 4.6 |
| RMS _{3exp} (pA) | 25.8 ± 1.5§§§ | 22.0 ± 0.8§§§ | 20.0 ± 0.9§§ | 21.2 ± 1.5 |
| RMS _{2exp} (pA) | 52.4 ± 4.3 | 44.4 ± 2.2 | 25.8 ± 1.3 | 25.9 ± 3.1 |
| | (n = 13) | (n = 38) | (n = 19~) | (n = 7~) |
| Erholung von der Inaktivierung | | | | |
| τ _{rec1} (ms) | 94.5 ± 5.4*** | 88.6 ± 5.7*** | 381 ± 43 | 245, 729 |
| τ _{rec2} (ms) | 1490 ± 145** | 1210 ± 69*** | 2296 ± 215 | 1825, 3736 |
| %A _{rec1} | 63 ± 2 | 56 ± 6 | 58 ± 2 | 59, 65 |
| %A _{rec2} | 37 ± 2 | 44 ± 2 | 42 ± 3 | 41, 35 |
| | (n = 9) | (n = 36) | (n = 11) | (n = 2) |
| Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung | | | | |
| V _{1/21} (mV) | -52.8 ± 1.4*** | -54.1 ± 0.8** | -69.7 ± 5.4 | - |
| V _{1/22} (mV) | -36.1 ± 3.5 | -34.1 ± 0.9 | -34.9 ± 1.4 | -33.0 ± 2.8 |
| k ₁ (mV) | 8.5 ± 0.9* | 9.8 ± 0.5* | 23.5 ± 7.4 | - |
| k ₂ (mV) | 5.8 ± 1.6 | 4.6 ± 0.3 | 5.4 ± 0.3 | 6.1 ± 0.4 |
| %A _{v1} | 63 ± 8*** | 52 ± 4*** | 10 ± 1 | - |
| %A _{v2} | 37 ± 8*** | 48 ± 4*** | 90 ± 1 | - |
| | (n = 11) | (n = 31) | (n = 11) | (n = 3) |

3.4 Abhängigkeit der I_{to} -Parameter vom Geschlecht

Neben den Einflüssen der unterschiedlichen Genotypen auf die schnelle Komponente des Gesamtauswärtsstroms wurden in dieser Arbeit auch geschlechtsabhängige Unterschiede untersucht. Es werden zunächst die Daten von weiblichen Wildtyp-Myozyten mit denen von männlichen Wildtyp-Myozyten verglichen. Anschließend werden innerhalb der weiblichen Myozyten die Daten der drei Genotypen (KChIP2^{+/+}, KChIP2^{+/-} und KChIP2^{-/-}) miteinander verglichen.

3.4.1 I_{to} -Parameter in weiblichen und männlichen Wildtyp-Myozyten

3.4.1.1 I_{to} -Inaktivierungskinetik

Betrachtete man die Stromdichte des Gesamtauswärtsstroms, so zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Wildtyp-Myozyten (σ : 53.9 ± 3.7 pA/pF, ♀ : 55.3 ± 3.1 pA/pF, siehe Tabelle 7). Allerdings war der Abfall des Gesamtauswärtsstroms im weiblichen Wildtyp schneller als im männlichen (Abb. 19A). Die Inaktivierungszeitkonstante τ_1 war in weiblichen Myozyten mit 54.4 ± 2.3 ms ($n = 16$) signifikant kleiner als in männlichen Myozyten mit 64.2 ± 2.4 ms ($n = 13$, $p = 0.007$; siehe Abb. 19B). Der Anteil der Amplitude $\%A_1$ am Gesamtauswärtsstrom war in weiblichen Wildtyp-Myozyten auch größer als in männlichen Myozyten, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant (vgl. Tabelle 7, KChIP2^{+/+} σ : 29 ± 5 % vs. ♀ : 40 ± 3 %, $p = 0.07$). Die Amplituden der Komponente A_1 waren im Wildtyp in den Weibchen nahezu gleich groß verglichen mit den Männchen (KChIP2^{+/+} σ : 2.62 ± 0.39 nA, $n = 13$ vs. ♀ : 2.93 ± 0.33 nA, $n = 16$; siehe Tabelle 7). Die Stromdichte der Komponente D_1 war allerdings in den weiblichen Wildtyp-Myozyten mit 21.5 ± 2.2 pA/pF ($n = 16$) signifikant größer als in den männlichen mit 14.7 ± 2.3 ($n = 13$, $p = 0.04$). Die anderen beiden Stromkomponenten zeigten, bis auf eine signifikant größere Amplitude A_3 in männlichen Wildtyp-Myozyten, keine weiteren signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 19B-D und Tabelle 7).

Der im Gegensatz zur Amplitude signifikant größere Stromdichte-Wert für D_1 in weiblichen gegenüber männlichen Wildtyp-Zellen lässt sich durch die unterschiedlich großen Ganzzellkapazitäten der weiblichen und männlichen Zellen erklären. Bei gleich großer Amplitude, lag die Ganzzellkapazität in männlichen Wildtyp-Zellen im Mittel bei 186 ± 12 pF ($n = 13$) und in weiblichen Zellen bei 142 ± 12 pF ($n = 16$, $p = 0.01$; siehe Tabelle 7). Bei Division der Stromamplitude durch die Ganzzellkapazität ergeben sich somit größere Werte für die Stromdichte der schnellen Komponente in weiblichen Wildtyp-Myozyten.

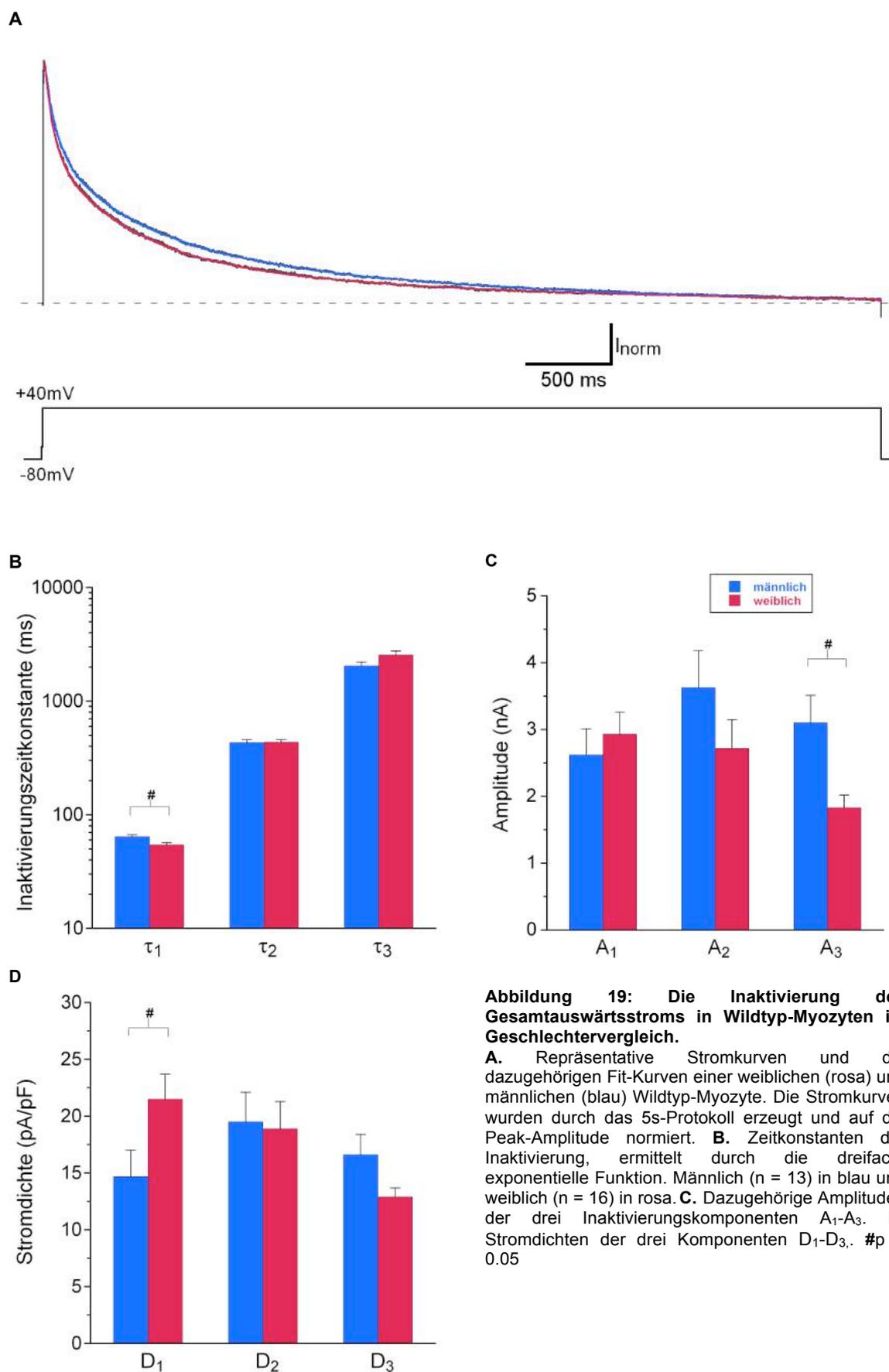


Abbildung 19: Die Inaktivierung des Gesamtauswärtsstroms in Wildtyp-Myozyten im Geschlechtervergleich.

A. Repräsentative Stromkurven und die dazugehörigen Fit-Kurven einer weiblichen (rosa) und männlichen (blau) Wildtyp-Myozyte. Die Stromkurven wurden durch das 5s-Protokoll erzeugt und auf die Peak-Amplitude normiert. **B.** Zeitkonstanten der Inaktivierung, ermittelt durch die dreifach-exponentielle Funktion. Männlich ($n = 13$) in blau und weiblich ($n = 16$) in rosa. **C.** Dazugehörige Amplituden der drei Inaktivierungskomponenten A_1 - A_3 . **D.** Stromdichten der drei Komponenten D_1 - D_3 . # $p \leq 0.05$

3.4.1.2 Die Erholung von der Inaktivierung

Anschließend wurde auch die Erholung von der Inaktivierung zwischen männlichen und weiblichen Wildtyp-Myozyten verglichen. Es war eine leichte Verschiebung zu kürzeren Zwischenpuls-Intervallen der Kurve der weiblichen gegenüber den männlichen Wildtyp-Myozyten zu sehen (siehe Abb. 20). Im Vergleich der Recovery-Zeitkonstanten zeigte sich $\tau_{\text{rec}1}$ in weiblichen Zellen mit 73.2 ± 3.3 ms (65 ± 2 %, $n = 13$) signifikant kleiner als in männlichen Zellen mit 94.5 ± 5.4 ms (63 ± 2 %, $n = 9$, $p = 0.03$; siehe Tabelle 7). Die langsame Recovery-Zeitkonstante $\tau_{\text{rec}2}$ war im Wildtyp zwischen weiblichen und männlichen Zellen nicht unterschiedlich (KChIP2^{+/+}: männlich 1490 ± 145 ms, $n = 9$ vs. weiblich 1365 ± 87 ms, $n = 13$; siehe Tabelle 7). Die prozentualen Anteile von $\tau_{\text{rec}1}$ und $\tau_{\text{rec}2}$ ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern.

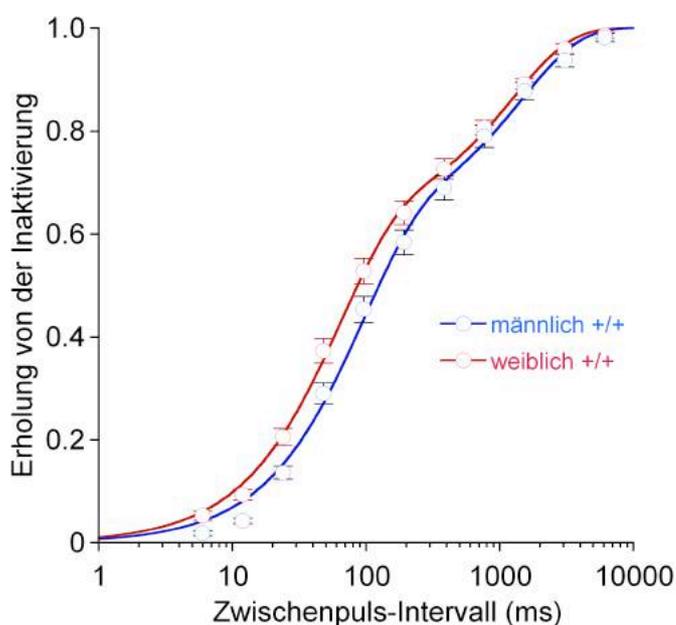


Abbildung 20: Erholung von der Inaktivierung in männlichen und weiblichen Wildtyp-Myozyten.

Semi-logarithmische Darstellung der Daten bei Anwendung des Recovery-Protokolls. Die durchgezogene Linie ist eine zweifach-exponentielle Funktion zur Darstellung der Kinetik. -○- KChIP2^{+/+} männlich ($n = 9$); -○- KChIP2^{+/+} weiblich ($n = 13$).

3.4.1.3 Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung

Anschließend wurde die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von weiblichen und männlichen Wildtyp-Myozyten verglichen. An die durch das variable Vorpuls-Protokoll generierten Datenpunkte wurde eine zweifache Boltzmann-Funktion angepasst. Es zeigte sich makroskopisch im Wildtyp eine Verschiebung der Kurve zu negativeren Vorpulsspannungen bei den weiblichen verglichen mit den männlichen Myozyten (Abb. 21). Die makroskopischen Unterschiede im Wildtyp spiegelten sich im Vergleich der Werte für $V_{1/21}$ wider. Dieser war in weiblichen Zellen mit -59.3 ± 2.1 mV ($n = 11$) ca. 6,5 mV negativer als in männlichen Zellen mit -52.8 ± 1.4 mV ($n = 11$, $p = 0.02$). Die Werte

für $V_{1/2}$ waren hingegen nicht unterschiedlich zwischen den Geschlechtern. Es zeigten sich auch keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Wildtyp-Myozyten im Vergleich der k -Werte, die die Steilheit der Kurve angeben und im Vergleich der relativen Anteile der beiden Komponenten an der zweifachen Boltzmann-Funktion (siehe Tabelle 7).

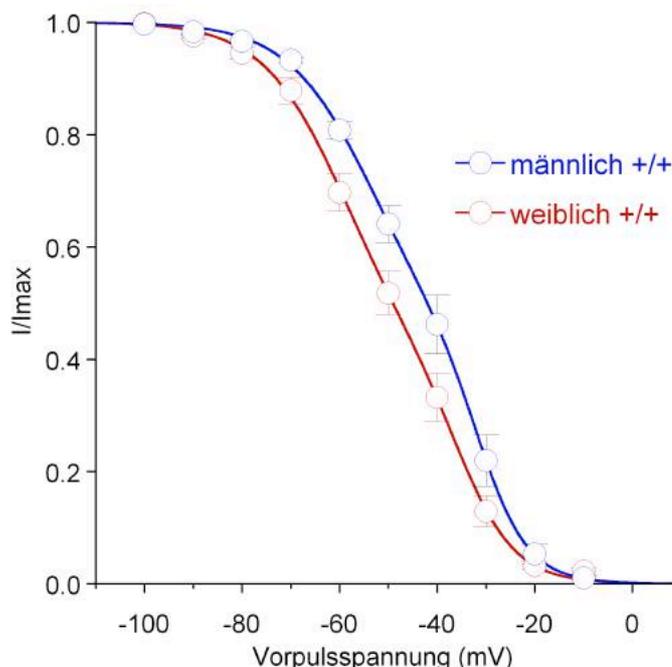


Abbildung 21: Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung in männlichen und weiblichen Wildtyp-Myozyten.

Anwendung des variablen Vorpuls-Protokolls und Angleichung eines zweifachen Boltzmann-Fits an die Datenpunkte.

-○- KChIP2^{+/+} männlich (n = 11); -○- KChIP2^{+/+} weiblich (n = 11).

3.4.1.4 Zusammenfassung des Geschlechtervergleichs im Wildtyp

Der Geschlechtervergleich im Wildtyp ergab signifikant größere Ganzzellkapazitätswerte in männlichen Myozyten verglichen mit weiblichen Myozyten. Die makroskopische Inaktivierung des Gesamtauswärtsstroms zeigte eine langsamere Kinetik in männlichen gegenüber weiblichen Myozyten (Abb. 19A). Diese ließ sich, in Bezug auf die schnelle Komponente auch in einer signifikant schnelleren Inaktivierungszeitkonstante τ_1 in weiblichen Myozyten bestätigen. Die dazugehörigen Stromdichte-Werte der schnellen Komponente zeigten ebenfalls eine signifikant größere Komponente D_1 in den Weibchen. Auch die Recovery-Zeitkonstante τ_{rec_1} in weiblichen Myozyten war signifikant schneller als in männlichen Myozyten, bei gleichem prozentualen Anteil der Komponente. Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung ergab in weiblichen Myozyten einen signifikant negativeren Wert für $V_{1/2}(1)$, welcher sich auch in einer makroskopischen Verschiebung des zweifachen Boltzmann-Fits zu negativeren Membranpotentialen zeigte (Abb. 21). Die beschriebenen Parameter sind in Tabelle 7 gegenübergestellt.

Tabelle 7: Geschlechtervergleich Wildtyp (KChIP2^{+/+}), #p < 0.05 weiblich verglichen mit männlich (t-Test nach Student).

| KChIP2 ^{+/+} | ♂ | ♀ |
|---|-------------|--------------|
| Inaktivierung bei +40mV | | |
| τ_1 (ms) | 64.2 ± 2.4 | 54.4 ± 2.3# |
| τ_2 (ms) | 432 ± 24 | 436 ± 20 |
| τ_3 (ms) | 2048 ± 157 | 2544 ± 222 |
| A ₁ (nA) | 2.62 ± 0.39 | 2.93 ± 0.33 |
| A ₂ (nA) | 3.63 ± 0.55 | 2.72 ± 0.43 |
| A ₃ (nA) | 3.10 ± 0.41 | 1.83 ± 0.19# |
| A ₀ (nA) | 0.60 ± 0.10 | 0.28 ± 0.07# |
| %A ₁ | 29 ± 5 | 40 ± 3 |
| %A ₂ | 37 ± 4 | 34 ± 3 |
| %A ₃ | 34 ± 3 | 25 ± 2 |
| Cap (pF) | 186 ± 12 | 142 ± 12# |
| D ₁ (pA/pF) | 14.7 ± 2.3 | 21.5 ± 2.2# |
| D ₂ (pA/pF) | 19.5 ± 2.6 | 18.9 ± 2.4 |
| D ₃ (pA/pF) | 16.6 ± 1.8 | 12.9 ± 0.8 |
| D ₀ (pA/pF) | 3.1 ± 0.5 | 2.0 ± 0.5 |
| D _{gesamt} (pA/pF) | 53.9 ± 3.7 | 55.3 ± 3.1 |
| RMS _{3exp} (pA) | 25.8 ± 1.5 | 20.3 ± 1.2 |
| RMS _{2exp} (pA) | 52.4 ± 4.3 | 50.4 ± 5.0 |
| | (n = 13) | (n = 16) |
| Erholung von der Inaktivierung | | |
| τ_{rec1} (ms) | 94.5 ± 5.4 | 73.2 ± 3.3# |
| τ_{rec2} (ms) | 1490 ± 145 | 1365 ± 87 |
| %A _{rec1} | 63 ± 2 | 65 ± 2 |
| %A _{rec2} | 37 ± 2 | 35 ± 2 |
| | (n = 9) | (n = 13) |
| Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung | | |
| V _{1/21} (mV) | -52.8 ± 1.4 | -59.3 ± 2.1# |
| V _{1/22} (mV) | -36.1 ± 3.5 | -37.6 ± 1.9 |
| k1 (mV) | 8.5 ± 0.9 | 7.6 ± 0.9 |
| k2 (mV) | 5.8 ± 1.6 | 5.4 ± 0.6 |
| %A _{v1} | 63 ± 8 | 58 ± 6 |
| %A _{v2} | 37 ± 8 | 41 ± 6 |
| | (n = 11) | (n = 11) |

3.4.2 I_{to}-Parameter in weiblichen Myozyten mit unterschiedlichem KChIP2-Genotyp

3.4.2.1 I_{to}-Inaktivierungskinetik

Die Daten für weibliche Myozyten wurden analog zu den männlichen Myozyten ausgewertet. Im Folgenden werden die Unterschiede zwischen den drei Genotypen im

weiblichen Geschlecht verglichen. Für die $KChIP2^{-/-}$ -Myozyten werden die Ergebnisse der dreifach-exponentiellen Auswertung als Vergleichswerte herangezogen. Allerdings ließen sich auch im weiblichen Geschlecht einige der $KChIP2^{-/-}$ -Myozyten nur durch Angleichung einer zweifach-exponentiellen Funktion an den Gesamtauswärtsstrom auswerten.

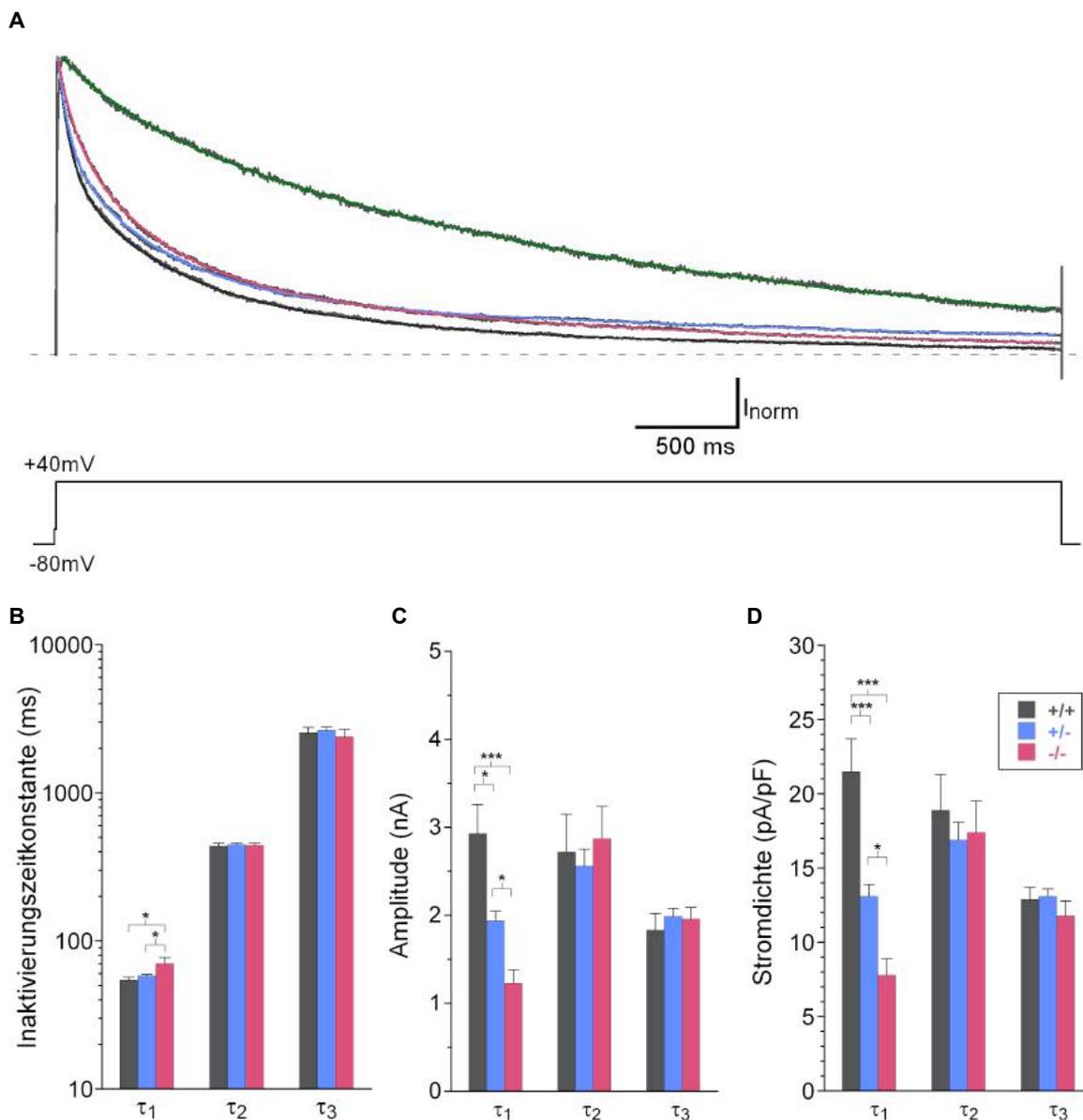


Abbildung 22: Inaktivierung des Gesamtauswärtsstroms in weiblichen Myozyten der Genotypen $KChIP2^{+/+}$, $KChIP2^{+/-}$ und $KChIP2^{-/-}$ bei Anwendung des 5s-Protokolls.

A. Repräsentative Stromkurven jeweils einer weiblichen Myozyte der Genotypen $KChIP2^{+/+}$ in grau, $KChIP2^{+/-}$ in hellblau und $KChIP2^{-/-}$ in hellrot bei Anwendung des dreifach-exponentiellen Fits. Stromkurve mit Fit-Funktion einer $KChIP2^{-/-}$ -Myozyte, die sich nur durch zweifach exponentiellen Fit auswerten ließ, in grün. Nicht-inaktivierende Stromkomponenten (unterhalb der gestrichelten Linie) sind nicht dargestellt. Die Stromkurven wurden normiert. **B.** Inaktivierungszeitkonstanten der drei Stromkomponenten in den Genotypen $KChIP2^{+/+}$ ($n = 16$, grau), $KChIP2^{+/-}$ ($n = 66$, hellblau), $KChIP2^{-/-}$ ($n=14$, rosa). **C.** Amplituden der einzelnen Stromkomponenten (A_1 - A_3). **D.** Stromdichtewerte der einzelnen Stromkomponenten (D_1 - D_3). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$, *** $p \leq 0.0001$

Die Stromdichte des Gesamtauswärtsstroms war in weiblichen Wildtyp-Myozyten (55.3 ± 3.1 pA/pF, $n = 16$) signifikant größer verglichen mit KChIP2^{+/-} (44.7 ± 2.0 pA/pF, $n = 67$, $p = 0.04$) und KChIP2^{-/-} (39.1 ± 3.9 pA/pF, $n = 14$, $p = 0.02$; siehe Tabelle 8). Die Ganzzellkapazitäten (Cap) waren zwar in den Wildtyp-Zellen kleiner als in den anderen beiden Genotypen, dieser Unterschied war aber nicht signifikant. Der Vergleich der Inaktivierungszeitkonstanten τ_1 in weiblichen Myozyten ergab einen signifikanten Unterschied zwischen KChIP2^{-/-} mit 70.3 ± 7.0 ms ($n = 14$), verglichen mit KChIP2^{+/-} mit 58.2 ± 1.3 ms ($n = 67$, $p = 0.01$) und dem Wildtyp mit 54.4 ± 2.3 ms ($n = 16$, $p = 0.006$; siehe Abb. 22B und Tabelle 8). Die Werte für τ_1 in Wildtyp und KChIP2^{+/-} waren, analog zu den männlichen Myozyten nahezu gleich groß (siehe Kapitel 3.3.2). Der prozentuale Anteil der schnellen Komponente am Gesamtauswärtsstrom (%A₁) war in allen drei Genotypen signifikant unterschiedlich voneinander. Im Wildtyp betrug der Anteil 40 ± 3 % ($n = 16$), in KChIP2^{+/-} 31 ± 1 % ($n = 67$) und in KChIP2^{-/-} 20 ± 2 % ($n = 14$; siehe Tabelle 8). Die Werte der dazugehörigen Amplitude A₁ waren signifikant kleiner in KChIP2^{+/-} (1.94 ± 0.11 nA; $n = 16$), verglichen mit dem Wildtyp (2.93 ± 0.33 nA; $n = 16$, $p = 0.0007$). Die Werte für A₁ in KChIP2^{-/-} (1.23 ± 0.15 nA, $n = 14$) waren wiederum signifikant kleiner als in den KChIP2^{+/-}-Myozyten ($p = 0.03$) und im Wildtyp ($p \leq 0.0001$; siehe Abb. 22C und Tabelle 8). Die Stromstärke der Komponente D₁ betrug in weiblichen Wildtyp-Myozyten 21.5 ± 2.2 pA/pF ($n = 16$) und war signifikant größer als in den KChIP2^{+/-}-Myozyten mit 13.1 ± 0.8 pA/pF ($n = 67$, $p \leq 0.0001$). Der Mittelwert von D₁ in weiblichen KChIP2^{-/-}-Myozyten betrug 7.8 ± 1.1 pA/pF ($n = 14$) und war auch signifikant kleiner als im Wildtyp ($p \leq 0.0001$) und in KChIP2^{+/-}-Myozyten ($p = 0.02$; siehe Abb. 22D und Tabelle 8). Im Vergleich zwischen den drei Genotypen zeigte sich in weiblichen Myozyten kein signifikanter Unterschied für die Amplituden A₂ und A₃, die Stromdichte D₂ und D₃, oder die Inaktivierungszeitkonstante τ_2 und τ_3 zwischen den drei Genotypen. Allerdings waren die Anteile von %A₂ und %A₃ signifikant unterschiedlich in den drei Genotypen (siehe Tabelle 8).

Die Daten der drei von insgesamt 17 weiblichen KChIP2^{-/-}-Myozyten, die sich nur mit dem zweifach-exponentiellen Fit auswerten ließen, sind separat in Tabelle 8 aufgeführt (KChIP2^{-/-} 2exp). Die Inaktivierungszeitkonstante der schnellen Stromkomponente betrug 241 ± 18 ms ($n = 3$) und war ca. 200 ms schneller als die Werte für die zweite Komponente der dreifach-exponentiellen Auswertung. Ebenso verhielt es sich mit der Amplitude bzw. der Dichte der schnelleren von zwei Stromkomponenten; diese betragen 0.74 ± 0.43 nA bzw. 4.3 ± 2.9 pA/pF ($n = 3$) und waren deutlich kleiner als die Werte für die zweite Komponente der dreifach-exponentiellen Auswertung. Der Wert für die Inaktivierungszeitkonstante der langsamen Stromkomponente betrug 2440 ± 376 ms (n

= 3) und die dazugehörige Amplitude war 1.99 ± 0.25 nA bzw. die Dichte war 10.4 ± 2.0 pA/pF. Diese Werte waren in ihrer Größenordnung vergleichbar mit den Werten für die dritte Stromkomponente aus der dreifach-exponentiellen Auswertung (siehe Tabelle 8).

3.4.2.2 Die Erholung von der Inaktivierung

Die oben beschriebenen Effekte des Genotyps auf die Erholung von der Inaktivierung in männlichen Myozyten (siehe Kapitel 3.3.3), ließen sich auch in weiblichen Zellen nachweisen. Auch in weiblichen Myozyten war $\tau_{\text{rec}1}$ in KChIP2^{-/-}-Myozyten mit 339 ± 29 ms (n = 9) signifikant langsamer ($p \leq 0.0001$) als in KChIP2^{+/+}- (73.2 ± 3.3 ms, n = 13) und in KChIP2^{+/-}-Myozyten (71.0 ± 2.6 ms, n = 61). Zwischen KChIP2^{+/+} und KChIP2^{+/-} bestand hingegen kein Unterschied für $\tau_{\text{rec}1}$. Der prozentuale Anteil von $\tau_{\text{rec}1}$ war in weiblichen Wildtyp-Myozyten signifikant größer (65 ± 2 %) als in KChIP2^{+/-}- (53 ± 1 %, $p = 0.0004$) und KChIP2^{-/-}-Myozyten (49 ± 4 %, $p = 0.001$). In KChIP2^{-/-} und in KChIP2^{+/-} war er hingegen kaum unterschiedlich voneinander. Die langsame Recovery-Zeitkonstante $\tau_{\text{rec}2}$ war in weiblichen KChIP2^{-/-}-Myozyten mit 1887 ± 157 ms (51 ± 4 %) auch signifikant größer als im Wildtyp (1365 ± 87 ms, 35 ± 2 %, $p = 0.002$) und in KChIP2^{+/-}-Myozyten (1156 ± 31 ms, 47 ± 1 %, $p \leq 0.0001$).

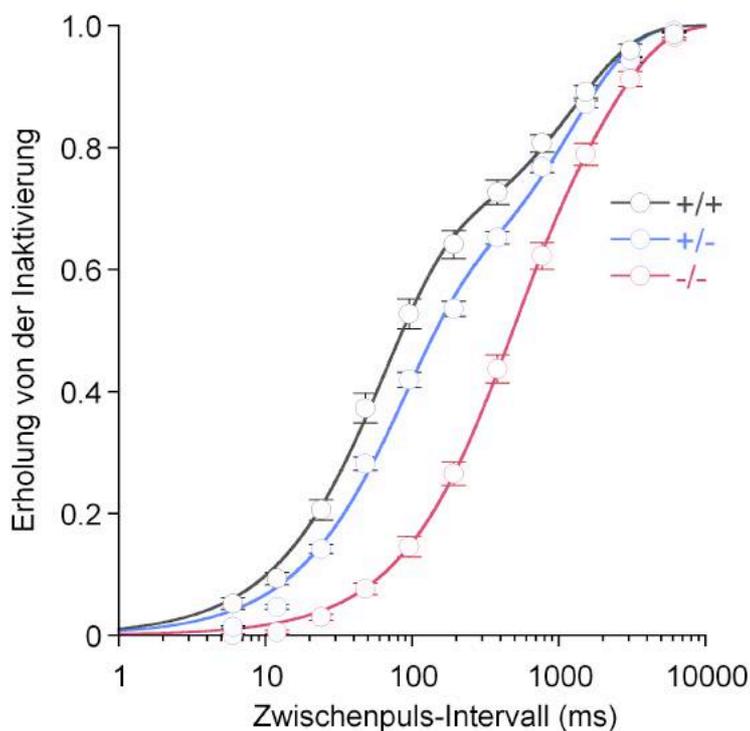


Abbildung 23: Die Erholung von der Inaktivierung in weiblichen Myozyten.

Semi-logarithmische Darstellung der Daten bei Anwendung des Recovery-Protokolls. Die durchgezogene Linie ist eine zweifach-exponentielle Funktion zur Darstellung der Kinetik. KChIP2^{+/+} (n = 13); -○- KChIP2^{+/-} (n = 61); -○- KChIP2^{-/-} (n = 9).

3.4.2.3 Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung

Der Vergleich der $V_{1/2}$ -Werte innerhalb des weiblichen Geschlechts, zeigte ähnliche Genotypen-abhängige Effekte, wie die unter Kapitel 3.3.4 beschriebenen Effekte für männliche Myozyten. Der Wert für $V_{1/21}$ in weiblichen KChIP2^{-/-}-Myozyten betrug -75.7 ± 4.3 mV (12 ± 2 %, $n = 9$) und war signifikant negativer als in KChIP2^{+/+} (-59.3 ± 2.1 mV, 58 ± 6 %, $n = 11$, $p = 0.001$) sowie in KChIP2^{+/-} (-56.5 ± 1.4 mV, 52 ± 3 %, $n = 55$, $p \leq 0.0001$). Ebenfalls signifikant kleiner war der relative Anteil von $V_{1/21}$ in KChIP2^{-/-}-Myozyten verglichen mit dem Wildtyp ($p \leq 0.0001$) und KChIP2^{+/-} ($p \leq 0.0001$; siehe Tabelle 8). Der Wert für k_1 , also dem zu $V_{1/21}$ gehörenden Steigungsfaktor der Kurve, ergab in KChIP2^{-/-} 12.0 ± 3.1 mV und war größer als in KChIP2^{+/+} (7.6 ± 0.9 mV, $p = 0.053$) und signifikant größer als in KChIP2^{+/-} (8.3 ± 0.4 mV, $p = 0.04$). Die Werte für $V_{1/22}$ und k_2 waren, analog zu den männlichen Myozyten, in allen drei Genotypen kaum unterschiedlich (siehe Tabelle 8). Der Wert für $V_{1/21}$ der KChIP2^{-/-}-Myozyte, die sich nur zweifach-exponentiell auswerten ließ (KChIP2^{-/-} 2exp), betrug -90.9 mV und war negativer als in den anderen KChIP2^{-/-}-Myozyten. Allerdings ließ sich diese, im Gegensatz zu den männlichen KChIP2^{-/-}-2exp-Myozyten, gut durch Angleichung einer zweifachen Boltzmann-Funktion auswerten (siehe Tabelle 8).

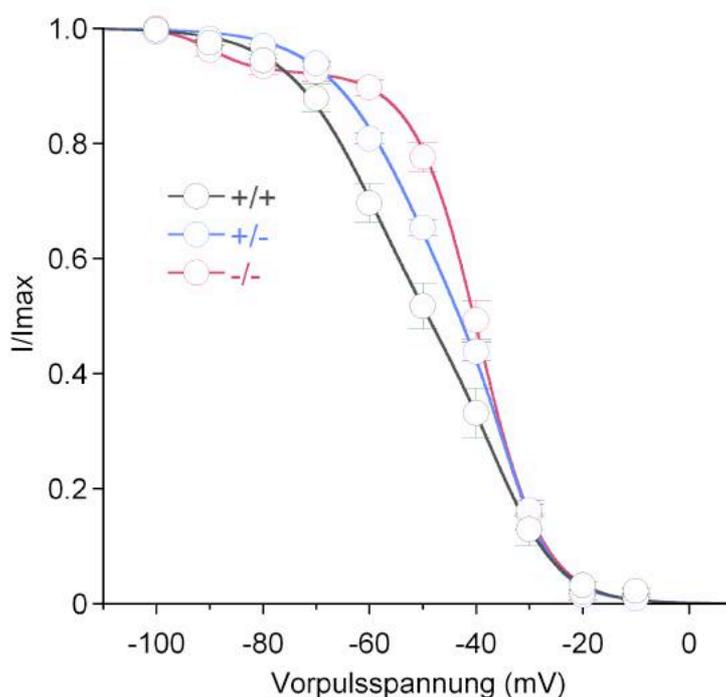


Abbildung 24: Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung in weiblichen Myozyten. Anwendung des variablen Vorpuls-Protokolls und Angleichung eines zweifachen Boltzmann-Fits an die Datenpunkte. -○- KChIP2+/+ ($n = 11$); -○- KChIP2+/- ($n = 55$); -○- KChIP2-/- ($n = 9$).

3.4.2.4 Zusammenfassung der Parameter für weibliche Myozyten

Der Genotypenvergleich im weiblichen Geschlecht zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede bezüglich der schnellen Stromkomponente des Gesamtauswärtsstroms zwischen allen drei Genotypen. Die Recovery-Kinetik und die Spannungsabhängigkeit

der Inaktivierung waren ebenfalls signifikant unterschiedlich in den KChIP2^{-/-}-Myozyten verglichen mit den anderen beiden Genotypen.

Tabelle 8: Alle Daten für weibliche Myozyten. Signifikanzen: *p < 0.05, **p ≤ 0.001, ***p ≤ 0.0001 jeweils verglichen mit KChIP2^{-/-} 3exp; °p < 0.05, °°p ≤ 0.001, °°°p ≤ 0.0001 jeweils verglichen mit KChIP2^{+/+} 3exp (One-Way ANOVA). , §§§p ≤ 0.0001, RMS_{3exp} verglichen mit RMS_{2exp} (t-Test nach Student). ~14 bzw. 3 von insgesamt 17 weiblichen KChIP2^{-/-}-Myozyten.

| ♀ | KChIP2 ^{+/+} | KChIP2 ^{+/-} | KChIP2 ^{-/-} | |
|--|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------|
| | 3exp | 3exp | 3exp | 2exp |
| Inaktivierung bei +40mV | | | | |
| τ ₁ (ms) | 54.4 ± 2.3* | 58.2 ± 1.3* | 70.3 ± 7.0 | - |
| τ ₂ (ms) | 436 ± 20 | 447 ± 10 | 442 ± 14 | 241 ± 18 |
| τ ₃ (ms) | 2544 ± 222 | 2654 ± 114 | 2399 ± 286 | 2440 ± 367 |
| A ₁ (nA) | 2.93 ± 0.33*** | 1.94 ± 0.11* ^{/°°} | 1.23 ± 0.15 | - |
| A ₂ (nA) | 2.72 ± 0.43 | 2.56 ± 0.19 | 2.87 ± 0.37 | 0.74 ± 0.43 |
| A ₃ (nA) | 1.83 ± 0.19 | 1.99 ± 0.09 | 1.96 ± 0.13 | 1.99 ± 0.25 |
| A ₀ (nA) | 0.28 ± 0.07 | 0.24 ± 0.03 | 0.38 ± 0.07 | 0.16 ± 0.09 |
| %A ₁ | 40 ± 3*** | 31 ± 1* ^{/°} | 20 ± 2 | - |
| %A ₂ | 34 ± 3* | 37 ± 1* | 45 ± 2 | 24 ± 9 |
| %A ₃ | 25 ± 2 | 32 ± 1° | 35 ± 3° | 76 ± 9 |
| Cap (pF) | 142 ± 12 | 155 ± 5 | 172 ± 12 | 196 ± 23 |
| D ₁ (pA/pF) | 21.5 ± 2.2*** | 13.1 ± 0.8* ^{/°°°} | 7.8 ± 1.1 | - |
| D ₂ (pA/pF) | 18.9 ± 2.4 | 16.9 ± 1.2 | 17.4 ± 2.1 | 4.3 ± 2.9 |
| D ₃ (pA/pF) | 12.9 ± 0.8 | 13.1 ± 0.5 | 11.8 ± 1.0 | 10.4 ± 2.0 |
| D ₀ (pA/pF) | 2.0 ± 0.5 | 1.5 ± 0.2 | 2.2 ± 0.3 | 1.0 ± 0.6 |
| D _{gesamt} (pA/pF) | 55.3 ± 3.1 | 44.7 ± 2.0° | 39.1 ± 3.9° | 15.7 ± 5.3 |
| RMS _{3exp} (pA) | 20.3 ± 1.2§§§ | 20.3 ± 0.6§§§ | 20.8 ± 1.1§§§ | 16.1 ± 2.1 |
| RMS _{2exp} (pA) | 50.4 ± 5.0 | 43.4 ± 2.0 | 36.5 ± 3.1 | 18.8 ± 3.8 |
| | (n = 16) | (n = 67) | (n = 14~) | (n = 3~) |
| Erholung von der Inaktivierung | | | | |
| τ _{rec1} (ms) | 73.2 ± 3.3*** | 71.0 ± 2.6*** | 339 ± 29 | 855 |
| τ _{rec2} (ms) | 1365 ± 87* | 1156 ± 31*** | 1792 ± 139 | 2742 |
| %A _{rec1} | 65 ± 2 | 53 ± 1°° | 49 ± 4°° | 58 |
| %A _{rec2} | 35 ± 2 | 47 ± 1°° | 51 ± 4°° | 42 |
| | (n = 13) | (n = 61) | (n = 9) | (n = 1) |
| Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung | | | | |
| V _{1/21} (mV) | -59.3 ± 2.1** | -56.5 ± 1.4*** | -75.7 ± 4.3 | -90.9 |
| V _{1/22} (mV) | -37.6 ± 1.9 | -35.6 ± 0.6 | -38.7 ± 1.2 | -40.8 |
| k ₁ (mV) | 7.6 ± 0.9 | 8.3 ± 0.4* | 12.0 ± 3.1 | 2.5 |
| k ₂ (mV) | 5.4 ± 0.6 | 4.5 ± 0.2 | 5.4 ± 0.3 | 6.3 |
| %A _{V1} | 58 ± 6*** | 52 ± 3*** | 12 ± 2 | 13 |
| %A _{V2} | 42 ± 6*** | 48 ± 3*** | 88 ± 2 | 87 |
| | (n = 11) | (n = 55) | (n = 9) | (n = 1) |

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von KChIP2 als essenziellen Regulator von Kv4.2 zu untersuchen und anhand verschiedener KChIP2-Genotypen sowie geschlechtsspezifisch zu charakterisieren. Dafür wurden linksventrikuläre Myozyten aus männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen mit unterschiedlichem KChIP2-Genotyp (KChIP2^{+/+}, KChIP2^{+/-} und KChIP2^{-/-}) isoliert. Dabei sollte insbesondere der bisher wenig untersuchte heterozygote KChIP2-Genotyp, welcher zur Zucht von Knockout-Mäusen verwendet wird, eine Rolle spielen. Die Einbeziehung des heterozygoten Genotyps ist in Bezug auf einen möglichen Gen-Dosis-Effekt von KChIP2 essenziell. Die verschiedenen etablierten Auswertemethoden zur Isolierung des Kv4.2-vermittelten transienten Kaliumauswärtsstroms I_{to} wurden in der vorliegenden Arbeit systematisch verglichen. Dies ergab die folgenden Ergebnisse:

- Die dreifach-exponentielle Auswertung war in Bezug auf die Isolierung von I_{to} aus dem Gesamtauswärtsstrom zu favorisieren.
- In den männlichen und weiblichen Myozyten zeigte sich ein Gen-Dosis-Effekt bezüglich der I_{to} -Amplitude und -dichte zwischen den Genotypen, nicht aber in Bezug auf die Inaktivierungskinetik, Erholung von der Inaktivierung und Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung, welche in KChIP2^{+/+} und KChIP2^{+/-} gleich waren.
- Es konnten geschlechtsabhängige Unterschiede in der Kinetik und Stromdichte von I_{to} sowie in der Erholung von der Inaktivierung und Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung in den Wildtyp-Myozyten festgestellt werden.

4.1 Vergleich der Auswertemethoden für I_{to}

Die Auswertung des transienten Kaliumauswärtsstroms I_{to} mittels Vorpuls-Subtraktionsprotokoll ist eine in der Literatur gängige Methode (Kuo *et al.* 2001; Trepanier-Boulay *et al.* 2001; Brouillette *et al.* 2004; Tozakidou *et al.* 2009). Bei dieser Methode soll ausschließlich I_{to} isoliert und die anderen Strom-Komponenten nicht beeinflusst werden. Brouillette *et al.* (2004) führten eine systematische Untersuchung der verschiedenen Vorpuls-Subtraktions-Protokolle für die einzelnen Kaliumauswärtsströme durch. Die für I_{to} verwendete Auswertemethode beinhaltete einen Vorpuls von 100 ms auf -40mV. Diese Auswertung wurde aufgrund der systematischen Aufarbeitung und vergleichenden Untersuchung verschiedener Vorpuls-Längen als Vorlage für die in der vorliegenden Arbeit angewandte Vorpuls-Subtraktions-Methode verwendet. Um sicher zu gehen, dass I_{to} vollständig inaktiviert wird, auch in KChIP2-defizienten Myozyten,

wurde eine Vorpulsdauer von 160 ms verwendet. Allerdings ist die in dieser Arbeit durch das Vorpuls-Subtraktionsprotokoll ermittelte Stromdichte der isolierten Stromkomponente mit 17.9 ± 1.9 pA/pF deutlich kleiner als die in der Literatur im Durchschnitt ermittelten Werte (siehe Einleitung, Tabelle 1: ca. 27,4 pA/pF, $n = 12$). Dies könnte möglicherweise damit zusammenhängen, dass durch den Vorpuls auf -40mV der I_{to} -Strom nicht komplett inaktiviert wurde oder die Dauer des Vorpulses doch nicht ausreichend lang war. Dadurch würde die ermittelte Differenz aus den beiden Stromkurven, welche I_{to} abbilden soll, zu klein ausfallen und würde demnach nicht der „wirklichen“ Stromamplitude von I_{to} entsprechen. Diese Einschränkung ist vermutlich bei der Verwendung eines Vorpuls-Subtraktions-Protokolls immer gegeben, da keine definitive Aussage über die nötige Länge und Amplitude des Vorpulses getroffen werden kann, bei dem lediglich der eine Kanal inaktiviert wird und alle anderen unbeeinflusst bleiben. Es handelt sich somit lediglich um eine Annäherung an eine „perfekte Lösung“, bei der, wie oben beschrieben, Kompromisse eingegangen werden müssen. Durch Anpassen einer einfach exponentiellen Funktion an die durch Subtraktion ermittelte Kurve wurde bei der Vorpuls-Subtraktions-Methode die Zeitkonstante der Inaktivierung ermittelt. Diese betrug im männlichen Wildtyp ca. 62 ms und war im Gegensatz zur oben beschriebenen Stromdichte vergleichbar mit den in der Literatur ermittelten Werten für τ_{inact} von I_{to} (siehe Einleitung, Tabelle 1).

Zusätzlich zur Vorpuls-Subtraktions-Methode sollten in dieser Arbeit weitere gängige Auswertemethoden für die Ermittlung der Stromkinetik und Amplitude von I_{to} verglichen werden. Die zweifach-exponentielle Auswertemethode ist eine weitere dieser Methoden (Guo *et al.* 1999; Thomsen *et al.* 2009; Foeger *et al.* 2013). Die schnelle Komponente würde in Wildtyp-Myozyten übereinstimmend mit der Literatur der Komponente $I_{to,f}$ entsprechen. Allerdings ist der in der vorliegenden Arbeit durch die zweifach-exponentielle Auswertung ermittelte Wert für die Inaktivierungszeitkonstante von τ_1 in männlichen Wildtyp-Myozyten mit ca. 160 ms (siehe Tabelle 3) langsamer als bekannte Werte (Guo *et al.* 1999; Xu *et al.* 1999; Brunet *et al.* 2004; Guo *et al.* 2005; Foeger *et al.* 2013). Lediglich Thomsen *et al.* (2009) ermittelten mit im Mittel 198 ms einen ähnlichen Wert für die Inaktivierungs-Zeitkonstante von $I_{to,f}$ mit der zweifach-exponentiellen Auswertung. Allerdings ist dort auch die von ihnen ermittelte Stromdichte (9 pA/pF) signifikant kleiner als in der vorliegenden Arbeit und anderen Publikationen. Die Zeitkonstante der Inaktivierung der langsamen Stromkomponente in männlichen Wildtyp-Myozyten, ermittelt durch die zweifach-exponentielle Auswertung (siehe Tabelle 3), ist vergleichbar mit zuvor publizierten Werten für $I_{K,slow}$ (Guo *et al.* 1999; Brunet *et al.* 2004; Foeger *et al.* 2013). Wie oben beschrieben unterscheidet sich der in dieser Arbeit

aus der zweifach-exponentiellen Auswertung ermittelte Wert der Inaktivierungszeitkonstante für $I_{to,f}$ im Wildtyp, trotz gleicher Auswertemethode, von zuvor publizierten. Möglicherweise könnte dieser Unterschied durch die Verwendung verschiedener Mauslinien bzw. der unterschiedlichen Herkunft der Mäuse, oder durch das unterschiedliche Alter der Tiere zum Zeitpunkt des Experiments erklärt werden. So wurden zum Beispiel bei Guo *et al.* 1999 zwar auch C57BL6-Mäuse verwendet, diese waren aber nur sechs bis acht Wochen alt, wohingegen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiere zehn bis zwölf Wochen alt waren. Foeger *et al.* (2013) verwendeten hingegen Mäuse zwischen acht und fünfzehn Wochen, was einem sehr weitgefassten Zeitraum entspricht. Außerdem ist die Isolierung von Kardiomyozyten aus dem Herzen ein aufwändiger Prozess, der möglicherweise bei unterschiedlicher Durchführung zu einer unterschiedlichen Beanspruchung der Myozyten mit Veränderung der Kanaldichte und -eigenschaften führt. Des Weiteren besteht epikardial eine höhere Konzentration von Kv4.2 und KChIP2 als endokardial (Rosati *et al.* 2001; Teutsch *et al.* 2007), sodass bei unterschiedlicher Entnahmetiefe des Gewebes auch unterschiedliche I_{to} -Dichten vorliegen können.

Eine weitere Auswertemethode, die in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde, ist die dreifach-exponentielle Auswertung des Gesamtauswärtsstroms, die ebenfalls in der Literatur beschrieben wurde (Xu *et al.* 1999; Liu *et al.* 2011; Foeger *et al.* 2013). Zuvor wurde diese Auswertemethode vor allem für Wildtyp-Myozyten des interventrikulären Septums (Xu *et al.* 1999; Brunet *et al.* 2004) oder in linksventrikulären Myozyten der Genotypen Wildtyp und KChIP2^{-/-} bei physiologischen Temperaturen (32°C) verwendet (Foeger *et al.* 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde die dreifach-exponentielle Auswertung in allen drei Genotypen und in beiden Geschlechtern bei Raumtemperatur angewendet und lieferte makroskopisch bessere Fit-Ergebnisse, sowie mit der Literatur vergleichbare Werte für $I_{to,f}$. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Inaktivierungszeitkonstante von τ_1 in männlichen Wildtyp-Myozyten aus der dreifach-exponentiellen Auswertemethode betrug ca. 66 ms und passte sehr gut zu den in der Literatur beschriebenen Zeitkonstanten von $I_{to,f}$ (siehe Einleitung, Tabelle 1). Der in dieser Arbeit durch die dreifach-exponentielle Funktion ermittelte Stromdichte-Mittelwert D_1 reproduziert ebenfalls publizierte Werte für $I_{to,f}$ (KChIP2^{+/+} männlich: 25.1 ± 2.3 pA/pF (n = 13) vgl. mit Einleitung, Tabelle 1: ca. 27,4 pA/pF (n = 12); (Kuo *et al.* 2001; Trepanier-Boulay *et al.* 2001; Marionneau *et al.* 2008; Tozakidou *et al.* 2009; Foeger *et al.* 2013; Liu *et al.* 2015).

Der oben beschriebene makroskopisch besser passende Fit der dreifach-exponentiellen Funktion ließ sich auch quantifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die RMS-Werte (**Root Mean Square**, deutsch: Quadratisches Mittel) von beiden Auswertemethoden (zweifach- und dreifach-exponentiell) ermittelt und verglichen. Der RMS-Wert gibt die durchschnittliche Abweichung der Datenpunkte von der angepassten exponentiellen Funktionskurve an. Diese zeigten signifikant schlechtere Korrelationskoeffizienten der zweifach- gegenüber der dreifach-exponentiellen Auswertung. In männlichen Wildtyp-Myozyten war der RMS-Wert der dreifach-exponentiellen Auswertung signifikant niedriger als der der zweifach-exponentiellen Auswertung, bei der die Werte mehr von der Fit-Funktion abwichen (siehe Tabelle 4). In den anderen Genotypen waren die Ergebnisse für die RMS-Werte ähnlich (siehe Tabelle 6), sodass dies ein starkes Argument für die Anwendung der dreifach-exponentiellen Auswertemethode zur Ermittlung der Amplitude und Kinetik von I_{to} für alle drei Genotypen war. Allerdings ließen sich einige der KChIP2^{-/-}-Myozyten nicht durch eine dreifach-exponentielle Funktion auswerten, sodass hier eine zweifach-exponentielle Funktion bevorzugt wurde. Dies traf aber nur für die Minderheit und ausschließlich für KChIP2^{-/-}-Myozyten zu, sodass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in deutlichem Kontrast zu den meisten bisher publizierten Studien, in denen die zweifach-exponentielle Funktion als besser passend beschrieben wurde, stehen (Guo *et al.* 1999; Xu *et al.* 1999; Guo *et al.* 2005; Foeger *et al.* 2013). So trafen zum Beispiel Xu *et al.* (1999) die Aussage, dass die Anwendung von dreifach-exponentiellen Funktionen die Qualität der Fit-Funktion nicht signifikant verbessere. Allerdings wurde bereits in ihrer Arbeit darauf hingewiesen, dass bei 40 von 65 ventrikulären Wildtyp-Myozyten eine dreifach-exponentielle Fit-Funktion hätte verwendet werden können (Xu *et al.* 1999). Eine weitere Publikation zeigte außerdem, dass auch Kv4.2-Knockout-Myozyten mit einer dreifach-exponentiellen Funktion ausgewertet werden können, da auch diese Ströme aus einer schnelleren und zwei langsamen Komponenten bestehen (Liu *et al.* 2015).

Ein weiteres Argument für die Anwendung der dreifach-exponentiellen Auswertemethode war, dass der Wert für τ_1 aus der dreifach-exponentiellen Auswertung dem Wert für τ_{inact} der Vorpuls-Subtraktionsmethode entsprach. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Inaktivierungszeitkonstante von I_{to} in männlichen Wildtyp-Myozyten aus der dreifach-exponentiellen Auswertemethode war nahezu identisch verglichen mit dem Wert aus der Vorpuls-Subtraktions-Methode (64.2 ± 2.4 ms, $n = 13$, vs. 62.2 ± 1.9 ms, $n = 15$, vgl. Kap. 3.1.2). Mit der Vorpuls-Subtraktions-Methode wird zwar möglicherweise die I_{to} -Amplitude unterschätzt (siehe oben), aber die Kinetik des isolierten Stroms sollte der „echten“ I_{to} -Kinetik entsprechen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die dreifach-

exponentielle Auswertung der Kinetik und der Amplitude der isolierten Stromkomponente $I_{to,f}$ am nächsten kommt. Des Weiteren ist positiv herauszustellen, dass bei der dreifach-exponentiellen Auswertemethode, im Gegensatz zur Vorpuls-Subtraktions-Methode, eine Zuordnung von einzelnen Stromkomponenten möglich ist. Die ermittelten Stromkomponenten der dreifach-exponentiellen Auswertung in Wildtyp-Myozyten könnten demnach durch den transienten Kaliumauswärtsstrom $I_{to,f}$, eine durch Kv1.5-vermittelte schnell aktivierende, langsam inaktivierende Komponente $I_{K,slow1}$ und einen Kv2-vermittelten langsam inaktivierenden, verzögerten Gleichrichter $I_{K,slow2}$, abgebildet werden (Liu *et al.* 2011). Für die Anwendung der gleichen Auswertemethode, in allen drei Genotypen (KChIP2^{+/+}, KChIP2^{+/-} und KChIP2^{-/-}), in der vorliegenden Arbeit war das die dreifach-exponentielle Auswertemethode, spricht die Tatsache, dass auch in der Literatur ein und die selbe Auswertemethode für Wildtyp und KChIP2^{-/-} (männlich 2exp.) verwendet wurde (Foeger *et al.* 2013), da man davon ausgeht, dass bei KChIP2^{-/-} eine andere Stromkomponente hochreguliert ist (siehe Kapitel 4.2).

4.2 Einfluss des KChIP2-Genotyps auf I_{to}

Die Kv4-Kanäle setzen sich in vivo aus heteromultimeren Kanalkomplexen, bestehend aus α - und β -Untereinheiten, zusammen. Die β -Untereinheit, die für den Kv4.2/Kv4.3-Kanal im Herzen von besonderer Bedeutung ist, ist KChIP2. Der Einfluss der KChIPs auf den Kv4-Kanal besteht vor allem darin, die Kanaldichte an der Zelloberfläche zu erhöhen, die Inaktivierung zu verlangsamen und die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung in Richtung positivere Werte zu verschieben sowie die Erholung von der Inaktivierung zu beschleunigen (An *et al.* 2000; Bähring *et al.* 2001). Die Modulation des Kv4-Kanals durch KChIP2 im Sinne einer schnellen Phase1-Repolarisation kann im Herzaktionspotential von besonderer Bedeutung sein. So stehen die Kanäle rechtzeitig für ein neues Aktionspotential zur Verfügung. Dies spielt in Mäuseherzen aufgrund der hohen Herzfrequenz von 600 Schlägen pro Minute in Ruhe (Dobson 2003) eine herausragende Rolle. Es ist außerdem bekannt, dass KChIP2 in vitro eine Dosis-abhängige Zunahme der Kv4.2 Expression erzeugt, die auf eine Stabilisierung durch KChIP2 zurückzuführen ist (Shibata *et al.* 2003). Außerdem wurde beschrieben, dass bei Anwendung der Vorpuls-Subtraktions-Methode, die Abwesenheit von KChIP2 zu einem vollständigen Verlust des $I_{to,f}$ führe (Kuo *et al.* 2001).

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte für die Stromdichte und die Inaktivierungszeitkonstante der männlichen Wildtyp- und KChIP2^{+/-}-Myozyten entsprechen den in der Literatur beschriebenen Werten für $I_{to,f}$ (Guo *et al.* 1999; Xu *et al.*

1999; Liu et al. 2011; Foeger et al. 2013). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten signifikante Unterschiede für die schnelle Komponente des Gesamtauswärtsstroms zwischen Wildtyp- und KChIP2^{-/-}-Myozyten (vgl. Kap. 3.3.1, Tabelle 5). In mehreren Publikationen wurde bereits beschrieben, dass in KChIP2^{-/-}-Myozyten kein $I_{to,f}$ mehr nachweisbar ist (Kuo et al. 2001; Thomsen et al. 2009; Foeger et al. 2013). Der $I_{to,f}$, als transienter Kaliumauswärtsstrom, ist vor allem durch eine schnelle Aktivierung und eine schnelle Inaktivierung sowie durch eine schnelle Erholung von der Inaktivierung gekennzeichnet (Xu et al. 1999). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass ein Kanal mit den gleichen Charakteristika wie im Wildtyp in KChIP2^{-/-}-Myozyten nicht zu finden ist. Stattdessen zeigte sich ein Kanal mit den Eigenschaften schnell zu aktivieren, langsamer zu inaktivieren und sich langsam von der Inaktivierung zu erholen. Der Wert für die Zeitkonstante der Inaktivierung der schnellen Komponente (τ_1) in männlichen KChIP2^{-/-}-Myozyten, der durch die dreifach-exponentielle Auswertung ermittelt wurde, war signifikant langsamer als in Wildtyp- und KChIP2^{+/-}-Zellen (vgl. Kap. 3.3.5, Tabelle 6). Ebenso waren die Stromamplitude sowie die Stromdichte der ersten Komponente signifikant kleiner in den KChIP2^{-/-}-Myozyten. Daher wurde in den meisten Publikationen bisher davon ausgegangen, dass statt $I_{to,f}$ in KChIP2^{-/-}-Myozyten $I_{to,s}$ hochreguliert sei (Thomsen et al. 2009; Foeger et al. 2013). Der Wert der Stromdichte D_1 in KChIP2^{-/-}-Myozyten war in der vorliegenden Arbeit aber kleiner als bekannte Werten für $I_{to,s}$ (vgl. Tabelle 6). Bereits publizierte Werte für $I_{to,s}$ liegen zwischen 10 und 12 pA/pF in ventrikulären Zellen, die keinen $I_{to,f}$ aufwiesen (Xu et al. 1999), in Zellen mit dominant negativer Kv4.2-Variante (Guo et al. 1999), in linksventrikulären KChIP2^{-/-}-Apexzellen (Foeger et al. 2013), und in Kv4.2^{-/-}-Zellen (Guo et al. 2005).

Die publizierten Werte der Inaktivierungszeitkonstanten für $I_{to,s}$ liegen um 200 ms (Guo et al. 1999; Xu et al. 1999; Guo et al. 2005; Foeger et al. 2013), was deutlich langsamer ist, als die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Werte für τ_1 in männlichen KChIP2^{-/-}-Myozyten. Allerdings handelte es sich dabei teilweise um interventrikuläre Septumzellen (Guo et al. 1999) und nicht um Zellen der linksventrikulären freien Wand. In dieser Arbeit wurden auch die Mehrheit der Stromkurven der KChIP2^{-/-}-Myozyten mittels einer dreifach-exponentiellen Funktion ausgewertet, da es deutliche Hinweise darauf gibt, dass $I_{to,f}$ in diesen Zellen nicht ersatzlos fehlt, sondern vielmehr durch einen anderen Strom „ersetzt“ wird (Foeger et al. 2013; Grubb et al. 2014). Die beschriebenen Ergebnisse für die Inaktivierungszeitkonstante der schnellen Komponente in männlichen KChIP2^{-/-}-Myozyten weisen entweder daraufhin, dass ein anderer „neuer“ Kanal in den Knockout-Zellen statt $I_{to,f}$ vermehrt exprimiert wird oder dass die Inaktivierungskinetik von $I_{to,s}$ in diesen Mäusen beschleunigt ist, um den Verlust von $I_{to,f}$ auszugleichen. Für die

These, dass ein anderer Kanal die Rolle von Kv4.2 in KChIP2^{-/-}-Myozyten übernimmt, sprechen auch die Ergebnisse einer Publikation von Liu *et al.* (2015). Dort wurde beobachtet, dass bei Kv4.2^{-/-}-Myozyten stattdessen ein auf Kv4.3-Kanälen basierender $I_{to,f}$ vorhanden sei (Liu *et al.* 2015). Ob dies in KChIP2^{-/-}-Myozyten auch der Fall sein kann, ist nicht hinreichend geklärt, da bisher noch nicht Mäuse mit kombiniertem Knockout für Kv4.2 und KChIP2 untersucht wurden. Generell ist aber auch bei Kv4.3-Kanälen KChIP2 die relevante β -Untereinheit. Ob stattdessen andere β -Untereinheit von Kv4-Kanälen eine größere Rolle in KChIP2^{-/-}-Myozyten spielen, wäre eine weitere Erklärung. Die These, dass stattdessen $I_{to,s}$ hochreguliert ist und eine beschleunigte Kinetik besitzt, unterstützen ähnliche Hinweise auf veränderte Kanaleigenschaften in Kv1.4^{-/-}-Myozyten, die bei Verlust von $I_{to,s}$ eine verlangsamte Kinetik eines ansonsten $I_{to,f}$ -ähnlichen Stromes zeigten (Guo *et al.* 1999). Es ist allerdings auch möglich, dass sowohl $I_{to,s}$ als auch I_{Kur} ($I_{K,slow1}$) hochreguliert sind, wie bereits Grubb *et al.* (2014) vorschlugen.

Kuo *et al.* (2001) beschrieben einen möglichen Gen-Dosis-Effekt von KChIP2 (vgl. Kap. 1.3). Sie berichteten, nach Verwendung des Vorpuls-Subtraktions-Protokolls, dass in KChIP2^{+/-}-Myozyten die Amplitude von $I_{to,f}$ um 50% reduziert sei und in KChIP2^{-/-}-Myozyten nahezu gar kein $I_{to,f}$ mehr nachweisbar sei (KChIP2^{-/-}: <5pA/pF bei (Kuo *et al.* 2001). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit durch das Vorpuls-Subtraktions-Protokoll nicht vollständig bestätigt werden. Zwar zeigte sich in den KChIP2^{-/-}-Myozyten auch eine massiv verringerte Stromdichte der isolierten Stromkomponente (siehe Tabelle 9), allerdings fiel die Reduktion der Dichte des $I_{to,f}$ zwischen dem Wildtyp- und dem KChIP2^{+/-}-Genotyp deutlich geringer aus, als von Kuo *et al.* (2001) beschrieben. Es zeigte sich zwar eine Reduktion der Stromdichtewerte, diese war aber für die isolierte Stromkomponente sehr gering (siehe Tabelle 9). Bei Anwendung der dreifach-exponentiellen Auswertung war die Reduktion der Dichte von Wildtyp zu KChIP2^{+/-} zwar 25%, war aber nicht statistisch signifikant (siehe Tabelle 6). Allerdings ließ sich eine deutlichere Reduktion (ca. 32%) der Amplitude der schnellen Komponente zwischen Wildtyp und KChIP2^{+/-} nachweisen (siehe Tabelle 6). Die Zeitkonstante der Inaktivierung des $I_{to,f}$ in KChIP2^{+/-}-Myozyten wurde bei Kuo *et al.* (2001) als identisch, verglichen mit dem Wildtyp beschrieben (Daten wurden nicht gezeigt). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, bei Anwendung der Vorpuls-Subtraktionsmethode, eine ca. 12 ms schnellere Inaktivierungszeitkonstante in KChIP2^{+/-}-Myozyten verglichen mit dem Wildtyp (siehe Tabelle 9). Bei Anwendung der dreifach-exponentiellen Auswertung zeigte sich aber eine nahezu identische Inaktivierungszeitkonstante τ_1 für Wildtyp und KChIP2^{+/-} (siehe Tabelle 6). Die

Zeitkonstante für die isolierte Stromkomponente in KChIP2^{-/-}-Myozyten ergab einen deutlich langsameren Wert als in beiden anderen Genotypen, der aufgrund seiner kleinen Stromdichte sowie der breiten Streuung aber schwierig zu bewerten ist (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Anwendung der Vorpuls-Subtraktions-Methode an männlichen Myozyten der Genotypen KChIP2^{+/+}, KChIP2^{+/-} und KChIP2^{-/-}.

| ♂ | KChIP2 ^{+/+} | KChIP2 ^{+/-} | KChIP2 ^{-/-} |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| τ (ms) | 62.2 ± 1.9 | 49.6 ± 1.7 | 178.9 ± 59.3 |
| Amplitude (nA) | 3.10 ± 0.28 | 2.42 ± 0.13 | 0.59 ± 0.04 |
| Stromdichte (pA/pF) | 17.9 ± 1.9 | 15.4 ± 0.8 | 3.8 ± 0.3 |
| | (n = 15) | (n = 65) | (n = 32) |

Dieser deutliche Unterschied in Bezug auf die Größe von I_{to} in KChIP2^{+/-}-Myozyten gegenüber dem Wildtyp, verglichen mit Kuo et al. (2001), könnte auf der Tatsache beruhen, dass bei Kuo et al. (2001) rechtsventrikuläre Myozyten, in der vorliegenden Arbeit aber ausschließlich linksventrikuläre Myozyten verwendet wurden. Es ist bekannt, dass Unterschiede in der Größe und Kinetik von I_{to} in rechtsventrikulären Myozyten gegenüber linksventrikulären Myozyten bestehen (Brunet et al. 2004; Marionneau et al. 2008; He et al. 2015).

Die vorliegende Arbeit liefert deutliche Hinweise auf einen Gen-Dosis-Effekt die I_{to} -Amplitude betreffend. Allerdings bleibt die Kinetik der schnellen Stromkomponente in KChIP2^{+/-} zunächst unverändert schnell, verglichen mit dem Wildtyp (siehe Kap. 3.3.5, Tabelle 6). Erst beim vollständigen Knockout von KChIP2 verändert sich auch die Kinetik und führt zu einer signifikant langsameren Inaktivierung, langsameren Erholung von der Inaktivierung sowie einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu negativeren Membranpotentialen (siehe Kap. 3.3.5, Tabelle 6). Die Schlussfolgerung daraus wäre, dass in KChIP2^{+/-} zwar eine verringerte Dichte von I_{to} nachweisbar ist, aber es sich, aufgrund der gleichen Kinetik, immer noch um $I_{to,f}$ handelt. Wohingegen die KChIP2^{-/-}-Myozyten einen Auswärtsstromstrom mit veränderter Kinetik aufweisen.

Die Erholung der Kv4.2-Kanäle von der Inaktivierung ist bei Koexpression von KChIPs beschleunigt (Bähring et al. 2001; Patel et al. 2002; Patel et al. 2004; Foeger et al. 2010; Foeger et al. 2013). Somit müsste im Rückschluss die Erholung von der Inaktivierung im Mausmodell beim Fehlen von KChIP2 langsamer sein. Dies ließ sich in dieser Arbeit im Vergleich der KChIP2-Genotypen bestätigen. Die Kinetik der Erholung von der Inaktivierung wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Recovery-Protokolls und

durch Anpassung einer zweifach-exponentiellen Funktion am Gesamtauswärtsstrom bestimmt (siehe Material und Methoden). Sie erlaubt eine weitere Charakterisierung des transienten Kaliumauswärtsstroms. Der Wert für $\tau_{\text{rec}1}$ in männlichen Wildtyp-Myozyten (Kap. 3.3.5, Tabelle 6) entsprach in der Größenordnung den publizierten Werten für $I_{\text{to},f}$, wobei sie in der vorliegenden Arbeit aber etwas langsamer waren (Guo *et al.* 1999; Liu *et al.* 2011; Foeger *et al.* 2013). Der ermittelte Wert für $\tau_{\text{rec}2}$ würde am ehesten den bisher publizierten Werten für $I_{\text{to},s}$ in KChIP2^{-/-}-Myozyten (vgl. 1213 ± 285 ms (Foeger *et al.* 2013)) oder den Werten für $I_{\text{to},s}$ in interventrikulären Septumzellen entsprechen (vgl. $1298 \pm ?$ ms (Xu *et al.* 1999); 1075 ± 125 ms (Guo *et al.* 2005)). Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Recovery-Kinetik der linksventrikulären Myozyten biphasisch ist. Allerdings wurden die Recovery-Kinetiken in der vorliegenden Arbeit nicht gesondert für unterschiedliche Stromkomponenten ausgewertet.

Im Knockout waren die Werte für $\tau_{\text{rec}1}$ und $\tau_{\text{rec}2}$ signifikant langsamer als in den beiden anderen Genotypen (siehe Kap. 3.3.5, Tabelle 6). Es könnte sich also um einen neuen Kanal-Typ mit deutlich langsamerem Erholungs-Mechanismus handeln oder auch um die Hochregulierung von z.B. $I_{\text{to},s}$ oder/und $I_{K,\text{slow}}$ (siehe oben) mit veränderter Kinetik.

Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nur mit Hilfe der Peakstrom-Amplitude bestimmt und nicht in die Einzelstrom-Komponenten differenziert. Es wurde bereits publiziert, dass $I_{\text{to},s}$ und $I_{K,\text{slow}}$ diesbezüglich sehr ähnliche Eigenschaften besitzen (Xu *et al.* 1999), sodass hier eine Differenzierung in einzelne Stromkomponenten nicht nötig erschien. Allerdings wurde zur Differenzierung der unterschiedlich inaktivierenden Komponenten des Gesamtauswärtsstroms eine zweifache Boltzmann-Funktion angewendet. Wie bereits für die anderen I_{to} -Parameter beschrieben, ergaben sich auch hier keinerlei Unterschiede zwischen Wildtyp und KChIP2^{+/-} (siehe Kap. 3.3.4 und Tabelle 6). Der Wert der ersten Komponente der zweifachen Boltzmann-Funktion zur Ermittlung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung war in KChIP2^{-/-}-Myozyten deutlich negativer als im Wildtyp und in KChIP2^{+/-}-Myozyten (siehe Kap. 3.3.5, Tabelle 6). Der $V_{1/2}$ -Wert der zweiten Komponente war hingegen in allen drei Gruppen gleich (vgl. Kap. 3.3.5, Tabelle 6). Der prozentuale Anteil der Komponenten an der Boltzmann-Funktion war signifikant unterschiedlich in KChIP2^{-/-}-Myozyten mit einer deutlich größeren zweiten Komponente ($V_{1/22}$) verglichen mit den beiden anderen Genotypen (siehe Kap. 3.3.5, Tabelle 6). Dies unterstützt die Vermutung, dass es sich in KChIP2^{-/-}-Myozyten, bei deutlich negativeren $V_{1/21}$ -Werten, um eine hochregulierte Kanalpopulation mit anderen Eigenschaften als $I_{\text{to},f}$ handeln könnte, die bereits bei deutlich negativeren Potentialen inaktiviert. Die in der

vorliegenden Arbeit beobachtete veränderte Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung in KChIP2^{-/-} steht im Kontrast zu publizierten Werten von Grubb *et al.* (2014), die keinen Unterschied der $V_{1/2}$ -Werte in KChIP2^{-/-}-Myozyten fanden. Allerdings wurde die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung in der genannten Publikation nur durch eine einfache Boltzmann-Funktion bestimmt (Grubb *et al.* 2014).

4.3 Einfluss des Geschlechts auf I_{to}

Das Vorhandensein geschlechtsabhängiger Unterschiede der kardialen Repolarisation in menschlichen Herzen ist bekannt und umfasst unter anderem eine längere Aktionspotentialdauer (APD) und höhere Anfälligkeit für Herzrhythmusstörungen in weiblichen Herzen (James *et al.* 2007). Diese geschlechtsabhängigen Unterschiede bezüglich einer verminderten Repolarisationsreserve und längeren APD sind auch für murine Herzen beschrieben (Wu and Anderson 2002). Repolarisationsreserve beschreibt die Fähigkeit, bei Ausfall einzelner Kaliumkanäle durch pharmakologische Blockierung oder Gendefekt den für die Repolarisation nötigen Kaliumauswärtsstrom über andere zur Verfügung stehende Kaliumkanäle auszugleichen. Die unterschiedliche Repolarisationsreserve der beiden Geschlechter führt dazu, dass die Auslösung von tödlichen Torsades-des-pointes-Arrhythmien bei weiblichen Mäusen begünstigt ist (Abi-Gerges *et al.* 2004; James *et al.* 2007). Dennoch wurde die Untersuchung geschlechtsabhängiger Unterschiede bezüglich der Kinetik des Kaliumauswärtsstroms in murinen Herzen bisher vernachlässigt. In der vorliegenden Arbeit wurden geschlechtsabhängige Unterschiede für I_{to} in Abhängigkeit vom KChIP2-Genotyp untersucht.

In einer Veröffentlichung von Trépanier-Boulay *et al.* (2001) wurden geschlechtsabhängige Unterschiede des Gesamtauswärtsstroms in Kardiomyozyten beschrieben. Die dort beschriebene Dichte des Gesamtauswärtsstroms in weiblichen Wildtyp-Myozyten (59 pA/pF) war signifikant kleiner als in männlichen (67 pA/pF, $p < 0.01$) bei gleicher Zellgröße der Myozyten, angegeben als Ganzzellkapazität [pF] (Trepanier-Boulay *et al.* 2001). Außerdem war die dort beschriebene Aktionspotentialdauer (APD) in weiblichen ventrikulären Myozyten länger als die der männlichen Myozyten. Die I_{to} -Stromdichte war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Geschlechtern, nur I_{Kur} und das dazugehörige Expressionslevel von Kv1.5 waren in weiblichen Mäusen signifikant kleiner als in Männchen (Trepanier-Boulay *et al.* 2001). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werten. Hier konnten keine Unterschiede in der Stromdichte des

Gesamtauswärtsstroms zwischen männlichen und weiblichen Wildtyp-Myozyten festgestellt werden (siehe Kap. 3.4.1.4, Tabelle 7). Allerdings waren die Myozyten der männlichen Wildtyp-Mäuse, gemessen als Ganzzellkapazität, signifikant größer als die der weiblichen (siehe Kap. 3.4.1). Dieser Unterschied wurde auch schon bei Wu & Anderson (2002) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit waren wie bei Trépanier-Boulay *et al.* (2001) die Stromdichten von I_{to} in männlichen und weiblichen Wildtyp-Myozyten nicht signifikant unterschiedlich (vgl. Kap. 3.4.1.4, Tabelle 7). Wu & Anderson (2002) beschrieben hingegen signifikant kleinere Stromdichten für I_{to} im weiblichen Wildtyp, allerdings führten sie die Versuche bei 35°C durch und verwendeten die Myozyten von zehn bis zwölf Monate alten Mäusen anderen genetischen Ursprungs.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Inaktivierungszeitkonstante in weiblichen Wildtyp-Myozyten war verglichen mit den männlichen Wildtyp-Myozyten signifikant schneller (vgl. Kap. 3.4.1.4, Tabelle 7). Dies steht in deutlichem Kontrast zu Untersuchungen von Brunet *et al.* (2004), welche in linksventrikulären Myozyten von C57BL6-Mäusen keinen signifikanten Unterschied in der Inaktivierungskinetik von I_{to} feststellten. Interessanterweise wurde dort aber eine deutlich schnellere Zeitkonstante der Inaktivierung in weiblichen rechtsventrikulären Myozyten beobachtet; ob dieser Unterschied signifikant war, wurde nicht angegeben (vgl. ♂: 79 ms vs. ♀: 65 ms, (Brunet *et al.* 2004)). Ebenfalls war die Erholung von der Inaktivierung in der vorliegenden Arbeit im weiblichen Wildtyp signifikant schneller als im männlichen Wildtyp (siehe Kap. 3.4.1.4, Tabelle 7). Für die langsamen Stromkomponenten (τ_2 und τ_3) ließen sich in der vorliegenden Arbeit, anders als bei Trépanier-Boulay *et al.* (2001), keine signifikant unterschiedlichen Inaktivierungszeitkonstanten oder Stromdichten zwischen Wildtyp-Männchen und -Weibchen nachweisen (siehe Tabelle 7). Dies entspricht aber den Ergebnissen von Brunet *et al.* (2004), die ebenfalls in rechts- und linksventrikulären Myozyten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Dichten der langsamen Stromkomponenten des Auswärtsstroms fanden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass im weiblichen Wildtyp die Inaktivierungszeitkonstante τ_1 und die Recovery-Zeitkonstante τ_{rec1} signifikant schneller waren, als im männlichen Wildtyp. Auch die Dichte der ersten Stromkomponente zeigte einen signifikanten Unterschied (siehe Kap. 3.4.1.4, Tabelle 7). Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zeigte ebenfalls einen signifikant negativeren $V_{1/21}$ -Wert für weibliche verglichen mit männlichen Wildtyp-Myozyten (siehe Kap. 3.4.1.4, Tabelle 7). Da man zunächst davon ausgeht, dass es sich in beiden Geschlechtern um die gleiche Stromkomponente, $I_{to,f}$, handelt, lässt sich festhalten, dass dieser Strom in weiblichen Myozyten eine veränderte

Kinetik und Spannungsabhängigkeit aufweist. Dies könnte ein Hinweis auf einen anderen Einfluss von KChIP2 in weiblichen Myozyten sein.

Es wurden in der vorliegenden Arbeit anschließend die KChIP2-Genotypen-abhängigen Einflüsse auf das weibliche Geschlecht untersucht, dabei ließ sich feststellen, dass der Genotyp KChIP2^{+/-} bzw. KChIP2^{-/-} auf die weiblichen Myozyten insgesamt einen ähnlichen Einfluss hatte wie auf die männlichen Myozyten. Die Inaktivierungszeitkonstante τ_1 war im Wildtyp und im KChIP2^{+/-}-Genotyp in den Weibchen gleich groß. Es zeigte sich auch hier in den KChIP2^{-/-}-Myozyten ein langsames τ_1 verglichen mit dem Wildtyp und KChIP2^{+/-}. Allerdings waren die Inaktivierungszeitkonstanten der schnellen Komponente aller drei Genotypen in den Weibchen ca. 10 ms kleiner als in den Männchen (siehe Tabelle 6 und 8). Unterschiede im Vergleich der Geschlechter zeigten sich bei Betrachtung der Stromdichtewerte der Komponente D_1 . Es zeigte sich im weiblichen Wildtyp insgesamt ein größerer Wert für D_1 als in den Männchen (siehe Tabelle 6 und 8). Die Stromdichte in den weiblichen KChIP2^{+/-}-Myozyten war, anders als bei den Männchen, gegenüber dem Wildtyp statistisch signifikant kleiner (siehe Tabelle 8). Die Reduktion der Stromdichte D_1 des KChIP2^{-/-}-Genotyps betrug aber, genau wie bei den Männchen (siehe Kap. 4.2), zwei Drittel des Wildtyp-Werts (siehe Tabelle 8). Ebenso war der prozentuale Anteil der schnellen Komponente (% A_1) am Gesamtauswärtsstrom in den weiblichen Myozyten insgesamt größer als in den Männchen (siehe Tabelle 6 und 8). Die zwar verlangsamte, aber immer noch sehr schnelle Inaktivierungszeitkonstante τ_1 sowie der relativ große Wert für D_1 in den weiblichen KChIP2^{-/-}-Myozyten verglichen mit den männlichen, könnte zunächst vermuten lassen, dass es sich womöglich trotz des Knockouts von KChIP2 in den Weibchen, um $I_{to,f}$ handeln könnte. Gegen diese These spricht die Tatsache, dass die Vergrößerung der Inaktivierungszeitkonstante, sowie die Reduktion von A_1 bzw. D_1 gegenüber dem Wildtyp aber in gleichen Relationen statt fand, wie bei den Männchen (siehe Tabelle 6 und 8). Auch die Recovery-Kinetik im weiblichen KChIP2^{-/-}-Genotyp war signifikant langsamer als im weiblichen Wildtyp und KChIP2^{+/-} und ebenso langsam wie im männlichen KChIP2^{-/-}-Genotyp (siehe Tabelle 6 und 8). Die Parameter der anderen beiden Stromkomponenten (τ_2 und τ_3) waren auch in den Weibchen zwischen allen drei Genotypen nicht zu unterscheiden. Diese Ergebnisse lassen sich derzeit nicht mit anderen Daten vergleichen, da bisher keine KChIP2-Knockout-Mäuse bezüglich ihrer geschlechtsabhängigen Unterschiede untersucht wurden.

Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass durch das Fehlen eines KChIP2-Allels (KChIP2^{+/-}-Genotyp) beim weiblichen Geschlecht bereits eine signifikante Reduktion der

I_{to} -Stromdichte erreicht wurde, bei gleichbleibender Inaktivierungskinetik und Erholung von der Inaktivierung. Durch den vollständigen Knockout wurde dann wiederum eine weitere Reduktion der Stromdichte der schnellen Komponente erreicht bei weiterhin relativ schneller Inaktivierung, aber deutlich langsamerer Erholung von der Inaktivierung und veränderter Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung (siehe Kap. 3.4.2.4, Tabelle 8). Daher lässt sich vermuten, dass es sich zwar um eine andere Stromkomponente handelt, zum Beispiel um $I_{to,s}$, aber mit deutlich schnellerer Inaktivierungs-Kinetik verglichen mit den Männchen. Daher wäre eine Untersuchung der tatsächlich exprimierten Kanal-Proteine in weiblichen KChIP2^{-/-}-Myozyten von besonderem Interesse. Des Weiteren bleibt offen, warum die Kinetik von I_{to} in weiblichen Myozyten insgesamt schneller ist, als in männlichen.

Mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede könnten durch den Einfluss des Plasmalevels von Östrogen auf die Kinetik und Stromdichte von I_{to} erklärt werden. Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Östrogen auf den Gesamtkaliumauswärtsstrom in Mäuseherzen wurden von Saito *et al.* (2009) durchgeführt. Sie untersuchten Unterschiede auf Kaliumströme im Herzen weiblicher Mäuse, abhängig von ihrem jeweiligen Östrogenlevel. Sie fanden heraus, dass Östrogen einen inhibitorischen Einfluss auf den Gesamtkaliumauswärtsstrom hat. Die Stromkomponenten $I_{to,f}$ und $I_{K,slow}$ waren niedriger in Mäusen mit hohem Östrogenlevel (Estrus, ovariektomierte Mäuse unter Östrogensubstitution) verglichen mit Mäusen mit niedrigem Östrogenlevel (Diestrus-2, ovariektomierte und männliche Mäuse). Es wurden außerdem erniedrigte Kv4.3- und Kv1.5-Expressionslevel unter dem Einfluss hoher Östrogenkonzentrationen gefunden; die Expressionslevel von Kv4.2, KChIP2 und Kv2.1 waren hingegen nicht verändert (Saito *et al.* 2009). Außerdem konnten sie verlängerte Aktionspotentiale und längere QT_c-Intervalle in Mäusen unter hohem Östrogeneinfluss feststellen (Saito *et al.* 2009). Dies bestätigte auch, dass I_{to} in weiblichen Mäusen am Ende der Schwangerschaft herunterreguliert war, während die Plasmalevel von Östrogen hoch waren (Eghbali *et al.* 2005). Dies ist zwar noch keine Erklärung für die insgesamt schnellere Inaktivierung der schnellen Komponente des Gesamtauswärtsstroms, aber ein Hinweis auf den Einfluss von Hormonen auf die Kinetik von Kalium-Kanälen im Herzen. Daher ist die weitere Untersuchung des Einflusses von Hormonen auf Kaliumkanäle und somit die Repolarisation am Herzen unerlässlich.

4.4 Klinischer Bezug und Ausblick

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind eine der Haupttodesursachen der modernen westlichen Gesellschaft (Schocken *et al.* 1992). Rund die Hälfte der Todesfälle mit

Herzversagen ist auf plötzliche Ereignisse zurückzuführen und vermutlich durch letale ventrikuläre Tachyarrhythmien verursacht (Tomaselli *et al.* 1994; Wang and Hill 2010). Ein wichtiger Bestandteil der Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind vor allem die degenerativen Herzerkrankungen. Hervorzuheben ist hier vor allem die Herzhypertrophie mit ihren Folgen. So können neben Herzinsuffizienz aufgrund ausgeschöpfter Kapazitäten auch ventrikuläre Tachyarrhythmien eine häufige Folge der Hypertrophie sein. Trotz intensiver Forschung sind bisher noch nicht alle molekularen Mechanismen der proarrhythmischen Genese bekannt (Wang and Hill 2010). Allerdings hat man bereits früh herausgefunden, dass in den ventrikulären Myozyten aus Meerschweinchen mit herbeigeführter schwerer Herzhypertrophie, die Aktionspotentialdauer (APD) des Herzaktionspotentials verlängert ist (Nordin *et al.* 1989).

Eine häufig beschriebene Veränderung bei Herzinsuffizienz, sowohl im Tiermodell als auch in humanen Herzen, ist die Herunterregulierung von I_{to} in den ventrikulären Myozyten von insuffizienten Herzen (Beuckelmann *et al.* 1993; Tomaselli and Marban 1999). In Mäuseherzen ist I_{to} massiv an der Dauer des kardialen Aktionspotentials beteiligt (Nerbonne 2004), da er durch seine, relativ gesehen, große Stromstärke die depolarisierenden Einflüsse von $I_{Ca,L}$ überbietet und daher zu einer starken Verminderung des Kalzium-Plateaus führt (Greenstein *et al.* 2000). Der Einfluss von I_{to} auf das menschliche Herz-Aktionspotential wird kontrovers diskutiert, da durch das stärkere Zusammenspiel von I_{to} , $I_{Ca,L}$ und anderen repolarisierenden Kaliumkanälen die dominante Wirkung von I_{to} abgeschwächt wird, sodass es zu einem ausgeprägten Plateau und somit einer längeren APD kommt (Greenstein *et al.* 2000). I_{to} ist aber dennoch für die erste Phase der Repolarisation essenziell und für die Beschaffenheit des Ca^{2+} -Plateaus des Aktionspotentials sowie dem Vorhandensein der klassischen Kerbe (*notch*) des ventrikulären Aktionspotentials (Tomaselli and Marban 1999; Greenstein *et al.* 2000; Nass *et al.* 2008; Wang and Hill 2010). I_{to} hat Einfluss auf die elektrische Antriebskraft des systolischen Kalzium-Eintritts in die Zelle (Sah *et al.*, 2003; Tozakidou *et al.*, 2001) und hat somit auch einen Effekt auf die weiteren an der Repolarisation beteiligten Kanäle und ihren Einfluss auf das Aktionspotential. Da das Vorhandensein von I_{to} im Herzen von Säugetieren insbesondere vom Vorhandensein seiner β -Untereinheit KCHIP2 abhängt (Kuo *et al.* 2001), ist es kaum verwunderlich, dass die Expression von KCHIP2 in Herzen von Patienten mit Herzinsuffizienz (NYHA IV) ebenfalls reduziert ist (Radicke *et al.* 2006). Aus den für das Aktionspotential stabilisierenden Eigenschaften des I_{to} folgte ein enormes Interesse an seinen

elektrophysiologischen Eigenschaften und der Bedeutung seiner einzelnen Komponenten.

Das bereits oben beschriebene, gleichzeitige Auftreten von Hypertrophie und veränderten I_{to} -Eigenschaften wird auch in Mausmodellen beschrieben. So wiesen in einer Veröffentlichung Mäuse mit durch transverser Aortenkonstriktion (TAK) hervorgerufener Hypertonie, die in Folge dessen eine Herz-Hypertrophie entwickeln, eine reduzierte KChIP2-Expression und einen Verlust des Kv4.2 vermittelten transienten Kaliumauswärtsstroms I_{to} auf (Jin *et al.* 2010). Viel interessanter an dieser Studie ist aber, dass die zuvor durch TAK hervorgerufenen Effekte auf das Myokard anschließend durch die Überexpression von KChIP2 mit Hilfe von Adenovirus-Injektion umgekehrt werden konnten. Die durch Überexpression von KChIP2 behandelten Mäuse zeigten im Gegensatz zu den TAK-behandelten Kontrollmäusen keine Hypertrophie. Des Weiteren konnte eine Erhöhung der I_{to} (bzw. $I_{to,f}$)-Dichte und eine Verkürzung der APD in den KChIP2-behandelten Mäusen gezeigt werden (Jin *et al.* 2010).

Es ist außerdem bekannt, dass die Reduktion von I_{to} nicht allein eine Folge von Herz-Hypertrophie ist, sondern diesen Prozess auch auslöst, also auch ein verstärkender Faktor ist (Kassiri *et al.* 2002). Der Verlust von I_{to} führt einerseits zu einer erhöhten Aktivität von Calcineurin, ein Enzym welches die Transkription wichtiger Gene moduliert (Kassiri *et al.* 2002; Sah *et al.* 2002). Andererseits hat I_{to} auch Einfluss auf die Aktivität der calcium-/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII), welche im Zusammenspiel mit Calcineurin über den Calcineurin-NFAT-Pfad zu einer Induktion von Hypertrophie führt (Molkentin *et al.* 1998; Anderson *et al.* 2011); siehe auch Abbildung 27). Einerseits hat I_{to} durch die Verlängerung des Aktionspotentials und den dadurch erhöhten Calcium-Einstrom in die Zelle indirekt Einfluss auf die Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Pfads, andererseits auch durch die direkte Kopplung zwischen I_{to} und inaktiviertem CaMKII (Keskanokwong *et al.* 2011). Durch den Verlust von I_{to} wird dann CaMKII freigesetzt und dadurch aktiviert. Dieses aktiviert dann wiederum durch Phosphorylierung verschiedene Proteine, die am Kalziumstrom in Herzmuskelzellen beteiligt sind und führt insgesamt zu einer Kalziumüberlastung der Zelle (Grueter *et al.* 2007).

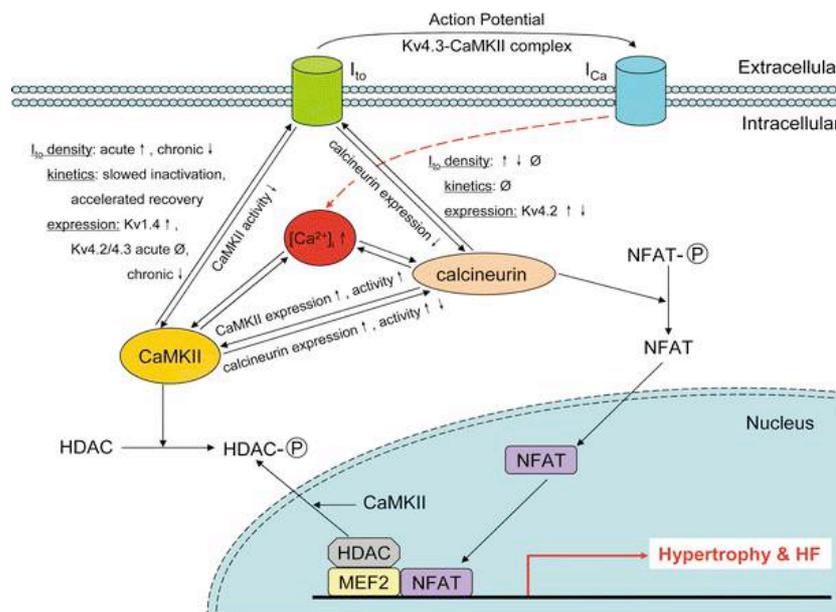


Abbildung 25: Interaktion zwischen I_{to} , CaMKII und Calcineurin. (He *et al.* 2015)

All diese Effekte führen zu der Entwicklung und Verstärkung von Herzhypertrophie und Herzversagen und sind dabei gleichzeitig natürlich auch ein möglicher Angriffspunkt für therapeutische Strategien. CaMKII scheint zur pharmakologischen Blockierung nur bedingt geeignet zu sein, da in CaMKII-Knockout-Mäusen mit Herzversagen zwar die zelluläre Kontraktilität verbessert war, die systolische Herzfunktion aber denen der Wildtyp-Mäusen mit Herzversagen gleich und zusätzlich eine verschlechterte diastolische Herzfunktion festgestellt wurde (Cheng *et al.* 2012). Hingegen scheint I_{to} ($I_{to,f}$) als pharmakologischer Angriffspunkt aber interessant zu sein, da die Über-Expression von Kv4.3 zu einer reduzierten CaMKII-Aktivität führte (Keskanokwong *et al.* 2011) und außerdem die durch Aortenstenose hervorgerufene Hypertrophie in Ratten neutralisierte (Lebeche *et al.* 2004). Wie oben schon beschrieben konnten auch durch Überexpression von KCHIP2 ähnliche Effekte in TAK-behandelten Mäusen gezeigt werden (Jin *et al.* 2010). Ein interessanter Ausgangspunkt für neue Experimente ist nun einerseits, die Rolle von I_{to} in der Entwicklung kardialer Pathologien weiter zu differenzieren und andererseits zu untersuchen, ob I_{to} ein möglicher Angriffspunkt für therapeutische Strategien in der Behandlung von Herzversagen sein könnte.

5. Zusammenfassung

Spannungsabhängige Kaliumkanäle sind essenziell für den Repolarisationsvorgang in Kardiomyozyten. Der transiente Kaliumauswärtsstrom I_{to} vermittelt die erste Phase der Repolarisation des Aktionspotentials und wird in zwei Subtypen ($I_{to,f}$ und $I_{to,s}$) unterteilt. Die molekularen Korrelate des $I_{to,f}$ am Herzen werden durch porenbildende Kv4 α -Untereinheiten sowie die zytoplasmatische β -Untereinheit KChIP2 gebildet. Die KChIP2-Proteine erhöhen die Kanalexpression an der Zelloberfläche und führen zu einem deutlichen Anstieg der Stromdichte von $I_{to,f}$. Des Weiteren haben sie Einfluss auf die Kinetik des Stroms, indem sie die Inaktivierung verlangsamen, die Erholung von der Inaktivierung beschleunigen und die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu positiveren Werten verschieben. In KChIP2-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass der Verlust von KChIP2 zu einem selektiven Verlust von $I_{to,f}$ führt.

In der vorliegenden Arbeit wurden linksventrikuläre Myozyten von männlichen und weiblichen Mäusen mit unterschiedlichen KChIP2-Genotypen (KChIP2^{+/+}, KChIP2^{+/-} und KChIP2^{-/-}) hinsichtlich ihrer Beschaffenheit von I_{to} untersucht. Mittels der Patch-Clamp-Technik wurden elektrophysiologische Parameter der Inaktivierung, Erholung von der Inaktivierung (Recovery) und Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass für die Auswertung des Gesamtauswärtsstroms bei allen drei Genotypen und in beiden Geschlechtern die dreifach-exponentielle Auswertemethode zu bevorzugen ist. Sowohl in männlichen als auch in weiblichen Myozyten zeigten sich bezüglich der Amplitude bzw. Dichte von I_{to} Gen-Dosis-abhängige Effekte. Die Kinetik der ersten Komponente des Gesamtauswärtsstroms (I_{to}) war in Wildtyp- und KChIP2^{+/-}-Myozyten gleich, aber mit einer signifikant schnelleren Inaktivierungszeitkonstante verglichen mit KChIP2^{-/-}. Auch die Recovery-Kinetik und die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zeigten Unterschiede in KChIP2^{-/-}-Myozyten verglichen mit dem Wildtyp und KChIP2^{+/-} auf. Es konnte gezeigt werden, dass trotz nachweisbarer Reduktion der Amplitude von I_{to} , die Kinetik des Stroms in KChIP2^{+/-} unverändert blieb und in KChIP2^{-/-} kompensatorische Mechanismen den Verlust von I_{to} ausglich. Des Weiteren war in weiblichen Wildtyp-Myozyten die Stromdichte von I_{to} größer und die Inaktivierungszeitkonstante schneller als in männlichen Myozyten, was einen geschlechtsabhängigen Unterschied $I_{to,s}$ aufzeigte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Genetik modulierende Effekte auf die Expression von Kanalproteinen hat, aber der vollständige Verlust der Kanalfunktion, im Falle von I_{to} , durch kompensatorische Mechanismen abgefangen wird. Des Weiteren unterstützen die Ergebnisse Hinweise auf

das Vorhandensein geschlechtsabhängiger Unterschiede des repolarisierenden Kaliumstroms.

5.1 Abstract

Voltage-gated potassium (K^+) channels are essential for the repolarization of the heart. The transient outward K^+ current (I_{to}) is crucial for the early phase of myocardial action potential repolarization and is divided into two subgroups ($I_{to,f}$ and $I_{to,s}$). The molecular correlates of $I_{to,f}$ in the heart are pore-forming Kv4 α -subunits and the intracellularly located auxiliary β -subunit KChIP2. The KChIP2 protein increases channel expression at the cell surface, leading to a significant increase in current density of $I_{to,f}$. Furthermore, they influence the kinetics of the current by slowing the inactivation, accelerating the recovery from inactivation and moving the voltage dependence of the half maximal steady-state inactivation to more positive values. In KChIP2-deficient mice was demonstrated that downregulation of KChIP2 leads to a selective loss of $I_{to,f}$.

In the present study left ventricular myocytes of male and female mice with different KChIP2-genotypes (KChIP2^{+/+}, KChIP2^{+/-} und KChIP2^{-/-}) were examined with regard to their properties of I_{to} . By means of patch clamp, electrophysiological parameters of inactivation, recovery from inactivation and voltage dependence of inactivation were determined. It was shown that for the evaluation of the total outward current of all three genotypes in both sexes, the triple exponential function is preferable. Both, male and female myocytes showed, regarding the amplitude or density of I_{to} , gene dose-dependent effects. The kinetics of the first component of the total outward current (I_{to}) was in wild-type and KChIP2^{+/-}-myocytes similar, but with a significantly faster time constant of inactivation than KChIP2^{-/-}. The recovery kinetics and voltage dependence of inactivation showed differences in KChIP2^{-/-}-myocytes compared with the wild type and KChIP2^{+/-}. It could be demonstrated that, despite detectable reduction in the amplitude of I_{to} , the kinetics of the current in KChIP2^{+/-} remained stable and in KChIP2^{-/-} compensatory mechanisms offset the loss of I_{to} . Furthermore, in female wild-type myocytes, the current density of I_{to} was larger and time constant of inactivation was faster than in male myocytes, thus indicating a gender difference of I_{to} .

In summary, the results of this study suggest that genetics has a modulating effect on the expression of channel proteins but that the complete loss of channel function is intercepted by compensatory mechanisms in case of I_{to} . Furthermore, the results support evidence of the existence of gender-dependent differences in repolarizing potassium outward currents.

6. Literaturverzeichnis

- Abi-Gerges, N., K. Philp, et al. (2004). "Sex differences in ventricular repolarization: from cardiac electrophysiology to Torsades de Pointes." *Fundam Clin Pharmacol* **18**(2): 139-51.
- An, W. F., M. R. Bowlby, et al. (2000). "Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors." *Nature* **403**(6769): 553-6.
- Anderson, M. E., J. H. Brown, et al. (2011). "CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure." *J Mol Cell Cardiol* **51**(4): 468-73.
- Bähring, R., J. Dannenberg, et al. (2001). "Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating." *J Biol Chem* **276**(26): 23888-94.
- Baldwin, T. J., M. L. Tsaour, et al. (1991). "Characterization of a mammalian cDNA for an inactivating voltage-sensitive K⁺ channel." *Neuron* **7**(3): 471-83.
- Barry, D. M., H. Xu, et al. (1998). "Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4 alpha subunit." *Circ Res* **83**(5): 560-7.
- Bassani, R. A. (2006). "Transient outward potassium current and Ca²⁺ homeostasis in the heart: beyond the action potential." *Braz J Med Biol Res* **39**(3): 393-403.
- Beuckelmann, D. J., M. Nabauer, et al. (1993). "Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure." *Circ Res* **73**(2): 379-85.
- Brouillette, J., R. B. Clark, et al. (2004). "Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes." *J Physiol* **559**(Pt 3): 777-98.
- Brunet, S., F. Aimond, et al. (2004). "Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K⁺ currents in adult mouse ventricles." *J Physiol* **559**(Pt 1): 103-20.
- Burgoyne, R. D. (2007). "Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca²⁺ signalling." *Nat Rev Neurosci* **8**(3): 182-93.
- Burgoyne, R. D. and J. L. Weiss (2001). "The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins." *Biochem J* **353**(Pt 1): 1-12.
- Cheng, J., L. Xu, et al. (2012). "CaMKII inhibition in heart failure, beneficial, harmful, or both." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**(7): H1454-65.
- Costantini, D. L., E. P. Arruda, et al. (2005). "The homeodomain transcription factor *Irx5* establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient." *Cell* **123**(2): 347-58.
- Decher, N., A. S. Barth, et al. (2004). "Novel KChIP2 isoforms increase functional diversity of transient outward potassium currents." *J Physiol* **557**(Pt 3): 761-72.
- Dixon, J. E. and D. McKinnon (1994). "Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats." *Circ Res* **75**(2): 252-60.

- Dobson, G. (2003). "On being the right size: heart design, mitochondrial efficiency and lifespan potential." Clin Exp Pharmacol Physiol **30**(8): 590-7.
- Eghbali, M., R. Deva, et al. (2005). "Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy." Circ Res **96**(11): 1208-16.
- Fiset, C., R. B. Clark, et al. (1997). "Shal-type channels contribute to the Ca²⁺-independent transient outward K⁺ current in rat ventricle." J Physiol **500** (Pt 1): 51-64.
- Foeger, N. C., C. Marionneau, et al. (2010). "Co-assembly of Kv4 {alpha} subunits with K⁺ channel-interacting protein 2 stabilizes protein expression and promotes surface retention of channel complexes." J Biol Chem **285**(43): 33413-22.
- Foeger, N. C., W. Wang, et al. (2013). "Stabilization of Kv4 protein by the accessory K(+) channel interacting protein 2 (KChIP2) subunit is required for the generation of native myocardial fast transient outward K(+) currents." J Physiol **591**(Pt 17): 4149-66.
- Greenstein, J. L., R. Wu, et al. (2000). "Role of the calcium-independent transient outward current I_{to1} in shaping action potential morphology and duration." Circ Res **87**(11): 1026-33.
- Grubb, S., T. Speerschneider, et al. (2014). "Loss of K⁺ currents in heart failure is accentuated in KChIP2 deficient mice." J Cardiovasc Electrophysiol **25**(8): 896-904.
- Grueter, C. E., R. J. Colbran, et al. (2007). "CaMKII, an emerging molecular driver for calcium homeostasis, arrhythmias, and cardiac dysfunction." J Mol Med (Berl) **85**(1): 5-14.
- Guo, W., W. E. Jung, et al. (2005). "Targeted deletion of Kv4.2 eliminates I_{to,f} and results in electrical and molecular remodeling, with no evidence of ventricular hypertrophy or myocardial dysfunction." Circ Res **97**(12): 1342-50.
- Guo, W., H. Xu, et al. (1999). "Molecular basis of transient outward K⁺ current diversity in mouse ventricular myocytes." J Physiol **521** Pt 3: 587-99.
- Gutman, G. A., K. G. Chandy, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels." Pharmacol Rev **57**(4): 473-508.
- Haim, T. E., W. Wang, et al. (2010). "Palmitate attenuates myocardial contractility through augmentation of repolarizing Kv currents." J Mol Cell Cardiol **48**(2): 395-405.
- He, Q., Y. Feng, et al. (2015). "Transient outward potassium channel: a heart failure mediator." Heart Fail Rev **20**(3): 349-62.
- Holmqvist, M. H., J. Cao, et al. (2002). "Elimination of fast inactivation in Kv4 A-type potassium channels by an auxiliary subunit domain." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 1035-40.
- Isbrandt, D., T. Leicher, et al. (2000). "Gene structures and expression profiles of three human KCND (Kv4) potassium channels mediating A-type currents I_{TO} and I_{SA}." Genomics **64**(2): 144-54.

- James, A. F., S. C. Choisy, et al. (2007). "Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization." Prog Biophys Mol Biol **94**(3): 265-319.
- Jin, H., L. Hadri, et al. (2010). "KChIP2 attenuates cardiac hypertrophy through regulation of Ito and intracellular calcium signaling." J Mol Cell Cardiol **48**(6): 1169-79.
- Johns, D. C., H. B. Nuss, et al. (1997). "Suppression of neuronal and cardiac transient outward currents by viral gene transfer of dominant-negative Kv4.2 constructs." J Biol Chem **272**(50): 31598-603.
- Kamb, A., J. Tseng-Crank, et al. (1988). "Multiple products of the Drosophila Shaker gene may contribute to potassium channel diversity." Neuron **1**(5): 421-30.
- Kassiri, Z., C. Zobel, et al. (2002). "Reduction of I(to) causes hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes." Circ Res **90**(5): 578-85.
- Keskanokwong, T., H. J. Lim, et al. (2011). "Dynamic Kv4.3-CaMKII unit in heart: an intrinsic negative regulator for CaMKII activation." Eur Heart J **32**(3): 305-15.
- Kuo, H. C., C. F. Cheng, et al. (2001). "A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I(to) and confers susceptibility to ventricular tachycardia." Cell **107**(6): 801-13.
- Lebeche, D., R. Kaprielian, et al. (2004). "In vivo cardiac gene transfer of Kv4.3 abrogates the hypertrophic response in rats after aortic stenosis." Circulation **110**(22): 3435-43.
- Liu, J., K. H. Kim, et al. (2011). "Dissection of the voltage-activated potassium outward currents in adult mouse ventricular myocytes: I(to,f), I(to,s), I(K,slow1), I(K,slow2), and I(ss)." Basic Res Cardiol **106**(2): 189-204.
- Liu, J., K. H. Kim, et al. (2015). "Kv4.3-Encoded Fast Transient Outward Current Is Presented in Kv4.2 Knockout Mouse Cardiomyocytes." PLoS One **10**(7): e0133274.
- Marionneau, C., S. Brunet, et al. (2008). "Distinct cellular and molecular mechanisms underlie functional remodeling of repolarizing K⁺ currents with left ventricular hypertrophy." Circ Res **102**(11): 1406-15.
- Molkentin, J. D., J. R. Lu, et al. (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy." Cell **93**(2): 215-28.
- Nabauer, M., D. J. Beuckelmann, et al. (1993). "Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure." Circ Res **73**(2): 386-94.
- Nabauer, M., D. J. Beuckelmann, et al. (1996). "Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle." Circulation **93**(1): 168-77.
- Nakamura, T. Y., W. A. Coetzee, et al. (1997). "Modulation of Kv4 channels, key components of rat ventricular transient outward K⁺ current, by PKC." Am J Physiol **273**(4 Pt 2): H1775-86.

- Nass, R. D., T. Aiba, et al. (2008). "Mechanisms of disease: ion channel remodeling in the failing ventricle." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **5**(4): 196-207.
- Neher, E. and B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**(5554): 799-802.
- Nerbonne, J. M. (2000). "Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium." J Physiol **525 Pt 2**: 285-98.
- Nerbonne, J. M. (2004). "Studying cardiac arrhythmias in the mouse--a reasonable model for probing mechanisms?" Trends Cardiovasc Med **14**(3): 83-93.
- Niwa, N., W. Wang, et al. (2008). "Kv4.3 is not required for the generation of functional Ito,f channels in adult mouse ventricles." J Mol Cell Cardiol **44**(1): 95-104.
- Nordin, C., F. Siri, et al. (1989). "Electrophysiologic characteristics of single myocytes isolated from hypertrophied guinea-pig hearts." J Mol Cell Cardiol **21**(7): 729-39.
- Numberger, M. and A. Draguhn (1996). Patch-Clamp-Technik. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Pak, M. D., K. Baker, et al. (1991). "mShal, a subfamily of A-type K⁺ channel cloned from mammalian brain." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4386-90.
- Patel, S. P. and D. L. Campbell (2005). "Transient outward potassium current, 'Ito', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms." J Physiol **569**(Pt 1): 7-39.
- Patel, S. P., D. L. Campbell, et al. (2002). "Elucidating KChIP effects on Kv4.3 inactivation and recovery kinetics with a minimal KChIP2 isoform." J Physiol **545**(Pt 1): 5-11.
- Patel, S. P., R. Parai, et al. (2004). "Regulation of Kv4.3 voltage-dependent gating kinetics by KChIP2 isoforms." J Physiol **557**(Pt 1): 19-41.
- Pongs, O., N. Kecskemethy, et al. (1988). "Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of Drosophila." EMBO J **7**(4): 1087-96.
- Radicke, S., D. Cotella, et al. (2006). "Functional modulation of the transient outward current Ito by KCNE beta-subunits and regional distribution in human non-failing and failing hearts." Cardiovasc Res **71**(4): 695-703.
- Rosati, B., Z. Pan, et al. (2001). "Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle." J Physiol **533**(Pt 1): 119-25.
- Sah, R., G. Y. Oudit, et al. (2002). "Inhibition of calcineurin and sarcolemmal Ca²⁺ influx protects cardiac morphology and ventricular function in K(v)4.2N transgenic mice." Circulation **105**(15): 1850-6.
- Saito, T., A. Ciobotaru, et al. (2009). "Estrogen contributes to gender differences in mouse ventricular repolarization." Circ Res **105**(4): 343-52.
- Salkoff, L., K. Baker, et al. (1992). "An essential 'set' of K⁺ channels conserved in flies, mice and humans." Trends Neurosci **15**(5): 161-6.

- Schocken, D. D., M. I. Arrieta, et al. (1992). "Prevalence and mortality rate of congestive heart failure in the United States." J Am Coll Cardiol **20**(2): 301-6.
- Serodio, P. and B. Rudy (1998). "Differential expression of Kv4 K⁺ channel subunits mediating subthreshold transient K⁺ (A-type) currents in rat brain." J Neurophysiol **79**(2): 1081-91.
- Shibata, R., H. Misonou, et al. (2003). "A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels." J Biol Chem **278**(38): 36445-54.
- Tempel, B. L., D. M. Papazian, et al. (1987). "Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*." Science **237**(4816): 770-5.
- Teutsch, C., R. P. Kondo, et al. (2007). "Spatial distributions of Kv4 channels and KChip2 isoforms in the murine heart based on laser capture microdissection." Cardiovasc Res **73**(4): 739-49.
- Thomsen, M. B., E. A. Sosunov, et al. (2009). "Deleting the accessory subunit KChIP2 results in loss of I_(to,f) and increased I_(K,slow) that maintains normal action potential configuration." Heart Rhythm **6**(3): 370-7.
- Tomaselli, G. F., D. J. Beuckelmann, et al. (1994). "Sudden cardiac death in heart failure. The role of abnormal repolarization." Circulation **90**(5): 2534-9.
- Tomaselli, G. F. and E. Marban (1999). "Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure." Cardiovasc Res **42**(2): 270-83.
- Tozakidou, M., D. Goltz, et al. (2009). "Molecular and functional remodeling of I_(to) by angiotensin II in the mouse left ventricle." J Mol Cell Cardiol **48**(1): 140-51.
- Trepanier-Boulay, V., C. St-Michel, et al. (2001). "Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle." Circ Res **89**(5): 437-44.
- Wang, H., Y. Yan, et al. (2007). "Structural basis for modulation of Kv4 K⁺ channels by auxiliary KChIP subunits." Nat Neurosci **10**(1): 32-9.
- Wang, Y. and J. A. Hill (2010). "Electrophysiological remodeling in heart failure." J Mol Cell Cardiol **48**(4): 619-32.
- Wettwer, E., G. J. Amos, et al. (1994). "Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin." Circ Res **75**(3): 473-82.
- Wickenden, A. D., P. Lee, et al. (1999). "Targeted expression of a dominant-negative K(v)4.2 K⁽⁺⁾ channel subunit in the mouse heart." Circ Res **85**(11): 1067-76.
- Wu, Y. and M. E. Anderson (2002). "Reduced repolarization reserve in ventricular myocytes from female mice." Cardiovasc Res **53**(3): 763-9.
- Xu, H., W. Guo, et al. (1999). "Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes." J Gen Physiol **113**(5): 661-78.
- Zhou, J., S. Kodirov, et al. (2003). "Regional upregulation of Kv2.1-encoded current, I_(K,slow2), in Kv1DN mice is abolished by crossbreeding with Kv2DN mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(2): H491-500.

6.1 Veröffentlichungen

Der Inhalt dieser Arbeit wurde publiziert:

Waldschmidt, L., Junkereit, V., Bähring, R. (2017). "KChIP2 genotype dependence of transient outward current (I_{to}) properties in cardiomyocytes isolated from male and female mice. " PLoS ONE doi: 10.1371/journal.pone.0171213. eCollection 2017.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| Ang II | Angiotensin II |
| ANOVA | <i>analysis of variance</i> ; Varianzanalyse |
| APD | Aktionspotentialdauer |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| FCS | <i>Fetal Calf Serum</i> (Fetales Kälberserum) |
| HEK | <i>human embryonic kidney</i> (humane embryonale Niere) |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl-)Piperazin-1-Ethansulfonat |
| $I_{Ca,L}$ | L-Typ- Ca^{2+} -Strom |
| I_{K1} | einwärts gerichteter K^+ -Strom |
| $I_{K,ATP}$ | ATP-sensitiver Kaliumkanal |
| $I_{K,r}$ | schnell (<i>rapid</i>) aktivierender <i>delayed rectifier</i> K^+ -Strom im humane Herz |
| $I_{K,s}$ | langsam (<i>slow</i>) aktivierender <i>delayed rectifier</i> K^+ -Strom im humane Herz |
| $I_{K,slow}$ | langsam (<i>slow</i>) aktivierender <i>delayed rectifier</i> K^+ -Strom im murinen Herz |
| I_{Na} | spannungsgesteuerter schneller Na^+ -Strom |
| I_{ss} | Steady-State-Kaliumauswärtsstrom |
| $I_{to,f}$ | schnelle Komponente des transienten Kaliumauswärtsstrom, f= fast |
| $I_{to,s}$ | langsame Komponente des transienten Kaliumauswärtsstrom, s= slow |
| k | Steigungsfaktor der Boltzmann-Funktion |
| KCHIP | <i>Kv Channel Interacting Protein</i> (Kaliumkanal- interagierendes Protein) |
| Kv-Kanäle | spannungsabhängige Kaliumkanäle |
| NCS | <i>Neuronal Calciumsensor</i> |
| OPA | <i>operational amplifier</i> (Operationsverstärker) |
| RMS | Root Mean Square, Quadratisches Mittel |
| R_s | Serienwiderstand |
| SEM | <i>standard error of the mean</i> , Standardabweichung |
| $V_{1/2}$ | mittels Boltzmann-Funktion bestimmtes Potenzial der halbmaximalen Inaktivierung |

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Robert Bähring für seine hervorragende Betreuung sowie seine hilfsbereite und motivierende Art danken, welche in besonderem Maße zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Die Gespräche mit ihm waren stets anregend und aufschlussreich, seine Art, wissenschaftliches Denken zu leben und zu fördern, waren stets eine Motivation.

Dem Leiter des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie Herrn Prof. Dr. Ehmke danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation an seinem Institut durchzuführen.

Den vielen Mitarbeitern des physiologischen Instituts möchte ich für die ständige Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit danken. In diesem Rahmen möchte ich besonders meinen Mitdoktoranden Lina Maria und Jessica danken, die als inhaltliche Diskussionspartnerinnen und nicht zuletzt als hilfsbereite Wegbegleiterinnen einen Hauptteil der Zeit an meiner Seite standen. Telse Kock und Margrit Hölzel danke ich für die Genotypisierung des Mäusegewebes. Peter Bassalay danke ich für die Computertechnische Unterstützung.

Meinen Freunden bin ich sehr dankbar für ihre stets aufmunternden Gespräche und die ein oder andere Rechtschreibkorrektur.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meinem Bruder für ihre grenzenlose Unterstützung, die die Grundsteine für meinen Weg gelegt hat. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lara Katharina Heike Waldschmidt
Geburtsdatum: 02.06.1990
Geburtsort: Lemgo

Schulische Ausbildung

1996 - 2000 Grundschule in Esslingen a. N. und Stade-Wiepenkathen
2000 - 2009 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Rudolph-Brandes-Gymnasium Bad Salzuflen (Nordrhein-Westfalen)

Studium

2009 - 2016 Studium der Humanmedizin in Hamburg und Zürich
08/2011 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum)
04/2015 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2016 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Dissertation

05/2013 Beginn der experimentellen Doktorarbeit am Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie des UKE Hamburg

Praktisches Jahr

05/2015 - 04/2016 Praktisches Jahr am Rigshospitalet in Kopenhagen, Stadtspital Triemli in Zürich und an den Asklepios Kliniken Altona und St. Georg in Hamburg

Beruflicher Werdegang

09/2016 – heute Assistenzärztin in der Abteilung für Kardiologie, Pneumologie und internistische Intensivmedizin des AK Wandsbek, Hamburg

10. Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift:

Lara Waldschmidt