

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie
Zentrum für Experimentelle Medizin

Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

Martinistr. 52
20246 Hamburg

Modulation des humanen rekombinanten I_{to} -Kanals Kv4.3/KChIP2 durch die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration

Dissertation

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

vorgelegt von:

Christiane Groen
aus Hamm

Hamburg 2017

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.09.2017**

**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

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Ionenströme während des kardialen Aktionspotenzials.....	5
1.2	Spannungsgesteuerte Kalium (Kv)-Kanäle.....	6
1.3	Kv4-Kanäle und ihre akzessorischen Untereinheiten	8
1.4	Zielsetzung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Heterologe Kanalexpression.....	12
2.1.1	Verwendete Klone	12
2.1.2	Zellkultur	12
2.1.3	Transfektion.....	13
2.2	Elektrophysiologie	14
2.2.1	Die Patch-Clamp-Technik.....	14
2.2.2	Versuchsaufbau.....	16
2.2.3	Versuchslösungen	17
2.2.4	Pulsprotokolle	19
2.2.5	Versuchsdurchführung	20
2.3	Datenerfassung und Auswertung	22
3	Ergebnisse	24
3.1	Auswirkung einer veränderten zytoplasmatischen Ca ²⁺ -Konzentration auf die Inaktivierungskinetik von Kv4.3/KChIP2-Komplexen	24
3.1.1	Kv4.3/KChIP2-Komplexe	24
3.1.2	Kv4.3 assoziiert mit KChIP2-EF-Hand-Mutanten.....	28
3.2	Rolle von CaMKII bei der Ca ²⁺ -abhängigen Modulation der Kv4.3-Inaktivierung	31
3.2.1	Homotetramere Kv4.3-Kanäle	31
3.2.2	Effekt des CaMKII-Inhibitors KN-93 auf die Ca ²⁺ -vermittelte Modulation der Kv4.3-Inaktivierung	35
3.2.3	Ca ²⁺ -vermittelte Modulation der Inaktivierung von Kv4.3-CaMKII-Site-Mutanten.....	40
3.3	Untersuchung von KChIP2-EF-Hand-Mutanten in Gegenwart von KN-93	43
3.4	Zusammenfassung.....	47
4	Diskussion	48
4.1	Ca ²⁺ -Abhängigkeit der funktionellen Kv4/KChIP-Interaktion.....	48
4.2	Modulation der I _{to} -Kanaleigenschaften durch CaMKII und deren Inhibitoren.....	50
4.3	Bedeutung der einzelnen KChIP2-EF-Handmotive für die Ca ²⁺ -abhängigen Regulation des Kv4.3-Kanals.....	55
4.4	Pathophysiologische Bedeutung des I _{to} und seiner Ca ²⁺ -abhängigen Modulation	59
5	Zusammenfassung	62

6	Literaturverzeichnis	64
7	Anhang.....	71
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	71
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	73
7.3	Tabellenverzeichnis.....	74
7.4	Herstellerverzeichnis	75
7.5	Danksagung	76
7.6	Lebenslauf	77
7.7	Eidesstattliche Versicherung	78

1 Einleitung

1.1 Ionenströme während des kardialen Aktionspotenzials

Bei der Erregungsbildung und Erregungsausbreitung im Herzen treten verschiedene Formen von Aktionspotenzialen auf, die durch die zeitliche Abfolge der Aktivierung von spannungsaktivierten Ionenkanälen bestimmt werden. Die Offenwahrscheinlichkeit der spannungsaktivierten Ionenkanäle wird über das Membranpotenzial gesteuert. Bei Öffnung ermöglichen Ionenkanäle, die als integrale Membranproteine eine Durchtrittspore in der Doppellipidschicht bilden, die erleichterte Diffusion von Ionen entlang eines elektrochemischen Gradienten. Ionenkanäle können anhand ihrer Selektivität für bestimmte Ionen beschrieben werden. Die Selektivität für bestimmte anorganische Ionen, wie z.B. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} oder Cl^- , kommt durch einen Selektivitätsfilter zustande, einer engen Stelle in der Pore, die nur von bestimmten Ionen passiert werden kann (Ashcroft 1999; Hille 2001; Behrends 2010).

Bei den kardialen Aktionspotenzialen wird zwischen den Schrittmacherpotenzialen am Sinusknoten und den Aktionspotenzialen in der Arbeitsmuskulatur der Ventrikel unterschieden. Im Arbeitsmyokard herrscht ein sehr stabiles, negatives Ruhemembranpotenzial, von dem aus die 200-400 ms langen Aktionspotenziale beginnen. Das Aktionspotenzial des Arbeitsmyokards lässt sich in fünf verschiedene Phasen einteilen: Das Aktionspotenzial beginnt mit Phase 0, wenn das Membranpotenzial, ausgehend vom Ruhemembranpotenzial die Schwelle von -60 mV überschreitet. Die Depolarisation kommt durch einen schnellen Na^+ -Einstrom (I_{Na}) zustande. Anschließend wird in Phase 1 eine initiale frühe Repolarisierung durch den transienten Auswärtsstrom (I_{to}) eingeleitet (Brahmajothi et al. 1999; Xu et al. 1999). Die Plateau-Phase (Phase 2) wird durch den Ca^{2+} -Einwärtsstrom (I_{CaL}) getragen, welcher verschiedenen K^+ -Auswärtsströmen (I_{Kr} : „rapid“, I_{Ks} : „slow“) entgegenwirkt, so dass die Repolarisierung verzögert wird und das Membranpotenzial zunächst nahezu konstant bleibt. Die Phase 3 tritt ein, wenn der K^+ -Auswärtsstrom den Ca^{2+} -Einwärtsstrom dominiert, was schließlich zu einer schnellen Repolarisierung führt. In Phase 4 ist das diastolische Ruhepotenzial von -90 mV wieder erreicht. Es wird hauptsächlich durch den einwärts rektifizierenden K^+ -Strom I_{K1} verursacht (Nerbonne et al. 2001, siehe Abb. 1.1).

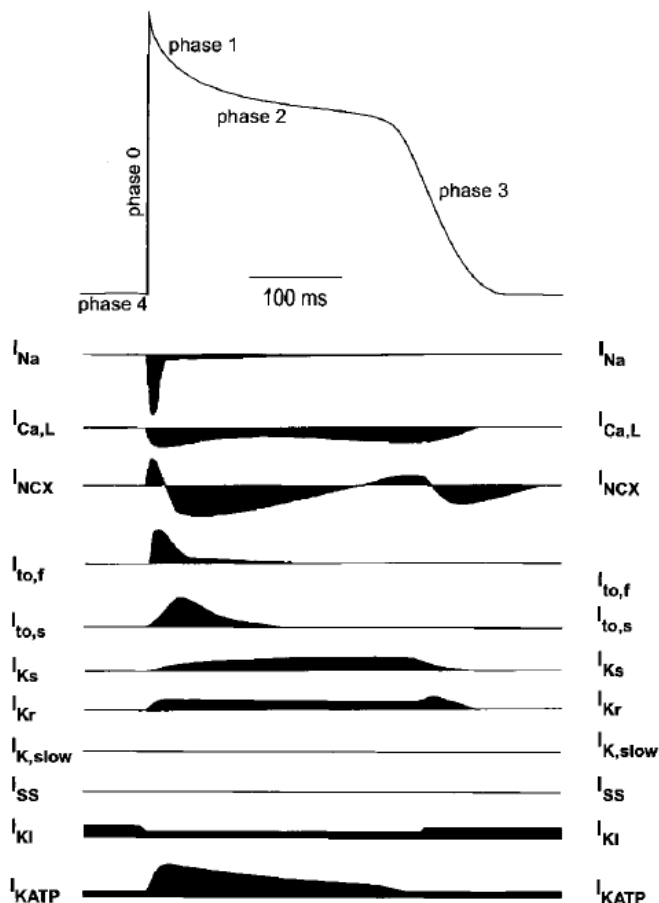


Abbildung 1.1: Ventrikuläres Herzaktionspotenzial

Unterhalb des humanen ventrikulären Aktionspotenzials sind die der jeweiligen Phase zugeordneten Stromkomponenten dargestellt. Die einzelnen Phasen des ventrikulären Herzaktionspotenzials sind im Text beschrieben (Nerbonne et al. 2001).

Neben anderen kardialen Kaliumkanälen ist der I_{to} besonders bedeutsam, da er die Amplitude der Plateauphase und damit die Länge des Herzaktionspotenzials steuert. In der Konsequenz moduliert I_{to} den transmembranären Ca^{2+} -Einstrom und damit die zyttoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration, die im ruhenden Kardiomyozyten lediglich 100 nM beträgt und während der Systole auf über 10 μ M ansteigen kann (Carafoli 1985; Blinks und Endoh 1986). Der I_{to} spielt folglich eine entscheidende Rolle bei der elektromechanischen Kopplung, also dem Zusammenspiel aus elektrischem Signal und Ventrikelkontraktion (Sah et al. 2002).

1.2 Spannungsgesteuerte Kalium (Kv)-Kanäle

Kaliumkanäle stellen die größte und vielfältigste Gruppe der Ionenkanäle dar (Gutman et al. 2005). Allein die spannungsgesteuerten Kalium(Kv)-Kanäle werden, basierend auf der Aminosäuresequenz des hydrophoben Kerns, in zwei Subgruppen und insgesamt zwölf Unterfamilien untergliedert (siehe Abb.1.2, Salkoff et al. 1992). Die enorm große Vielfalt kommt zum einen durch ver-

schiedene Gene, die für verschiedene Kv-Kanäle codieren, zustande (Birnbaum et al. 2004), aber auch durch alternatives Splicing (Gutman et al. 2005) sowie die Bildung heterooligomerer Kanäle aus verschiedenen Kv-Kanal-Untereinheiten derselben Unterfamilie (KvX) (Isacoff et al. 1990; Ruppersberg et al. 1990). Des Weiteren werden die Kanaleigenschaften durch posttranslationale Modifikationen und durch akzessorische β -Untereinheiten moduliert (Birnbaum et al. 2004, siehe Kap. 1.3).

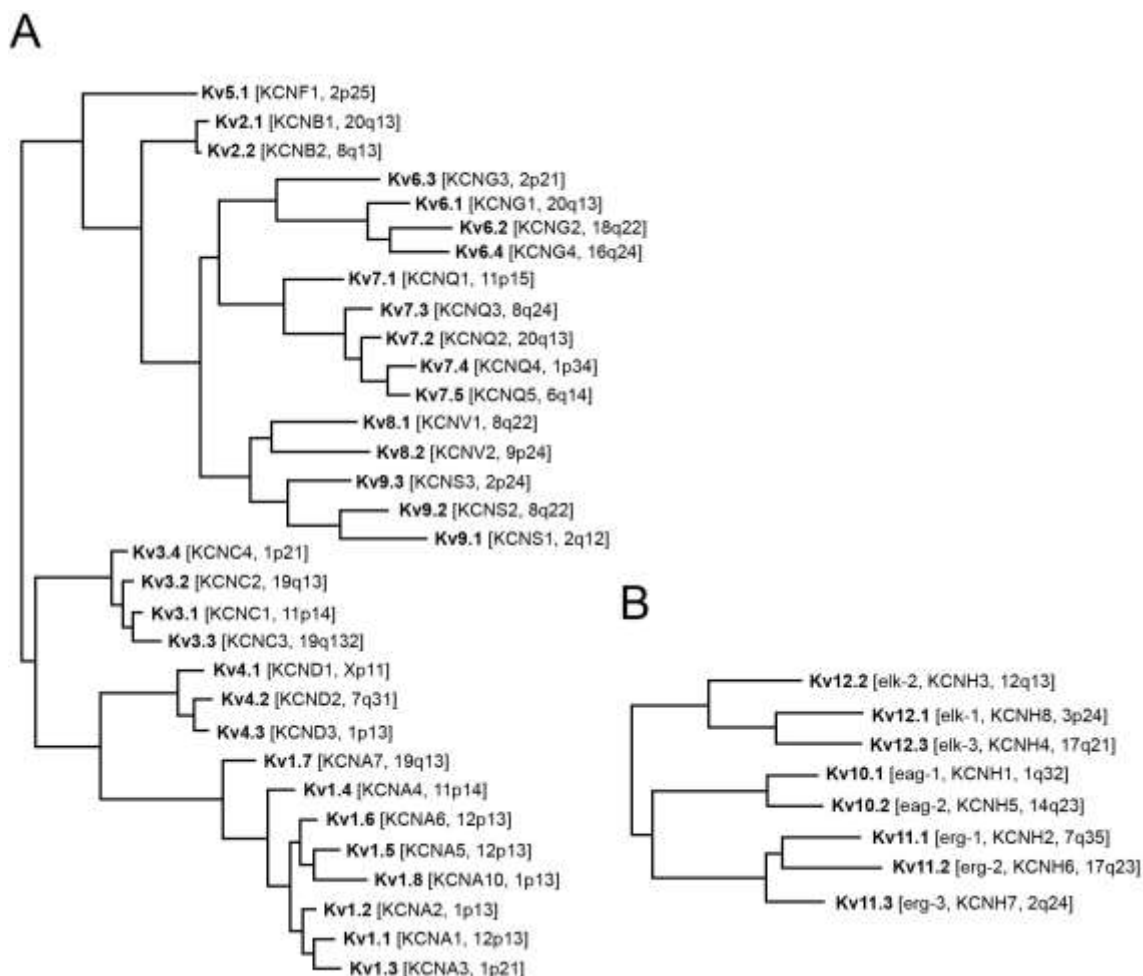


Abbildung 1.2: Phylogenetischer Baum für Kv-Kanäle

Die Einteilung der Kv-Kanäle in zwei Gruppen basiert auf analogen Aminosäuresequenzen des hydrophoben Kerns dieser Proteine. **A** Phylogenetischer Baum für die Kv1-9 Familien. Kv5, Kv6, Kv8 und Kv9 sind die Struktur betreffend verwandt, jedoch agieren sie nicht als Kanäle, sondern werden als Modifizierer klassifiziert. **B** Phylogenetischer Baum für die Kv10-12 Familien. Kv10, Kv11 und Kv12 zeigen weniger große Strukturhomologien zu den klassischen Kv-Kanälen und wurden ursprünglich als eag, erg und elk Kanäle bezeichnet. In eckigen Klammern sind jeweils Genbezeichnung und chromosomale Lokalisation für den Menschen angegeben (Gutman et al. 2005).

Kv-Kanäle sind Tetramere aus porenformenden α -Untereinheiten, die vierfach symmetrisch um eine zentrale Pore angeordnet sind (MacKinnon 1991; Li et al. 1994; Doyle et al. 1998; Long et al. 2005). Dieses Tetramer ist in den meisten Fällen ausreichend, um einen funktionalen Kanal zu bilden. Jede α -Untereinheit

besteht aus sechs membran-durchspannenden Segmenten (S1-S6) mit einem intrazellulären N- und C-Terminus variabler Länge (Niwa und Nerbonne 2010). Das S4-Segment dient als Hauptkomponente des Spannungssensors in Kv-Kanälen und hat durch die Aminosäuren Arginin und Lysin eine positive Ladung an jeder dritten Position (Papazian et al. 1991; Horn 2000). Als Antwort auf die Depolarisation wird das S4 Segment nach außen über die Membran verschoben und triggert damit die Konformationsänderung, die die Kanalpore öffnet und somit zur spannungsabhängigen Aktivierung führt (Larsson et al. 1996; Bezanilla 2002). Der Linker zwischen Segment S5 und S6 wird als Porenschleife bezeichnet. Sie enthält den K⁺-Selektivitätsfilter mit einer Sequenz aus acht Aminosäuren (T/S)xxxTxGYG, auch Kaliumkanal-Signatur-Sequenz genannt (Heginbotham et al. 1994). Für den Zusammenbau der Kv-Kanal-Untereinheiten zu Tetrameren ist eine Sequenz von etwa 130 Aminosäuren in der zytoplasmatischen N-terminalen Region erforderlich (Shen und Pfaffinger 1995). Diese Tetramerisationsdomäne bestimmt anhand der polaren Berührungsflächen zwischen den Untereinheiten, ob und welche Tetramere gebildet werden (Kreusch et al. 1998).

Einige Kv-Kanäle zeigen eine Kanalinaktivierung. Die sogenannten A-Typ-Kanäle inaktivieren sehr schnell, indem sich die Kanalpore bei anhaltender Depolarisation verschließt und der Ionenstrom unterbrochen wird. Bei negativen Membranpotenzialen erholt sich der Kanal von der Inaktivierung und wird wieder in den aktivierbaren Zustand überführt. Für die schnelle Inaktivierung (N-Typ-Inaktivierung) ist in vielen Fällen der zytoplasmatische Terminus verantwortlich. Die ersten 20 Aminosäuren des N-Terminus bilden hier einen intrazellulären „Ball“, der durch Bindung an den intrazellulären Kanaleingang die Pore verschließt (Hoshi et al. 1990; Zagotta et al. 1990; Long et al. 2005; „Ball-and-Chain-Mechanismus“). Zusätzlich gibt es die langsamere C-Typ-Inaktivierung, bei der weiter C-terminal gelegene Proteindomänen involviert sind. Hier erfährt die Pore in der Nähe des Selektivitätsfilters Konformationsänderungen, so dass sie für K⁺-Ionen unpassierbar wird (Liu et al. 1996; Zhou et al. 2001).

1.3 Kv4-Kanäle und ihre akzessorischen Untereinheiten

Kv4-Kanäle zeichnen sich durch die Vermittlung eines bei Membrandepolarisation schnell aktivierenden und schnell inaktivierenden Auswärtsstroms, sowie eine schnelle Erholung von der Inaktivierung aus. Sie vermitteln den transienten

Auswärtsstrom (I_{to}) in Kardiomyozyten und den somatodendritischen A-Typ-Strom (I_{SA}) in Neuronen.

Innerhalb der Kv4-Kanalfamilie gibt es drei Mitglieder: Kv4.1, Kv4.2 und Kv4.3, wobei das Kv4.3 Gen durch alternatives Splicing für Kv4.3S und Kv4.3L (kurz und lang) codiert (Baldwin et al. 1991; Pak et al. 1991). Die inhärenten Eigenschaften der Kv4-Kanäle unterliegen zahlreichen Modulationen durch regulierende Faktoren und enzymatische Prozesse. Die Kv4-Kanäle haben verschiedene akzessorische Untereinheiten, die die biophysikalischen Eigenschaften und die Zelloberflächenexpression der Kanäle modulieren (Li et al. 2006). Hierzu gehören die Diaminopeptidylpeptidase-verwandten-Proteine 6 und 10 (DPP6 und DPP10) und die Kv-Kanal-Interagierenden-Proteine (KChIPs; Radicke et al. 2005, siehe Abb. 1.3). Im menschlichen Herzen finden sich vor allem Kv4.3 und KChIP2, als molekulares Korrelat des I_{to} .

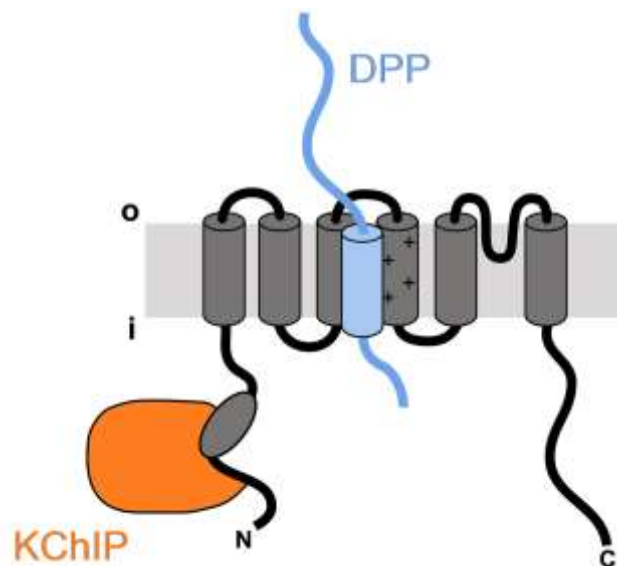


Abbildung 1.3: Die Kv4.3-Kanaluntereinheit mit den akzessorischen Untereinheiten KChIP und DPP

Die schematische Darstellung zeigt die Kv4.3-Topologie in der Membran mit den sechs Transmembrandomänen, dem N- und C-Terminus, sowie dem positiv geladenen S4-Segment. Die akzessorischen Untereinheiten DPP (blau) und KChIP (orange) sind entsprechend der jeweiligen Bindungsdomänen eingezeichnet.

Auf die KChIPs soll hier ausführlicher eingegangen werden, da sie eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des I_{to} in Kardiomyozyten spielen. Zum einen wird der transmurale I_{to} -Gradient, der eine deutlich größere I_{to} Stromamplitude im Epikard als im Endokard bewirkt, entscheidend durch die jeweils vorherrschende KChIP2-mRNA-Konzentration mitbestimmt (Rosati et al. 2001; Patel und Campbell 2005). Des Weiteren zeigte sich in Versuchen mit KChIP2

Knockout-Mäusen ein Gendosiseffekt von KChIP2 auf die I_{to} -Expression (Kuo et al. 2001; Waldschmidt et al. 2017).

KChIPs wurden mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid-Systems als Kv4 assoziierte Proteine entdeckt, indem die N-terminale Region von Kv4.3 als „Bait“ benutzt wurde (An et al. 2000). Aktuell sind vier KChIP-Gene bekannt, von denen jedes multiple Produkte durch alternatives Splicing produziert, so dass bisher zwölf verschiedene KChIPs aus Gehirn und Herz isoliert wurden (Maffie und Rudy 2008). KChIPs sind kleine Proteine mit 200-250 Aminosäuren aus der Familie des Recoverins und sind eng verwandt mit Frequenin, wiederum bekannt als „Neuronal Calcium Sensor Protein 1“ (NCS-1, Pongs et al. 1993). KChIPs können Calcium mit einer hohen Affinität binden, was es den KChIPs prinzipiell ermöglicht, als Calciumsensoren zu fungieren (Lin et al. 2004; Pioletti et al. 2006). Alle Mitglieder der KChIP-Familie bestehen aus einer variablen N-terminalen Region und einer hoch konservierten C-terminalen Region mit 4 EF-Handmotiven, die jeweils aus Schleifen mit 12 Aminosäuren bestehen (An et al. 2000; Burgoyne und Weiss 2001). Charakteristisch für KChIPs ist die Sequenz CPXG im ersten EF-Handmotiv, was gleichzeitig die Ursache dafür ist, dass das erste EF-Handmotiv unfähig ist Ca^{2+} zu binden (Flaherty et al. 1993; Bourne et al. 2001). Die Komplexbildung zwischen Kv4-Kanälen und KChIPs wurde sowohl auf struktureller, als auch auf funktioneller Ebene untersucht. Kristallstrukturdaten haben gezeigt, dass die Bindung von KChIP in einer Stöchiometrie von 4:4 zweischalig um das Kv4-Tetramer in der Ebene der Tetramerisationsdomäne erfolgt (Pioletti et al. 2006). KChIPs modifizieren Kv4 Ströme in heterologen Expressionssystemen. KChIPs vereinfachen das „Trafficking“, den Untereinheitenzusammenbau, die Stabilität und die Oberflächenexpression von Kv4 Kanalkomplexen, so dass ein großer Anstieg der Amplitude erfolgt (An et al. 2000; Shibata et al. 2003). Zusätzlich verändern KChIPs auch die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kv4-Kanäle in heterologen Expressionssystemen. Im Allgemeinen ist in Gegenwart von KChIPs die Inaktivierung langsamer, es kommt zu einem positiven Shift der Steady-State-Inaktivierungskurve, und die Erholung von der Inaktivierung ist beschleunigt (An et al. 2000; Bähring et al. 2001). Diese Effekte sind für alle KChIP-Isoformen ähnlich, außer für die alternative Splicevariante KChIP4a, welche die Oberflächenexpression nicht fördert und die Kanalinaktivierung größtenteils verhindert (Holmqvist et al. 2002).

Verschiedene Arbeitsgruppe untersuchten bereits Ca^{2+} abhängige Effekte auf das KChIP-Protein. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Ca^{2+} an KChIP substantielle Konformationsänderungen in den helikalen Strukturen bewirkt (Lin et al. 2004, Pioletti et al. 2006). Die Bildung von Kv4/KChIP-Komplexen ist dabei unabhängig von Ca^{2+} möglich (An et al. 2000, Bähring et al. 2001), wird aber durch Ca^{2+} verstärkt (Lin et al. 2004). Nicht bekannt ist dagegen, ob die Bindung von Ca^{2+} an die KChIPs die elektrophysiologischen Eigenschaften bereits existierender Kv4/KChIP-Kanalkomplexe beeinflusst.

1.4 Zielsetzung

In dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde ein möglicher Einfluss einer Bindung von Ca^{2+} an KChIP2 auf die elektrophysiologischen Eigenschaften und insbesondere auf die Inaktivierungskinetik bereits existierender Kv4.3/KChIP2-Kanalkomplexe untersucht. Es wurden dafür Whole-Cell-Patch-Clamp Experimente an heterolog exprimierten Kanälen durchgeführt, wobei durch Befüllen der Patch-Pipette mit Lösungen unterschiedlicher Ca^{2+} -Konzentration, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von Experiment zu Experiment variiert wurde. Anschließend wurden entsprechende KChIP2-Mutanten eingesetzt, um die Rolle der einzelnen EF-Handmotive für die Modulation aufzuklären. Zusätzlich sollte ein möglicher Einfluss der durch hohe Ca^{2+} -Konzentration aktivierten Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige-Proteinkinase II (CaMKII) auf die Stromkinetik aufgeklärt werden. Hierfür wurden sowohl Experimente mit einem CaMKII-Blocker, als auch Experimente mit Kv4.3-Mutanten mit veränderten CaMKII-Phosphorylierungsstellen durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Heterologe Kanalexpression

2.1.1 Verwendete Klone

Für alle Klone wurde der Expressionsvektor pcDNA3 (Life Technologies/Invitrogen) benutzt. Alle Konstrukte wurden mit Standard-PCR-Methoden hergestellt, in den entsprechenden Vektor kloniert und zur Kontrolle sequenziert. In den Experimenten wurden zum einen humane Wildtyp-Klone der Kv4.3-Untereinheit (Kv4.3wt; Isbrandt et al. 2000; kurze Splice-Variante) und KChIP2b benutzt (auch KChIP2.1wt genannt und im Folgendem als KChIP2 bezeichnet; Bähring et al. 2001; siehe (Decher et al. 2004) für gängige KChIP Nomenklatur). Zur Vereinfachung werden die Wildtyp-Klone im Weiteren als Kv4.3 und KChIP2 bezeichnet. Zusätzlich wurden die KChIP2-Mutanten KChIP2 Δ EF2 (D135A), KChIP2 Δ EF3 (D171A), KChIP2 Δ EF4 (D219A) und KChIP2 Δ EF2, EF3 (D135A, D171A) verwendet, die zuvor von Jens Dannenberg (ZMNH) hergestellt worden waren. Durch das Einfügen einer ungeladenen Aminosäure anstatt der ersten koordinierenden Aminosäure (Aspartat) im Loop war die EF-Hand inaktiviert. Außerdem kamen zwei Kv4.3-Mutanten zum Einsatz, in denen die CaMKII-Phosphorylierungsstellen modifiziert waren. In einer der beiden Kv4.3-Mutanten (Kv4.3-AAA) war an den drei CaMKII-Phosphorylierungsstellen Serin bzw. Threonin zu Alanin mutiert, was eine Phosphorylierung von Kv4.3 durch die CaMKII verhinderte (T53A, S516A, S550A). In der anderen Kv4.3-Mutante (Kv4.3-DDD) war das Serin bzw. Threonin der drei CaMKII-Phosphorylierungsstellen zu Aspartat mutiert, was zu einer Pseudophosphorylierung von Kv4.3 führte (T53D, S516D, S550D). Als Transfektionskontrolle diente eine nicht bleichende Mutante des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP, BD Biosciences).

2.1.2 Zellkultur

Als heterologes Expressionssystem für die verwendeten Klone dienten humane embryonale Nieren (HEK) 293-Zellen. Als Nährmedium für die Zellen wurde Dulbecco's MEM/NUT MIX F-12 (Gibco) verwendet, dem 10 % hitzeinaktiviertes

fötales Kälberserum (Biochrom) und 1 % L-Glutamin (Gibco) hinzugefügt wurde. Die Zellen wurden in 75 ml Zellkulturflaschen (Standardkulturfläche „Easy-Flask“, Nunc) mit 60 ml Nährmedium im Brutschrank unter Standardbedingungen (37°C, 95 % relative Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂) kultiviert.

Nach zwei bis drei Tagen wurden die Zellen umgesetzt. Hierzu wurde das Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline, PBS) gewaschen und dann zum Ablösen der Zellen für 1-2 min mit 5 ml Trypsin-EDTA (Gibco) inkubiert. Die Proteasereaktion wurde durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium gestoppt. Für die fortlaufende Kultur wurden die Zellen anschließend mit einer Dichte von 4×10^4 /ml (Neubauer-Zählkammer) in frischem Nährmedium in neue Kulturflaschen ausplattiert. Nach 2-3 Tagen im Brutschrank unter Standardbedingungen hatten die Zellen eine ausreichende Dichte erreicht und das zugegebene Kulturmedium war verbraucht, so dass die Zellen erneut passagiert wurden.

Ein Teil der Zellen wurde mit einer Dichte von 5×10^4 /ml in 35 mm Kulturschalen (Nunc Standard-Dishes, Nunc) ausplattiert. Die Kulturschalen wurden zuvor mit Poly-L-Lysin Hydrobromid (Sigma-Aldrich) beschichtet, um die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Zelloberfläche und Boden der Kulturschale zu vergrößern, so dass die Haftung der Zellen am Boden verbessert wurde. Nach ca. 24 h im Inkubator wurde in den Kulturschalen die Transfektion durchgeführt.

2.1.3 Transfektion

Die Transfektion wurde mit der Liposomen-Einschluss-Methode durchgeführt. Es wurden zur Tansfektions-DNA 100 µl Optimem-Reagenz (Invitrogen) pro Kulturschale gegeben. Weitere 100 µl Optimem-Reagenz pro Kulturschale wurde mit 2,5 µl Lipofectamin 2000 (Invitrogen) pro Kulturschale gemischt und anschließend mit dem Gemisch aus DNA und Optimem-Reagenz vereinigt. Die Zellkulturschalen wurden mit 2 ml Optimem-Reagenz gewaschen, dann mit 800 µl Optimem-Reagenz befüllt und wieder inkubiert. Nach 30-minütiger Inkubation des DNA-Gemisches mit Lipofectamin 2000 in Optimem-Reagenz, wurden jeweils 200 µl des Gemisches tröpfchenweise in die Zellkulturen gegeben. Nach 5-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium durch Standardkultur-

medium ausgetauscht. Die elektrophysiologischen Experimente wurden nach weiteren 24-48 h durchgeführt.

Für die alleinige Expression von Kv4.3-Untereinheiten wurden 1 µg cDNA pro Kulturschale benutzt. Bei Coexpression von Kv4.3 mit KChIP2 oder mit KChIP2-Mutanten wurden 0,1 µg Kv4.3-cDNA und 1 µg KChIP2-cDNA eingesetzt. Bei der Coexpression von Kv4.3-CaMKII-Site-Mutanten mit KChIP2 wurden je 0,2 µg Kv4.3-cDNA und 1 µg KChIP2-cDNA benutzt. Zusätzlich wurden bei allen Transfektionsansätzen 0,5 µg EGFP-cDNA pro Kulturschale cotransfiziert. Die EGFP-Expression ermöglichte später, die erfolgreich transfizierten Zellen unter UV-Beleuchtung zu identifizieren.

2.2 Elektrophysiologie

2.2.1 Die Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik geht auf das Verfahren der Spannungsklemme (Voltage-Clamp) zurück. Das Voltage-Clamp-Verfahren wurde 1949 von Cole (Cole 1949) und Marmont (Marmont 1949) entwickelt und von Hodgkin, Huxley und Katz (Hodgkin et al. 1952) weiter modifiziert, so dass Stromableitungen an Tintenfisch-Axonen durchgeführt werden konnten. Das daraus entwickelte Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Verfahren ermöglichte dann die Messung von potenzialabhängigen Membranleitfähigkeiten an einzelnen Zellen. 1976 gelang es Neher und Sakmann (Neher und Sakmann 1976) Kanalströme einzelner kanalbildender Proteine zu zeigen, indem sie Spannungs- und Strommessung mit einer einzigen Mikroelektrode durchführten. Es entstand das Patch-Clamp-Verfahren (Hamill et al. 1981).

Im Patch-Clamp-Verfahren wird durch die Spannungsklemme die Änderung des Membranpotenzials der untersuchten Zelle verhindert, indem ein Kompensationsstrom erzeugt wird, der so groß ist wie der Strom, der durch die Membran fließt, diesem jedoch entgegen gerichtet ist. Der Kompensationsstrom wird mit Hilfe eines negativen Rückkopplungsmechanismus durch den Vorverstärker erzeugt, einem Strom-Spannungs-Wandler, der aus Operationsverstärker (OPA) und Rückkopplungswiderstand (RF) besteht. An den beiden Eingängen des Operationsverstärkers liegen die Membranspannung (U_m) der Zelle und die vorgegebene

Sollspannung (U_{soil}) an. Bei einer Differenz zwischen U_{soil} und U_m entsteht am Ausgang eine Spannung proportional zur Differenz, so dass ein Strom durch RF fließt und eine Spannung entsteht. Da der OPA einen sehr hohen Eingangswiderstand hat, fließt der Strom fast ausschließlich in die Pipette, bis keine Differenz mehr zwischen den beiden Eingängen besteht, also U_{soil} und U_m gleich sind. Dieser Kompensationsstrom, der dem Strom entspricht, der über die Membran fließt, lässt einen Einblick in die Leitfähigkeiten der Membran zu, die unter anderem von Ionenkanälen bestimmt werden (Numberger et al. 1996, siehe Abb. 2.1).

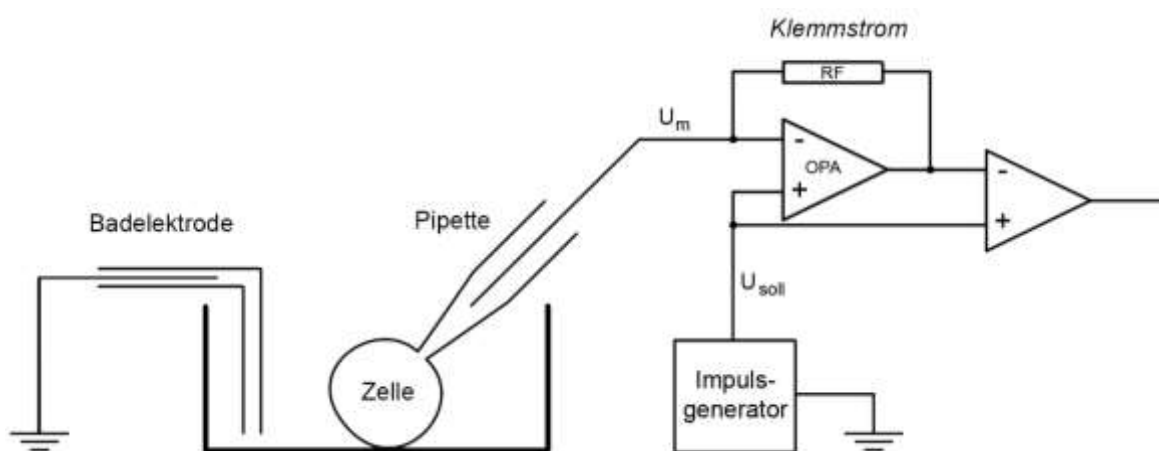


Abbildung 2.1: Vereinfachtes Schaltbild des Patch-Clamp-Verfahrens in der Whole-Cell-Konfiguration

Der Vorverstärker besteht aus einem Operationsverstärker (OPA) und einem Rückkopplungswiderstand (RF). Die Sollspannung (U_{soil}) wird von außen vorgegeben. Das Membranpotenzial (U_m) wird stetig mit der Sollspannung abgeglichen und bei Bedarf durch den in die Pipette fließenden Klemmstrom angepasst. RF liegt eine zum Klemmstrom proportionale Spannung an (Numberger M. 1996).

Bei der Patch-Clamp-Technik werden die Cell-Attached Konfiguration, die Whole-Cell-Konfiguration, die Inside-Out-Konfiguration und die Outside-Out-Konfiguration unterschieden. In dieser Doktorarbeit wurden alle Messungen in der Whole-Cell-Konfiguration (Whole-Cell-Messung) durchgeführt. Hierfür wird nach Erreichen der Cell-Attached Konfiguration, bei der ein hoher Abdichtwiderstand (Giga-Seal) herrscht, durch das Anlegen von Unterdruck der Patch geöffnet. Durch das bestehende Gigaseal sind das Zellinnere und das Innere der Pipette gegenüber der Außenlösung isoliert. Die intrazelluläre Lösung in der Pipette vermischt sich nach dem Öffnen der Zellmembran in kürzester Zeit mit dem Zellinneren, so dass durch ihr wesentlich größeres Volumen die Zusammensetzung des Zellinneren vorgegeben ist und dieses entsprechend manipuliert werden kann. In der Whole-Cell-Konfiguration wird über die gesamte Zellmembran abgeleitet, so dass nicht

der Beitrag der einzelnen Kanäle sichtbar wird, sondern ein makroskopisches Strommuster als Summation aller Leitfähigkeiten der Zellmembran.

2.2.2 Versuchsaufbau

Der Messstand, mit dem die Patch-Clamp-Experimente durchgeführt wurden, war zum Schutz vor Erschütterungen auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut und zur elektrischen Abschirmung von einem geerdeten Faraday-Käfig umgeben. Zur optischen Kontrolle der Experimente diente ein inverses Mikroskop (Axiovert, Carl-Zeiss AG). Es wurden Objektive mit 10-facher und 40-facher Vergrößerung zusammen mit einem Okular 10-facher Vergrößerung verwendet, so dass maximal eine 400-fache Vergrößerung möglich war. Um den Kontrast zu verbessern wurde ein Nomarski-Phasenkontrast benutzt. Um die transfizierten Zellen anhand der Expression von EGFP zu identifizieren, wurde neben einer Weißlichtquelle eine UV-Lichtquelle (HBO-UV-Halogenlampe, Carl-Zeiss AG) genutzt. Im Strahlengang wurde hierfür ein Grünfilter vorgeschaltet. Als Messkammern für die elektrophysiologischen Ableitungen dienten 35 mm-Kulturschalen, die in eine passende Vertiefung im Mikroskoptisch eingelegt wurden.

Die Badlösung in der Messkammer wurde während der Messung ständig ausgetauscht. Für die langsame Superperfusion wurde eine 50 ml-Spritze ohne Kolben verwendet. An der Mündung der Spritze wurde ein Infusionsschlauch sowie ein Dreiweghahn zur Regulation befestigt. Mit Hilfe einer Drehschraubenklammer konnte die gravitationsgetriebene Flussgeschwindigkeit justiert werden. Am Ende des Infusionsschlauches strömte die Extrazellulärlösung über eine gebogene Glaskapillare in die Messkammer. Auf der anderen Seite der Messkammer wurde die Lösung über eine weitere Glaskapillare mit Hilfe einer Aquariumpumpe abgesaugt. Für die lokale Superfusion von Substanzen kam zusätzlich ein ventilgesteuertes Superfusionssystem (AutoMate Scientific), das mit einer peristaltischen Pumpe (BVP, Ismatec) angetrieben wurde, zum Einsatz.

Die Patchpipetten wurden aus dünnwandigem Borosilikatglas (TW150F-4, World Precision Instruments; Durchmesser: 1,5 mm außen, 1,12 mm innen) hergestellt. Die Glasröhrchen wurden mit einem horizontalen Pipettenziehgerät (DMZ-Puller, Zeitz) gezogen und anschließend „hitzepoliert“. Die Pipettenwiderstände lagen bei den verwendeten Lösungen (siehe Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2) zwischen 2 und

3,5 M Ω . Die Pipette wurde in einen Elektrodenhalter eingesetzt, der durch einen Mikromanipulator (Eppendorf) bewegt werden konnte. Der Druck in der Pipette konnte über einen Silikonschlauch variiert werden.

Die Elektrode bestand aus einem Silberdraht, der durch eine Redoxreaktion in KCl Lösung unter Anlegen einer Gleichspannungsquelle chloriert wurde, um eine Polarisierung der Elektrode zu verhindern. Als Badelektrode wurde ein Silberdraht mit einem Ag/AgCl-Pellet (World Precision Instruments) benutzt, der mit dem Vorverstärker verbunden war.

Die vom Vorverstärker gemessenen Signale wurden an den EPC9-Patch-Clamp-Verstärker (HEKA Elektronik), der mit einem Computer und der SoftwarePULSE (HEKA Elektronik) gesteuert wurde, weitergegeben. Hier wurde die gemessene Stromantwort verstärkt und mit einer Eckfrequenz von 0,2–4 kHz gefiltert. Anschließend erfolgte eine Digitalisierung des analogen Messsignals mit einem Sample-Intervall von 50-1000 μ s.

2.2.3 Versuchslösungen

Die Messungen wurden unter ständigem Durchfluss von extrazellulärer Lösung durchgeführt. Die Zusammensetzung der extrazellulären Lösung ist der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Tabelle 2.1: Extrazelluläre Lösung

	<i>M (g/mol)</i>	<i>c (mM)</i>
NaCl	58,4	135
KCl	74,6	5
CaCl ₂	147	2
MgCl ₂	203	2
HEPES	238	5
Sucrose	342	10

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Die berechnete Osmolarität betrug 307 mOsm. Bei Versuchen mit völligem Ca²⁺-Entzug wurden 10 μ M BAPTA-AM zur ansonsten extrazellulären Lösung hinzugegeben.

Die Pipette wurde mit einer intrazellulären Lösung gefüllt, die unterschiedliche Konzentrationen an Calcium enthalten konnte. Mit Hilfe des Programmes

WEBMAXC Extended (MaxChelator, USA) wurde jeweils die freie Ca^{2+} -Konzentration berechnet und unter Zugabe von EDTA und EGTA bzw. zusätzlich BAPTA eingestellt. Die Magnesium-Konzentration wurde so berechnet, dass die freie Konzentration 0,8 mM betrug. Bei der Berechnung wurde ein pH-Wert von 7,2, eine Temperatur von 22°C und eine Ionenstärke von 0,1 angenommen.

In den Experimenten wurde eine Ca^{2+} -freie Lösung, eine 10 μM Ca^{2+} -Lösung sowie eine 50 μM Ca^{2+} -Lösung als Pipettenlösung verwendet. Die Zusammensetzung der verschiedenen Pipettenlösungen sind der Tabelle 2.2 zu entnehmen.

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Pipettenlösungen

	M (g/mol)	<i>Ca²⁺ freie Lösung</i> c (mM)	<i>10 μM Ca²⁺- Lösung</i> c (mM)	<i>50 μM Ca²⁺- Lösung</i> c (mM)
KCl	74,6	125	125	125
CaCl₂	147	-	3,0	3,8
MgCl₂	203	4,8	3,6	2,9
BAPTA	629	2	-	-
EDTA	372	2	2	2
EGTA	380	2	2	2
HEPES	238	10	10	10
Sucrose	342	13	9	9

Die jeweilige Stock-Lösung wurde mit Hilfe von 1 M KOH auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. Die berechnete Osmolarität betrug für alle intrazellulären Lösungen 293 mOsm.

Es wurden jeweils 10 ml der Stock-Lösung entnommen und Gluthation und K_2ATP in einer Konzentration von jeweils 2 mM hinzugegeben. Der pH-Wert wurde erneut kontrolliert und mit 1M KOH auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. In einigen Experimenten wurden zusätzlich 1 bzw. 10 μM KN-93 (2-[N-(2-Hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzene-sulfonyl)]-amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine) oder KN-92 (2-[N-(4-Methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine) zur intra- und extrazellulären Lösung hinzugefügt (siehe Kap. 2.2.5). Bei Experimenten mit BAPTA-AM wurden 10 μM BAPTA-AM 5 h nach Transfektion zur Badlösung hinzugeben und auch jeweils 10 μM BAPTA-AM zur intra- und extrazellulären Lösung hinzugefügt.

2.2.4 Pulsprotokolle

Für die elektrophysiologischen Experimente wurden Messprotokolle mit dem Programm PULSE (HEKA Elektronik) definiert. Durch die in den Messprotokollen vorgegebenen Änderungen des Membranpotenzials wurde eine Stromantwort an der Membran bewirkt, die dann kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet wurde.

Um die Inaktivierungskinetik der Kv4.3-Kanäle zu untersuchen und um einen Anhalt über die funktionale Expressionsrate zu erhalten wurde ein Testpulsprotokoll verwendet. Hierfür wurde, ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV, ein 200 ms langer Vorpuls auf -100 mV appliziert. Es folgte ein Spannungssprung auf +40 mV für 3000 ms, so dass es zu einer Aktivierung und einer nahezu vollständigen Inaktivierung der Kanäle kam (siehe Abb. 2.2).



Abbildung 2.2: Testpulsprotokoll

Vorpuls auf -100 mV (200 ms), anschließender Puls auf +40 mV (3000 ms), ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV.

Die Erholung von der Inaktivierung (Recovery), also der Vorgang, bei dem die inaktivierten Kanäle wieder in einen aktivierbaren Zustand übergehen, wurde mit Hilfe eines Doppelpulsprotokolls untersucht. Zur Bestimmung der Recovery-Kinetik folgte auf den Spannungssprung auf +40 mV nach 1500 ms erneut das Haltepotenzial für ein variables Zeitintervall, bevor ein weiterer Puls auf +40 mV für 25 ms stattfand. Das Zeitintervall zwischen Kontroll- und Testpuls wurde von Puls zu Puls verdoppelt, so dass die Zwischenpulsdauer zwischen 2,5 ms und 5,1 s bzw. für Experimente mit KN-93 und KN-92 zwischen 20 ms und 20,5 s variierte. Zur Beschreibung ihrer Spannungsabhängigkeit wurde die Recovery-Kinetik in einigen Versuchen auch für verschiedene Haltepotenziale, nämlich -80 mV, -100 mV und -120 mV, bestimmt (siehe Abb. 2.3).

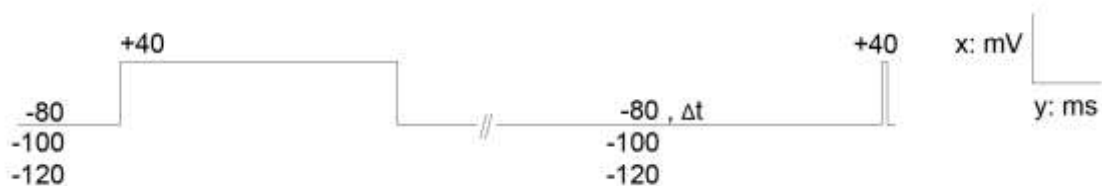


Abbildung 2.3: Recovery-Protokoll

Spannungssprung auf +40 mV (1500 ms) und zurück auf das jeweilige Haltepotenzial von -80 mV, -100 mV oder -120 mV. Nach einer Zeit (Δt) zwischen 2,5 ms und 5,1 s bzw. 20 ms und 20,5 s folgte ein weiterer Puls auf +40 mV (25 ms).

2.2.5 Versuchsdurchführung

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die mit intrazellulärer Lösung gefüllte Pipette wurde so am Pipettenhalter befestigt, dass ein mit dem Vorverstärker verbundener Silberdraht in die Pipettenlösung tauchte. Um zu verhindern, dass die Pipettenöffnung beim Eintauchen in die Badlösung mit kleinen Partikeln verunreinigt oder extrazelluläre Lösung in die Pipette gezogen wird, wurde ein Überdruck angelegt.

Nach dem Eintauchen in die Badlösung wurde das Offset-Potenzial (Spannungen, die zwischen den einzelnen Komponenten der Messkette entstehen) korrigiert. Durch die Applikation eines repetitiven, rechteckförmigen Testpulses konnte der resultierende Pipettenstrom am Computer beobachtet werden. Mit Hilfe des Mikromanipulators und unter optischer Kontrolle wurde die Pipette nahe an die Zelloberfläche herangeführt. Am Computer konnte bei Kontakt eine leichte Abnahme des Pipettenstroms beobachtet werden. Durch Ablassen des Überdruckes und sanftes Saugen konnte dann die Cell-Attached-Konfiguration mit Ausbildung eines „GigaSeals“ erreicht werden.

Ein negatives Potenzial von -50 mV wurde an die Elektrode angelegt, was die Sealbildung förderte und die Depolarisierung der Zelle beim späterem Durchbrechen der Zellmembran (bzw. dem Eröffnen der Zelle) verhindert. Da die Wand der Glaspipette ein Isolator zwischen zwei leitenden Medien ist, wirkt sie wie ein Kondensator (C_p). Die Umladeprozesse zeigen sich in schnell ansteigenden und exponentiell abfallenden transienten kapazitiven Strömen als Antwort auf einen Spannungstestpuls. Diese schnelle Kapazitätskomponente wurde kompensiert. Für die Kapazitätskompensation wurden die Umladeströme über einen parallelen Schaltkreis appliziert.

Zum Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration (siehe Abb. 2.4) wurde durch Saugen ein Unterdruck an der Pipette erzeugt, so dass der Membranbereich unter der Pipettenmündung durchbrochen wurde. Die Stromantwort auf den Spannungstestpuls veränderte sich beim Durchbrechen schlagartig, da nun Umladeprozesse über die gesamte Fläche der Zellmembran (C_m) stattfanden. Diese langsame Kapazitätskomponente wurde ebenfalls kompensiert.

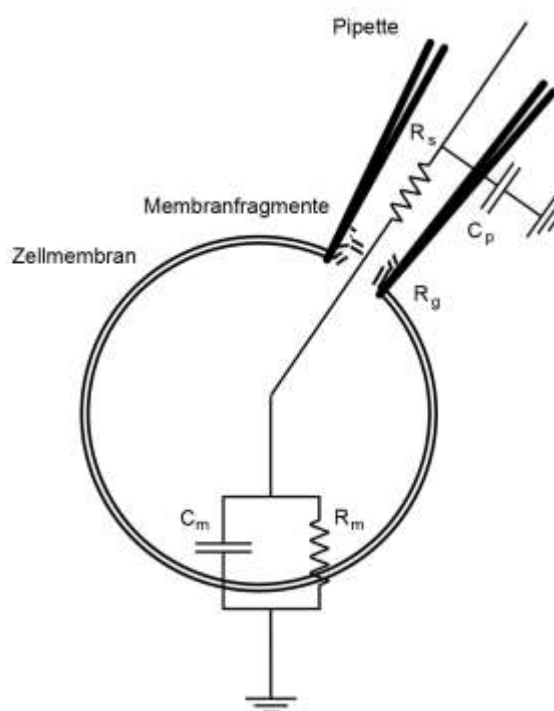


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung und elektronisches Schaltbild der Whole-Cell-Konfiguration

R_s : Serienwiderstand, R_g : Sealwiderstand, C_p : Pipettenkapazität, R_m : Membranwiderstand, C_m : Membrankapazität (Numberger M. 1996).

Anschließend wurde versucht, falls noch nicht erreicht, den Serienwiderstand auf Widerstände von 3-6 M Ω zu reduzieren, denn je kleiner der Serienwiderstand, desto schneller und genauer wird die gewünschte Spannung in der Zelle erreicht. Dabereits ein Teil der Sollspannung am Serienwiderstand abfällt, wird in der Zelle eine geringere Spannung als die vorgegebene Sollspannung aufgebaut. Der nach Optimierung des Serienwiderstandes verbleibende Spannungsabfall wurde bis zu 90 % durch Addition einer zusätzlichen Spannung kompensiert.

Nach dem Öffnen der Zellen wurden zunächst jeweils 20 Testpulse appliziert, so dass vom Öffnen der Zelle und den damit beginnenden Austausch der intrazellulären Flüssigkeit bis zur Messung des später ausgewerteten Testpulses mehr als 5 Minuten vergingen. Die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle befand sich somit auf einem gleichbleibenden Niveau (Steady-State). Im Anschluss wurden weitere

Whole-Cell-Messungen mit Hilfe der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Testprotokolle durchgeführt.

Bei Experimenten mit KN-93 und KN-92 wurde abweichend von der oben beschriebenen Vorgehensweise über ein ventilgesteuertes Superfusionssystem zunächst jeweils die extrazelluläre Lösung mit 1 μM KN-93 auf die Zelle in die Badlösung gegeben. Nach Erreichen einer konstanten Amplitude im Testpuls folgte dann die Messung der Erholung von der Inaktivierung. Die Substanz wurde nach Beendigung des Messprotokolls mit der extrazellulären Lösung ausgewaschen. Bei stabilen Ableitungen erfolgten im Anschluss Experimente mit 10 μM KN-93 bzw. Kontrollexperimente mit 1 und 10 μM KN-92 in der extrazellulären Lösung, die ebenfalls über das Superfusionssystem auf die Zelle gegeben wurden.

Die Messungen wurden durch unspezifische Leckströme, die unter anderem durch Ionenflüsse durch den Spalt zwischen Zelle und Pipette zustande kommen, beeinflusst. Der Leckstrom, der in seiner Größe proportional zur Änderung der Membranspannung ist, wurde im Anschluss an das jeweilige Messprotokoll mit Hilfe des P/5 Leckprotokolls bestimmt. Hierfür wurde ein dem Messprotokoll gleichendes, jedoch nur 1/5 der Amplitude betragendes Protokoll fünfmal hintereinander durchgeführt, die Leckströme gemittelt und das Ergebnis nach Multiplikation mit dem Faktor 5 von der gemessenen Stromkurve subtrahiert. Der Einfluss der in HEK293-Zellen vorkommenden endogenen Kanäle (Jiang et al. 2002) auf die Whole-Cell-Messungen konnte dagegen vernachlässigt werden, da ihre Anzahl im Vergleich zu den überexprimierten transfizierten Kanälen sehr gering war.

2.3 Datenerfassung und Auswertung

Die Computersoftware PULSE (HEKA Elektronik) wurde für die Festlegung der Pulsprotokolle, die Steuerung des Verstärkers, sowie die Aufnahme der Messdaten genutzt. Die aufgenommenen Stromkurven wurden mit PULSEFIT (HEKA Elektronik) ausgewertet und mit der Software Kaleidagraph (Synergy Software) weiter analysiert:

Die Inaktivierungskinetik der Kv4.3-Ströme wurde mit einer 3-fach exponentiellen Funktion ausgewertet.

$$I(t) = amp_0 + amp_1 e^{\left(\frac{-t}{\tau_1}\right)} + amp_2 e^{\left(\frac{-t}{\tau_2}\right)} + amp_3 e^{\left(\frac{-t}{\tau_3}\right)}$$

- $I(t)$: Stromamplitude zum Zeitpunkt t
 amp_x : Anteilige Amplitude des Abfalles, für den die jeweilige Komponente der Inaktivierung verantwortlich ist
 τ_x : Zeitkonstanten der Inaktivierung

Die Erholung von der Inaktivierung wurde analysiert, indem das jeweilige Maximum des Testpulsstroms auf das Maximum des Kontrollpulsstroms normiert und gegen das Zeitintervall zwischen den beiden Pulsen semi-logarithmisch aufgetragen wurde. Diese Daten wurden anschließend mono- bzw. doppeltexponentiell gefittet.

$$\frac{I_t}{I_{Kontrolle}} = 1 - e^{\left(\frac{-t}{\tau_{rec}}\right)}$$

bzw.

$$\frac{I_t}{I_{Kontrolle}} = amp_1 \left(1 - e^{\left(\frac{-t}{\tau_{rec1}}\right)}\right) + amp_2 \left(1 - e^{\left(\frac{-t}{\tau_{rec2}}\right)}\right)$$

- I_t : Testpuls-Stromamplitude nach Zwischenpulsdauer t
 $I_{Kontrolle}$: Kontrollpuls-Stromamplitude
 t : Zwischenpulsdauer
 amp_x : Anteilige Amplitude der Erholung von der Inaktivierung, für den die jeweilige Komponente der Erholung verantwortlich ist
 $\tau_{rec,x}$: Zeitkonstanten für die Erholung von der Inaktivierung

Die ermittelten Zeitkonstanten der Inaktivierung und der Erholung von der Inaktivierung wurden anschließend zur weiteren Datenverwaltung und für die statistische Auswertung in Microsoft Excel übertragen. Die Abbildungen im Ergebnisteil wurden mit Kaleidagraph erstellt und dann weiter mit Adobe Photoshop bearbeitet. Die Mittelwerte sind jeweils zusammen mit dem Standardfehler (SEM) angegeben. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde mit dem t-Test nach Student berechnet, wobei von einer zweiseitigen Verteilung und von Stichproben gleicher Varianz ausgegangen wurde. Der p -Wert wurde entweder auf die vierte Stelle nach dem Komma gerundet oder als $p < 0,0001$ angegeben. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Die Fehlerbalken in den Abbildungen repräsentieren jeweils den zugehörigen Standardfehler (SEM).

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkung einer veränderten zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration auf die Inaktivierungskinetik von Kv4.3/KChIP2-Komplexen

3.1.1 Kv4.3/KChIP2-Komplexe

Um den Einfluss der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration auf das Inaktivierungsverhalten von Kv4.3/KChIP2-Kanalkomplexen zu untersuchen, wurden Experimente in der Whole-Cell-Konfiguration mit jeweils unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen in der Pipettenlösung durchgeführt (siehe Material und Methoden). Es wurden zunächst Wildtyp-(Kv4.3/KChIP2)-Komplexe getestet. Abbildung 3.1 zeigt Experimente in BAPTA (Abb. 3.1A) bzw. $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (Abb. 3.1B), bei denen die Kanäle durch repetitive Spannungspulse auf +40 mV im Abstand von 15 s aktiviert wurden, um Stromamplitude und makroskopische Inaktivierung zu erfassen. Die Ströme zeigten innerhalb der ersten 5 min nach dem Durchbrechen der Zellmembran zur Whole-Cell-Konfiguration einen leichten "Run-down" auf ca. 90 % der Ausgangsamplitude (Abb. 3.1C). Die Stromeigenschaften nach dieser Vorlaufzeit wurden für die folgende vergleichende Analyse herangezogen. Sowohl in BAPTA als auch in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ zeigten die Kv4.3/KChIP2-vermittelten Ströme eine schnelle Inaktivierung. Die Inaktivierungskinetik erschien in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ etwas schneller und die Inaktivierung weniger vollständig als in BAPTA (Abb. 3.1A, B). Die Inaktivierungskinetik ließ sich am besten durch eine dreifach-exponentielle Funktion beschreiben. Die drei Zeitkonstanten definieren eine initiale, eine intermediäre und eine kumulative Phase der Inaktivierung (siehe Material und Methoden).

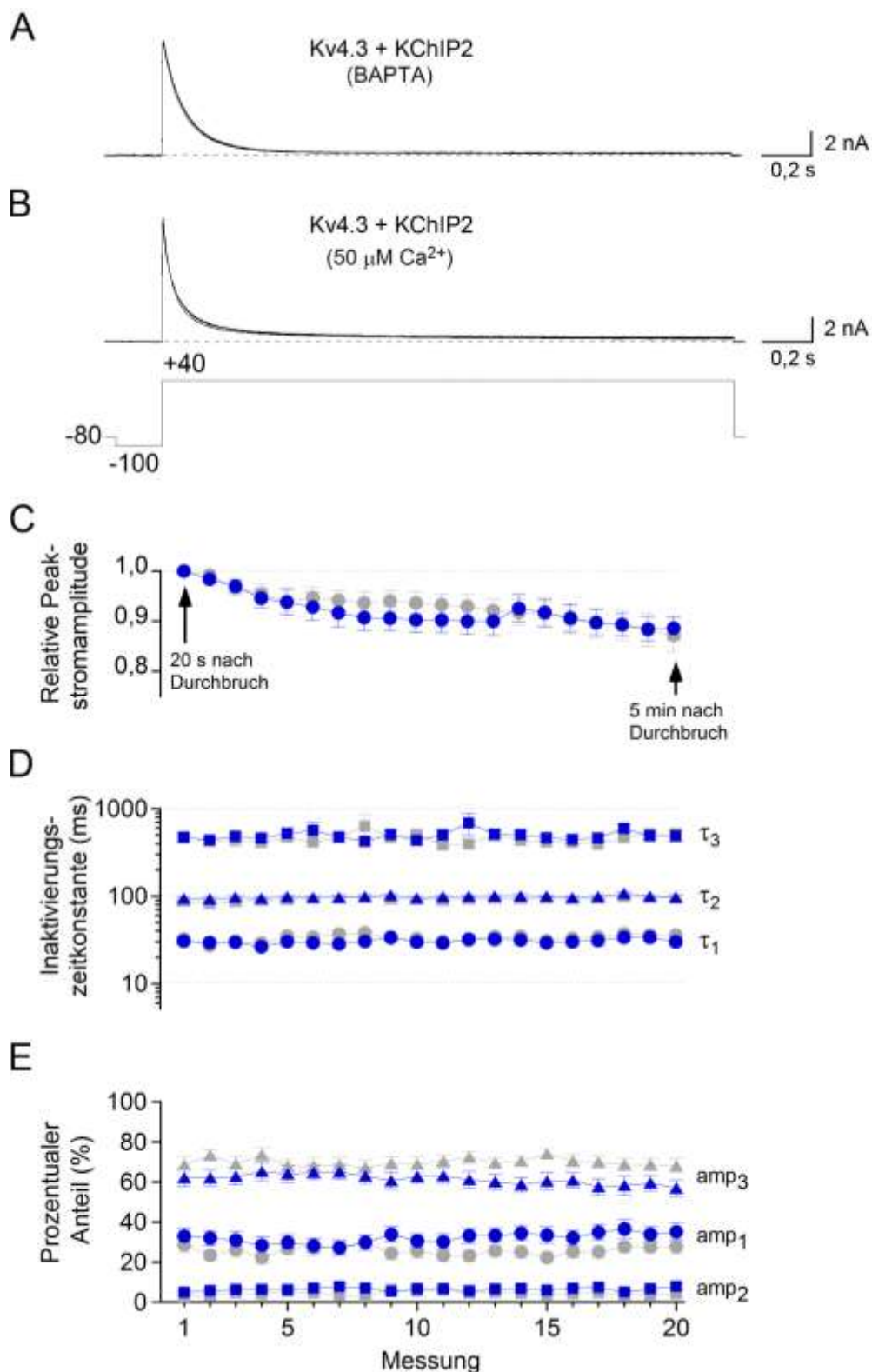


Abbildung 3.1: Inaktivierung von Kv4.3/KChIP2-Komplexen

A Repräsentative Stromkurven (1., 5., 10, 15. und 20. Stromantwort überlagert) gemessen in einer Kv4.3/KChIP2-exprimierenden Zelle in BAPTA. **B** Entsprechende Stromkurven einer anderen Kv4.3/KChIP2-exprimierenden Zelle in 50 $\mu\text{M Ca}^{2+}$ (die Messungen begannen ca. 20 s nach Durchbruch der Zellmembran; gestrichelte Nulllinie; das Pulsprotokoll ist unter den Stromkurven dargestellt). **C** Relative Peak-Stromamplituden (bezogen auf die jeweils erste Messung 20 s nach Durchbruch der Zellmembran) über 20 Messungen mit 15 s Abstand in BAPTA (graue Symbole) und 50 $\mu\text{M Ca}^{2+}$ (blaue Symbole); nach der 20. Messung waren etwa 5 min vergangen. **D** Inaktivierungszeitkonstanten über 20 Messungen, ermittelt mit einer dreifach-exponentiellen Funktion (siehe Material und Methoden). **E** Prozentuale Anteile der Inaktivierungszeitkonstanten am Gesamtstromabfall.

Die dreifach-exponentielle Auswertung der makroskopischen Inaktivierung bestätigte eine im Vergleich zu BAPTA ($\tau_1=37,1$ ms; $\text{amp}_1=27,7$ %) schnellere initiale Inaktivierung in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ($\tau_1=30,1$ ms; $\text{amp}_1=36,9$ %). Experimente, wie in Abb. 3.1 für BAPTA und $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ gezeigt, wurden auch mit BAPTA-AM und $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ durchgeführt. Dabei fiel auf, dass in BAPTA-AM alle drei Zeitkonstanten noch kleiner waren als in BAPTA (beides Ca^{2+} -frei). Auch die prozentualen Anteile waren unterschiedlich und glichen in BAPTA-AM tendenziell eher denen in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$. Ähnliche Befunde ergaben sich bei der Gegenüberstellung der Werte von BAPTA-AM und $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$. Auch hier waren die drei Zeitkonstanten in $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ größer und die Unterschiede in deren prozentualen Anteilen noch deutlicher. Dagegen waren die Zeitkonstanten und deren relative Anteile teilweise nicht signifikant unterschiedlich für die Pipettenlösungen mit BAPTA-AM und $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$. Die Zeitkonstanten der Inaktivierung und deren prozentualen Anteile für Kv4.3/KChIP2 mit den unterschiedlichen Pipettenlösungen sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Kinetik der makroskopischen Inaktivierung von Kv4.3/KChIP2-Komplexen

Pipetten-Lösung	τ_1 (ms)	amp_1 (%)	τ_2 (ms)	amp_2 (%)	τ_3 (ms)	amp_3 (%)	<i>n</i>
BAPTA-AM	$23,1 \pm 0,8^a$	$48,6 \pm 6,9^d$	$55,2 \pm 3,4^b$	$46,1 \pm 6,7^e$	357 ± 11^c	$5,3 \pm 0,4^f$	10
BAPTA	$37,1 \pm 2,5$	$27,7 \pm 3,0$	100 ± 5	$69,4 \pm 3,2^g$	521 ± 56	$2,9 \pm 0,4^h$	16
$10 \mu\text{M Ca}^{2+}$	$37,1 \pm 2,8$	$24,5 \pm 2,6^i$	101 ± 6	$72,7 \pm 2,5^j$	545 ± 65	$2,9 \pm 0,3^k$	21
$50 \mu\text{M Ca}^{2+}$	$30,1 \pm 2,7$	$36,9 \pm 4,9$	$95,9 \pm 4,6$	$55,1 \pm 4,6$	450 ± 43	$8,1 \pm 1,3$	20

τ_1, τ_2, τ_3 : Inaktivierungszeitkonstanten; $\text{amp}_1, \text{amp}_2, \text{amp}_3$: Prozentuale Anteile der Zeitkonstanten am Gesamtstromabfall; Signifikanzen wurden mit dem t-Test nach Student untersucht (^a $p=0,0002$ relativ zu BAPTA und $p=0,0021$ relativ zu $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^b $p<0,0001$ relativ zu BAPTA, $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ und $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^c $p=0,0314$ relativ zu BAPTA; ^d $p=0,0044$ relativ zu BAPTA und $p=0,0004$ relativ zu $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^e $p=0,0018$ relativ zu BAPTA und $p<0,0001$ relativ zu $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^f $p=0,0007$ relativ zu BAPTA und $p<0,0001$ relativ zu $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^g $p=0,0201$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^h $p=0,0014$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ⁱ $p=0,0301$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^j $p=0,0015$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^k $p=0,0002$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$).

Weiterhin wurde die Erholung der Kv4.3/KChIP2-Komplexe von der Inaktivierung (Recovery) untersucht. In Abbildung 3.2 sind typische Doppelpuls-Experimente mit unterschiedlichen Zwischenpulsintervallen (siehe Material und Methoden) und BAPTA (Abb. 3.2A) bzw. $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (Abb. 3.2B) in der Pipettenlösung gezeigt.

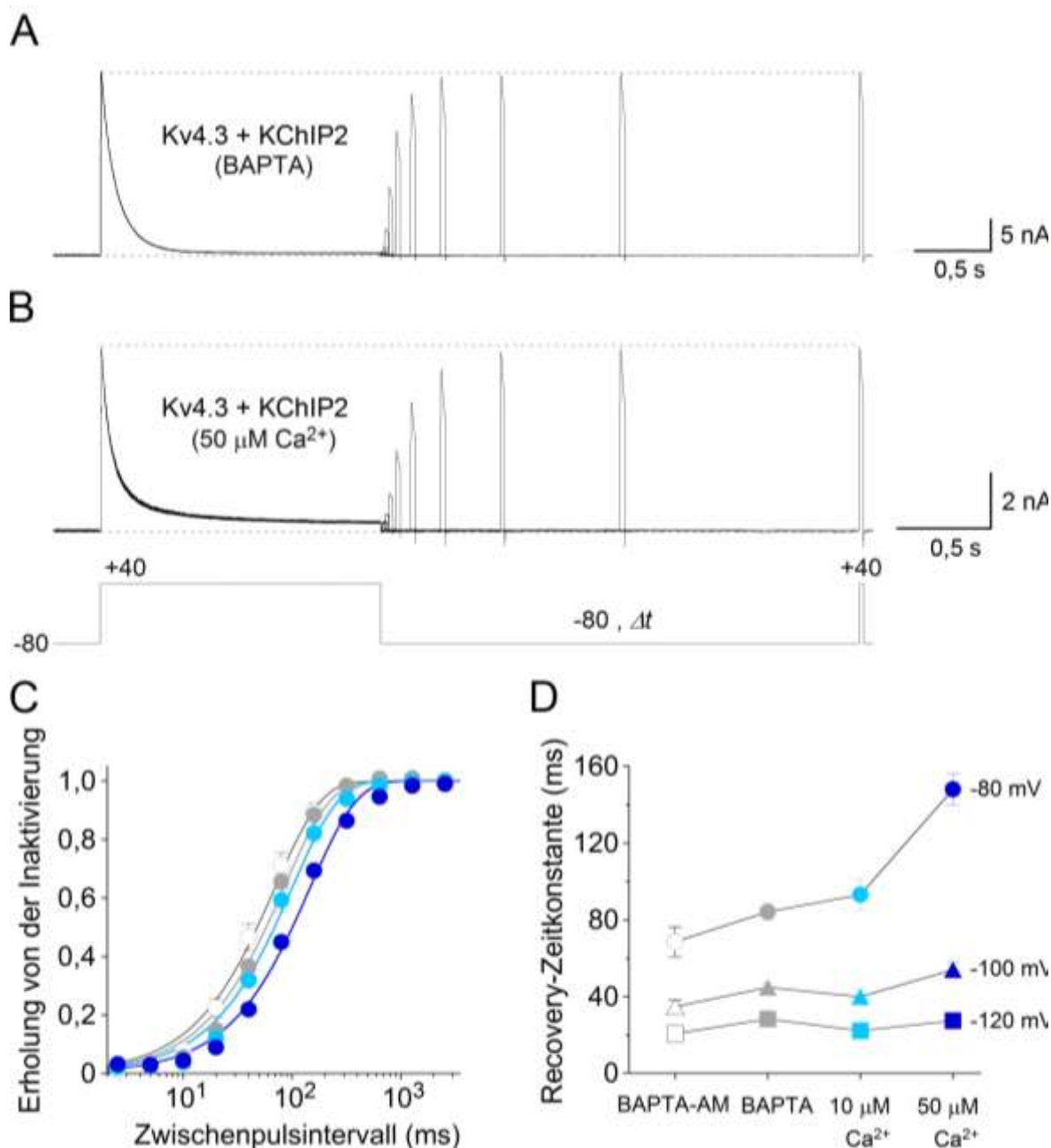


Abbildung 3.2: Erholung von der Inaktivierung von Kv4.3/KChIP2-Komplexen

A Repräsentative Stromkurven gemessen in einer Kv4.3/KChIP2-exprimierenden Zelle in BAPTA, ca. 5 min nach Durchbruch der Zellmembran. **B** Entsprechende Stromkurven einer anderen Kv4.3/KChIP2-exprimierenden Zelle in 50 $\mu\text{M Ca}^{2+}$ (Nulllinie und maximale Stromamplitude jeweils gestrichelt; das verwendete Doppelpulsprotokoll ist unter den Stromkurven dargestellt). **C** Die relativen Stromamplituden wurden gegen das Zwischenpuls-Intervall semi-logarithmisch aufgetragen, und die Daten wurden mit einer einfach-exponentiellen Funktion beschrieben. Es sind die Ergebnisse für alle vier Pipettenlösungen, BAPTA-AM (weiß), BAPTA (grau), 10 μM (hellblau) und 50 $\mu\text{M Ca}^{2+}$ (dunkelblau), gezeigt. **D** Mittelwerte der Recovery-Zeitkonstanten (siehe Tab. 3.2) für alle vier Pipettenlösungen bei den Zwischenpulspotenzialen -80, -100 und -120 mV.

Die vollständige Erholung von der Inaktivierung wurde in 50 $\mu\text{M Ca}^{2+}$ etwas später erreicht als in BAPTA (Abb. 3.2A, B). Zur Ermittlung der Recovery-Zeitkonstanten diente eine einfach-exponentielle Funktion (siehe Material und Methoden). Die Auswertung bestätigte die im Vergleich zu BAPTA ($\tau_{\text{rec-80}}=84,2$ ms) langsamere Recovery-Kinetik in 50 $\mu\text{M Ca}^{2+}$ ($\tau_{\text{rec-80}}=148$ ms). Die Recovery-Kinetiken bei

-80 mV für alle verwendeten Pipettenlösungen sind in Abbildung 3.2C gezeigt. Die Erholung von der Inaktivierung in BAPTA war auch langsamer als in BAPTA-AM (beides Ca^{2+} -frei). Die Recovery-Kinetik der Kv4-Kanäle ist stark spannungsabhängig (Bähring et al. 2001). Deshalb wurden für alle verwendeten Pipettenlösungen (BAPTA-AM, BAPTA, $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ und $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$) Doppelpuls-Experimente mit Recovery-Potenzialen von -80, -100 und -120 mV durchgeführt (siehe Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Recovery-Kinetik von Kv4.3/KChIP2-Komplexen

Pipetten- lösung	$\tau_{\text{rec-80}}$ (ms)	$\tau_{\text{rec-100}}$ (ms)	$\tau_{\text{rec-120}}$ (ms)
BAPTA-AM	68,6±7,8 (n=12) ^a	34,8±3,5 (n=8) ^d	20,7±1,8 (n=5) ^f
BAPTA	84,2±4,4 (n=13) ^b	44,8±2,6 (n=12)	28,4±1,7 (n=10)
$10 \mu\text{M Ca}^{2+}$	93,1±8,1 (n=17) ^c	40,0±4,1 (n=12) ^e	22,2±2,6 (n=9)
$50 \mu\text{M Ca}^{2+}$	148±8 (n=15)	54,0±4,0 (n=14)	27,5±2,7 (n=10)

$\tau_{\text{rec(-80)}}$, $\tau_{\text{rec(-100)}}$, $\tau_{\text{rec(-120)}}$: Recovery-Zeitkonstanten bei unterschiedlichen Zwischenpuls-Potenzialen; Signifikanzen wurden mit dem t-Test nach Student untersucht (^a $p=0,0458$ relativ zu $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ und $p<0,0001$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^b $p<0,0001$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^c $p<0,0001$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^d $p=0,0289$ relativ zu BAPTA und $p=0,0040$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^e $p=0,0220$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^f $p=0,0164$ relativ zu BAPTA).

Es zeigte sich, dass die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Recovery-Kinetik bei unterschiedlichen Potenzialen unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Abb. 3.2D). Die stärkste Abhängigkeit war bei -80 mV zu beobachten, in abgeschwächter Form auch bei -100 mV, während bei -120 mV keine signifikante Abhängigkeit zu beobachten war.

3.1.2 Kv4.3 assoziiert mit KChIP2-EF-Hand-Mutanten

Nachdem ein signifikanter Einfluss der Ca^{2+} -Konzentration auf die Inaktivierungseigenschaften von Kv4.3/KChIP2-Komplexen gezeigt werden konnte, wurden die gleichen Experimente mit KChIP2-EF-Hand-Mutanten durchgeführt. Ziel der Versuche war es, die funktionale Rolle der einzelnen EF-Handmotive und ihren Beitrag zur KChIP-vermittelten Modulation der Inaktivierungseigenschaften näher zu charakterisieren. Die Experimente mit den Mutanten KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2}$, KChIP2 $_{\Delta\text{EF}3}$, KChIP2 $_{\Delta\text{EF}4}$ und KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2, \text{EF}3}$ waren auf Pipettenlösungen mit BAPTA und $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ beschränkt. Alle vier KChIP2-EF-Hand-Mutanten bewirkten bei Co-expression eine Verlangsamung der initialen und eine Beschleunigung der kumulativen Phase der Kv4.3-Kanal-Inaktivierung (siehe Abb.3.3 und Tab.3.3).

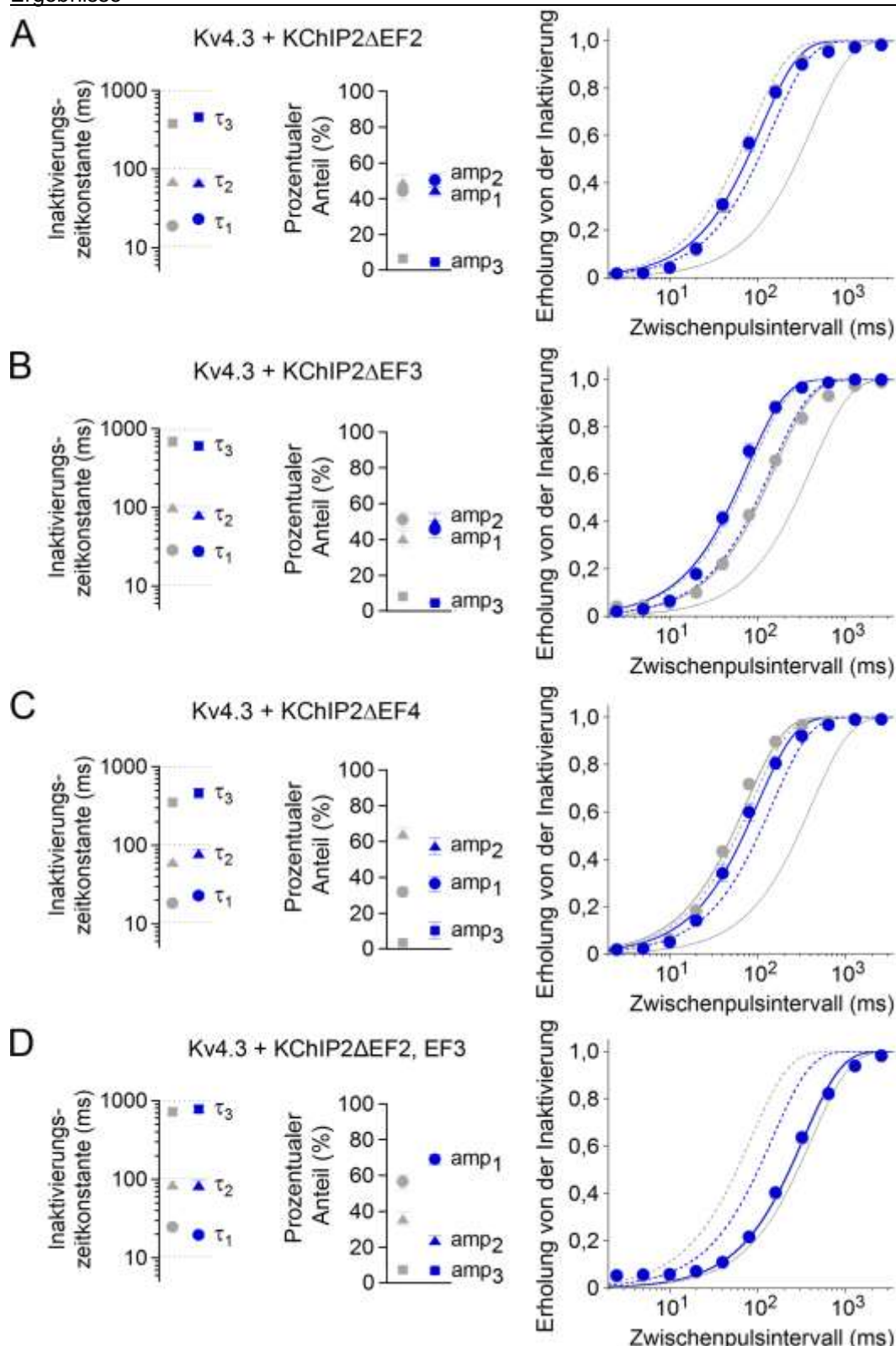


Abbildung 3.3: Kv4.3-Inaktivierung und Erholung von der Inaktivierung mit KCHIP2-EF-Hand-Mutanten

Die 1. Spalte zeigt die Inaktivierungszeitkonstanten von KCHIP2 Δ EF2 (**A**), KCHIP2 Δ EF3 (**B**), KCHIP2 Δ EF4 (**C**) und KCHIP2 Δ EF2,EF3 (**D**) in BAPTA (graue Symbole) und 50 μ M Ca²⁺ (blaue Symbole) nach der 20. Messung, ermittelt mit einer dreifach-exponentiellen Funktion. Gestrichelte Linien: Werte für Kv4.3 ohne KCHIP2 in BAPTA. Die 2. Spalte zeigt die dazugehörigen prozentualen Anteile der Inaktivierungszeitkonstanten am Gesamtstromabfall. In der 3. Spalte ist die Erholung von der Inaktivierung bei -80 mV für die Mutanten (**A**, **B**, **C**, **D**) dargestellt. Es wurden die relativen Stromamplituden gegen das Zwischenpuls-Intervall semi-logarithmisch aufgetragen und mit einer einfach-exponentiellen Funktion beschrieben. Gestrichelte Linien: Werte für Kv4.3/KCHIP2-Komplexe in BAPTA und 50 μ M Ca²⁺. Durchgezogene Linie: Werte von Kv4.3 ohne KCHIP2 in BAPTA.

Tabelle 3.3: Zeitkonstanten der Inaktivierung für Kv4.3 mit KChIP2-EF-Hand-Mutanten

Pipettenlösung	τ_1 (ms)	amp ₁ (%)	τ_2 (ms)	amp ₂ (%)	τ_3 (ms)	amp ₃ (%)	n
KChIP2							
BAPTA	37,1±2,5	27,7±3,0	100±5	69,4±3,2 ^a	521±56	2,9±0,4 ^b	16
50 μ M Ca ²⁺	30,1±2,7	36,9±4,9	95,9±4,6	55,1±4,6	450±43	8,1±1,3	20
KChIP2_{ΔEF2}							
BAPTA	19,0±1,1	44,2±4,8	69,9±2,5	49,1±4,5	385±35	6,7±1,2	16
50 μ M Ca ²⁺	23,1±1,7	50,3±3,7	67,6±3,8	45,1±3,6	460±27	4,7±0,5	19
KChIP2_{ΔEF3}							
BAPTA	28,5±2,6	51,2±4,4	100±9	40,6±4,7	693±90	8,2±0,6 ^c	14
50 μ M Ca ²⁺	27,7±3,4	45,7±5,0	81,1±6,3	49,6±5,2	611±72	4,7±0,5	18
KChIP2_{ΔEF4}							
BAPTA	18,4±1,8	32,0±2,9	61,2±2,9	64,5±3,1	353±35	3,5±0,5	20
50 μ M Ca ²⁺	23,0±2,1	36,5±4,4	79,5±10,1	57,7±4,7	465±64	10,3±4,7	20
KChIP2_{ΔEF2, EF3}							
BAPTA	24,7±2,0	56,6±4,1 ^d	86,0±7,3	35,9±3,7 ^e	730±50	7,5±0,8	15
50 μ M Ca ²⁺	19,6±1,4	69,1±2,8	84,9±11,8	24,0±2,5	787±77s	6,9±0,8	8

τ_1 , τ_2 , τ_3 : Inaktivierungszeitkonstanten; amp₁, amp₂, amp₃: Prozentuale Anteile der Zeitkonstanten am Gesamtstromabfall; Signifikanzen wurden mit dem t-Test nach Student untersucht (^ap=0,0201 relativ zu 50 μ M Ca²⁺; ^bp=0,0014 relativ zu 50 μ M Ca²⁺; ^cp=0,0001 relativ zu 50 μ M Ca²⁺; ^dp=0,0491 relativ zu 50 μ M Ca²⁺; ^ep=0,0390 relativ zu 50 μ M Ca²⁺).

Die dreifach-exponentielle Auswertung der makroskopischen Inaktivierung zeigte für keine der Mutanten eine signifikante Veränderung der Zeitkonstanten in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration. Allerdings fiel auf, dass der relative Amplitudenanteil amp₃ von KChIP2_{ΔEF3} in 50 μ M Ca²⁺ signifikant größer war als in BAPTA. Für KChIP2_{ΔEF2, EF3} war der relative Amplitudenanteil amp₁ in 50 μ M Ca²⁺ signifikant größer und amp₂ dagegen kleiner als in BAPTA. Die relativen Amplitudenanteile von KChIP2_{ΔEF2} und KChIP2_{ΔEF4} zeigten keine signifikanten Unterschiede für die beiden unterschiedlichen Ca²⁺-Konzentrationen.

Als nächstes wurde die Erholung von der Inaktivierung der KChIP2-EF-Hand-Mutanten untersucht. Bei der Auswertung der Messergebnisse wurde deutlich, dass die Coexpression aller Mutanten, mit Ausnahme von KChIP2_{ΔEF2, EF3}, zu einer ähnlich schnellen Recovery-Kinetik führte wie bei den Wildtyp-Kv4.3/KChIP2-Komplexen (siehe Abb. 3.3 und Tab. 3.4).

Tabelle 3.4: Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung für Kv4.3 mit KChIP2-EF-Hand-Mutanten

Pipettenlösung	τ_{rec-80} (ms)	$\tau_{rec-100}$ (ms)	$\tau_{rec-120}$ (ms)
KChIP2			
BAPTA	84,2±4,4 (n=13) ^a	44,8±2,6 (n=12)	28,4±1,7 (n=10)
50 μ M Ca ²⁺	148±8 (n=15)	54,0±4,0 (n=14)	27,5±2,7 (n=10)
KChIP2_{ΔEF2}			
BAPTA	104±9 (n=13)	42,9±2,6 (n=15) ^d	23,5±1,9 (n=12)
50 μ M Ca ²⁺	109±7 (n=11)	34,7±2,8 (n=11)	21,4±1,8 (n=13)
KChIP2_{ΔEF3}			
BAPTA	180±20 (n=13) ^b	68,8±6,4 (n=14)	37,0±3,7 (n=12)
50 μ M Ca ²⁺	72,6±7,5 (n=9)	58,6±9,8 (n=10)	30,1±4,5 (n=10)
KChIP2_{ΔEF4}			
BAPTA	69,5±5,4 (n=22) ^c	31,3±2,1 (n=20) ^e	19,1±1,4 (n=15)
50 μ M Ca ²⁺	107±10 (n=12)	50,0±5,7 (n=10)	22,4±2,3 (n=10)
KChIP2_{ΔEF2, EF3}			
BAPTA	430±55 (n=12)	130±12 (n=13)	63,1±4,8 (n=12)
50 μ M Ca ²⁺	378±30 (n=8)	103±30 (n=8)	52,4±2,4 (n=2)

$\tau_{rec(-80)}$, $\tau_{rec(-100)}$, $\tau_{rec(-120)}$: Recovery-Zeitkonstanten bei unterschiedlichen Zwischenpuls-Potenzialen; Signifikanzen wurden mit dem t-Test nach Student untersucht (^ap<0,001 relativ zu 50 μ M Ca²⁺; ^bp=0,0004 relativ zu 50 μ M Ca²⁺; ^cp=0,0009 relativ zu 50 μ M Ca²⁺; ^dp=0,0450 relativ zu 50 μ M Ca²⁺; ^ep=0,0008 relativ zu 50 μ M Ca²⁺).

Für die Mutante KChIP2_{ΔEF3} zeigte sich in 50 μ M Ca²⁺ eine Beschleunigung der Recovery-Kinetik im Vergleich zu BAPTA. Dagegen kam es bei der Mutante KChIP2_{ΔEF4} zu einer Verlangsamung der Recovery-Kinetik in 50 μ M Ca²⁺. Für die Mutante KChIP2_{ΔEF2} und die Doppelmutante KChIP2_{ΔEF2, EF3} zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen in BAPTA und 50 μ M Ca²⁺.

3.2 Rolle von CaMKII bei der Ca²⁺-abhängigen Modulation der Kv4.3-Inaktivierung

3.2.1 Homotetramere Kv4.3-Kanäle

Um die Möglichkeit eines Ca²⁺-abhängigen Regulationsmechanismus von I_{to} ohne die direkte Bindung von Calcium an KChIP2 zu testen, wurden zunächst Experimente mit Wildtyp-Kanälen (Kv4.3) ohne gleichzeitige Expression von KChIP2

durchgeführt. Insgesamt zeigte sich, dass die initiale Inaktivierung der Kv4.3-Homotetramere in allen vier Ca^{2+} -Konzentrationen, sowohl im Vergleich zu Kv4.3/KChIP2, als auch im Vergleich zu den Kv4.3/KChIP2-Mutanten-Komplexen schneller war (siehe Abb. 3.1, Abb. 3.4, Tab. 3.1, Tab. 3.3 und Tab. 3.5).

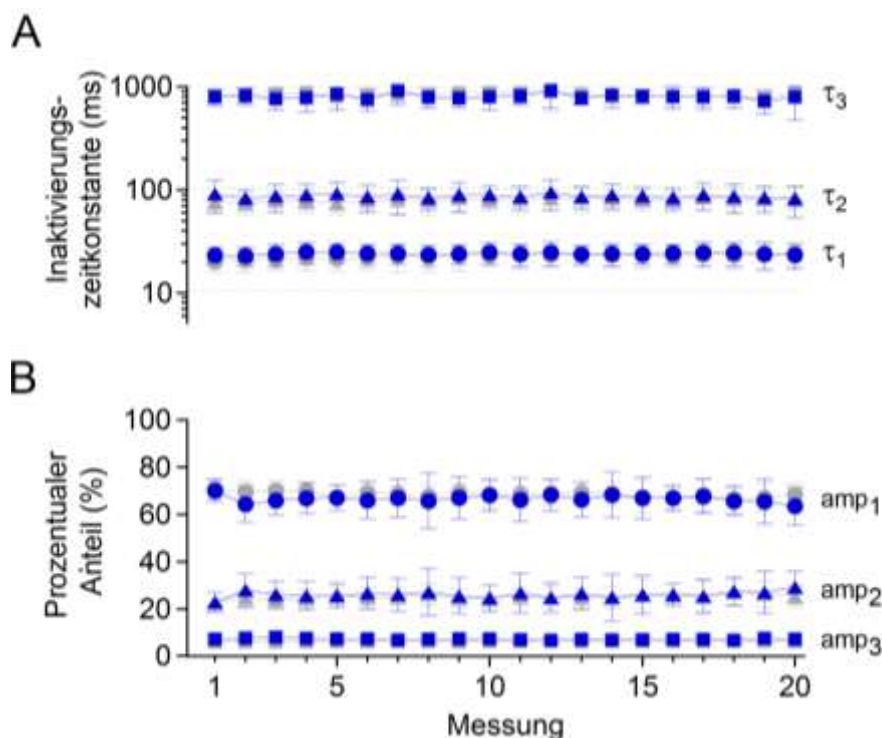


Abbildung 3.4: Inaktivierung der Kv4.3-Homotetramere

A Inaktivierungszeitkonstanten über 20 Messungen (die Messungen begannen ca. 20 s nach Durchbruch der Zellmembran) ermittelt mit einer dreifach-exponentiellen Funktion (siehe Material und Methoden) in BAPTA (graue Symbole) und $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (blaue Symbole); nach der 20. Messung waren etwa 5 min vergangen. **B** Prozentuale Anteile der Inaktivierungszeitkonstanten am Gesamtstromabfall.

Tabelle 3.5: Zeitkonstanten der Inaktivierung von Kv4.3-Homotetrameren

Pipettenlösung	τ_1 (ms)	amp_1 (%)	τ_2 (ms)	amp_2 (%)	τ_3 (ms)	amp_3 (%)	n
BAPTA-AM	25,2±2,2	61,9±2,4 ^g	80,1±6,9 ^a	31,1±2,4 ⁱ	667±53 ^d	7,0±0,6	16
BAPTA	24,4±1,4	68,4±1,1 ^h	85,6±4,4 ^b	25,3±1,0 ^j	853±36 ^e	6,0±0,3 ^l	20
10 $\mu\text{M Ca}^{2+}$	24,0±1,5	58,6±2,8	80,5±4,5 ^c	34,3±2,3 ^k	723±40 ^f	7,2±0,5	18
50 $\mu\text{M Ca}^{2+}$	27,8±1,4	63,7±1,9	103±7	28,5±1,6	928±70	7,8±0,4	22

τ_1 , τ_2 , τ_3 : Inaktivierungszeitkonstanten; amp_1 , amp_2 , amp_3 : Prozentuale Anteile der Zeitkonstanten am Gesamtstromabfall; Signifikanzen wurden mit dem t-Test nach Student untersucht (^a $p=0,0259$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^b $p=0,0397$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^c $p=0,0116$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^d $p=0,0047$ relativ zu BAPTA, $p=0,0086$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^e $p=0,0194$ relativ zu $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^f $p=0,0219$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^g $p=0,0136$ relativ zu BAPTA, ^h $p=0,0012$ relativ zu $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ und $p=0,0419$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ⁱ $p=0,0200$ relativ zu BAPTA, ^j $p=0,0007$ relativ zu $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^k $p=0,0402$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^l $p=0,0026$ relativ zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$).

In der dreifach-exponentiellen Auswertung der makroskopischen Inaktivierung zeigten sich für keine der Versuchslösungen signifikante Unterschiede in der

initialen Inaktivierung (τ_1). Die intermediäre (τ_2) und kumulative Phase (τ_3) der Inaktivierung waren jedoch im Vergleich zu BAPTA ($\tau_1=24,4$ ms, $\text{amp}_1=68,4$ %; $\tau_2=85,6$ ms, $\text{amp}_2=25,3$ %; $\tau_3=852$ ms, $\text{amp}_3=6,0$ %) in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ($\tau_1=27,8$ ms, $\text{amp}_1=63,7$ %; $\tau_2=103$ ms, $\text{amp}_2=28,5$ %; $\tau_3=928$ ms, $\text{amp}_3=7,8$ %) langsamer, wobei gleichzeitig der prozentuale Anteil von τ_1 an der Inaktivierung ab- und der von τ_3 zunahm. Bei der Betrachtung der übrigen Pipettenlösungen fiel auf, dass in BAPTA-AM die Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 noch kleiner als in BAPTA waren, die prozentualen Anteile sich jedoch nicht signifikant von denen in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ unterschieden. Ebenfalls signifikant kleiner waren τ_2 und τ_3 in $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ im Vergleich zu $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$, wobei der Anteil an τ_2 hier deutlich abnahm. Zwischen BAPTA und BAPTA-AM zeigte sich auch eine deutlich größere dritte Inaktivierungszeitkonstante. Zusätzlich verschob sich, entgegen dem zuvor beschriebenen Trend, der Anteil der Zeitkonstanten an der Inaktivierung signifikant zu τ_1 unter Abnahme von amp_2 . Auch bei der Gegenüberstellung von Experimenten in BAPTA und $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ konnte eine Verschiebung zu kleineren amp_1 - und größeren amp_2 -Werten festgestellt werden. Die Zeitkonstanten der Inaktivierung und deren prozentuale Anteile für die unterschiedlichen Pipettenlösungen sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Anschließend wurde die Erholung der homotetrameren Kv4.3-Kanäle von der Inaktivierung untersucht. Hierfür wurden erneut Doppelpuls-Experimente mit unterschiedlichen Zwischenpulsintervallen für die vier Pipettenlösungen durchgeführt und die Recovery-Zeitkonstante mit einer einfach-exponentiellen Funktion ermittelt (siehe Material und Methoden). Die Auswertung zeigte deutlich, dass die Erholung von der Inaktivierung der Kv4.3-Homotetramere per se langsamer war als die der Wildtyp-Kv4.3/KChIP2-Komplexe (z.B.: BAPTA-AM: Kv4.3: $\tau_{\text{rec-80}}=396$ ms, Kv4.3/KChIP2: $\tau_{\text{rec-80}}=68,6$ ms; siehe Abb. 3.5A, Tab. 2.1 und Tab. 3.6).

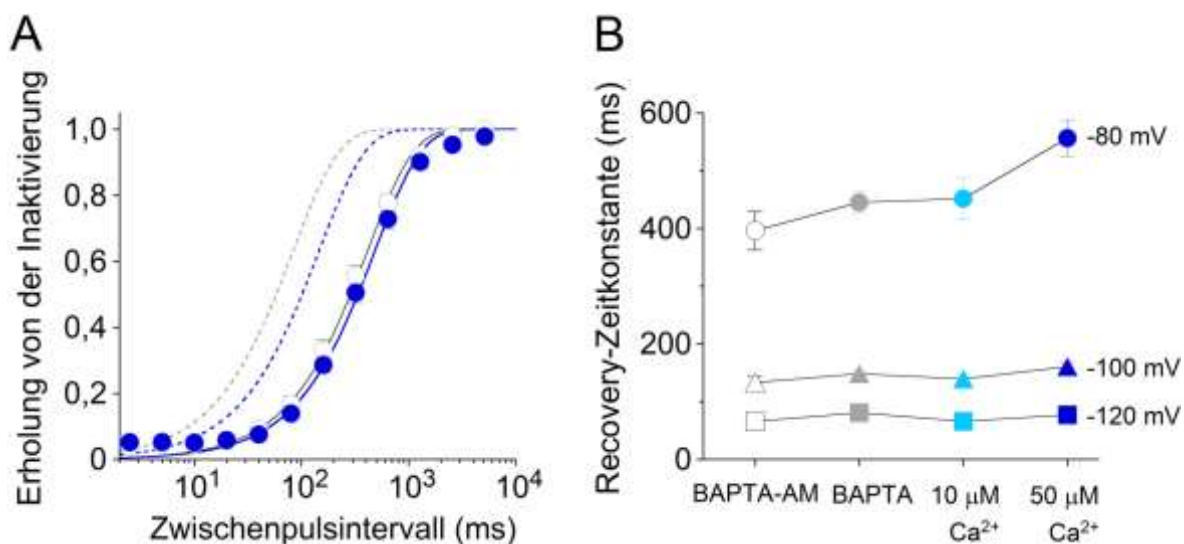


Abbildung 3.5: Erholung von der Inaktivierung der Kv4.3-Homotetramere

A Die relativen Stromamplituden wurden gegen das Zwischenpuls-Intervall semi-logarithmisch aufgetragen. Die Daten wurden mit einer einfach-exponentiellen Funktion beschrieben (siehe Material und Methoden). Es sind die Ergebnisse für die Kv4.3-Homotetramere in BAPTA-AM (weiß) und 50 μM Ca^{2+} (blau), gezeigt, sowie die Werte der Kv4.3/KCHIP2-Komplexe in BAPTA (grau gestrichelte Linie) und 50 μM Ca^{2+} (blau gestrichelte Linie). **B** Mittelwerte der Recovery-Zeitkonstanten (siehe Tabelle 3.6) für alle vier Pipettenlösungen, BAPTA-AM (weiß), BAPTA (grau), 10 μM (hellblau) und 50 μM Ca^{2+} (blau), bei unterschiedlichen Zwischenpulspotenzialen (-80, -100 und -120 mV).

Tabelle 3.6: Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.3-Homotetrameren

Pipettenlösung	$\tau_{\text{rec-80}}$ (ms)	$\tau_{\text{rec-100}}$ (ms)	$\tau_{\text{rec-120}}$ (ms)
BAPTA-AM	396 \pm 33 ^a (n=12)	133 \pm 10 ^d (n=10)	65,7 \pm 3,9 (n=11) ^e
BAPTA	445 \pm 19 ^b (n=15)	148 \pm 19 (n=13)	80,8 \pm 2,4 (n=11)
10 μM Ca^{2+}	451 \pm 36 ^c (n=13)	140 \pm 10 (n=13)	65,7 \pm 7,5 (n=10)
50 μM Ca^{2+}	556 \pm 32 (n=11)	160 \pm 7 (n=13)	77,1 \pm 4,5 (n=13)

$\tau_{\text{rec(-80)}}$, $\tau_{\text{rec(-100)}}$, $\tau_{\text{rec(-120)}}$: Recovery-Zeitkonstanten bei unterschiedlichen Zwischenpuls-Potenzialen; Signifikanzen wurden mit dem t-Test nach Student untersucht (^ap=0,0024 relativ zu 50 μM Ca^{2+} ; ^bp=0,0041 relativ zu 50 μM Ca^{2+} ; ^cp=0,0433 relativ zu 50 μM Ca^{2+} ; ^dp=0,0335 relativ zu 50 μM Ca^{2+} ; ^ep=0,0038 relativ zu BAPTA).

Die Erholung von der Inaktivierung war allerdings bei hohen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen langsamer als bei niedrigen. Der größte signifikante Unterschied zeigte sich zwischen Experimenten in BAPTA-AM ($\tau_{\text{rec-80}}$ =396 ms) und Experimenten in 50 μM Ca^{2+} ($\tau_{\text{rec-80}}$ =556 ms) bei einem Recovery-Potenzial von -80 mV. Des Weiteren ergab sich eine signifikante Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung bei -80 mV für Experimente in BAPTA und 50 μM Ca^{2+} , sowie für 10 μM Ca^{2+} und 50 μM Ca^{2+} . Bei den Recovery-Potenzialen von -100 mV und -120 mV wurde das Signifikanzniveau jeweils nur noch für einige wenige Gruppen erreicht.

Insgesamt zeigte sich für die Kv4.3-Homotetramere, vergleichbar zu den Ergebnissen der Kv4.3/KChIP2-Komplexe, dass die Ca^{2+} -abhängige Verlangsamung der Recovery-Kinetik bei weniger negativen Recovery-Potenzialen stärker ausgeprägt ist (siehe Abb. 3.5B).

3.2.2 Effekt des CaMKII-Inhibitors KN-93 auf die Ca^{2+} -vermittelte Modulation der Kv4.3-Inaktivierung

Eines der regulatorischen Proteine, die durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen gesteuert werden, ist die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII). Um einen möglichen Einfluss der aktivierten CaMKII auf die Kanaleigenschaften von dem der Ca^{2+} -Bindung an KChIP2 abzugrenzen, wurde KN-93, ein CaMKII-Blocker, zu den Versuchslösungen hinzugegeben. Zunächst wurden Experimente mit 1 μM KN-93 in BAPTA-AM, BAPTA und 50 μM für Kv4.3-Homotetramere und Wildtyp-Kv4.3/KChIP2-Komplexe durchgeführt (siehe Tab. 3.1 und Tab. 3.7).

Tabelle 3.7: Zeitkonstanten der Inaktivierung von K4.3-Homotetrameren und Kv4.3/ KChIP2-Komplexen mit 1 μM KN-93

<i>Pipettenlösung</i>	τ_1 (ms)	amp_1 (%)	τ_2 (ms)	amp_2 (%)	τ_3 (ms)	amp_3 (%)	<i>n</i>
Kv4.3							
BAPTA-AM	35,2±3,1 ^a	60,6±4,4 ^d	95,5±6,6	32,6±4,1	655±39	6,8±0,4 ^f	11
BAPTA	35,0±3,8 ^b	66,5±4,3	109±12 ^c	27,6±4,2	795±116	5,9±0,5	12
50 μM Ca^{2+}	28,3±3,4	71,8±2,9 ^e	95,6±12,2	23,1±2,7	791±78	5,1±0,5 ^g	13
Kv4.3/KChIP2							
BAPTA-AM	41,0±2,4 ^h	86,5±3,9 ^l	218±42 ⁱ	9,4±3,7 ⁿ	660±33 ^j	4,1±0,6	8
BAPTA	42,1±4,1	55,8±8,0 ^m	126±27	41,1±7,6 ^o	699±83	3,1±0,6	17
50 μM Ca^{2+}	39,8±4,5	43,6±10,7	91,2±6,3	53,0±10,4	944±221 ^k	3,4±0,8 ^p	7

τ_1 , τ_2 , τ_3 : Inaktivierungszeitkonstanten; amp_1 , amp_2 , amp_3 : Prozentuale Anteile der Zeitkonstanten am Gesamtstromabfall; Signifikanzen wurden mit dem t-Test nach Student untersucht (^a $p=0,0111$ relativ zu Kv4.3 ohne KN-93; ^b $p<0,0042$ relativ zu Kv4.3 ohne KN-93; ^c $p=0,0374$ relativ zu Kv4.3 ohne KN-93; ^d $p=0,0385$ relativ zu 50 μM Ca^{2+} ; ^e $p=0,0359$ relativ zu Kv4.3 ohne KN-93; ^f $p=0,0197$ relativ zu 50 μM Ca^{2+} ; ^g $p<0,0001$ relativ zu Kv4.3/KChIP2 ohne KN-93; ^h $p<0,0001$ relativ zu Kv4.3/KChIP2 ohne KN-93; ⁱ $p=0,0154$ relativ zu 50 μM Ca^{2+} und $p=0,0005$ relativ zu Kv4.3/KChIP2 ohne KN-93; ^j $p<0,0001$ relativ zu Kv4.3/KChIP2 ohne KN-93; ^k $p=0,0024$ relativ zu Kv4.3/KChIP2 ohne KN-93; ^l $p=0,0177$ relativ zu BAPTA, $p=0,0016$ relativ zu 50 μM Ca^{2+} und $p=0,0004$ relativ zu Kv4.3/KChIP2 ohne KN-93; ^m $p=0,0030$ relativ zu Kv4.3/KChIP2 ohne KN-93; ⁿ $p=0,0111$ relativ zu BAPTA, $p=0,0011$ relativ zu 50 μM Ca^{2+} und $p=0,0004$ relativ zu Kv4.3/KChIP2 ohne KN-93; ^o $p=0,0021$ relativ zu Kv4.3/KChIP2 ohne KN-93; ^p $p=0,0446$ relativ zu Kv4.3/KChIP2 ohne KN-93).

Die dreifach-exponentielle Auswertung der makroskopischen Inaktivierung zeigte beim Vergleich der Messdaten der Kv4.3-Homotetramere mit und ohne Zugabe

von KN-93 (siehe Tab. 3.5 und Tab. 3.7), dass insbesondere die Zeitkonstanten τ_1 (BAPTA-AM: 35,2 ms, BAPTA: 35,0 ms, 50 μM Ca^{2+} : 28,3 ms) und τ_2 (BAPTA-AM: 95,5 ms, BAPTA: 109 ms, 50 μM Ca^{2+} : 95,6 ms) bei geblockter CaMKII, also in Versuchen mit KN-93, in allen Ca^{2+} -Konzentrationen deutlich erhöht waren, während τ_3 (BAPTA-AM: 655 ms, BAPTA: 795 ms, 50 μM Ca^{2+} : 791 ms) in etwa gleich blieb bzw. kleiner wurde. Dieser Effekt nahm außerdem mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration ab. Die Verteilung der Amplituden verschob sich mit KN-93 im Vergleich zu den Versuchen ohne KN-93 in 50 μM Ca^{2+} -Lösung insofern, als dass amp_1 zunahm, amp_2 und amp_3 jedoch kleiner wurden.

Experimente mit Kv4.3/KChIP2-Komplexen in Abwesenheit und Gegenwart des CaMKII-Inhibitors KN-93 lieferten vergleichbare Ergebnisse (siehe Tab. 3.1 und Tab. 3.7). In Gegenwart von KN-93 waren auch hier in BAPTA-AM und BAPTA die Zeitkonstanten der Inaktivierung wesentlich größer als ohne KN-93. Zusätzlich verlagerte sich in Gegenwart von KN-93 die Amplitudenverteilung verschieden stark zu amp_1 unter Abnahme von amp_2 und teilweise amp_3 . In 50 μM Ca^{2+} zeigte sich mit KN-93 weder für τ_1 und τ_2 , noch für die dazugehörigen relativen Amplituden signifikante Unterschiede. Dafür war hier in Gegenwart von KN-93 τ_3 deutlich erhöht, sowie deren Anteil an der Inaktivierungskinetik verringert.

In Gegenwart von KN-93 zeigte sich für die Kv4.3-Homotetramere keine signifikanten Veränderungen der Zeitkonstanten in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration (BAPTA-AM, BAPTA und 50 μM Ca^{2+}), allerdings verschoben sich ihre prozentualen Anteile in 50 μM Ca^{2+} im Vergleich zu BAPTA-AM zu τ_1 unter Abnahme von amp_2 und amp_3 . Im Gegensatz dazu veränderten sich die Stromkurven der Kv4.3/KChIP2-Komplexe in Gegenwart von KN-93 in 50 μM Ca^{2+} relativ zu BAPTA-AM dahingehend, dass der prozentuale Anteil amp_1 kleiner und amp_2 größer wurde. Dieser Effekt war ebenfalls zwischen Versuchen mit BAPTA-AM und BAPTA signifikant.

Bei der Untersuchung der Erholung von der Inaktivierung in Gegenwart von KN-93 fiel anfangs auf, dass sowohl bei Experimenten mit den Kv4.3-Homotetrameren als auch mit den Kv4.3/KChIP2-Komplexen eine langsame Komponente zur Recovery-Kinetik hinzukam. Aus diesem Grund wurden die erhobenen Messdaten nicht wie in der bisherigen Auswertung einfach-, sondern doppelt-exponentiell gefittet und demzufolge zwei anstatt einer Zeitkonstante bestimmt. Die schnelle Komponente wurde als das eigentliche Korrelat der Erholung von der Inaktivierung betrachtet, während die langsamere Komponente anderen Mechanismen, ohne

direkten Zusammenhang zur Erholung von der Inaktivierung, zugeschrieben wurde (siehe Abb. 3.6 und Tab. 3.8).

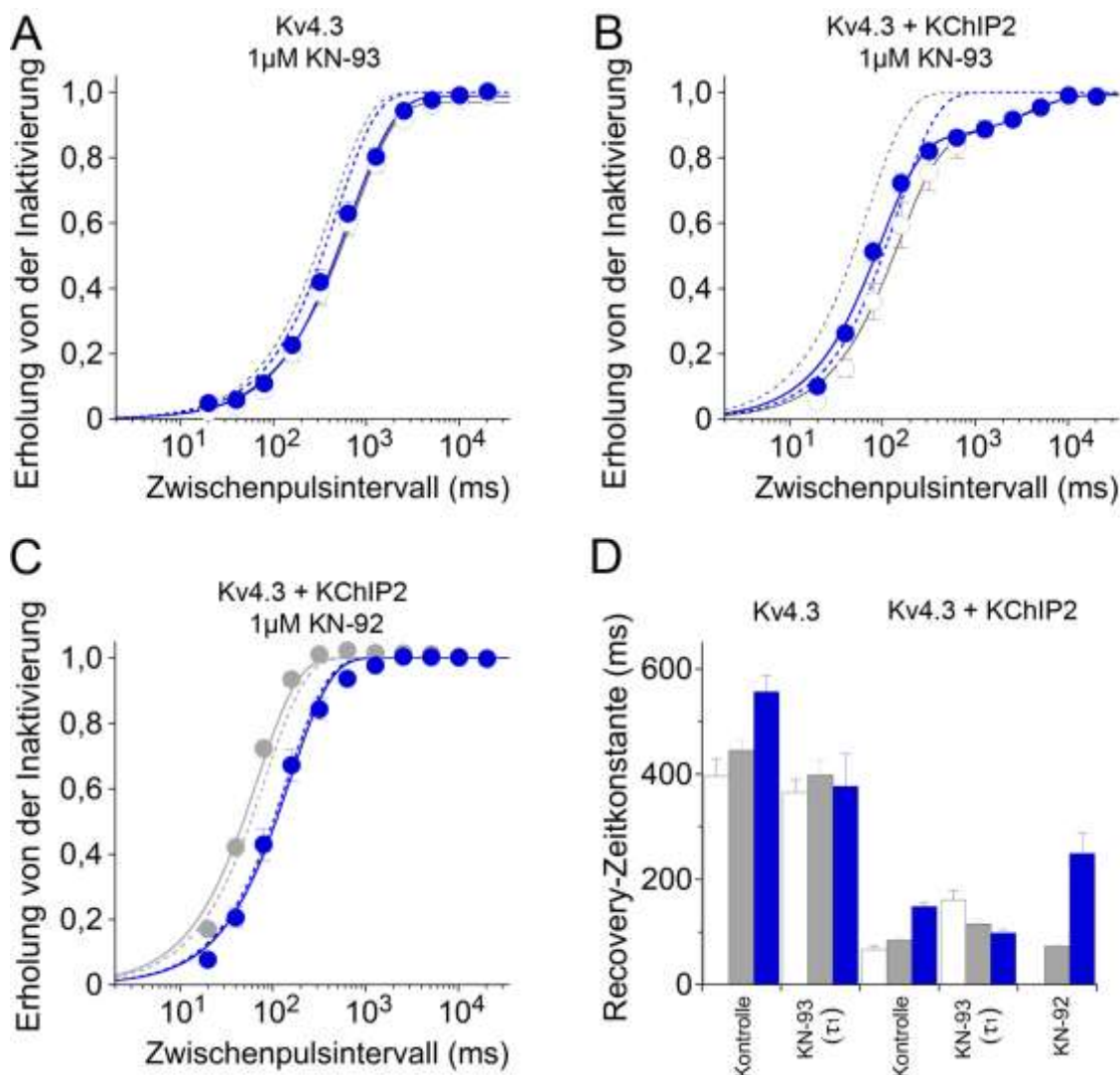


Abbildung 3.6: Erholung von der Inaktivierung der K4.3-Homotetrameren und Kv4.3/KChIP2-Komplexen ohne und mit Zugabe von KN-93 oder KN-92

A Die relativen Stromamplituden wurden gegen das Zwischenpuls-Intervall semi-logarithmisch aufgetragen, und für Experimente mit KN-93 mit einer 2-fach-exponentiellen Funktion beschrieben (siehe Material und Methoden). Es sind die Ergebnisse für die Kv4.3/KChIP2-Komplexe in BAPTA-AM (weiß) und 50 µM Ca²⁺ (blau) mit 1 µM KN-93 gezeigt, sowie die Werte der Kv4.3/KChIP2-Komplexe in BAPTA (grau gestrichelte Linie) und 50 µM Ca²⁺ (blau gestrichelte Linie) ohne Blocker mit einfach-exponentieller Funktion. **B** Ergebnisse für die Kv4.3-Homotetramere mit 1 µM KN-93 (2-fach-exponentiell) in BAPTA-AM (weiß) und 50 µM Ca²⁺ (blau), sowie ohne Blocker (einfach-exponentiell, grau und blau gestrichelte Linie). **C** Es sind die Ergebnisse für die Kv4.3/KChIP2-Komplexe in BAPTA (grau) und 50 µM Ca²⁺ (blau) mit 1 µM KN-92 (einfach-exponentiell) gezeigt, sowie die Werte der Kv4.3/KChIP2-Komplexe ohne Blocker (einfach-exponentiell, grau und blau gestrichelte Linie). **D** Mittelwerte der Recovery-Zeitkonstanten bzw. bei KN-93 die schnelle Komponente der Recovery-Kinetik ($\tau_{1,rec-80}$) für BAPTA-AM (weiß), BAPTA (grau) und 50 µM Ca²⁺ (blau) mit und ohne KN-93 bzw. KN-92 (siehe Tab. 3.7, 3.8 und 3.9).

Tabelle 3.8: Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.3-Homotetrameren und Kv4.3/KChIP2-Komplexen mit 1 und 10 μM KN-93

Pipettenlösung	1 μM KN-93			10 μM KN-93		
	$\tau_{1,\text{rec-80}}$ (ms)	$\tau_{2,\text{rec-80}}$ (ms)	n	$\tau_{1,\text{rec-80}}$ (ms)	$\tau_{2,\text{rec-80}}$ (ms)	n
Kv4.3						
BAPTA-AM	365 \pm 23	1420 \pm 570	7			
BAPTA	398 \pm 28	1160 \pm 250	10			
50 μM Ca ²⁺	377 \pm 61	1490 \pm 510	9			
Kv4.3/KChIP2						
BAPTA-AM	160 \pm 18 ^a	2650 \pm 940	9			
BAPTA	115 \pm 9	1900 \pm 300 ^b	15	109 \pm 22	1450 \pm 320	9
50 μM Ca ²⁺	97,7 \pm 6,5	4140 \pm 760	10			

$\tau_{1,\text{rec}(-80)}$, $\tau_{2,\text{rec}(-80)}$: Recovery-Zeitkonstanten bei Zwischenpuls-Potenzialen von -80 mV; Signifikanzen wurden mit dem t-Test nach Student untersucht (^ap=0,0173 relativ zu BAPTA und p=0,0034 relativ zu 50 μM Ca²⁺; ^bp=0,0055 relativ zu 50 μM Ca²⁺).

Bei Messungen mit KN-93 ergaben sich für die Recovery-Kinetik der Kv4.3-Homotetramere zwischen BAPTA-AM ($\tau_{1,\text{rec-80}}$ =365 ms, $\tau_{2,\text{rec-80}}$ =1420 ms), BAPTA ($\tau_{1,\text{rec-80}}$ =398 ms, $\tau_{2,\text{rec-80}}$ =1160 ms) und 50 μM Ca²⁺ ($\tau_{1,\text{rec-80}}$ =377 ms, $\tau_{2,\text{rec-80}}$ =1490 ms) keine signifikanten Effekte. Aufgrund der Auswertung mit zwei anstatt einer Zeitkonstante konnten die Ergebnisse nicht direkt mit den Werten der Kv4.3-Homotetramere ohne KN-93 verglichen werden. Es kann dennoch festgehalten werden, dass in Versuchen mit Kv4.3-Homotetrameren ohne geblockter CaMKII eine Verlangsamung in hohen Ca²⁺-Konzentrationen stattfand, die bei Zugabe von 1 μM KN-93 nicht mehr erkennbar war (siehe Abb. 3.6).

Im Gegensatz zu der in den verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen gleichbleibenden Recovery-Kinetik der Kv4.3-Homotetramere, zeigte sich in den Experimenten mit den Kv4.3/KChIP2-Komplexen in Gegenwart von KN-93 mit zunehmender Ca²⁺-Konzentration eine Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung (BAPTA-AM: $\tau_{1,\text{rec-80}}$ =160 ms, $\tau_{2,\text{rec-80}}$ =2650 ms, 50 μM Ca²⁺: $\tau_{1,\text{rec-80}}$ =97,7 ms, $\tau_{2,\text{rec-80}}$ =4140 ms). Aufgrund der doppelt-exponentiellen Funktion unter Zugabe von KN-93 ist auch für die Kv4.3/KChIP2-Komplexe mit KN-93 kein direkter Vergleich mit den einfach-exponentiellen Werten ohne KN-93 möglich. Es zeigte sich jedoch, dass die Erholung von der Inaktivierung für Kv4.3/KChIP2-Komplexe mit KN-93 in 50 μM Ca²⁺ schneller wurde, während diese in Experimenten ohne KN-93 sogar verlangsamt wurde (siehe Abb.3.6).

In der vorliegenden Arbeit kam es nur in Gegenwart von KN-93 zu einer doppelt-exponentiellen Recovery-Kinetik. Insbesondere um die Frage nach einem KN-93-konzentrationsabhängigen Effekt zu beantworten, wurden zusätzliche Experimente mit Kv4.3/KChIP2-Komplexen und 10 μM KN-93 in der BAPTA-Versuchslösung durchgeführt. Es zeigte sich jedoch weder für die schnelle ($\tau_{1,\text{rec-80}}=109$ ms) noch für die langsame Zeitkonstante ($\tau_{2,\text{rec-80}}=1450$ ms) ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu 1 μM KN-93. Ein konzentrationsabhängiger Effekt von KN-93 auf die Recovery-Kinetik konnte somit nicht bestätigt werden (siehe Tab. 3.8).

Nachdem die KN-93-Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf die doppelt-exponentielle Recovery-Kinetik hatte, wurden weitere Experimente zum besseren Verständnis der hier aufgetretenen Ca^{2+} -abhängigen Beschleunigung, sowie der aufgetretenen doppelt-exponentiellen Kinetik durchgeführt. Hierfür wurden Kv4.3/KChIP2-Komplexe in BAPTA und 50 μM Ca^{2+} unter Zugabe von 1 und 10 μM KN-92, einem inaktiven Analogon von KN-93, gemessen. Der beste Fit für die Recovery-Kinetik von Kv4.3/KChIP2-Komplexe mit KN-92 konnte hier mit einer einfach-exponentiellen Funktion erreicht werden (siehe Tab. 3.9 und Abb. 3.6).

Tabelle 3.9: Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung für Kv4.3/KChIP2-Komplexe mit 1 und 10 μM KN-92

<i>Pipettenlösung</i>	<i>BAPTA</i>	<i>50 μM Ca^{2+}</i>
	$\tau_{\text{rec-80}}$ (ms)	$\tau_{\text{rec-80}}$ (ms)
1 μM KN-92	72,5 \pm 4,8 ^a (n=7)	249 \pm 39 (n=18)
10 μM KN-92	119 \pm 19 (n=5)	406 \pm 71 (n=6)

$\tau_{\text{rec(-80)}}$: Recovery-Zeitkonstante bei Zwischenpuls-Potenzialen von -80 mV; Signifikanzen wurden mit dem t-Test nach Student untersucht (^ap=0,0072 relativ zu 50 μM Ca^{2+} und p=0,0166 relativ zu 10 μM KN-92).

Für Experimente mit 1 μM KN-92 zeigte sich im Vergleich zu BAPTA ($\tau_{\text{rec-80}}=72,5$ ms) in 50 μM Ca^{2+} ($\tau_{\text{rec-80}}=249$ ms) eine signifikante Verlangsamung der Recovery-Kinetik. Auch mit 10 μM KN-92 war die Erholung von der Inaktivierung in 50 μM deutlich langsamer, erreichte das Signifikanzniveau jedoch nicht. Weiterhin ließ sich ermitteln, dass mit Zunahme der KN-92-Konzentration die Erholung von der Inaktivierung langsamer wurde. Dieser Effekt war für BAPTA stärker ausgeprägt, als für Versuche mit 50 μM Ca^{2+} .

3.2.3 Ca²⁺-vermittelte Modulation der Inaktivierung von Kv4.3-CaMKII-Site-Mutanten

Die Auswertung der Messdaten von Kv4.3/KChIP2-Komplexen mit KN-92 ergab eine einfach-exponentielle Funktion für die Recovery-Kinetik. Um zwischen einem Kanalblock durch KN-93 und einem CaMKII-Effekt zu differenzieren, wurden Experimente mit Kv4.3-Mutanten durchgeführt. In der ersten Mutante (Kv4.3-AAA) waren die drei CaMKII-Phosphorylierungsstellen inaktiviert, während diese in der zweiten (Kv4.3-DDD) pseudophosphoryliert waren (siehe Kap. 2.1.1).

Aufgrund der geringen Stromamplitude und damit schlecht auszuwertenden Messdaten konnten keine Werte für Kv4.3-AAA und Kv4.3-DDD ohne die Co-expression von KChIP2 erhoben werden. Obwohl durch die Transfektion keine quantitative Beurteilung der Stromamplitude möglich ist, fiel auf, dass die Stromamplituden für beide Kv4.3-Mutanten coexprimiert mit KChIP2, trotz im Vergleich zum Wildtyp verdoppelter Kv4.3-DNA-Menge, verhältnismäßig klein waren. Die Stromamplitude war sowohl für Kv4.3-AAA/KChIP2, als auch für Kv4.3-DDD/KChIP2 signifikant kleiner als die der Wildtyp-Kv4.3/KChIP2-Komplexe (siehe Tab. 3.10).

Beim Vergleich der Messwerte von Kv4.3-AAA/KChIP2 und Kv4.3/KChIP2-Komplexe in BAPTA war der prozentuale Anteil an der Amplitude signifikant von amp_2 zu amp_1 verschoben. Außerdem war τ_2 signifikant kleiner, während τ_3 signifikant größer war. Beim Vergleich von Kv4.3-AAA/KChIP2 mit Kv4.3/KChIP2 in 50 μ M Ca²⁺ zeigte sich ein signifikant kleinerer Anteil von amp_3 an der Amplitude und ebenfalls ein signifikant kleineres τ_2 , sowie τ_3 .

Beim Vergleich der Messwerte von Kv4.3-DDD/KChIP2 und Kv4.3/KChIP2 unterschieden sich die Messungen in BAPTA insofern, dass mit Kv4.3-DDD/KChIP2 amp_1 signifikant zunahm, während amp_2 deutlich kleiner wurde. Zusätzlich war τ_3 in den Experimenten mit Kv4.3-DDD/KChIP2 deutlich kleiner als beim Wildtyp. In 50 μ M Ca²⁺ war dieser Effekt ebenfalls signifikant für amp_1 , amp_2 und τ_3 , zusätzlich war τ_2 mit Kv4.3-DDD/KChIP2 signifikant größer als mit Kv4.3/KChIP2.

Bei der Gegenüberstellung der beiden Kv4.3-CaM-Kinase-Site-Mutanten zeigten sich in BAPTA keine signifikanten Unterschiede in der Inaktivierungskinetik. In 50 μ M Ca²⁺ war für Kv4.3-DDD/KChIP2, im Vergleich zu Kv4.3-AAA/KChIP2, amp_1 zu amp_2 verschoben.

Die Inaktivierungskinetik von Kv4.3-AAA/KChIP2 zeigte keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration (BAPTA: $\tau_1=41,2$ ms (42,9 %), $\tau_2=68,9$ ms (53,7 %), $\tau_3=953$ ms (3,4 %); $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$: $\tau_1=28,8$ ms (33,1 %), $\tau_2=75,0$ ms (63,7 %), $\tau_3=791$ ms (3,2 %)). Für Kv4.3-DDD/KChIP2 zeigte sich in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ lediglich eine schnellere initiale Inaktivierung als in BAPTA ($p=0,04$), die übrigen tau- und Amplituden-Werte unterschieden sich nicht signifikant in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration.

Tabelle 3.10: Zeitkonstanten der Inaktivierung von Kv4.3-CaMKII-Site-Mutante Kv4.3-AAA/KChIP2 und Kv4.3-DDD/KChIP2

Pipettenlösung	<i>I</i> (nA)	τ_1 (ms)	amp ₁ (%)	τ_2 (ms)	amp ₂ (%)	τ_3 (ms)	amp ₃ (%)	<i>n</i>
Kv4.3/KChIP2								
BAPTA	18,6 ±2,3 ^a	37,1 ±2,5	27,7 ±3,0 ^c	100 ±5 ^e	69,4 ±3,2 ^g	521 ±56 ⁱ	2,9 ±0,4	16
$50 \mu\text{M Ca}^{2+}$	19,6 ±2,9 ^b	30,1 ±2,7	36,9 ±4,9 ^d	95,9 ±4,6 ^f	55,1 ±4,6 ^h	450 ±43 ^j	8,1 ±1,3 ^k	20
Kv4.3-AAA/KChIP2								
BAPTA	6,1 ±1,1	41,2 ±6,3	42,9 ±5,5	68,9 ±7,3	53,7 ±5,6	953 ±129	3,4 ±0,5	11
$50 \mu\text{M Ca}^{2+}$	8,0 ±2,2	28,8 ±2,1	33,1 ±6,0 ^l	75,0 ±2,7	63,7 ±5,7 ^m	791 ±123	3,2 ±0,9	7
Kv4.3-DDD/KChIP2								
BAPTA	9,8 ±2,6	48,3 ±6,9 ⁿ	62,1 ±10,2	157 ±48	34,5 ±9,6	885 ±151	3,4 ±1,0	10
$50 \mu\text{M Ca}^{2+}$	7,3 ±2,2	31,8 ±2,7	67,2 ±4,9	70,7 ±5,4	28,8 ±4,8	1020 ±170	4,0 ±1,0	13

τ_1 , τ_2 , τ_3 : Inaktivierungszeitkonstanten; amp₁, amp₂, amp₃: Prozentuale Anteile der Zeitkonstanten am Gesamtstromabfall; Signifikanzen wurden mit dem t-Test nach Student untersucht (^a $p=0,0002$ relativ zu Kv4.3-AAA/KChIP2 und $p=0,0208$ relativ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 in BAPTA; ^b $p=0,0500$ relativ zu Kv4.3-AAA/KChIP2 und $p=0,0049$ relativ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^c $p=0,0155$ relativ zu Kv4.3-AAA/KChIP2 und $p=0,0005$ relativ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 in BAPTA; ^d $p=0,0009$ relativ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^e $p=0,0017$ relativ zu Kv4.3-AAA/KChIP2 in BAPTA; ^f $p=0,0157$ relativ zu Kv4.3-AAA/KChIP2 und $p=0,0032$ relativ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^g $p=0,0151$ relativ zu Kv4.3-AAA/KChIP2 und $p=0,0003$ relativ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 in BAPTA; ^h $p=0,0018$ relativ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ⁱ $p=0,0020$ relativ zu Kv4.3-AAA/KChIP2 und $p=0,0122$ relativ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 in BAPTA; ^j $p=0,0026$ relativ zu Kv4.3-AAA/KChIP2 und $p=0,0002$ relativ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^k $p=0,0402$ relativ zu Kv4.3-AAA/KChIP2 in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^l $p=0,0005$ relativ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ^m $p=0,0003$ relativ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$; ⁿ $p=0,0403$ relativ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$).

Als nächstes wurde die Erholung von der Inaktivierung der Kv4.3-CaMKII-Site-Mutanten Kv4.3-AAA und Kv4.3-DDD untersucht (siehe Abb. 3.7).

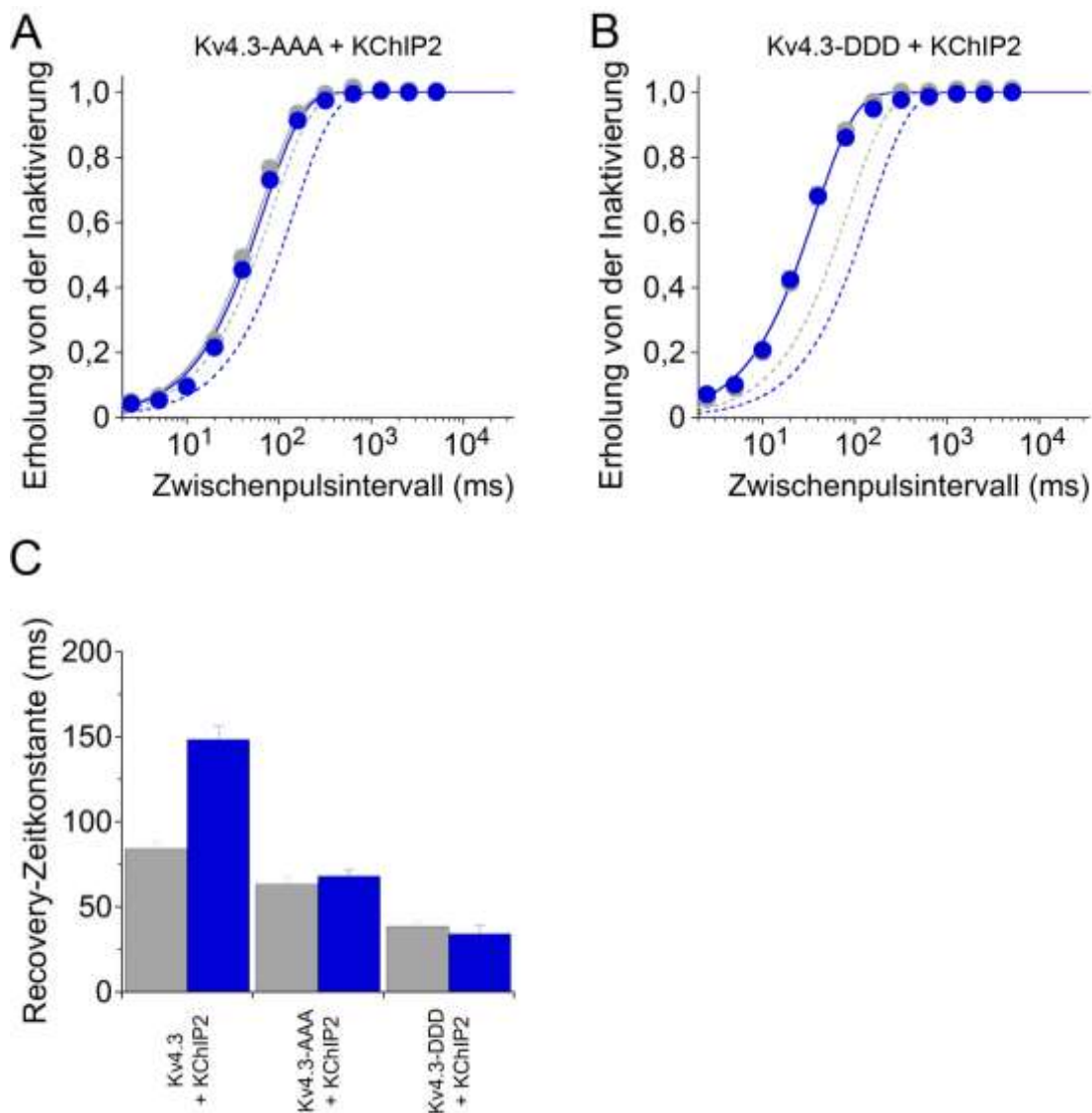


Abbildung 3.7: Erholung von der Inaktivierung der Kv4.3-CaMKII-Site-Mutante Kv4.3-AAA und Kv4.3-DDD

A Die relativen Stromamplituden wurden gegen das Zwischenpuls-Intervall semi-logarithmisch aufgetragen und die Daten mit einer einfach-exponentiellen Funktion beschrieben (siehe Material und Methoden). Es sind die Ergebnisse für Kv4.3-AAA/KChIP2 in BAPTA (grau) und 50 μM Ca^{2+} (blau) gezeigt, sowie die Werte der Kv4.3/KChIP2-Komplexe in BAPTA und 50 μM Ca^{2+} (grau bzw. blau gestrichelte Linie). **B** Ergebnisse für die Kv4.3-DDD/KChIP2 in BAPTA (grau) und 50 μM Ca^{2+} (blau), sowie der Kv4.3/KChIP2-Komplexe (grau und blau gestrichelte Linie). **C** Mittelwerte der Recovery-Zeitkonstanten (siehe Tabelle 3.10) für BAPTA (grau) und 50 μM Ca^{2+} (blau).

Die statistische Auswertung dieser Messdaten ergab keine signifikanten Unterschiede für Experimente mit Kv4.3-AAA/KChIP2 in 50 μM Ca^{2+} ($\tau_{\text{rec-80}}=63,2$ ms) und BAPTA ($\tau_{\text{rec-80}}=68,1$ ms). Jedoch war die Erholung der Kv4.3-Mutante von der Inaktivierung sowohl in BAPTA, als auch in 50 μM Ca^{2+} signifikant schneller als die der Kv4.3/KChIP2-Komplexe. Mit der pseudophosphorylierten Kv4.3-CaMKII-Site-Mutante Kv4.3-DDD zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Ca^{2+} -Konzentrationen. Jedoch war die Erholung von der Inaktivierung der pseudophosphorylierten Kv4.3-DDD sowohl in BAPTA als auch in

50 μM Ca^{2+} deutlich schneller als die der Kv4.3/KChIP2-Komplexe und ebenfalls schneller als die der Kv4.3-AAA-Mutante (siehe Tab. 3.11).

Tabelle 3.11: Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.3-CaMKII-Site-Mutante Kv4.3-AAA/KChIP2 und Kv4.3-DDD/KChIP2

<i>Pipettenlösung</i>	<i>BAPTA</i>	<i>50 μM Ca^{2+}</i>
	$\tau_{\text{rec-80}}$ (ms)	$\tau_{\text{rec-80}}$ (ms)
Kv4.3/ KChIP2	84,2 \pm 4,4 ^a (n=13)	148 \pm 8 ^b (n=15)
Kv4.3-AAA/ KChIP2	63,2 \pm 4,6 ^c (n=11)	68,1 \pm 3,7 ^d (n=11)
Kv4.3-DDD/ KChIP2	38,5 \pm 2,5 (n=10)	39,0 \pm 3,1 (n=13)

$\tau_{\text{rec}(-80)}$: Recovery-Zeitkonstante bei Zwischenpuls-Potenzialen von -80 mV; Signifikanzen wurden mit dem t-Test nach Student untersucht (^a $p=0,0032$ relativ zu Kv4.3-AAA/KChIP2 und $p<0,0001$ relativ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 in BAPTA; ^b $p<0,0001$ relativ zu Kv4.3-AAA/KChIP2 und $p<0,0001$ relativ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 in 50 μM Ca^{2+} ; ^c $p=0,0002$ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 in BAPTA; ^d $p<0,0001$ relativ zu Kv4.3-DDD/KChIP2 50 μM Ca^{2+}).

3.3 Untersuchung von KChIP2-EF-Hand-Mutanten in Gegenwart von KN-93

Um die Effekte, die durch Ca^{2+} -Bindung an die EF-Handmotive von KChIP2 entstehen, von denen der aktivierten CaMKII zu unterscheiden, wurden die Experimente mit den KChIP2-EF-Hand-Mutanten ebenfalls in 1 μM KN-93 durchgeführt. Da es in den vorherigen Experimenten zu keiner Modulation der Erholung von der Inaktivierung durch die KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2, \text{EF}3}$ -Mutante kam, wurde auf weitere Messungen mit dieser Mutante verzichtet. Zusätzlich wurden die Versuche auf Lösungen mit BAPTA-AM und 50 μM Ca^{2+} beschränkt.

Die Messung der Inaktivierungskinetiken der drei EF-Hand-Mutanten KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2}$, KChIP2 $_{\Delta\text{EF}3}$ und KChIP2 $_{\Delta\text{EF}4}$ in BAPTA-AM und 50 μM Ca^{2+} ergab, mit Ausnahme einer Verkleinerung der Amplitude amp_3 für KChIP2 $_{\Delta\text{EF}4}$ in 50 μM Ca^{2+} , keine signifikanten Unterschiede (siehe Tab. 3.12).

Tabelle 3.12: Zeitkonstanten der Inaktivierung für Kv4.3 und KChIP2-EF-Hand-Mutanten mit 1 μM KN-93

<i>Pipettenlösung</i>	τ_1 (ms)	<i>amp</i> ₁ (%)	τ_2 (ms)	<i>amp</i> ₂ (%)	τ_3 (ms)	<i>amp</i> ₃ (%)	<i>n</i>
KChIP2_{ΔEF2}							
BAPTA-AM	25,7±1,7	77,3±6,8	97,0±14,3	19,3±6,1	554±39	3,5±0,7	7
50 μM Ca ²⁺	28,8±5,4	65,4±6,8	105±16	23,3±5,3	489±83	11,3±6,7	10
KChIP2_{ΔEF3}							
BAPTA-AM	26,5±1,8	76,3±7,1	116±23	19,4±5,9	651±75	4,7±1,2	10
50 μM Ca ²⁺	30,7±3,1	67,8±5,5	99,0±15,1	27,3±4,9	558±65	4,9±0,7	11
KChIP2_{ΔEF4}							
BAPTA-AM	35,3±3,4	69,1±6,9	121,±19	27,0±6,3	683±99	4,0±0,9 ^a	9
50 μM Ca ²⁺	23,6±4,8	64,1±9,2	76,3±14,9	34,2±9,0	682±149	1,8±0,3	10

τ_1 , τ_2 , τ_3 : Inaktivierungszeitkonstanten; *amp*₁, *amp*₂, *amp*₃: Prozentuale Anteile der Zeitkonstanten am Gesamtstromabfall; Signifikanzen wurden mit dem t-Test nach Student untersucht (^ap=0,0309 relativ zu 50 μM Ca²⁺)

Bei der Auswertung der Erholung von der Inaktivierung wurden die Daten mit Hilfe einer doppelt-exponentiellen Funktion ausgewertet (siehe Abb. 3.8). Dies entspricht dem Vorgehen bei den Experimenten mit Kv4.3-Homtetrameren in Gegenwart von KN-93 (siehe Kap. 3.2.2).

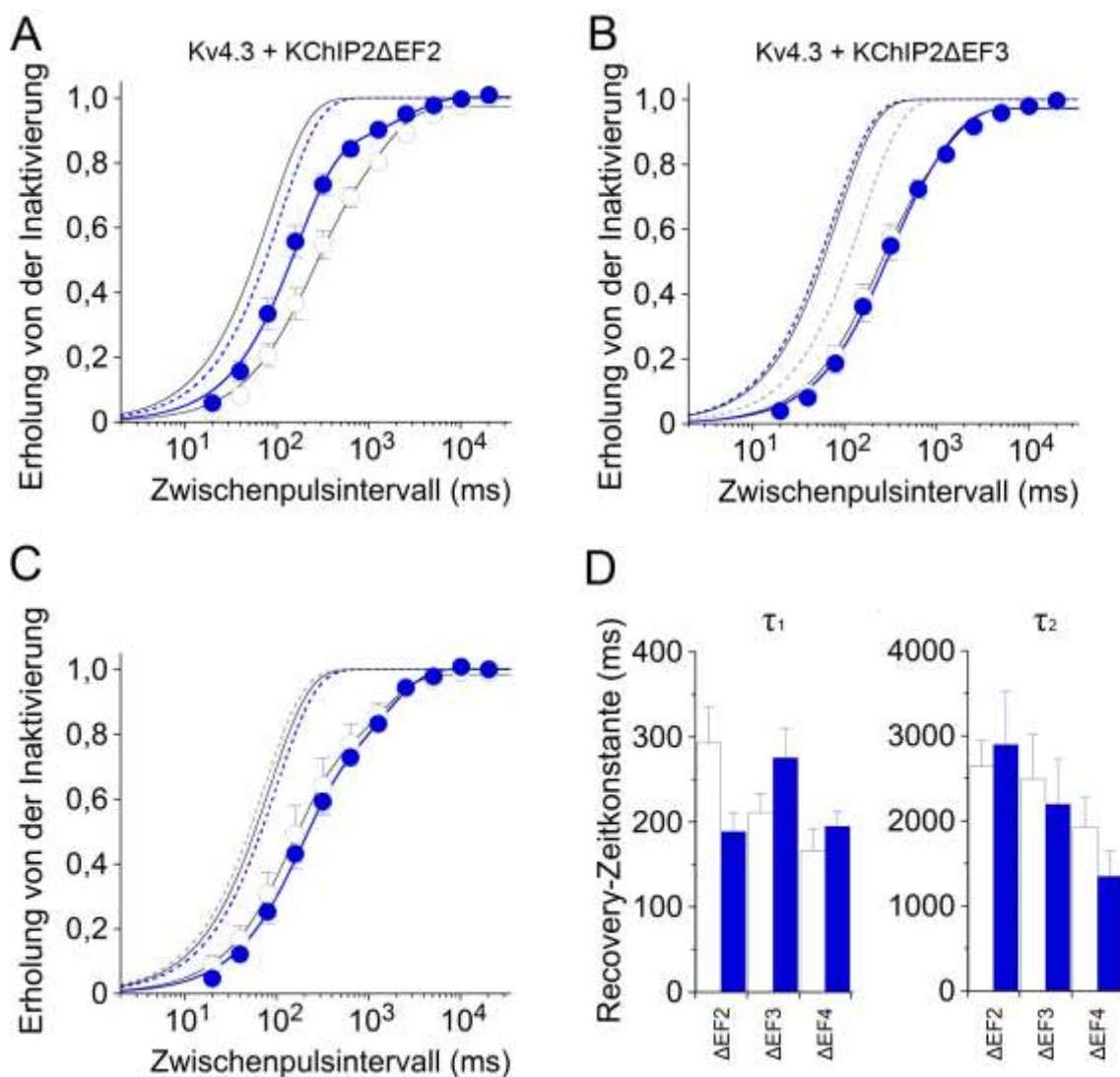


Abbildung 3.8: Erholung von der Inaktivierung von Kv4.3/KChIP2-EF-Hand-Mutanten mit 1 μ M KN-93

A Die relativen Stromamplituden wurden gegen das Zwischenpuls-Intervall semi-logarithmisch aufgetragen und die Daten mit einer 2-fach-exponentiellen Funktion beschrieben (siehe Material und Methoden). Es sind die Ergebnisse für Kv4.3/KChIP2 Δ EF2 in BAPTA-AM (weiß) und 50 μ M Ca $^{2+}$ (blau) mit KN-93 gezeigt, für Kv4.3/KChIP2 Δ EF2 ohne Blocker in BAPTA und 50 μ M Ca $^{2+}$ (grau bzw. blau gestrichelte Linie), sowie für Kv4.3/KChIP2-Komplexe ohne Blocker (schwarze Linie). **B** Es sind die Ergebnisse für Kv4.3/KChIP2 Δ EF3 in BAPTA-AM (weiß) und 50 μ M Ca $^{2+}$ (blau) mit KN-93 gezeigt, für Kv4.3/KChIP2 Δ EF3 ohne Blocker in BAPTA und 50 μ M Ca $^{2+}$ (grau bzw. blau gestrichelte Linie), sowie für Kv4.3/KChIP2-Komplexe ohne Blocker (schwarze Linie). **C** Es sind die Ergebnisse für Kv4.3/KChIP2 Δ EF4 in BAPTA-AM (weiß) und 50 μ M Ca $^{2+}$ (blau) mit KN-93 gezeigt, für Kv4.3/KChIP2 Δ EF4 ohne Blocker in BAPTA und 50 μ M Ca $^{2+}$ (grau bzw. blau gestrichelte Linie), sowie für Kv4.3/KChIP2-Komplexe ohne Blocker (schwarze Linie). **D** Mittelwerte der Recovery-Zeitkonstanten (siehe Tab. 3.13) für BAPTA-AM (weiß) und 50 μ M Ca $^{2+}$ (blau) mit KN-93.

Bei der statistischen Auswertung wurden die relevanten schnellen Komponenten der Erholung von der Inaktivierung miteinander verglichen. Es zeigte sich eine beschleunigte initiale Erholung von der Inaktivierung für KChIP2 Δ EF2 in 50 μ M Ca $^{2+}$ (BAPTA-AM: $\tau_{1,rec-80}$ =274 ms, 50 μ M Ca $^{2+}$: $\tau_{1,rec-80}$ =180 ms). Die schnellen Komponenten der Recovery-Zeitkonstanten von KChIP2 Δ EF3 (BAPTA-AM: $\tau_{1,rec-80}$ =226 ms, 50 μ M Ca $^{2+}$: $\tau_{1,rec-80}$ =253 ms) und KChIP2 Δ EF4 (BAPTA-AM: $\tau_{1,rec-80}$ =

157 ms, 50 μM Ca^{2+} : $\tau_{1,\text{rec-80}}=195$ ms) zeigten dagegen keine signifikanten Veränderungen zwischen BAPTA-AM und 50 μM Ca^{2+} (siehe Tab. 3.13).

Tabelle 3.13: Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung für KChIP2-EF-Hand-Mutanten mit 1 μM KN-93

<i>Pipettenlösung</i>	$\tau_{1,\text{rec-80}}$ (ms)	$\tau_{2,\text{rec-80}}$ (ms)	<i>n</i>
KChIP2$_{\Delta\text{EF}2}$			
BAPTA-AM	274 \pm 42 ^a	2640 \pm 310	10
50 μM Ca^{2+}	180 \pm 22	2950 \pm 575	12
KChIP2$_{\Delta\text{EF}3}$			
BAPTA-AM	226 \pm 22	2160 \pm 490	13
50 μM Ca^{2+}	253 \pm 33	2320 \pm 530	13
KChIP2$_{\Delta\text{EF}4}$			
BAPTA-AM	157 \pm 24	1740 \pm 370	10
50 μM Ca^{2+}	195 \pm 18	949 \pm 300	10

$\tau_{1\text{rec}(-80)}$, $\tau_{2\text{rec}(-80)}$: Recovery-Zeitkonstanten bei Zwischenpuls-Potenzialen von -80 mV; Signifikanzen wurden mit dem t-Test nach Student untersucht (^a $p=0,0333$ relativ zu 50 μM Ca^{2+}).

Zusammenfassend zeigt sich in Gegenwart von KN-93 für KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2}$ in 50 μM Ca^{2+} eine signifikante Beschleunigung der Recovery-Kinetik, die ohne KN-93 nicht zu beobachten war. Für KChIP2 $_{\Delta\text{EF}3}$ und KChIP2 $_{\Delta\text{EF}4}$ kommt es dagegen unter dem Einfluss von KN-93 zu keinen signifikanten Veränderungen der Recovery-Kinetik, obwohl diese ohne KN-93 in 50 μM Ca^{2+} für KChIP2 $_{\Delta\text{EF}3}$ beschleunigt und für KChIP2 $_{\Delta\text{EF}4}$ -Mutante verlangsamt war.

3.4 Zusammenfassung

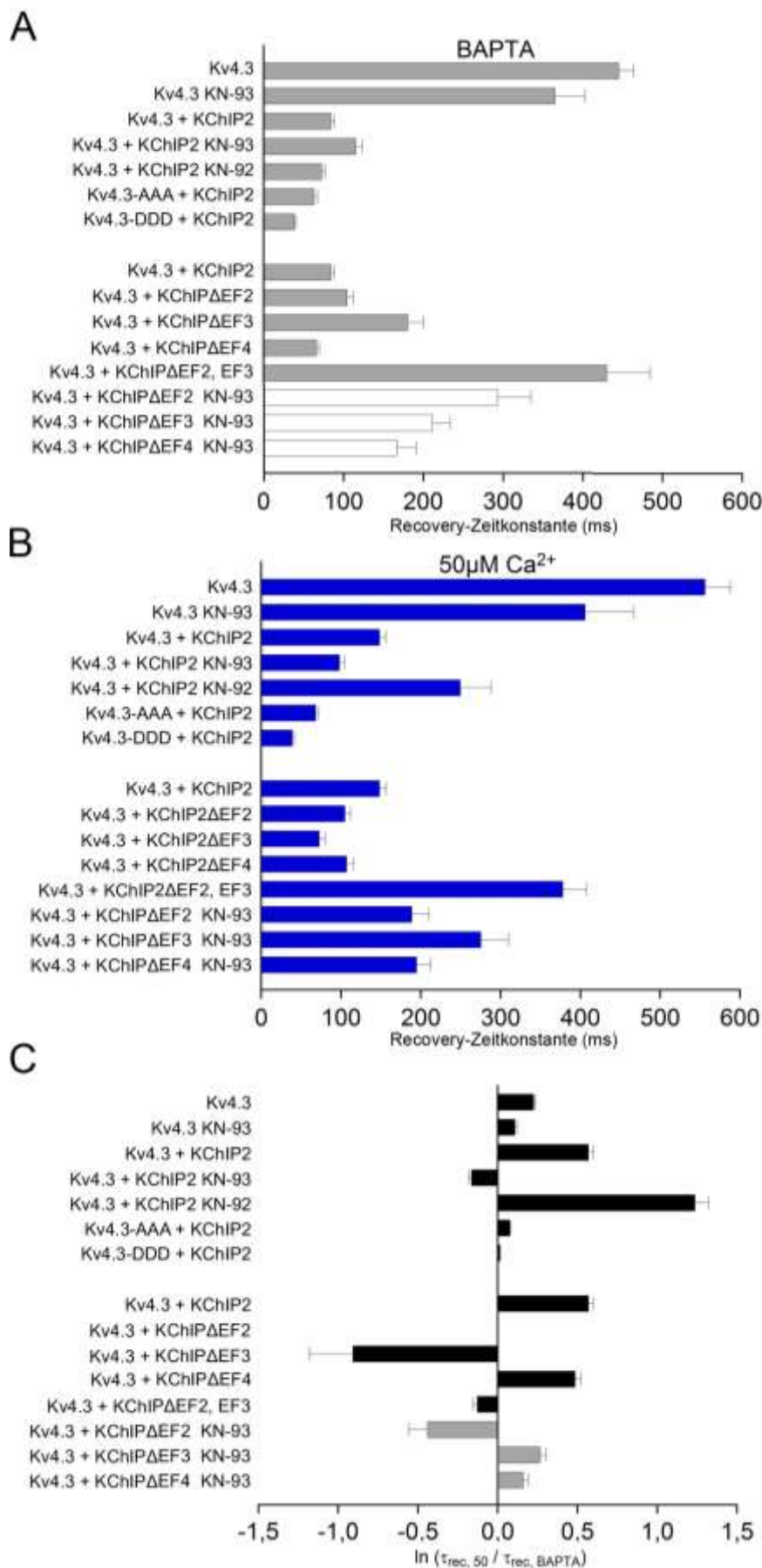


Abbildung 3.9: Zusammenfassung

In **A** und **B** sind zusammenfassend die Mittelwerte der Recovery-Zeitkonstanten mit dem jeweiligen SEM in einem Balkendiagramm dargestellt. Für Versuche mit schneller und langsamer Recovery-Komponente ist jeweils τ_1 gezeigt. **A** zeigt die Werte mit BAPTA in der ic-Lösung (grau), mit Ausnahme der Versuche der KChIP2-Mutanten und KN-93, die in BAPTA-AM durchgeführt wurden (weiß). **B** zeigt Versuche mit $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ in der ic-Lösung (blau). In **C** wurden die Mittelwerte der Recovery-Zeitkonstanten von BAPTA (schwarz) oder BAPTA-AM (grau) in ein logarithmisches Verhältnis zu den Mittelwerten der Messungen in $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ gesetzt. Es ergibt sich somit ein positiver Wert, wenn es in hohen Ca^{2+} -Konzentration zu einer Beschleunigung der Recovery-Kinetik kommt und ein negativer Wert bei einer Verlangsamung.

4 Diskussion

4.1 Ca^{2+} -Abhängigkeit der funktionellen Kv4/KChIP-Interaktion

Bei der Untersuchung der Auswirkung einer veränderten zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration auf die Kv4.3/KChIP2-Kanalkomplexe lässt sich als erstes festhalten, dass die Fähigkeit der Interaktion mit Kv4.3 bei allen vier untersuchten Ca^{2+} -Konzentrationen (BAPTA-AM, BAPTA, 10 μM und 50 μM) erhalten blieb. Sowohl in Abwesenheit von Ca^{2+} (BAPTA-AM), als auch mit hohen Ca^{2+} -Konzentrationen (50 μM) in der Patch-Pipette zeigten sich in den Experimenten die typischen Merkmale der KChIP-Modulation: die Stromdichte war erhöht bzw. nicht erniedrigt (obwohl in Kombination mit KChIP2-cDNA 10mal weniger Kv4.3-cDNA eingesetzt wurde), die makroskopische Inaktivierung verlangsamt und die Erholung von der Inaktivierung stark beschleunigt. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass die durch Ca^{2+} -Bindung an die EF-Handmotive ausgelöste mögliche Konformationsänderungen in den helikalen KChIP-Anteilen (Lin et al. 2004; Pioletti et al. 2006) per se nicht entscheidend für die Interaktion von KChIP2 mit Kv4.3 sind. Unterstützt wird dieses Fazit durch die Experimente von An und Mitarbeitern (2000). Basierend auf Immunpräzipitationen und elektro-physiologischen Experimenten wurde berichtet, dass die KChIP1 dreifach EF-Hand-Mutante trotz fehlender Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit an Kv4 α -Untereinheiten bindet, wobei eine Modulation des Kv4.2-Stroms durch diese KChIP1-Mutante allerdings nicht mehr stattfand (An et al. 2000). Übereinstimmend zu diesen Bindungsstudien zeigte die Co-Immunopräzipitation eines N-terminalen Kv4.2-Fragments mit KChIP2 keine Ca^{2+} -Abhängigkeit (Bähring et al. 2001).

In einigen Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde BAPTA-AM bereits fünf Stunden nach der Transfektion zur Badlösung hinzugefügt. BAPTA-AM ist ein membrangängiges Derivat von BAPTA, einem hoch selektiven Ca^{2+} -Chelator, der zur Kontrolle der intrazellulären und extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration genutzt wird (Tsien 1980). BAPTA ist selektiver für Ca^{2+} ($K_d=160-700$ nM) als EDTA und EGTA, in seiner Bindungsaffinität weniger pH sensitiv und 50-400 mal schneller bei der Bindung bzw. Abgabe von Ca^{2+} -Ionen (Pethig et al. 1989). Die durchgeführten Versuche mit BAPTA-AM zeigten, dass auch ein frühzeitiger und längerfristiger Ca^{2+} -Entzug nicht kritisch für die initiale Faltung und Bindung von KChIP2 am Kv4.3-Kanal ist. Allerdings war das typische Crossover der A-Typ-Stromkurve,

dass in Gegenwart von KChIP durch erhöhte τ_1 - und τ_2 -Werte, sowie erniedrigte τ_3 -Werte entsteht, mit BAPTA-AM nicht zu sehen. Ursächlich hierfür war, dass es bei der makroskopischen Inaktivierung mit BAPTA-AM zu keiner signifikanten Veränderung von τ_1 , amp_1 und amp_2 kommt und τ_2 erniedrigt anstatt erhöht war. Die KChIP2-vermittelte Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung war dagegen unabhängig von kurzfristigen (BAPTA) oder längerfristigen (BAPTA-AM) Ca^{2+} -Entzug zu beobachten. Aufgrund der beschriebenen Vorgehensweise (siehe Material und Methoden) bleibt jedoch ein kleines Zeitfenster, in dem theoretisch die Proteinsynthese und die anschließende Interaktion mit dem Kv4.3-Kanal für einige KChIPs schon stattgefunden haben könnte. Insgesamt widerlegen die Ergebnisse jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit trotzdem die von Pioletti et al (2006) publizierte These, die Ca^{2+} -Bindung an KChIP sei für die initiale Faltung und Bindung am Kv4-Kanal essentiell. Pioletti und Mitarbeiter schlussfolgerten dies aufgrund von Messungen des Dichroismus und aufgrund von dynamischen Streulichtmessungen. Unter Ca^{2+} -Entzug zeigte sich in ihren Experimenten bei Messung des Dichroismus eine weniger helikale Struktur des KChIPs. Diese Konformationsänderung sei dafür verantwortlich, dass in dynamischen Streulichtmessungen unter Ca^{2+} -Entzug die zunächst monodisperse Proteinlösung Aggregate bildet (Pioletti et al. 2006).

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Kv4.3-KChIP-Interaktion in allen vier Ca^{2+} -Konzentrationen stattfindet, wurde als nächstes die Ca^{2+} -abhängige Modulation der Kv4.3-Inaktivierungskinetik untersucht. Die Ca^{2+} -abhängige Modulation des Kv4-Kanals wurde bisher in heterologen Expressionssystemen, Myozyten und Neuronen erforscht. Eine der ersten Versuche zur Untersuchung des direkten Ca^{2+} -Einflusses auf den Kaliumauswärtsstrom wurde an hippocampalen Neuronen von Meerschweinchen durchgeführt. Als Ergebnis wurde eine Unterdrückung des durch Depolarisation aktivierten somatodendritischen A-Typ-Stroms in hohen Ca^{2+} -Konzentrationen beschrieben (Chen und Wong 1991). Eine Ca^{2+} -abhängige Modulation des A-Stroms in den Körnerzellen von Rattenkleinhirnen wurde von Wang und Mitarbeitern (2005) gezeigt: in Patch-Clamp-Experimenten mit hohen Ca^{2+} -Konzentration kam es zu einer Erhöhung der I_A -Amplitude, einer Verlangsamung der schnellen Komponente der Inaktivierung und einem negativen Shift der Steady-State Inaktivierung, jedoch gab es keinen Einfluss auf die Erholung von der Inaktivierung. Als Ursache hierfür wurde über eine Ca^{2+} -abhängige KChIP-Modulation gemutmaßt (Wang et al. 2005). In

Versuchen zu Cav3-Kv4-Kanalkomplexen in Rattenstellatumzellen konnte gezeigt werden, dass KChIP3 als physiologischer Calciumsensor für Kv4-Kanäle fungiert. Die Experimente ließen den Schluss zu, dass Ca^{2+} -Einstrom über KChIP3 zu einer Rechtsverschiebung der Inaktivierungskurve führt und damit zu einer I_A -Amplitudenzunahme (Anderson et al. 2010). Die Betrachtung der publizierten Literatur lässt darauf schließen, dass in der vorliegenden Arbeit erstmals Experimente durchgeführt wurden, die direkt den Einfluss von variierenden intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen auf die Inaktivierungskinetik definierter Kv4-Kanalkomplexe (Kv4.3/KChIP2) untersuchten. Als ein wichtiges Ergebnis der Versuche mit Kv4.3/KChIP2-Komplexen kann festgehalten werden, dass eine von der Ca^{2+} -Konzentration abhängige Modulation bestätigt wurde. Den größten Einfluss hatte die Ca^{2+} -Konzentration dabei auf die Erholung von der Inaktivierung, bei der es in hoher intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration zu einer deutlichen Verlangsamung der Recovery-Kinetik kam. Die makroskopische Inaktivierung wurde dagegen nur geringfügig durch die vorherrschende Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst.

Zusammenfassend zeigen die Experimente der Kv4.3/KChIP2-Komplexe, dass die KChIP2-vermittelte Modulation durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration gesteuert wird, die Ca^{2+} -Konzentration jedoch nicht kritisch für die KChIP2-Bindung ist. Die in der vorliegenden Arbeit durch elektrophysiologische Experimente gewonnenen Erkenntnisse werden durch spektrometrische Experimente und Pull-down-Assays der Arbeitsgruppe von Chang unterstützt: Wie auch schon Pioletti et al. (2006) konnten diese Autoren zeigen, dass Ca^{2+} -Bindung zu einer Veränderung in der helikalen Konformation der Proteinstruktur von KChIP2.1 und KChIP2.2 führt (Lin et al. 2004). Weiterhin stellten sie fest, dass erhöhte Ca^{2+} und Mg^{2+} -Konzentrationen signifikant die Interaktion zwischen Kv-Kanal und KChIP2.2 verstärken, jedoch für die initiale Proteinfaltung und Bindung nicht notwendig sind (Chen et al. 2006). Auf die Rolle der einzelnen EF-Handmotive bei der Modulation wird in Kapitel 4.3 genauer eingegangen.

4.2 Modulation der I_{to} -Kanaleigenschaften durch CaMKII und deren Inhibitoren

Die experimentellen Befunde mit homotetrameren Kv4.3-Kanälen legen nahe, dass der I_{to} nicht allein durch die Ca^{2+} -Bindung an die EF-Handmotive von KChIP2 moduliert wird. Die Verlangsamung der Recovery-Kinetik der Kv4.3-Homotetra-

mere in hohen Ca^{2+} -Konzentrationen muss durch einen weiteren Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus zustande kommen. Im Kv4.3-Kanalprotein wurden verschiedene mögliche Phosphorylierungsstellen für cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), Proteinkinase C (PKC), extrazellulär regulierte Kinase (ERK) und Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII) identifiziert (Isbrandt et al. 2000).

Das Hauptaugenmerk lag in dieser Arbeit auf der CaMKII, da diese nicht nur mit Kv4.2/Kv4.3 Untereinheiten co-immunopräzipitiert (El-Haou et al. 2009), sondern eine Hauptrolle bei der Regulierung des kardialen $I_{\text{to},f}$ (Kv4.2/Kv4.3) und $I_{\text{to},s}$ (Kv1.4) spielt (Niwa und Nerbonne 2010). Die CaMKII wird durch die Bindung von Ca^{2+} -gebundenem Calmodulin aktiviert, was eine Autophosphorylierung bewirkt (Couchonnal und Anderson 2008). Anschließend können Zielstrukturen wie die Kv4.3-Untereinheit phosphoryliert werden. Kv4.3 besitzt hierfür als Zielstruktur eine CaMKII-Phosphorylierungsstelle am N-Terminus und zwei weitere am C-Terminus (Isbrandt et al. 2000). Eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch eine physiologisch relevante endogene CaMKII-Aktivität in Zellen der HEK293-Zelllinie ist denkbar.

Um einen über CaMKII vermittelten Effekt und einen über KChIP2-vermittelten Effekt von Ca^{2+} zu differenzieren, wurden Experimente mit KN-93, einem spezifischen Blocker der CaMKII, durchgeführt. KN-93 blockiert, mit einer IC_{50} von 370 nM, kompetitiv die Calmodulin Bindungsdomäne und verhindert damit die Stimulation des Enzyms (Sumi et al. 1991). In der vorliegenden Arbeit bewirkte KN-93 in Versuchen mit Kv4.3-Homotetrameren, sowie auch mit Kv4.3/KChIP2-Komplexen eine deutlich langsamere initiale (τ_1) und intermediäre (τ_2) makroskopische Inaktivierung. Bei der Erholung von der Inaktivierung bewirkte KN-93 eine doppelt-exponentielle Kinetik, so dass diese nur eingeschränkt mit den einfach-exponentiellen Ergebnissen ohne KN-93 zu vergleichen sind. Die zusätzliche langsame Zeitkonstante kommt am ehesten dadurch zustande, dass KN-93, neben seiner Eigenschaft als CaMKII-Blocker, auch eine direkte Wirkung auf die Kv4-Stromkinetik hat. KN-93 ist ein potenter extrazellulärer „Open Channel Blocker“ (Rezazadeh et al. 2006) und beeinflusst sowohl den Spitzen- und Späten-Kv-Strom, als auch die Inaktivierungsrate (Ledoux et al. 1999). Die direkten Effekte von KN-93 auf die Kv4-Stromkinetik sind jedoch unabhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der CaMKII-Aktivität (Ledoux et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wird der Fokus jedoch auf Ca^{2+} -abhängige Effekte gelegt, so

dass die Ergebnisse unter Zugabe von KN-93 untereinander vergleichbar bleiben. So fällt beim Vergleich der Messdaten der Kv4.3/KChIP2-Komplexe mit KN-93 in niedrigen und hohen Ca^{2+} -Konzentration auf, dass in hohen Ca^{2+} -Konzentrationen die Erholung von der Inaktivierung deutlich gegenüber den Messungen in niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen beschleunigt ist. Durch Einbeziehung der Ergebnisse der Kv4.3/KChIP2-Komplexe ohne KN-93 lassen sich die unterschiedlichen Einflüsse von CaMKII und KChIP2 auf den Kv4-Kanal aufschlüsseln, was zu der folgenden Hypothese führt: Bei blockierter CaMKII kommt es durch die Bindung von Ca^{2+} an die KChIP2-EF-Handmotive zu einer Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung. Die durch die Ca^{2+} -Bindung bedingten Konformationsänderungen in den helikalen Strukturen des KChIP2-Proteins führen zu einer Verstärkung der Kv4.3/KChIP2-Interaktion und -Modulation. Wie die Versuche ohne KN-93 zeigen, wird diese Beschleunigung jedoch durch einen stärkeren, entgegengesetzten Effekt der aktivierten CaMKII kompensiert oder sogar umgekehrt. Insgesamt kommt es so in hohen Ca^{2+} -Konzentrationen durch die Aktivierung der CaMKII, die den Kv4-Kanal phosphoryliert, zu einer Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung.

Diese Schlussfolgerungen stehen in deutlichem Widerspruch zu den Resultaten von Sergeant und Mitarbeitern (2005), die den Einfluss der CaMKII auf die Kv4.3-Stromkinetik (ohne Coexpression von KChIP) mit Patch-Clamp-Versuchen an HEK293-Zellen untersuchten. Bei Versuchen mit autophosphorylierter CaMKII kam es hier zu einer Beschleunigung der Recovery-Kinetik, während sich bei Zugabe von 0,3 μM KN-93 eine Verlangsamung der Recovery-Kinetik zeigte (Sergeant et al. 2005). Kritisch muss in dieser Publikation jedoch gesehen werden, dass KN-93 in einer Konzentration eingesetzt wurde, in der die IC_{50} der CaMKII noch nicht erreicht ist, so dass noch ausreichend aktivierte CaMKII zur Phosphorylierung des Kv4.3-Kanals vorhanden gewesen sein könnte. Außerdem wurden viele Zellen aufgrund von zu großen Strömen von der Auswertung ausgeschlossen und aus technischen Gründen musste zum Teil auf eine Serienwiderstandskompensation verzichtet werden.

Zum besseren Verständnis der vielfältigen direkten und indirekten Auswirkungen von KN-93 auf die Kv4-Stromkinetik wurden zusätzliche Experimente mit KN-92, einem inaktiven Struktur analog von KN-93, durchgeführt. KN-92 hat ein ähnliches Hemmungsprofil von Spitzen- und Späten-Kv-Strom wie KN-93, jedoch ist die Inhibition insgesamt weniger potent (Ledoux et al. 1999). Bei der Auswertung der

Versuche mit KN-92 zeigte sich eine einfach-exponentielle Recovery-Kinetik, die im Rahmen der weniger starken direkten Effekte auf den Kv4-Kanal zu sehen ist. Außerdem war die Erholung von der Inaktivierung in Versuchen mit $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ im Vergleich zu BAPTA signifikant langsamer. In Zusammenschau mit den Resultaten von Kv4.3/KChIP2-Komplexen mit und ohne KN-93 bestätigen die KN-92-Versuche nochmals die obige Schlussfolgerung, dass es durch Ca^{2+} aktivierte CaMKII KChIP-abhängig zu einer Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung kommt.

Um den Mechanismus der CaMKII abhängigen Kontrolle der I_{to} -Kanaleigenschaften weiter aufzuklären, wurden weitere Experimente mit zwei verschiedenen Kv4.3-Mutanten durchgeführt. In der ersten Kv4.3-Mutante (Kv4.3-AAA) wurden jeweils an den drei CaMKII-Phosphorylierungsstellen Serin bzw. Threonin zu Alanin mutiert, so dass eine Phosphorylierung von Kv4.3 durch die CaMKII nicht möglich war. Bei der Auswertung zeigte sich für Kv4.3-AAA in beiden Ca^{2+} -Konzentrationen, im Vergleich zum Wildtyp-Kv4.3/KChIP2-Komplex (mit und ohne Zugabe von KN-93) eine sehr viel schnellere Erholung von der Inaktivierung. Dieses Ergebnis ist unter der Annahme, dass eine Phosphorylierung des Kv4.3-Kanals durch die CaMKII nicht stattfindet, schlüssig, da die Phosphorylierung im Wildtyp-Kv4.3/KChIP2-Komplex eine Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung bewirkt. Aufgrund der ausgeschalteten Modulation durch die CaMKII sollte beim Vergleich der Messdaten in niedrigen und in hohen Ca^{2+} -Konzentration nun der beschleunigende Effekt der Ca^{2+} -Bindung an den KChIP2-EF-Handmotiven auf die Erholung von der Inaktivierung zu beobachten sein. Entgegen dieser Erwartung konnte jedoch kein signifikanter Ca^{2+} -abhängiger Unterschied in den Recovery-Zeitkonstanten gemessen werden. Ein Grund hierfür könnte eine nach oben hin begrenzte Fähigkeit von KChIP2 sein, die Erholung von der Inaktivierung zu beschleunigen. Vorstellbar wäre, dass es ähnlich wie bei der Recovery-Kinetik von Kv4.3/KChIP2 bei -120 mV zu einer Sättigung der Recovery-Geschwindigkeit kommt und somit die Ca^{2+} -Bindung an die KChIP2-EF-Handmotive keine weitere Beschleunigung bewirken kann.

In der zweiten Kv4.3-Mutante (Kv4.3-DDD) wurde jeweils das Serin bzw. Threonin der drei CaMKII-Phosphorylierungsstellen zu Aspartat mutiert, so dass eine Pseudophosphorylierung entstand. Wie für Kv4.3-AAA konnte auch bei den Messungen der Kv4.3-DDD-Mutante eine starke Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung im Vergleich zum Wildtyp-Kv4.3/KChIP2-Komplex beo-

bachtet werden, die jedoch ebenfalls keine weiteren von der Ca^{2+} -Konzentration abhängigen Effekte aufwies. Für letzteres könnte, wie bei Kv4.3-AAA, eine Sättigung der Recovery-Geschwindigkeit verantwortlich sein. Das Ergebnis der stark beschleunigten Erholung von der Inaktivierung steht dagegen im Widerspruch zur vermuteten starken Verlangsamung durch die den CaMKII-Effekt nachahmende Pseudophosphorylierung. Als Ursache für die starke Beschleunigung der Recovery-Kinetik für Kv4.3-DDD muss diskutiert werden, ob gegebenenfalls die Pseudophosphorylierung durch Aspartat nicht ausreichend ist, um den Effekt der aktivierten CaMKII nachzuahmen. Alternativ ist es möglich, dass die CaMKII nicht alle drei Phosphorylierungsstellen des Kv4.3-Kanals gleichermaßen zur Modulation der Kanaleigenschaften nutzt, so dass durch die dreifache Mutation eine inadäquate Vereinfachung des Sachverhalts vorliegt, die dem System mit den verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der Kv4.3-Phosphorylierung nicht gerecht wird. In der bereits weiter oben diskutierten Publikation von Sergeant et al. (2005) wurde zum Beispiel beschrieben, dass die CaMKII-abhängige Modulation der Kv4.3-Stromkinetik primär durch die zweite Phosphorylierungsstelle am C-Terminus stattfindet. Nicht zuletzt war in den Messungen beider Kv4.3-Mutanten die verhältnismäßig kleine Stromamplitude auffällig. Es ist, wie bei allen Mutationen, nicht auszuschließen, dass durch die dreifache Kv4.3-Mutation eine Veränderung der Proteinstruktur ausgelöst wird, die unter Umständen einen verminderten Transport des Proteins zur Membran bewirkt oder anderweitig die Funktionsweise des Kanals beeinflusst und damit die geringe Stromamplitude oder auch die beschleunigte Recovery-Kinetik erklärt.

In Zusammenschau der durchgeführten Experimente zur Kontrolle der Kv4.3/KChIP2-Kanaleigenschaften durch die CaMKII kann festgehalten werden, dass es durch Aktivierung der CaMKII in hohen Ca^{2+} -Konzentrationen vor allem zu einer Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung kam. Bei Inhibition der CaMKII konnte dieser Effekt nicht mehr beobachtet werden. Die CaMKII besitzt damit einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die Modulation der Kv4-Stromkinetik. Insgesamt ist aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten der Interaktionen eine abschließende Beurteilung der CaMKII-Funktion und Aufgabe bei der I_{to} -Regulation in den humanen Kardiomyozyten schwierig.

Zusätzlich müssen Hinweise auf ein Reservoir inaktiver CaMKII (Keskanokwong et al. 2011) bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Keskanokwong und Kollegen fanden in ventrikulären Myozyten signifikante Mengen

inaktiver CaMKII, die sich nicht durch hohe Ca^{2+} -Konzentration aktivieren ließen. Ursächlich hierfür zeigte sich in ihren Experimenten die Bindung von Kv4.3 an die Calmodulin-Bindungsstelle der inaktiven CaMKII. Eine Aktivierung der gebundenen CaMKII durch Ca^{2+} sei nur bei reduzierter Kv4.3-Expression möglich (Keskanokwong et al. 2011). Außerdem wurde publiziert, dass die Assoziation von CaMKII mit Kv4.3 auch bei nicht erhöhten intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentrationen stattfindet und die Kv4.3 Proteine ebenfalls bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentration phosphoryliert werden können (Colinas et al. 2006). Neben den direkten Effekten auf die Kv4.3-Stromkinetik wurde in isolierten ventrikulären Hundemyozyten gezeigt, dass eine gesteigerte CaMKII-Aktivität zu einer herabgesetzten KCND3 (Kv4.3) Expression führt und somit eine Abnahme der $I_{\text{to,f}}$ -Dichte bewirkt wird (Xiao et al. 2008). Insbesondere um auch die Messergebnisse der beiden Kv4.3-Mutanten besser beurteilen zu können, sollten weitere Experimente durchgeführt werden. Zum einen wären elektrophysiologische Versuche, die vor allem die Erholung von der Inaktivierung betreffen, für Kv4.3-Mutanten sinnvoll, bei denen nur eine oder zwei Phosphorylierungsstellen durch Mutation verändert worden sind. Ergänzend könnte durch Protein-Assays untersucht werden, ob die Kv4.3-Mutationen die KChIP-Bindung an den Kv4.3-Kanal beeinflussen. Außerdem sollte nach möglichen weiteren Angriffspunkten der CaMKII, wie z.B. direkt am KChIP-Protein, gesucht werden.

4.3 Bedeutung der einzelnen KChIP2-EF-Handmotive für die Ca^{2+} -abhängigen Regulation des Kv4.3-Kanals

Nachdem eine von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängige Modulation der Kv4.3/KChIP2-Komplexe gezeigt und unter Berücksichtigung des CaMKII-Signalweges diskutiert wurde, soll nun auf die Bedeutung der einzelnen EF-Handmotive für die Ca^{2+} -abhängige Regulation eingegangen werden. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, besitzen alle Mitglieder der KChIP-Familie vier EF-Handmotive (An et al. 2000; Burgoyne und Weiss 2001) von denen alle, bis auf EF1, die Fähigkeit besitzen Ca^{2+} zu binden (Flaherty et al. 1993; Vijay-Kumar und Kumar 1999; Bourne et al. 2001; Zhou et al. 2004; Chen et al. 2006). Um die funktionale Rolle der einzelnen EF-Handmotive und ihren Beitrag zur Ca^{2+} -abhängigen Regulation der Kanaleigenschaften zu untersuchen, wurden Experimente mit den EF-Hand-Mutanten KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2}$, KChIP2 $_{\Delta\text{EF}3}$, KChIP2 $_{\Delta\text{EF}4}$ und KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2, \text{EF}3}$ durchgeführt.

Im Gegensatz zu den zahlreichen anderen Studien, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nur der Effekt einer EF-Handmutation untersucht, sondern auch die Ca^{2+} -Abhängigkeit der entsprechenden Mutantenkomplexe. Die Versuche der vorliegenden Arbeit waren auf EF-Hand-Mutanten beschränkt, von denen bekannt war, dass bei ihnen die Fähigkeit, den Kv4-Kanal zu modulieren, erhalten ist. Die Auswahl der EF-Hand-Mutanten basiert auf der Publikation von Pioletti und Mitarbeitern (2006). In ihrer Arbeit wurde gezeigt, dass es bei gleichzeitiger Mutation aller drei funktionalen EF-Handmotive, also KChIP1 $_{\Delta\text{EF}2, \text{EF}3, \text{EF}4}$, zu einem Verlust der Modulationsfähigkeit und Bindungsfähigkeit des Kv4-Kanals kommt. Für die Einzelmutanten KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2}$, KChIP $_{\Delta\text{EF}3}$ und KChIP2 $_{\Delta\text{EF}4}$, sowie für die Doppelmutanten KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2, \text{EF}3}$ und KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2, \text{EF}4}$ blieb die Bindungsfähigkeit in Pull-down-Assays dagegen erhalten. Die elektrophysiologischen Messungen zeigten anschließend, dass die Stromamplitude und die kinetischen Eigenschaften von Kv4.3 coexprimiert mit KChIP1 $_{\Delta\text{EF}2}$, KChIP1 $_{\Delta\text{EF}3}$ und KChIP1 $_{\Delta\text{EF}2, \text{EF}4}$ vergleichbar zu denen von Kv4.3 coexprimiert mit KChIP1wt waren. Bei Messungen mit KChIP1 $_{\Delta\text{EF}3}$ und KChIP1 $_{\Delta\text{EF}2, \text{EF}4}$ waren die modulatorischen Effekte von der eingesetzten Proteinmenge abhängig. Bei einer Reduktion der relativen KChIP1-Menge von (Kv4.3:KChIP1) 1,5:1 auf 3,5:1 waren die beiden Mutanten nicht mehr in der Lage die Kinetik von Kv4.3 zu beeinflussen. Die Mutanten KChIP1 $_{\Delta\text{EF}3, \text{EF}4}$ und KChIP1 $_{\Delta\text{EF}2, \text{EF}3, \text{EF}4}$ hatten jeglichen Einfluss auf den Kv4-Kanal verloren, so dass die aufgezeichnete Stromkinetik der von Kv4.3-Homotetrameren entsprach (Pioletti et al. 2006).

Die in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Daten unterstützen die Annahme, dass alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mutanten (KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2}$, KChIP2 $_{\Delta\text{EF}3}$, KChIP2 $_{\Delta\text{EF}4}$ und KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2, \text{EF}3}$) die Fähigkeit behalten haben an den Kv-Kanal zu binden, sowohl in niedrigen, als auch in hohen Ca^{2+} -Konzentrationen. Die typischen Veränderungen der Kanaleigenschaften, ausgelöst durch die Bindung von KChIPs, wie die Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung und die Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung sind für die Mutanten, mit Ausnahme der Doppelmutante KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2, \text{EF}3}$, in allen Ca^{2+} -Konzentrationen erhalten geblieben. Bei Messungen mit KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2, \text{EF}3}$ kam es zwar zur KChIP2 typischen Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung, jedoch blieb eine signifikante Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung aus. Diese Messdaten lassen vermuten, dass eine Bindung der KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2, \text{EF}3}$ -Mutante an den Kv4.3-Kanal stattfindet, eine Modulation der Erholung von der Inaktivierung jedoch nicht mehr

möglich ist. Aus diesem Resultat kann möglicherweise abgeleitet werden, dass die Erholung von der Inaktivierung sensibler gegenüber Mutationen in den EF-Handmotiven ist als die makroskopische Inaktivierung.

Interessant sind in diesem Zusammenhang die publizierten Daten aus Experimenten mit einer minimalen KChIP2d-Isoform, die aus Frettchenherzen isoliert wurde (Patel et al. 2002). KChIP2d korrespondiert zu den 70 C-terminalen Aminosäuren der längeren KChIP2-Splicevarianten und besitzt somit nur das EF-Handmotiv 4. KChIP2d ist somit bezüglich der vorhandenen EF-Handmotive am ehesten mit KChIP2 $_{\Delta EF2, EF3}$ zu vergleichen, auch wenn eine unterschiedliche Proteinfaltung anzunehmen ist. Patel und Mitarbeiter (2002) konnten zeigen, dass die minimale KChIP2d-Isoform die KChIP-typischen Effekte auf die Kv4.3 Stromkinetik hatte: Die makroskopische Inaktivierung war verlangsamt und die Erholung von der Inaktivierung beschleunigt. In Experimenten mit KChIP2d und BAPTA-AM blieb der regulatorische Effekt auf die Erholung von der Inaktivierung erhalten, während die makroskopische Inaktivierung weitestgehend der von Kv4.3-Homotetrameren, entspricht. Es wird geschlossen, dass ausschließlich die makroskopische Inaktivierung Ca^{2+} -abhängig über das EF-Handmotiv moduliert wird und es einen weiteren, EF-Handmotiv unabhängigen, Mechanismus für die Erholung von der Inaktivierung gibt (Patel et al. 2002). Diese These steht in Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der eine von der Ca^{2+} -Konzentration abhängige KChIP2-vermittelte Modulation der Recovery-Kinetik gezeigt werden konnte (siehe Kap. 3.1.1). Die Aussagekraft der Experimente von Patel und Mitarbeitern ist folglich auf die untersuchte KChIP2d-Isoform limitiert und kann nicht als allgemeingültig für KChIP2 gelten.

Um die elektrophysiologischen Effekte der einzelnen EF-Handmotive zu beurteilen, wurden, aufgrund des in Kapitel 4.2 diskutierten Einflusses der CaMKII auf die Kinetik, Versuche mit und ohne KN-93 durchgeführt. Ohne den CaMKII-Inhibitor KN-93 kam es mit KChIP2 $_{\Delta EF3}$ in hohen Ca^{2+} -Konzentrationen zu einer Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung, während es für die Mutante KChIP $_{\Delta EF4}$ zu einer Verlangsamung kam. Keine Ca^{2+} -abhängigen Veränderungen waren für die Mutante KChIP2 $_{\Delta EF2}$ zu beobachten. In Experimenten mit KN-93 führte eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} zu einer Beschleunigung der Recovery-Kinetik für KChIP2 $_{\Delta EF2}$, während keine Ca^{2+} -abhängigen Effekte für KChIP2 $_{\Delta EF3}$ und KChIP2 $_{\Delta EF4}$ zu beobachten waren.

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen für die Ca^{2+} -abhängige Recovery-Kinetik von KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2}$ (mit KN-93: keine Ca^{2+} -abhängige Veränderung; ohne KN-93: Beschleunigung in hohen Ca^{2+} -Konzentrationen) lässt sich schlussfolgern, dass die Bindung von Ca^{2+} an EF2 keinen oder nur einen geringen Anteil an der Modulation der Kv4.3-Kanaleigenschaften hat. Dagegen scheint die Ca^{2+} Bindung an EF3 und EF4 direkt die I_{to} -Stromkinetik zu beeinflussen. Unterstützt wird dieses Resultat durch mehrere Veröffentlichungen, in denen ebenfalls die Bedeutung der einzelnen KChIP-EF-Handmotive untersucht wurde. In Kristallstrukturanalysen von KChIP1-Kv4.3-T1-Komplexen konnte gezeigt werden, dass nur EF3 und EF4 in Ca^{2+} -gebundenem Zustand vorliegen, während die Ca^{2+} -Bindung an EF2 durch die Interaktion mit dem T1N Helix gestört wird (Pioletti et al. 2006). Die Ergebnisse einer Studie zur Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Bindungsaffinität von KChIP2.2 (Lee et al. 2009) sprechen ebenfalls für eine essentielle Rolle von EF3 und EF4 an der KChIP2-abhängigen Regulation der Kv4.3-Stromkinetik. Die Ca^{2+} -Bindungsaffinität wurde in dieser Arbeit für die KChIPs durch Messung der 8-Anilidonaphthalene-1-Sulfonat(ANS)-Fluoreszenz unter Ca^{2+} -Zugabe bestimmt. Für KChIP2.2wt ergaben sich in den Experimenten zwei verschiedene Typen von Ca^{2+} -Bindungsstellen, nämlich eine mit hoher und eine mit niedriger Ca^{2+} -Bindungsaffinität. Durch Mutationen des EF-Handmotives in EF3 oder EF4 ging jeweils die hohe Ca^{2+} -Bindungsaffinität des KChIPs verloren. Dagegen behielt die KChIP2 $_{\Delta\text{EF}2}$ -Mutante sowohl die hohe, als auch die niedrige Ca^{2+} -Bindungsaffinität, so dass das Ca^{2+} -Bindungsverhalten am ehesten dem von KChIP2.2wt entsprach (Lee et al. 2009).

Für KChIP2 $_{\Delta\text{EF}4}$ bedeuten die beschriebenen Ergebnisse, dass die Erholung von der Inaktivierung durch den CaMKII-Effekt in hohen Ca^{2+} -Konzentration verlangsamt wird. Unter Zugabe von KN-93 kann sich die Recovery-Kinetik nicht mehr in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration verändern, da durch die Mutation in EF4 die KChIP-abhängige Modulation beeinträchtigt ist.

Des Weiteren muss diskutiert werden, dass es in Experimenten in Abwesenheit von KN-93 mit KChIP $_{\Delta\text{EF}3}$ zu einer Beschleunigung der Recovery-Kinetik in hohen Ca^{2+} -Konzentration kam. Aufgrund der CaMKII-Aktivität wäre eine Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung, wie sie auch für KChIP2 und KChIP2 $_{\Delta\text{EF}4}$ gezeigt werden konnte, zu erwarten gewesen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sich die KChIP $_{\Delta\text{EF}3}$ -Mutante in den Experimenten von Lee und Mitarbeitern (Lee et al. 2009) ebenfalls entgegengesetzt zum KChIPwt und den

anderen EF-Hand-Mutanten verhielt. Es wurde unter anderem die Kv-Kanal-Bindungsfähigkeit von KChIP2.2wt und den Einfachmutanten mEF2, mEF3 und mEF4 in Pull-down-Assays in Abhängigkeit von der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentration untersucht. Die Auswertung zeigte, dass die Kv-Kanal-Bindungsaffinität für KChIP2 in hohen Ca^{2+} -Konzentration verstärkt wurde, während sie für mEF2 und mEF4 unverändert blieb bzw. sich nach Zugabe von Mg^{2+} für mEF4 verstärkte. Die Kv-Kanal-Bindungsfähigkeit der Mutante mEF3 wurde dagegen in hohen Ca^{2+} -Konzentrationen sogar geschwächt (Lee et al. 2009). Der Mechanismus der zu dieser gegensätzlichen Regulation führt bleibt zunächst unklar und sollte Ziel weiterführender Untersuchungen sein. Eine mögliche Erklärung könnten zusätzliche Regulationsmechanismen, wie z.B. über die Proteinkinase C sein. Denkbar wäre jedoch auch eine durch die in das EF-Handmotiv eingebrachte Mutation bedingte Veränderung der KChIP-Molekülstruktur und eine damit einhergehende Veränderung der Kv4-Modulation.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente lassen den Schluss zu, dass der Mechanismus der Ca^{2+} -abhängigen Regulation der Kv4.3/KChIP2-Inaktivierungskinetik entscheidend über die EF-Handmotive 3 und 4 vermittelt wird. Da sich die vorliegende Arbeit auf die direkten elektrophysiologischen Effekte unterschiedlicher intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen beschränkt, kann die Rolle der EF-Handmotive bei weiteren Ca^{2+} -abhängigen Regulationsmechanismen, wie der KChIP2-Bindung an Phospholipide (Liao et al. 2009), dem „Trafficking“ von Kv4.3/KChIP2-Komplexen (Hasdemir et al. 2005) und der DNA-Bindungsaffinität von KChIP2 (Osawa et al. 2005), nicht weiter beurteilt werden. Es ist also durchaus möglich, dass EF2 hier eine wichtige Funktion bei der Ca^{2+} -abhängigen Steuerung übernimmt. Unter Berücksichtigung der bereits oben diskutierten Publikationen von Pioletti et al. (2006) und Lee et al. (2009) scheint es jedoch wahrscheinlicher, dass auch hier EF3 und EF4 eine Schlüsselrolle übernehmen.

4.4 Pathophysiologische Bedeutung des I_{to} und seiner Ca^{2+} -abhängigen Modulation

Kv4-Kanäle vermitteln die Repolarisation des kardialen Aktionspotenzials und sind somit mit verantwortlich für den reibungslosen Ablauf der myokardialen Kontraktion (siehe Kap. 1.1). Veränderung des I_{to} haben bedeutsame pathophy-

logische Konsequenzen unter anderem dadurch, dass sie zu lebensbedrohlichen Arrhythmien führen können.

Eines der aus einer Veränderung des I_{to} resultierenden Krankheitsbilder ist das 1992 erstmals beschriebene Brugada-Syndrom, das durch Rechtsschenkelblock, ST- Streckenhebung und plötzlichen Herztod ohne strukturelle Herzerkrankungen gekennzeichnet ist (Brugada und Brugada 1992). Es ist eine Ionenkanalkrankheit, die für 4-12 % der Fälle von plötzlichem Herztod verantwortlich gemacht werden kann (Antzelevitch et al. 2005), wobei die Prävalenz mit 5/10000 großen geographischen Schwankungen unterliegt (Hermida et al. 2000). Das Brugada-Syndrom kommt durch ein Ungleichgewicht von positiven ein- und auswärtsgerichteten Ionenströmen während der initialen Repolarisierung (Phase 1) zustande. Neben mehr als 100 verschiedenen Mutationen, die eine Abnahme des transmembranären Na^+ -Stroms (I_{Na}) oder L-Typ-Calcium-Stroms ($I_{Ca,L}$) bewirken, wurden auch „Gain of Function-Mutationen“ des I_{to} beschrieben, die ebenfalls zur Ausbildung des Brugada-Syndroms führen. Gemeinsam ist allen Mechanismen, dass sie durch relativ oder absolut erhöhte I_{to} -Ströme vermittelt werden und somit den charakteristischen „Notch“ und den Verlust des Aktionspotenzialplateaus verursachen (siehe Abb. 4.1; Benito et al. 2009).

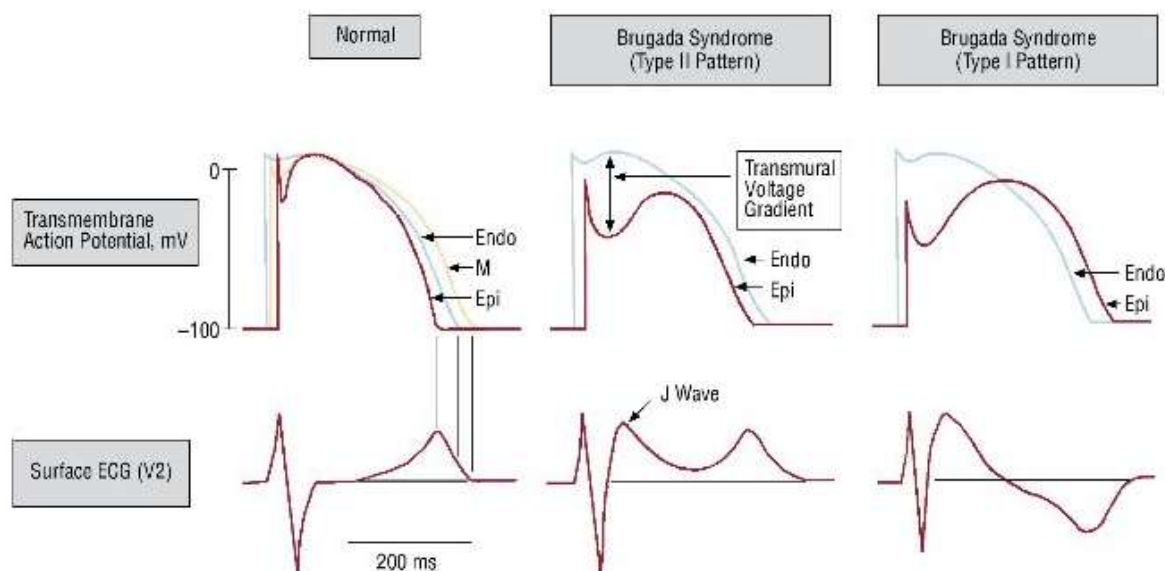


Abbildung 4.1: Entstehungsmechanismus der ST-Hebung im Brugada-Syndrom

Durch die Ausbildung eines „Notchs“ in einigen Regionen des Epikards, aber nicht im Endokard wird ein transmuraler Spannungsgradient produziert, der die J-Punkt Hebung verursacht. Bei deutlichem „Notch“ verlängert sich das Aktionspotenzial im Epikard im Vergleich zum Endokard, so dass eine ST-Hebung und eine negative T-Welle entsteht. Endo: Endokard; Epi: Epikard; M: Myokard (Benito et al. 2009).

Auch für eine Vielzahl von weiteren Herzerkrankungen wurde eine Veränderung der I_{to} -Dichte und der daraus folgenden Modulation der Repolarisationsphase des Aktionspotenzials nachgewiesen. Sowohl in Kardiomyozyten von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz (Beuckelmann et al. 1993), als auch in Kardiomyozyten von Patienten mit chronischen Vorhofflimmern wurde eine verminderte I_{to} -Dichte festgestellt (Van Wagoner et al. 1997; Bosch et al. 1999; Brandt et al. 2000). Des Weiteren besteht auch ein Zusammenhang zwischen Herzhypertrophie und Veränderungen in der Expression des I_{to} . So konnte auch hier eine Verlängerung des Herzaktionspotenzials einhergehend mit einer verminderten I_{to} -Dichte gezeigt werden (Potreau et al. 1995; Meszaros et al. 1996).

Es wird deutlich, dass eine Aufklärung der molekularen Mechanismen, die zu einem „Electrical Remodeling“ in Kardiomyozyten führen, unabdingbar für das Auffinden von therapeutischen Angriffspunkten ist. Neben den direkten Effekten auf den I_{to} , sei es durch Mutationen oder Veränderungen in der Expressionsrate, spielt bei der Pathophysiologie die durch Ca^{2+} aktivierte CaMKII eine Rolle. In Herzhypertrophie und Herzversagen konnte eine gesteigerte Expression und Aktivität der CaMKII gefunden werden (Grueter et al. 2007; Couchonnal und Anderson 2008). Über die CaMKII-Phosphorylierungsstellen am Kv4.3-Kanal kommt es zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten und diskutierten Veränderungen in der I_{to} -Inaktivierungskinetik. In verschiedenen Publikationen wurden zusätzliche Mechanismen einer CaMKII-abhängigen Regulation beschrieben. Sowohl bei chronischer Überexpression von CaMKII δ in ventrikulären Rattenmyozyten (Wagner et al. 2009), als auch bei gesteigerter CaMKII-Aktivität in ventrikulären Hundemyozyten (Xiao et al. 2008), kommt es zu einer reduzierten KCND2- bzw. KCND3-Transkription und damit einhergehend zu einer reduzierten I_{to} -Dichte. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der Kv4.3-Kanal nicht nur entscheidend für das Herzaktionspotenzial ist, sondern zusammen mit der CaMKII an der Steuerung von Apoptose und Nekrose von Kardiomyozyten im kranken Herzen beteiligt ist (Li et al. 2012).

Zusammenfassend erfordert die Komplexität der CaMKII-abhängigen Regulation noch weitere Forschung auf molekularer Ebene. Letztendlich könnten auch die verschiedenen akzessorischen Untereinheiten der Kv4-Kanäle durch die CaMKII reguliert werden, da bereits für KCHIP2 und Kv β mögliche CaMKII-Phosphorylierungsstellen gezeigt werden konnten (Marionneau et al. 2011).

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt einer variierenden zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration auf den Kv4.3/KChIP2-Kanal zu untersuchen. Die elektrophysiologischen Experimente mit intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen von null (BAPTA-AM und BAPTA) bis 50 μM zeigen eine Ca^{2+} -abhängige Modulation der Kv4.3/KChIP2-Inaktivierungskinetik. Die Ca^{2+} -Konzentration hat vor allem einen Einfluss auf die Erholung von der Inaktivierung. Durch Versuche mit Kv4.3/KChIP2-Komplexen, Kv4.3-Homotetrameren und Kv4.3-CaMKII-Site-Mutanten, sowie durch den Einsatz des CaMKII-Inhibitors KN-93 konnte gezeigt werden, dass dieser Ca^{2+} -abhängige Effekt auf die Erholung von der Inaktivierung über zwei verschiedene Mechanismen zustande kommt: Zum einem kommt es zu einer Beschleunigung der Recovery-Kinetik durch die Bindung von Ca^{2+} an die EF-Handmotive der KChIP-Proteine. Diese Beschleunigung wird jedoch durch einen stärkeren entgegengesetzten Effekt der CaMKII kompensiert. Die hohen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen bewirken eine Aktivierung der CaMKII, die wiederum den Kv4.3-Kanal phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt dazu, dass es in hohen Ca^{2+} -Konzentrationen insgesamt zu einer Verlangsamung der Recovery-Kinetik kommt.

Experimente mit verschiedenen EF-Hand-Mutanten haben ergeben, dass die KChIP-abhängige Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung insbesondere durch Ca^{2+} -Bindung an die EF-Handmotive 3 und 4 vermittelt wird. Das EF-Handmotiv 2 scheint dagegen für eine Modulation der Kv4.3-Stromkinetik nicht unbedingt nötig zu sein.

In vivo ist der Kv4.3/KChIP2-vermittelte I_{to} maßgeblich bei der Entstehung bedeutender Herzerkrankungen, wie Arrhythmien, Herzinsuffizienz und Herzhypertrophie, involviert. Um hier neue Therapieansätze zu entwickeln ist eine Erforschung der zugrundeliegenden Pathomechanismen erforderlich. Ein Verständnis der pathologischen Abläufe in Kardiomyozyten setzt wiederum detailliertes Wissen über die physiologische Funktion voraus. Diese Arbeit leistet durch die Untersuchung von Ca^{2+} -abhängigen Regulationsmechanismen einen Beitrag auf dem Gebiet der Grundlagenforschung zur Funktionsweise von Ionenkanälen.

Abstract

The main objective of the current thesis was to investigate the effect of varied cytoplasmic Ca^{2+} -concentration on the Kv4.3 channels complexed with KChIP2. Macroscopic currents recorded in whole-cell-patch-clamp configuration with zero (BAPTA-AM and BAPTA) to 50 μM Ca^{2+} in the patch-pipette showed a Ca^{2+} dependent modulation of Kv4.3/KChIP2 channel inactivation. The Kv4.3/KChIP2 mediated current decay was faster, and the recovery of Kv4.3/KChIP2 channels from inactivation slower with 50 μM Ca^{2+} than with BAPTA (nominal Ca^{2+} -free) in the patch-pipette. The Ca^{2+} dependences were further tested with Kv4.3wt and Kv4.3-CaMKII-site-mutants coexpressed with or without KChIP2wt, as well as in absence and presence of the CaMKII inhibitor KN-93. The experiments suggest two different mechanisms of Ca^{2+} -dependent gating modulation: The recovery is accelerated due to binding of Ca^{2+} to KChIP2 EF-hands. This acceleration is compensated by a stronger opposite effect of CaMKII. CaMKII is activated in high Ca^{2+} -concentrations which lead to a slower recovery by phosphorylation of Kv4.3.

Patch-clamp recordings of Kv4.3 channels coexpressed with specifically EF-hand-mutated KChIPs showed that the KChIP-dependent acceleration of inactivation is particularly mediated by EF-hand motifs 3 and 4. In contrast, the EF-hand motif 2 does not seem to be necessary for a modulation of the Kv4.3 inactivation.

In vivo, the transient outward current (I_{to}) is mediated by Kv4.3 in human cardiomyocytes. It is involved in the development of heart diseases such as arrhythmia, congestive heart failure and cardiac hypertrophy. In order to develop new therapeutic approaches detail knowledge of physiological as well as pathological processes is needed. Therefore this investigation of Ca^{2+} -dependent regulation mechanisms of Kv4.3 complexed with KChIP2 makes an important contribution to the necessary basic scientific research on ion channels and channelopathies.

6 Literaturverzeichnis

An, W. F., M. R. Bowlby, M. Betty, J. Cao, H. P. Ling, G. Mendoza, J. W. Hinson, K. I. Mattsson, B. W. Strassle, J. S. Trimmer und K. J. Rhodes (2000). "Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors." Nature **403**(6769): 553-556.

Anderson, D., W. H. Mehaffey, M. Iftinca, R. Rehak, J. D. Engbers, S. Hameed, G. W. Zamponi und R. W. Turner (2010). "Regulation of neuronal activity by Cav3-Kv4 channel signaling complexes." Nat Neurosci **13**(3): 333-337.

Antzelevitch, C., P. Brugada, M. Borggrefe, J. Brugada, R. Brugada, D. Corrado, I. Gussak, H. LeMarec, K. Nademanee, A. R. Perez Riera, W. Shimizu, E. Schulze-Bahr, H. Tan und A. Wilde (2005). "Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association." Circulation **111**(5): 659-670.

Ashcroft, F. M. (1999). Ion channels and disease : channelopathies. San Diego u.a., Acad. Press.

Bähring, R., J. Dannenberg, H. C. Peters, T. Leicher, O. Pongs und D. Isbrandt (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): 23888-23894.

Baldwin, T. J., M. L. Tsaur, G. A. Lopez, Y. N. Jan und L. Y. Jan (1991). "Characterization of a mammalian cDNA for an inactivating voltage-sensitive K⁺ channel." Neuron **7**(3): 471-483.

Behrends, J. C. (2010). Physiologie : 93 Tabellen. Stuttgart, Thieme.

Benito, B., J. Brugada, R. Brugada und P. Brugada (2009). "Brugada syndrome." Rev Esp Cardiol **62**(11): 1297-1315.

Beuckelmann, D. J., M. Nabauer und E. Erdmann (1993). "Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure." Circ Res **73**(2): 379-385.

Bezanilla, F. (2002). "Voltage sensor movements." J Gen Physiol **120**(4): 465-473.

Birnbaum, S. G., A. W. Varga, L. L. Yuan, A. E. Anderson, J. D. Sweatt und L. A. Schrader (2004). "Structure and function of Kv4-family transient potassium channels." Physiol Rev **84**(3): 803-833.

Blinks, J. R. und M. Endoh (1986). "Modification of myofibrillar responsiveness to Ca⁺⁺ as an inotropic mechanism." Circulation **73**(3 Pt 2): III85-98.

Bosch, R. F., X. Zeng, J. B. Grammer, K. Popovic, C. Mewis und V. Kuhlkamp (1999). "Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation." Cardiovasc Res **44**(1): 121-131.

Bourne, Y., J. Dannenberg, V. Pollmann, P. Marchot und O. Pongs (2001). "Immunocytochemical localization and crystal structure of human frequenin (neuronal calcium sensor 1)." J Biol Chem **276**(15): 11949-11955.

Brahmajothi, M. V., D. L. Campbell, R. L. Rasmusson, M. J. Morales, J. S. Trimmer, J. M. Nerbonne und H. C. Strauss (1999). "Distinct transient outward potassium current (I_{to}) phenotypes and distribution of fast-inactivating potassium channel alpha subunits in ferret left ventricular myocytes." J Gen Physiol **113**(4): 581-600.

Brandt, M. C., L. Priebe, T. Bohle, M. Sudkamp und D. J. Beuckelmann (2000). "The ultrarapid and the transient outward K^{+} current in human atrial fibrillation. Their possible role in postoperative atrial fibrillation." J Mol Cell Cardiol **32**(10): 1885-1896.

Brugada, P. und J. Brugada (1992). "Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report." J Am Coll Cardiol **20**(6): 1391-1396.

Burgoyne, R. D. und J. L. Weiss (2001). "The neuronal calcium sensor family of Ca^{2+} -binding proteins." Biochem J **353**(Pt 1): 1-12.

Carafoli, E. (1985). "The homeostasis of calcium in heart cells." J Mol Cell Cardiol **17**(3): 203-212.

Chen, C. P., L. Lee und L. S. Chang (2006). "Effects of metal-binding properties of human Kv channel-interacting proteins on their molecular structure and binding with Kv4.2 channel." Protein J **25**(5): 345-351.

Chen, Q. X. und R. K. Wong (1991). "Intracellular Ca^{2+} suppressed a transient potassium current in hippocampal neurons." J Neurosci **11**(2): 337-343.

Cole, K. S. (1949). "Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane." Archives des Sciences Physiologiques **3**: 253-258.

Colinas, O., M. Gallego, R. Setien, J. R. Lopez-Lopez, M. T. Perez-Garcia und O. Casis (2006). "Differential modulation of Kv4.2 and Kv4.3 channels by calmodulin-dependent protein kinase II in rat cardiac myocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(4): H1978-1987.

Couchonnal, L. F. und M. E. Anderson (2008). "The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease." Physiology (Bethesda) **23**: 151-159.

Decher, N., A. S. Barth, T. Gonzalez, K. Steinmeyer und M. C. Sanguinetti (2004). "Novel KChIP2 isoforms increase functional diversity of transient outward potassium currents." J Physiol **557**(Pt 3): 761-772.

Doyle, D. A., J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait und R. MacKinnon (1998). "The structure of the potassium channel: molecular basis of K^{+} conduction and selectivity." Science **280**(5360): 69-77.

El-Haou, S., E. Balse, N. Neyroud, G. Dilanian, B. Gavillet, H. Abriel, A. Coulombe, A. Jeromin und S. N. Hatem (2009). "Kv4 potassium channels form a

tripartite complex with the anchoring protein SAP97 and CaMKII in cardiac myocytes." Circ Res **104**(6): 758-769.

Flaherty, K. M., S. Zozulya, L. Stryer und D. B. McKay (1993). "Three-dimensional structure of recoverin, a calcium sensor in vision." Cell **75**(4): 709-716.

Grueter, C. E., R. J. Colbran und M. E. Anderson (2007). "CaMKII, an emerging molecular driver for calcium homeostasis, arrhythmias, and cardiac dysfunction." J Mol Med **85**(1): 5-14.

Gutman, G. A., K. G. Chandy, S. Grissmer, M. Lazdunski, D. McKinnon, L. A. Pardo, G. A. Robertson, B. Rudy, M. C. Sanguinetti, W. Stuhmer und X. Wang (2005). "International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels." Pharmacol Rev **57**(4): 473-508.

Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann und F. J. Sigworth (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch **391**(2): 85-100.

Hasdemir, B., D. J. Fitzgerald, I. A. Prior, A. V. Tepikin und R. D. Burgoyne (2005). "Traffic of Kv4 K⁺ channels mediated by KChIP1 is via a novel post-ER vesicular pathway." J Cell Biol **171**(3): 459-469.

Heginbotham, L., Z. Lu, T. Abramson und R. MacKinnon (1994). "Mutations in the K⁺ channel signature sequence." Biophys J **66**(4): 1061-1067.

Hermida, J. S., J. L. Lemoine, F. B. Aoun, G. Jarry, J. L. Rey und J. C. Quiret (2000). "Prevalence of the brugada syndrome in an apparently healthy population." Am J Cardiol **86**(1): 91-94.

Hille, B. (2001). Ion channels of excitable membranes. Sunderland, Mass., Sinauer.

Hodgkin, A. L., A. F. Huxley und B. Katz (1952). "Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo." J Physiol **116**(4): 424-448.

Holmqvist, M. H., J. Cao, R. Hernandez-Pineda, M. D. Jacobson, K. I. Carroll, M. A. Sung, M. Betty, P. Ge, K. J. Gilbride, M. E. Brown, M. E. Jurman, D. Lawson, I. Silos-Santiago, Y. Xie, M. Covarrubias, K. J. Rhodes, P. S. Distefano und W. F. An (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): 1035-1040.

Horn, R. (2000). "A new twist in the saga of charge movement in voltage-dependent ion channels." Neuron **25**(3): 511-514.

Isacoff, E. Y., Y. N. Jan und L. Y. Jan (1990). "Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes." Nature **345**(6275): 530-534.

Isbrandt, D., T. Leicher, R. Waldschutz, X. Zhu, U. Luhmann, U. Michel, K. Sauter und O. Pongs (2000). "Gene structures and expression profiles of three human KCND (Kv4) potassium channels mediating A-type currents I_(TO) and I_(SA)." Genomics **64**(2): 144-154.

Jiang, B., X. Sun, K. Cao und R. Wang (2002). "Endogenous Kv channels in human embryonic kidney (HEK-293) cells." Mol Cell Biochem **238**(1-2): 69-79.

Keskanokwong, T., H. J. Lim, P. Zhang, J. Cheng, L. Xu, D. Lai und Y. Wang (2011). "Dynamic Kv4.3-CaMKII unit in heart: an intrinsic negative regulator for CaMKII activation." Eur Heart J **32**(3): 305-315.

Kreusch, A., P. J. Pfaffinger, C. F. Stevens und S. Choe (1998). "Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel." Nature **392**(6679): 945-948.

Kuo, H. C., C. F. Cheng, R. B. Clark, J. J. Lin, J. L. Lin, M. Hoshijima, V. T. Nguyen-Tran, Y. Gu, Y. Ikeda, P. H. Chu, J. Ross, W. R. Giles und K. R. Chien (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): 801-813.

Larsson, H. P., O. S. Baker, D. S. Dhillon und E. Y. Isacoff (1996). "Transmembrane movement of the shaker K^+ channel S4." Neuron **16**(2): 387-397.

Ledoux, J., D. Chartier und N. Leblanc (1999). "Inhibitors of calmodulin-dependent protein kinase are nonspecific blockers of voltage-dependent K^+ channels in vascular myocytes." J Pharmacol Exp Ther **290**(3): 1165-1174.

Lee, L., K. C. Chen und L. S. Chang (2009). "Functional roles of EF-hands in human potassium channel-interacting protein 2.2." Protein Pept Lett **16**(9): 1081-1087.

Li, M., N. Unwin, K. A. Stauffer, Y. N. Jan und L. Y. Jan (1994). "Images of purified Shaker potassium channels." Curr Biol **4**(2): 110-115.

Li, Q., Y. Zhang, Y. Sheng, R. Huo, B. Sun, X. Teng, N. Li, J. X. Zhu, B. F. Yang und D. L. Dong (2012). "Large T-antigen up-regulates Kv4.3 $K^{(+)}$ channels through Sp1, and Kv4.3 $K^{(+)}$ channels contribute to cell apoptosis and necrosis through activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II." Biochem J **441**(3): 859-867.

Li, Y., S. Y. Um und T. V. McDonald (2006). "Voltage-gated potassium channels: regulation by accessory subunits." Neuroscientist **12**(3): 199-210.

Liao, Y. S., K. C. Chen und L. S. Chang (2009). "Functional role of EF-hands 3 and 4 in membrane-binding of KChIP1." J Biosci **34**(2): 203-211.

Lin, Y. L., C. Y. Chen, C. P. Cheng und L. S. Chang (2004). "Protein-protein interactions of KChIP proteins and Kv4.2." Biochem Biophys Res Commun **321**(3): 606-610.

Liu, Y., M. E. Jurman und G. Yellen (1996). "Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K^+ channel during gating." Neuron **16**(4): 859-867.

Long, S. B., E. B. Campbell und R. Mackinnon (2005). "Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K^+ channel." Science **309**(5736): 897-903.

MacKinnon, R. (1991). "Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel." Nature **350**(6315): 232-235.

Maffie, J. und B. Rudy (2008). "Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K⁺ currents in neurons." J Physiol **586**(Pt 23): 5609-5623.

Marionneau, C., R. R. Townsend und J. M. Nerbonne (2011). "Proteomic analysis highlights the molecular complexities of native Kv4 channel macromolecular complexes." Semin Cell Dev Biol **22**(2): 145-152.

Marmont, G. (1949). "Studies on the axon membrane; a new method." J Cell Physiol **34**(3): 351-382.

Meszaros, J., K. O. Ryder und G. Hart (1996). "Transient outward current in catecholamine-induced cardiac hypertrophy in the rat." Am J Physiol **271**(6 Pt 2): H2360-2367.

Neher, E. und B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**(5554): 799-802.

Nerbonne, J. M., C. G. Nichols, T. L. Schwarz und D. Escande (2001). "Genetic manipulation of cardiac K(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here?" Circ Res **89**(11): 944-956.

Niwa, N. und J. M. Nerbonne (2010). "Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (I_{to}) expression and regulation." J Mol Cell Cardiol **48**(1): 12-25.

Numberger M., D. A. (1996). Patch-Clamp-Technik. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

Osawa, M., A. Dace, K. I. Tong, A. Valiveti, M. Ikura und J. B. Ames (2005). "Mg²⁺ and Ca²⁺ differentially regulate DNA binding and dimerization of DREAM." J Biol Chem **280**(18): 18008-18014.

Pak, M. D., K. Baker, M. Covarrubias, A. Butler, A. Ratcliffe und L. Salkoff (1991). "mShal, a subfamily of A-type K⁺ channel cloned from mammalian brain." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4386-4390.

Papazian, D. M., L. C. Timpe, Y. N. Jan und L. Y. Jan (1991). "Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence." Nature **349**(6307): 305-310.

Patel, S. P. und D. L. Campbell (2005). "Transient outward potassium current, 'I_{to}', 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 und H. C. Strauss (2002). "Elucidating KChIP effects on Kv4.3 inactivation and recovery kinetics with a minimal KChIP2 isoform." J Physiol **545**(Pt 1): 5-11.

Pethig, R., M. Kuhn, R. Payne, E. Adler, T. H. Chen und L. F. Jaffe (1989). "On the dissociation constants of BAPTA-type calcium buffers." Cell Calcium **10**(7): 491-498.

Pioletti, M., F. Findeisen, G. L. Hura und D. L. Minor, Jr. (2006). "Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer." Nat Struct Mol Biol **13**(11): 987-995.

Potreau, D., J. P. Gomez und N. Fares (1995). "Depressed transient outward current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart." Cardiovasc Res **30**(3): 440-448.

Radicke, S., D. Cotella, E. M. Graf, U. Ravens und E. Wettwer (2005). "Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative beta-subunit of human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3." J Physiol **565**(Pt 3): 751-756.

Rezazadeh, S., T. W. Claydon und D. Fedida (2006). "KN-93 (2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine), a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, is a direct extracellular blocker of voltage-gated potassium channels." J Pharmacol Exp Ther **317**(1): 292-299.

Rosati, B., Z. Pan, S. Lypen, H. S. Wang, I. Cohen, J. E. Dixon und D. McKinnon (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): 119-125.

Ruppersberg, J. P., K. H. Schroter, B. Sakmann, M. Stocker, S. Sewing und O. Pongs (1990). "Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins." Nature **345**(6275): 535-537.

Sah, R., R. J. Ramirez und P. H. Backx (2002). "Modulation of Ca⁽²⁺⁾ release in cardiac myocytes by changes in repolarization rate: role of phase-1 action potential repolarization in excitation-contraction coupling." Circ Res **90**(2): 165-173.

Sergeant, G. P., S. Ohya, J. A. Reihill, B. A. Perrino, G. C. Amberg, Y. Imaizumi, B. Horowitz, K. M. Sanders und S. D. Koh (2005). "Regulation of Kv4.3 currents by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II." Am J Physiol Cell Physiol **288**(2): C304-313.

Shen, N. V. und P. J. Pfaffinger (1995). "Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K⁺ channel subunit proteins." Neuron **14**(3): 625-633.

Shibata, R., H. Misonou, C. R. Campomanes, A. E. Anderson, L. A. Schrader, L. C. Doliveira, K. I. Carroll, J. D. Sweatt, K. J. Rhodes und J. S. Trimmer (2003). "A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels." J Biol Chem **278**(38): 36445-36454.

Sumi, M., K. Kiuchi, T. Ishikawa, A. Ishii, M. Hagiwara, T. Nagatsu und H. Hidaka (1991). "The newly synthesized selective Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells." Biochem Biophys Res Commun **181**(3): 968-975.

Tsien, R. Y. (1980). "New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures." Biochemistry **19**(11): 2396-2404.

Van Wagoner, D. R., A. L. Pond, P. M. McCarthy, J. S. Trimmer und J. M. Nerbonne (1997). "Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation." Circ Res **80**(6): 772-781.

Vijay-Kumar, S. und V. D. Kumar (1999). "Crystal structure of recombinant bovine neurocalcin." Nat Struct Biol **6**(1): 80-88.

Waldschmidt, L., V. Junkereit und R. Bähring (2017). "KChIP2 genotype dependence of transient outward current (I_{to}) properties in cardiomyocytes isolated from male and female mice." PLoS One **12**(1): e0171213.

Wang, X., J. Bao, X. M. Zeng, Z. Liu und Y. A. Mei (2005). "Elevation of intracellular Ca²⁺ modulates A-currents in rat cerebellar granule neurons." J Neurosci Res **81**(4): 530-540.

Xiao, L., P. Coutu, L. R. Villeneuve, A. Tadevosyan, A. Maguy, S. Le Bouter, B. G. Allen und S. Nattel (2008). "Mechanisms underlying rate-dependent remodeling of transient outward potassium current in canine ventricular myocytes." Circ Res **103**(7): 733-742.

Xu, H., H. Li und J. M. Nerbonne (1999). "Elimination of the transient outward current and action potential prolongation in mouse atrial myocytes expressing a dominant negative Kv4 alpha subunit." J Physiol **519 Pt 1**: 11-21.

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

Zhou, W., Y. Qian, K. Kunjilwar, P. J. Pfaffinger und S. Choe (2004). "Structural insights into the functional interaction of KChIP1 with Shal-type K⁽⁺⁾ channels." Neuron **41**(4): 573-586.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

BAPTA	1,2-Bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
BAPTA-AM	1,2-Bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure Acetoxymethylester
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin abhängige Proteinkinase II
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP	Diaminopeptidyl transferase-like protein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein (verbessertes grün fluoreszierendes Protein)
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
EF	Calcium-bindendes Motiv, benannt nach Helices im Parvalbumin-Protein
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
HCN	Hyperpolarisations-aktivierter und durch cyclische Nukleotide- modulierter Kanal
HEK	Human embryonic kidney (aus einer menschlichen embryonalen Nierenzelle gewonnene immortalisierte Zelllinie)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl-)Piperazin-1-Ethansulfonat
ic-Lösung	Intrazelluläre Lösung (Lösung in der Patch-Pipette)
IC ₅₀	Halbmaximal inhibierende Konzentration

I_{to}	Transienter Kaliumauswärtsstrom
KChIP	K-Channel-Interacting-Protein (Kaliumkanal-interagierendes Protein)
KN-92	2-[N-(4-Methoxybenz-enesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine
KN-93	2-[N-(2-Hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzene-sulfonyl)]-amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine
Kv-Kanal	Spannungsabhängiger K^+ -Kanal
MEM	Minimum Essential Medium
NCS	Neuronal Calcium Sensor
OPA	Operationsverstärker
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PKC	Proteinkinase C
RF	Rückkopplungswiderstand
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
U_m	Membranspannung
U_{soll}	Sollspannung

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Ventrikuläres Herzaktionspotenzial	6
Abbildung 1.2: Phylogenetischer Baum für Kv-Kanäle	7
Abbildung 1.3: Die Kv4.3-Kanaluntereinheit mit den akzessorischen Unter- einheiten KChIP und DPP	9
Abbildung 2.1: Vereinfachtes Schaltbild des Patch-Clamp-Verfahrens in der Whole-Cell-Konfiguration	15
Abbildung 2.2: Testpulsprotokoll	19
Abbildung 2.3: Recovery-Protokoll	20
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung und elektronisches Schaltbild der Whole-Cell-Konfiguration	21
Abbildung 3.1: Inaktivierung von Kv4.3/KChIP2-Komplexen	25
Abbildung 3.2: Erholung von der Inaktivierung von Kv4.3/KChIP2-Komplexen.....	27
Abbildung 3.3: Kv4.3-Inaktivierung und Erholung von der Inaktivierung mit KChIP2-EF-Hand-Mutanten	29
Abbildung 3.4: Inaktivierung der Kv4.3-Homotetramere.....	32
Abbildung 3.5: Erholung von der Inaktivierung der Kv4.3-Homotetramere.....	34
Abbildung 3.6: Erholung von der Inaktivierung der K4.3-Homotetrameren und Kv4.3/KChIP2-Komplexen ohne und mit Zugabe von KN-93 oder KN-92	37
Abbildung 3.7: Erholung von der Inaktivierung der Kv4.3-CaMKII-Site-Mutante Kv4.3-AAA und Kv4.3-DDD.....	42
Abbildung 3.8: Erholung von der Inaktivierung von Kv4.3/KChIP2-EF-Hand- Mutanten mit 1 μ M KN-93	45
Abbildung 3.9: Zusammenfassung	47
Abbildung 4.1: Entstehungsmechanismus der ST-Hebung im Brugada- Syndrom.....	60

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Extrazelluläre Lösung.....	17
Tabelle 2.2:	Zusammensetzung der Pipettenlösungen	18
Tabelle 3.1:	Kinetik der makroskopischen Inaktivierung von Kv4.3/KChIP2-Komplexen	26
Tabelle 3.2:	Recovery-Kinetik von Kv4.3/KChIP2-Komplexen.....	28
Tabelle 3.3:	Zeitkonstanten der Inaktivierung für Kv4.3 mit KChIP2-EF-Hand-Mutanten	30
Tabelle 3.4:	Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung für Kv4.3 mit KChIP2-EF-Hand-Mutanten	31
Tabelle 3.5:	Zeitkonstanten der Inaktivierung von Kv4.3-Homotetrameren	32
Tabelle 3.6:	Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.3-Homotetrameren	34
Tabelle 3.7:	Zeitkonstanten der Inaktivierung von K4.3-Homotetrameren und Kv4.3/KChIP2-Komplexen mit 1 μ M KN-93.....	35
Tabelle 3.8:	Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung von K4.3-Homotetrameren und Kv4.3/KChIP2-Komplexen mit 1 und 10 μ M KN-93.....	38
Tabelle 3.9:	Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung für Kv4.3/KChIP2-Komplexe mit 1 und 10 μ M KN-92.....	39
Tabelle 3.10:	Zeitkonstanten der Inaktivierung von Kv4.3-CaMKII-Site-Mutante Kv4.3-AAA/KChIP2 und Kv4.3-DDD/KChIP2	41
Tabelle 3.11:	Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung von Kv4.3-CaMKII-Site-Mutante Kv4.3-AAA/KChIP2 und Kv4.3-DDD/KChIP2.....	43
Tabelle 3.12:	Zeitkonstanten der Inaktivierung für Kv4.3 und KChIP2-EF-Hand-Mutanten mit 1 μ M KN-93.....	44
Tabelle 3.13:	Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung für KChIP2-EF-Hand-Mutanten mit 1 μ M KN-93.....	46

7.4 Herstellerverzeichnis

Adobe Systems Inc., San Jose, CA-95110, USA

Apple Inc., Cupertino, CA 95014, USA

AutoMate Scientific, Berkeley, CA 94710, USA

BD Biosciences, San Jose, CA 95131, USA

Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland

Gibco, 76131 Karlsruhe, Deutschland

HEKA Elektronik, 66466 Lambrecht, Deutschland

Heraeus Holding, 63450 Hanau, Deutschland

Ismatec, 97877 Wertheim-Mondfeld, Deutschland

Life Technologies Corporation/Invitrogen, Carlsbad, CA 92008, USA

MaxChelator, Stanford University, Pacific Grove, CA 93950, USA

Microsoft Corp., Redmond, WA 98052, USA

Nunc GmbH & Co. KG, 63505 Langenselbold, Deutschland

Biochrom AG, 12247 Berlin, Deutschland

Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO 63103, USA

Synergy Software Inc., Reading, PA 19606, USA

World Precision Instruments, Sarasota, FL 34240, USA

Carl-Zeiss AG, 73447 Oberkochen, Deutschland

Zeitz-Instrumente GmbH, 81377 München, Deutschland

7.5 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen bedanken, die mich auf ganz unterschiedliche Weise unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Robert Bähring für das interessante Dissertationsthema und die geduldige Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die Grundlagen der Elektrophysiologie danken. Seine engagierte Betreuung, die hilfreichen Diskussionen und die vielen wertvollen Hinweise haben entscheidend zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Heimo Ehmke danke ich für die Möglichkeit, die Räume und Geräte des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie am UKE nutzen zu dürfen.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Instituts, vor allem aber den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mit großer Hilfsbereitschaft und einem gutem Arbeitsklima dafür gesorgt haben, dass mir die Arbeit im Labor viel Freude bereitet hat. Auch der großen Diskussionsbereitschaft innerhalb der Arbeitsgruppe sind viele wertvolle Anregungen und Ideen zu den Ergebnissen dieser Arbeit zu verdanken.

Des Weiteren danke ich Annett Hasse, Margrit Hölzel und Telse Kock für Ihre Unterstützung als Medizinisch-Technische Assistentinnen.

Meiner Familie und insbesondere meinem Mann möchte ich einen besonderen Dank für die stetige Unterstützung und Bestärkung in allen Phasen dieser Arbeit aussprechen.

7.6 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

7.7 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: