

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie

Funktionelle Expression von epitopmarkierten $K_v4.2$ Kanälen in kultivierten hippocampalen Neuronen

Dissertation

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

vorgelegt von:
Helena Catherine Prechtel
aus Göttingen

Hamburg 2018

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.06.2018**

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

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Robert Bähring

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Roland Bender

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Mechanismen neuronaler Erregbarkeit und Plastizität	1
1.2	Kaliumkanäle	4
1.3	A-Typ-Strom vermittelnde Ionenkanäle	7
1.4	Ziel der Arbeit	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Heterologe Expression von Plasmid-DNA in kultivierten hippocampalen Neuronen	15
2.1.1	Primärkultur hippocampaler Neurone	15
2.1.2	Verwendete Plasmid-DNA	15
2.1.3	Transfektion primärer Neurone	16
2.2	Elektrophysiologische Untersuchungen	18
2.2.1	Prinzip der Patch-Clamp-Technik	18
2.2.2	Aufbau des Messstandes	19
2.2.3	Messpipetten	20
2.2.4	Messlösungen	20
2.2.5	Durchführung der Experimente	21
2.2.6	Ableitkonfigurationen	23
2.2.7	AMPA-Behandlung der Neuronenkulturen	25
2.3	Verwendete Stimulationsprotokolle und Datenauswertung	25
2.3.1	Auswertung der einzelnen Experimente	25
2.3.2	Statistische Auswertung	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Whole-Cell-Ableitungen nativer A-Typ-Ströme von kultivierten hippocampalen Neuronen	28
3.1.1	Stromamplituden nativer Kaliumströme	28
3.1.2	Inaktivierungskinetik makroskopischer Ströme	29
3.1.3	Erholung von der Inaktivierung	30
3.1.4	Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung	31

3.2	Effekte heterolog exprimierter Kaliumkanaluntereinheiten in hippocampalen Neuronen	31
3.2.1	Stromamplituden heterolog exprimierter A-Typ-Ströme	31
3.2.2	Inaktivierung makroskopischer Ströme.....	34
3.2.3	Erholung von der Inaktivierung.....	36
3.2.4	Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung.....	39
3.3	Charakterisierung von somatischen und dendritischen Strömen mittels Nucleated-Patch-Ableitungen	42
3.4	Induktion synaptischer Aktivität durch AMPA-Behandlung.....	46
3.5	KChIP-Aktivität in Abhängigkeit der Calcium- und Magnesiumkonzentration.....	48
4	Diskussion.....	51
4.1	Heterologe Expression von epitopmarkierten Kanälen	51
4.2	Kontrolle der funktionellen $K_v4.2$ Oberflächenexpression	52
4.3	Kontrolle der subzellulären $K_v4.2$ Verteilung in Neuronen.....	56
4.4	Aktivitätsabhängige Modulierung der $K_v4.2$ Expression.....	58
5	Zusammenfassung / Abstract.....	61
6	Abkürzungsverzeichnis.....	63
7	Literaturverzeichnis	65
8	Danksagung.....	75
9	Eidesstattliche Versicherung.....	76

1 Einleitung

1.1 Mechanismen neuronaler Erregbarkeit und Plastizität

Neuronen sind informationsverarbeitende und -verbreitende Einheiten in unserem Nervensystem. Sie kommunizieren untereinander durch elektrochemische Signale. Eine elektrische Erregung kann als Aktionspotential weitergeleitet werden und somit der Signalübertragung dienen (Hille, 2001). Es gibt unterschiedliche Arten von Nervenzellen, die je nach Funktion und Lokalisation einen unterschiedlichen Aufbau und verschiedene Eigenschaften besitzen. Gemeinsam ist eine Aufteilung in einen Zellkörper (Soma), einen efferenten Teil (Axon) und einen afferenten Teil (Dendriten). In dieser Arbeit wurden CA1 Pyramidenzellen untersucht. Diese zeichnen sich durch ihr dreieckiges Soma (Pyramide) und durch einen großen apikalen, mehrere 100 μm langen Dendriten (Bannister und Larkman, 1995) aus, der von der Spitze der „Pyramide“ ausgeht (Spruston, 2008) (Abbildung 1).

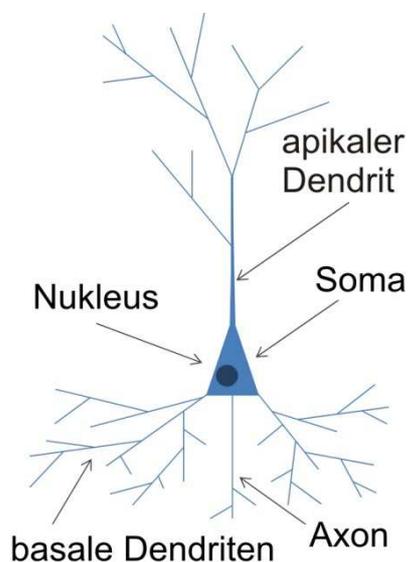


Abbildung 1: Pyramidenzelle.
CA1 Pyramidenzelle des Hippokampus, schematisch dargestellt.

Am initialen, noch unmyelinisierten Segment des Axons (axon initial segment) können Aktionspotentiale generiert und weitergeleitet werden, aber auch andere

Entstehungsorte für ein Aktionspotential sind sehr wahrscheinlich (Gasparini et al., 2004). Die Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotentialen wird durch ein Zusammenspiel von passiven Membraneigenschaften (Membrankapazität) und aktiven Membraneigenschaften (Ionenkanäle) beeinflusst. Durch verschiedene Kanaltypen in der Zellmembran und eine unterschiedliche Zellmorphologie können sich die Aktionspotential-Typen in verschiedenen Geweben stark unterscheiden (Baranauskas, 2007; Vetter et al., 2001). In hippokampalen CA1 Pyramidenzellen können Aktionspotentiale rückwärtsgerichtet (backpropagating action potential, bAP) in die Dendriten fortgeleitet werden, wo sie modulierend auf die synaptische Aktivität einwirken können (Bernard und Johnston, 2003).

Die Kommunikation zwischen den Nervenzellen erfolgt hauptsächlich über chemische Synapsen. Diese bestehen aus der Präsynapse, dem synaptischen Spalt und der Postsynapse. Die Präsynapse besteht aus den synaptischen Endknöpfchen, die meist die letzte Aufzweigung des Axons darstellen. Die Postsynapse besteht aus den dendritischen Spines (Dornen). Präsynapse und Postsynapse werden durch den synaptischen Spalt voneinander getrennt. In einer exzitatorischen glutamatergen Synapse führt eine Depolarisation der Präsynapse zu Calciumeinstrom und dadurch zu einer Glutamatausschüttung in den synaptischen Spalt. Das Glutamat kann an Ionenkanalgekoppelte Glutamatrezeptoren in der postsynaptischen Membran binden, wodurch es zu einer Ionenkanalöffnung kommt (Abbildung 2). Es existieren drei Hauptgruppen dieser ionotropen Glutamatrezeptoren: Kainat-Rezeptoren, die für Natrium, Kalium und in geringem Umfang auch für Calcium leitfähig sind, hauptsächlich Natrium und Kalium permeable AMPA-Rezeptoren und nichtselektiv kationendurchlässige NMDA-Rezeptoren, welche neben Natrium und Kalium auch für Calcium permeabel sind (Hille, 2001). Durch Aktivierung der AMPA-Rezeptoren kommt es zu einem schnellen Natriumeinstrom, der eine lokale Depolarisation der Zellmembran hervorruft. Für die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren ist neben der Glutamatbindung zusätzlich eine Vordepolarisation der Zellmembran notwendig. Neben Kalium und Natrium kann durch diese Kanäle vor allem Calcium in die Zelle einströmen und auf diese Weise eine Reihe von calciumgekoppelten Prozessen auslösen (Flores-Soto et al., 2012). Durch den exzitatorischen postsynaptischen Strom (EPSC) kommt es zu einer Depolarisation der postsynaptischen Zelle, die als exzitatorisches

postsynaptisches Potential (EPSP) bezeichnet wird. Durch räumliche und zeitliche Akkumulation von mehreren exzitatorischen Signalen kann das Schwellenpotential für ein Aktionspotential erreicht werden.

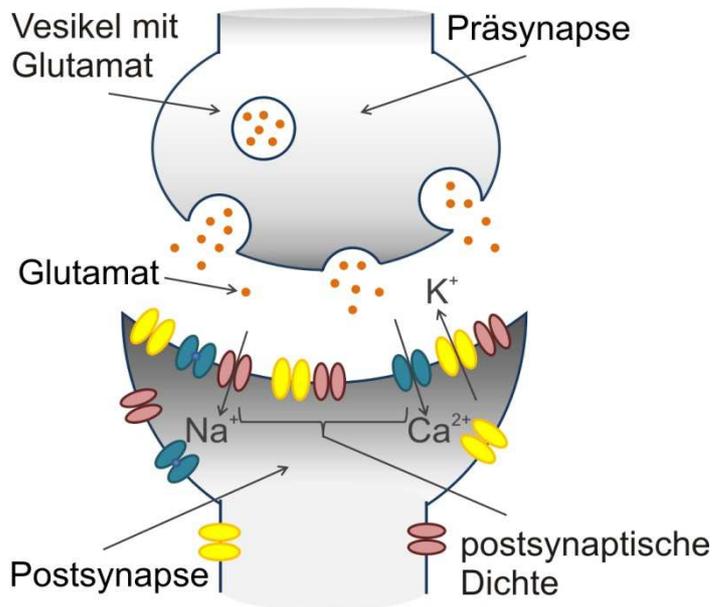


Abbildung 2: Glutamaterge Synapse.

Schematische Darstellung einer glutamatergen Synapse. K⁺, Na⁺ und Ca²⁺ Ströme sind mit Pfeilen durch die jeweiligen Kanäle gekennzeichnet.

Die Bezeichnung Neuroplastizität oder neuronale Plastizität beschreibt aktivitätsabhängige inter- und intraneuronale, strukturelle und funktionelle Veränderungen. Die synaptische (extrinsische) Neuroplastizität beruht auf synaptischen Veränderungen, zum Beispiel der Langzeitpotenzierung (LTP) oder Langzeitdepression (Bliss und Gardner-Medwin, 1973; Daoudal und Debanne, 2003). Die intrinsische Neuroplastizität beruht auf Veränderungen innerhalb einer Nervenzelle, beispielsweise der Hoch- oder Herunterregulation von Ionenkanälen oder auch auf Veränderungen deren funktioneller Eigenschaften. Somit können durch Modulation von postsynaptischen Glutamatrezeptoren exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSPs) und bAPs beeinflusst werden (Beck und Yaari, 2008; Frick und Johnston, 2005; Schulz, 2006). Da in den einzelnen neuronalen Kompartimenten unterschiedliche und charakteristische Kombinationen von Ionenkanälen vertreten sind (Vacher et al., 2008), variieren die Mechanismen der intrinsischen Plastizität zwischen Axon, Soma und Dendriten (Beck und Yaari, 2008). Wahrscheinlich besteht eine funktionelle Synergie zwischen synaptischer und intrinsischer Neuroplastizität (Daoudal und Debanne, 2003).

Es wird zusätzlich angenommen, dass intrinsische Plastizität in einigen Erkrankungen des ZNS involviert ist. Eine Fehlregulation der intrinsischen Erregbarkeit kann beispielsweise epileptische Anfälle begünstigen (Beck und Yaari, 2008).

Es sind verschiedene Erkrankungen bekannt die auf Veränderungen von Ionenkanaldichte oder -funktion in Nervenzellen beruhen (Aronica et al., 2009; Hanna, 2006; Singh et al., 2006; Steinlein, 2004). Insbesondere ergeben sich Hinweise auf einen Zusammenhang mit verminderter K_v4 -Kanalfunktion und Epilepsie (Aronica et al., 2009; Singh et al., 2006; Bernard et al., 2004).

1.2 Kaliumkanäle

Die ubiquitär vorkommenden Kaliumkanäle stellen eine große und relevante Gruppe unter den Ionenkanälen dar. Durch alternatives Splicen und posttranslationale Modifikation vergrößert sich die Vielfalt an Kaliumkanälen zusätzlich (Coetzee et al., 1999). Ihre wichtigsten Funktionen bestehen in der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials und der Repolarisation nach einem Aktionspotential. Weiterhin sind sie beteiligt an der Kaliumhomöostase, Signaltransduktion, sekretorischen Prozessen und Zellproliferation (Coetzee et al., 1999; Hille, 2001). Fast alle Kaliumkanäle bestehen aus vier α -Untereinheiten, die ein Tetramer um eine zentrale Pore bilden. Die assemblierenden α -Untereinheiten können identisch sein, oder sich aus verschiedenen Untereinheiten derselben Unterfamilie zu einem Heteromer zusammensetzen. Anhand der Membrantopologie können mehrere Arten von Kaliumkanal- α -Untereinheiten unterschieden werden (Abbildung 3). Eine α -Untereinheit kann aus zwei, vier, sechs, sieben oder acht Transmembrandomänen (TM) bestehen. Am einfachsten aufgebaut sind die einwärtsrektifizierenden-Kaliumkanäle (K_{ir}), welche aus nur zwei Transmembrandomänen bestehen, die durch eine selektive und porenbildende Schleife verbunden sind (Hibino et al., 2010). Die α -Untereinheiten der sogenannten „Leck“-Kaliumkanäle enthalten vier Transmembrandomänen und zwei Porendomänen (Goldstein et al., 1998), durch ihr Schaltverhalten tragen sie vor allem zur Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials bei. Aus sieben Transmembrandomänen besteht der spannungs- und calciumaktivierte BK-Kanal (Big-conductance- K^+ -channel) der einen extrazellulären N-Terminus besitzt (Salkoff et al.,

2006). Eine weitere Gruppe Kaliumkanäle besteht aus acht Transmembrandomänen und zwei porenbildenden Regionen, welche bisher allerdings nur in Pilzen nachgewiesen wurden (Ketchum et al., 1995). Die aus sechs Transmembrandomänen bestehenden spannungsaktivierten Kaliumkanalfamilien K_V 1-12 bilden eine große Gruppe unter den Kaliumkanälen.

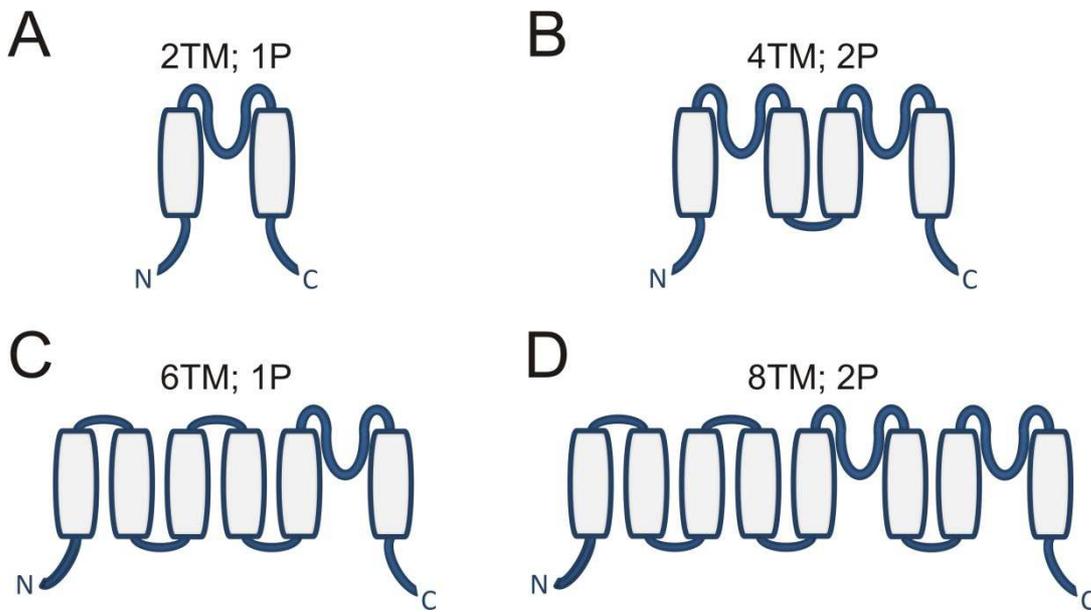


Abbildung 3: Kaliumkanalfamilien.

A: Die α -Untereinheiten der einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle (K_{ir}) bestehend aus zwei Transmembrandomänen (TM) und einer Porendomäne (P). **B:** α -Untereinheiten der „Leck“-Kaliumkanäle oder Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle (K_{2P}) mit zwei Porenregionen und vier Transmembrandomänen. **C:** Spannungsaktivierte Kaliumkanal- α -Untereinheit mit sechs Transmembrandomänen und einer Porendomäne. **D:** Kaliumkanaluntereinheit mit acht Transmembransegmenten und zwei Porendomänen.

Der erste spannungsgesteuerte Kaliumkanal (K_V 1/Shaker) wurde 1987 aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* kloniert (Kamb et al., 1987). Kurz darauf wurden mit K_V 2 (Shab), K_V 3 (Shaw) und K_V 4 (Shal) weitere Kanäle der Shaker Familie entdeckt. Eine K_V α -Untereinheit (schematisch am Beispiel von K_V 4.2 in Abbildung 4 dargestellt) besteht aus jeweils einem zytoplasmatischen, aminoterminalen Ende, sechs Transmembranhelices (S1-S6), mit einem Spannungssensor in S4, einer Tetramerisierungsdomäne (T1) und dem zytoplasmatischen, carboxyterminalen Ende. Das S5 und das S6 Segment bilden zusammen mit der Porenschleife (*Pore-Loop*) die Porenregion und den Selektivitätsfilter und stellen somit den inneren Teil des Kanals dar (Birnbauer et al., 2004). Das S4 Segment enthält viele positiv geladene Aminosäuren und fungiert als Spannungssensor. Bei Depolarisation der Membran

wirken Kräfte auf dieses Segment, die zu einer Konformationsänderung des Kanals führen (Bezanilla, 2002). Die etwa 130 Aminosäuren lange T1 Domäne liegt am N-terminalen Ende einer α -Untereinheit. Im Kanalmodell erscheinen die vier T1 Domänen wie eine hängende Gondel. Sie sind essentiell für die Tetramerisierung der vier α -Untereinheiten, wobei die unterfamilienspezifische Zusammenlagerung wahrscheinlich in polaren Wechselwirkungen zwischen den Kopplungsstellen der T1 Domänen begründet liegt (Kreusch et al., 1998). Zusätzlich ist die T1 Domäne an der Bindung von akzessorischen Untereinheiten (Gulbis et al., 2000), am *axonalen targeting* (Gu et al., 2003; Rivera et al., 2005) und am *gating* (Covarrubias et al., 2008) des Kanals beteiligt. In K_v2 -, K_v3 - und K_v4 -Kanälen enthält die T1 Domäne eine Zn^{+} -bindende Struktur, nicht jedoch in der K_v1 Familie (Covarrubias et al., 2008). Die S5 und S6 Segmente formen im Tetramer zusammengelagert die Struktur eines „umgekehrten Tipis“ (Doyle et al., 1998). Der *Pore-Loop*, die Schleife zwischen S5 und S6, liegt an der Außenseite und stellt den größten Teil des Selektivitätsfilers dar (Doyle et al., 1998). Die Spitze des Tipis wird von den vier S6 Segmenten gebildet. Durch Konformationsänderungen an dieser Stelle kann der Kanal geöffnet oder geschlossen werden (Jiang et al., 2002).

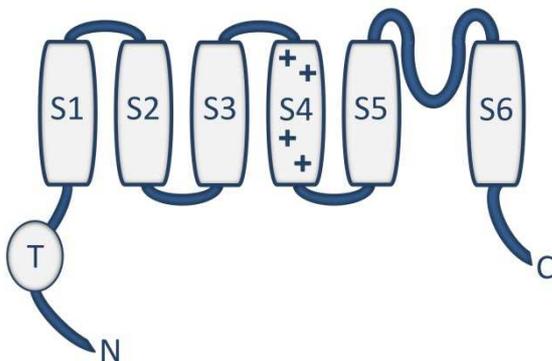


Abbildung 4: Aufbau einer $K_v4.2$ - α -Untereinheit.

Schematischer Aufbau einer $K_v4.2$ - α -Untereinheit. Der Kanal besteht aus sechs Transmembransegmenten (S1-S6), die die Zellmembran durchspannen. Das aminoterminalen (N) sowie das carboxyterminalen (C) Ende liegen intrazellulär. Die Tetramerisierungsdomäne (T) liegt zwischen S1 und dem aminoterminalen Ende. Das positiv geladene S4 Segment dient als Spannungssensor. Zwischen S5 und S6 liegt die Porenschleife.

1.3 A-Typ-Strom vermittelnde Ionenkanäle

Die ersten transienten A-Typ-Kaliumströme wurden 1961 entdeckt (Hagiwara et al., 1961). Zehn Jahre später bekam dieser Strom den Namen I_A (Connor und Stevens, 1971). Der I_A unterscheidet sich von anderen Kaliumströmen vor allem dadurch, dass er sowohl schnell aktiviert als auch schnell inaktiviert. A-Typ-Kaliumströme werden durch Kanäle der K_V1 Unterfamilie (insbesondere $K_V1.4$), $K_V3.3$, $K_V3.4$ und die Kanäle der K_V4 Unterfamilie ($K_V4.1$, $K_V4.2$ und $K_V4.3$) vermittelt. Während die erstgenannten Kanäle vorwiegend axonal verteilt sind, sind die Kanäle der K_V4 Familie somatodendritisch vorhanden (Coetzee et al., 1999). Daher wird dieser Strom auch als somatodendritischer A-Typ-Strom (I_{SA}) bezeichnet. Die Lokalisation im Dendriten ist von großer Bedeutung, da die $K_V4.2$ -Kanäle dort zu einer kontrollierten Erregbarkeit der Membran beitragen (Hoffman et al., 1997). Eine andere Lesart für I_{SA} ist „subthreshold activating“ im Hinblick auf seine Eigenschaft schon bei unterschwelligen Potentialen zu aktivieren. Bei hippocampalen CA1 Neuronen liegt die Aktivierungsschwelle für den I_{SA} zwischen -60 mV und -70 mV (Jerng et al., 2004a). Dort ist hauptsächlich $K_V4.2$ der den I_{SA} vermittelnde Kanal, eine Verminderung der funktionellen $K_V4.2$ Aktivität geht mit einer verminderten I_{SA} Amplitude einher (Chen et al., 2006b; Kim und Hoffman, 2008). In Herzmuskelzellen vermitteln die K_V4 -Kanäle den transienten Auswärtsstrom I_{TO} (transient outward current), welcher wichtig für die frühe Phase der Aktionspotential-Repolarisation in Myozyten ist (Nerbonne und Kass, 2005). Die kinetischen Eigenschaften der A-Typ-Ströme unterscheiden sich deutlich in den verschiedenen Zelltypen. Dies kann an einer Zusammensetzung aus unterschiedlichen Kanalsubtypen, Phosphorylierung und der Interaktion mit β -Untereinheiten liegen. Die niedrige Aktivierungsschwelle und die schnelle Aktivierungskinetik ermöglichen dem $K_V4.2$ -Kanal dämpfend auf erregende Stimuli einzuwirken. Hierbei ist besonders die Lokalisation in den Dendriten von Bedeutung, da diese nicht nur passive, signalempfangende Eigenschaften besitzen sondern auch aktiv Signale modifizieren und sogar Aktionspotentiale generieren können (Johnston et al., 1996). Die Dichte des I_{SA} variiert innerhalb der Dendriten. Sie nimmt proportional mit der Entfernung vom Soma zu, während die Amplitude der langsam inaktivierenden K^+ -Ströme gleich bleibt (Hoffman et al., 1997). Dies korreliert mit der Abschwächung retrograd laufender Aktionspotentiale (bAPs, backpropagating action

potentials). Ihre Amplitude nimmt mit Entfernung vom Soma ab und verringert sich damit umgekehrt proportional zur Stromdichtezunahme des I_{SA} im Dendriten (Hoffman et al., 1997) (Abbildung 5). Durch zeitliches und räumliches Zusammentreffen eines bAP mit einer weiteren lokalen Depolarisation, beispielsweise in Form eines exzitatorischen postsynaptischen Potentials, kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Depolarisation. Dies scheint durch eine Inaktivierung der $K_{v4.2}$ -Kanäle mitbedingt zu sein (Magee und Johnston, 1997) und ist ein wichtiger Mechanismus intrinsischer Neuroplastizität.

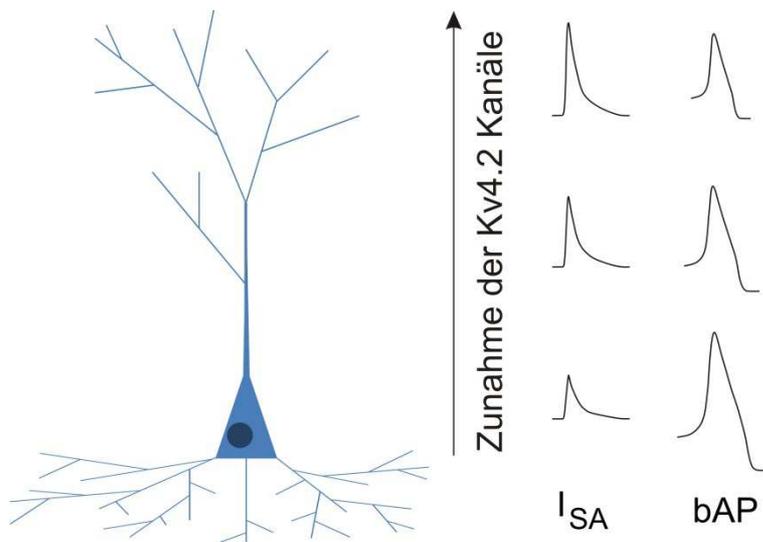


Abbildung 5: Verteilung von $K_{v4.2}$ in CA1 Pyramidenzellen.

Hier ist schematisch die Verteilung von $K_{v4.2}$ dargestellt, wobei die Dichte der Kanäle vom Soma bis zu den distalen Dendriten zunimmt. Daneben zu sehen ist die Amplitudenveränderung des I_{SA} und der rückwärtsgerichteten Aktionspotentiale (bAP) im Dendriten.

In den Dendriten befindet sich der $K_{v4.2}$ -Kanal vorwiegend in den Spines, was seinen Einfluss auf postsynaptische Potentiale begünstigt (Kim et al., 2005). Die Amplitude von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSPs) ist bei blockiertem I_{SA} größer, somit können schneller Aktionspotentiale generiert werden (Hoffman et al., 1997; Ramakers und Storm, 2002). Die frühe Inaktivierung des Kanals erlaubt eine Signalmodulation bei der zeitlichen Akkumulation mehrerer exzitatorischer Signale: da der Kanal beim Eintreffen des ersten Signals inaktiviert, kann er das nächste nicht mehr abschwächen. So kann unter physiologischen Bedingungen ein gepaartes Aufeinandertreffen einer unterschweligen Depolarisation mit einem bAP eine Verminderung der Depolarisationsabschwächung verursachen (Hoffman et al., 1997; Johnston et al., 2000; Migliore et al., 1999). Weiterhin verlängert der I_{SA} in Neuronen

bei Depolarisation die Latenz bis zum Aktionspotential und kann damit Einfluss auf die Spikefrequenz nehmen (Schoppa und Westbrook, 1999). Bei einer reduzierten I_{SA} Amplitude kann eine erniedrigte Schwelle für Langzeitpotenzierung (LTP) beobachtet werden (Chen et al., 2006a; Ramakers und Storm, 2002). Die Beeinflussung von I_{SA} und LTP scheint wechselseitig zu sein. Es wurde eine aktivitätsabhängige Internalisierung der $K_v4.2$ -Kanäle durch eine Clathrin vermittelte Endozytose nachgewiesen (Hammond et al., 2008; Kim et al., 2007). Auch eine chemisch induzierte LTP führte zu einer Internalisierung von $K_v4.2$ und Membraninsertion von AMPA Rezeptoren (Hammond et al., 2008; Kim et al., 2007). Zusätzlich beobachteten Frick et al. einen hyperpolarisierenden Shift in der *Steady-State*-Inaktivierungskurve des Kanals nach LTP Induktion (Frick et al., 2004).

Die funktionelle Verteilung von $K_v4.2$ wird von Transkription, Translation, posttranslationaler Modifikation und Interaktion mit β -Untereinheiten beeinflusst. Eine Oligomerisierung der Kanäle und das Binden von β -Untereinheiten beginnt bereits im Endoplasmatischem Retikulum, wobei die Bindung von β -Untereinheiten den Transport aus dem Endoplasmatischem Retikulum zu begünstigen scheint (An et al., 2000; Ma und Jan, 2002; Shibata et al., 2003). Der Transport in den Dendriten wird durch ein Di-Leucin-Motiv am C-Terminus und einer C-terminalen Interaktion mit Kif17, einem Motorprotein für den dendritischen Transport, bestimmt (Chu et al., 2006; Kim und Hoffman, 2008; Kim et al., 2005, 2007; Rivera et al., 2003, 2005). Der I_{SA} wird durch Phosphorylierung von den Proteinkinasen A und C (PKA, PKC), der Mitogen-abhängigen-Proteinkinase (MAPK) und der Calcium-Calmodulin abhängigen Kinase II (CaMKII) beeinflusst. Durch erhöhtes intrazelluläres Calcium können PKA und PKC direkt oder über MAPK Aktivierung zu einer Phosphorylierung von $K_v4.2$ und damit zu einer Positivverschiebung der Aktivierung führen (Jerng et al., 2004a; Schrader et al., 2002). Weiterhin kann durch eine CaMKII abhängige Phosphorylierung eine Zunahme des I_{SA} bewirkt werden (Varga et al., 2004). Auch kann durch Phosphorylierung am C- oder N-Terminus die Verweildauer des Kanals in der Membran (CaMKII), oder die Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften reguliert werden (PKA, PKC, MAPK) (Jerng et al., 2004a). Der synaptische Membranein- und ausbau ist von der Aktivität der PKA abhängig (Hammond et al., 2008). Ein enger Zusammenhang zwischen LTP und $K_v4.2$ Umverteilung von den Spines in die Dendriten wurde nachgewiesen

(Kim et al., 2007). Die Internalisierung von $K_V4.2$ -Kanälen ist von Glutamat-Rezeptor Aktivierung abhängig, weiterhin scheint sie Clathrin-vermittelt und von NMDA-Rezeptoraktivierung und Calciumeinstrom abhängig (Kim et al., 2007). Ein weiteres wichtiges Protein für den aktivitätsabhängigen Membraneinbau ist LGI1 (Smith et al., 2012).

Auch durch Toxine kann der $K_V4.2$ -Kanal beeinflusst werden: Es sind unter anderem mit 4-Aminopyridin, Tarantula-Toxin und NS5806 verschiedene Substanzen bekannt, die mit K_V4 -Kanälen interagieren und dadurch A-Typ-Ströme beeinflussen können (Sanguinetti et al., 1997; Ebbinghaus et al., 2004; Tseng et al., 1996; Witzel et al., 2012).

Der native I_{SA} in Neuronen und der I_{TO} in Myozyten unterscheiden sich deutlich von den in Zellkulturlinien gemessenen Strömen. Dies legt die Beteiligung akzessorischer β -Untereinheiten am I_{SA} nahe. Vor allem die Inaktivierung und die Erholung von der Inaktivierung sind langsamer als in nativen Zellen (Serôdio et al., 1994, 1996). Bislang sind zwei unterschiedliche akzessorische β -Untereinheiten bekannt: die K_V -Kanal-Interagierenden-Proteine (K_V -channel-interacting-proteins, KChIPs) und die Dipeptidyl-Aminopeptidase-ähnlichen-Proteine (DPPs) (Abbildung 6). KChIPs sind zytoplasmatische Proteine, die zur Familie der Neuronalen-Calcium-Sensoren (NCS) gehören und dementsprechend Calcium bindende EF-Hand Motive besitzen (An et al., 2000). Die Genfamilie der KChIPs umfasst vier verschiedene Mitglieder (KChIP1 bis KChIP4), welche wiederum jeweils in unterschiedlichen Splicevarianten existieren. Insgesamt wurden bislang zwölf verschiedene KChIP Varianten beschrieben (Jerng et al., 2004b). Alle Mitglieder dieser Familie kommen im ZNS vor. KChIP2 wird zusätzlich in Myozyten exprimiert, aber auch in anderen Geweben wurden KChIP Subtypen nachgewiesen (An et al., 2000; Pruunsild und Timmusk, 2005). KChIP1 scheint vor allem mit $K_V4.3$ in hippokampalen Interneuronen und Körnerzellen des Cerebellums zu interagieren, während KChIP2 vor allem in den Dendriten von hippokampalen und kortikalen Pyramidenzellen zusammen mit $K_V4.2$ auftritt (An et al., 2000).

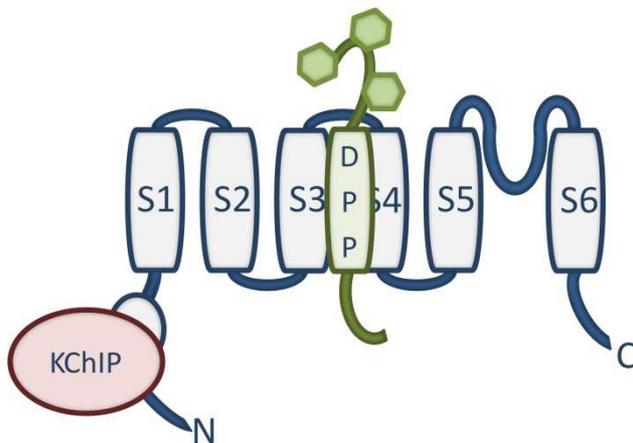


Abbildung 6: K_v4.2-α-Untereinheit mit KChIP und DPP.

An eine K_v4.2 α-Untereinheit können sich jeweils eine membrandurchspannende DPP β-Untereinheit zwischen das S3 und S4 Segment und ein KChIP an das aminoternale Ende im Bereich der T-Domäne anlagern. Beide wirken modulierend auf die Kanaleigenschaften.

Außer ihrer Funktion als akzessorische β-Untereinheiten für K_v4-Kanäle können KChIPs auch andere Funktionen innerhalb der Zelle übernehmen. So ist zum Beispiel KChIP3 identisch mit dem schon früher beschriebenen Calsenilin (Buxbaum et al., 1998) und bis auf eine Verkürzung von 30 Aminosäuren am N-Terminus auch mit dem Transkriptionsfaktor DREAM (downstream regulatory element antagonist modulator) (Carrión et al., 1999). Auch bei anderen NCS Proteinen (zum Beispiel Frequentin, NCS-1) kann eine Interaktion mit K_v4 beobachtet werden, diese ist aber sehr viel schwächer ausgeprägt als bei den KChIPs (Nakamura et al., 2001; Ren et al., 2003). KChIPs sind relativ kleine Proteine mit einer Länge von 200-250 Aminosäuren. Ihr C-terminaler Anteil ist hoch konserviert, sie besitzen dort jeweils vier EF-Hand-Motive, wovon drei funktionell sind, also Calcium binden können. Der N-terminale Bereich des Proteins ist sehr variabel. Hier sitzen wahrscheinlich Sequenzen, die für den Transport des Proteins von Bedeutung sind (An et al., 2000; O'Callaghan et al., 2003). Jeweils vier KChIPs und vier α-Untereinheiten lagern sich zu einem oktameren Kanalkomplex zusammen, wofür verschiedene Bindungsstellen verantwortlich sind. Die scheinbar wichtigste Bindung entsteht dadurch, dass KChIP eine hydrophobe Tasche bildet, in die der N-Terminus der α-Untereinheit eingebettet werden kann. Eine weitere Bindung besteht zwischen dem KChIP und der T-Domäne der benachbarten α-Untereinheit (Pioletti et al., 2006; Wang et al., 2007). Eine derartige Stabilisierung des Kanalkomplexes durch die bindenden KChIPs trägt wahrscheinlich auch zu einem erhöhten Membraneinbau des Kanals bei (Cui et al., 2008). Die Effekte von KChIP1,

KChIP2 und KChIP3 sind sehr ähnlich. Es kommt zu einer verstärkten Oberflächenexpression von K_{V4} und einer deutlichen Zunahme der Stromamplitude, was durch einen verstärkten Transport zur Plasmamembran erklärt wird (An et al., 2000; Bähring et al., 2001a). Eventuell ist dafür eine, durch KChIP Bindung verstärkte, Phosphorylierung am $K_{V4.2}$ -C-Terminus verantwortlich (Shibata et al., 2003). Auch für die Modulation des Kanals durch PKA scheint eine KChIP Bindung notwendig (Schrader et al., 2002). Zusätzlich wird auch das Schaltverhalten der Kanäle durch KChIP beeinflusst. Allgemein wird die initiale Phase der Inaktivierung verlangsamt und die Erholung von der Inaktivierung beschleunigt. Weiterhin vergrößert sich das Aktivierungsfenster, da es kaum zu einer Positivverschiebung der Aktivierungskurve, jedoch zu einer starken Verschiebung der *Steady-State*-Inaktivierungskurve zu positiveren Werten kommt (An et al., 2000; Bähring et al., 2001a; Gebauer et al., 2004; Jerng et al., 2005). KChIP4 besitzt eine Sonderstellung unter den KChIPs. Sein N-Terminus ist stark hydrophob und ähnelt dadurch einem Transmembransegment. Diese Domäne scheint die Inaktivierung des Kanals völlig aufzuheben und wird daher als „Inactivation supressor“ bezeichnet (Holmqvist et al., 2002; Jerng und Pfaffinger, 2008). Weiterhin führt die Koexpression von KChIP4 zu einer erhöhten Retention von K_{V4} im endoplasmatischen Retikulum (Shibata et al., 2003). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Koexpression von KChIP eine Umverteilung von $K_{V4.2}$ in die Peripherie des Neurons begünstigt. Dies scheint an der Beeinflussung von einem hydrophoben Retentionssignal am $K_{V4.2}$ N-Terminus durch KChIP zu liegen (Shibata et al., 2003). In Neuronen und Myozyten ist die Inaktivierungskinetik des I_{SA} deutlich schneller als bei alleiniger K_{V4} Expression. Da KChIP zu einer weiteren Verlangsamung führt, wurde vermutet, dass eine weitere β -Untereinheit am I_{SA} beteiligt ist. Es wurde nach sogenannten „Inaktivierungsbeschleunigern“ gesucht, die 2003 als DPPX identifiziert wurden (Nadal et al., 2003) und zur Familie der Dipeptidyl-Aminopeptidase-Proteine (DPP) gehören. Sie besitzen eine hohe Sequenzhomologie mit der Serin-Protease DPP4 (CD26) (Nadal et al., 2006). Allerdings ist beim DPPX im katalytischen Zentrum das Serin gegen ein Aspartat ausgetauscht und weist keine Peptidaseaktivität mehr auf (Kin et al., 2001). Die DPPs sind integrale, die Zellmembran einmal durchspannende Membranproteine mit einem zytoplasmatischen N-Terminus und einem relativ großen, stark konservierten extrazellulären C-Terminus. Es sind mehrere Splicevarianten bekannt, die sich

hauptsächlich in ihrem N-Terminus unterscheiden (Wada et al., 1992). Es gibt zwei mit K_{V4} interagierende Mitglieder dieser Familie, DPPX (DPP6) und DPPY (DPP10), die wiederum in verschiedenen Splicevarianten vorkommen (Jerng et al., 2004b). DPPX scheint stärker in den hauptsächlich $K_{V4.2}$ exprimierenden hippokampalen Pyramidenzellen vorhanden zu sein, während DPPY vor allem in den vorwiegend $K_{V4.3}$ exprimierenden Purkinje-Zellen und hippokampalen Interneuronen vorkommt (Zagha et al., 2005). DPPs können den Membraneinbau von K_{V4} begünstigen und somit zu einer bis zu zwanzigfachen Erhöhung der Stromamplitude führen (Nadal et al., 2003, 2006). Sowohl die Inaktivierung als auch die Erholung von der Inaktivierung werden durch DPPs beschleunigt. Die Aktivierungs- und die *Steady-State*-Inaktivierungskurve werden zu negativeren Potentialen verschoben, wodurch die unterschwellige Aktivierung des Kanals ermöglicht wird. Außerdem wird die *Time-to-Peak* verkürzt (Nadal et al., 2003).

Es wird angenommen, dass der neuronale I_{SA} von ternären Kanalkomplexen aus K_{V4} , KChIP und DPP vermittelt wird, da heterolog exprimierte Komplexe dieser Art dem nativen I_{SA} sehr ähneln (Jerng et al., 2005; Nadal et al., 2003). Wie oben beschrieben gibt es verschiedene Mechanismen der Einflussnahme von KChIPs und DPPs auf die Eigenschaften des I_{SA} . Allerdings ist weiterhin nicht vollständig geklärt, welche Rolle die neuronale $K_{V4.2}$ /KChIP-Interaktion bei der funktionellen Oberflächenexpression, der subzellulären Verteilung und aktivitätsabhängigen Internalisierung, als Basis der I_{SA} -Dynamik, spielt.

1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war herauszufinden, ob die Interaktion von KChIP2.1 mit $K_{V4.2}$ in Neuronen Einfluss auf die funktionelle Oberflächenexpression und somatodendritische Verteilung, sowie auf die Eigenschaften des I_{SA} hat. Hierzu wurde mittels *Patch-Clamp*-Technik der I_{SA} in kultivierten CA1 Pyramidenzellen untersucht. Neben den Kontrollmessungen wurden Untersuchungen an Neuronen durchgeführt, die mit cDNA des h $K_{V4.2}$ wt-Kanal beziehungsweise der KChIP bindungsdefizienten h $K_{V4.2A14K}$ Mutante transfiziert worden waren. Teilweise erfolgte die Kofransfektion mit hKChIP2.1. Im *Whole-Cell*-Modus wurde die Amplitude des I_{SA} bestimmt, um

Rückschlüsse auf die funktionelle Oberflächenexpression von $K_v4.2$ zu ziehen. Des Weiteren wurde die Inaktivierungskinetik untersucht. Zusätzlich wurde die Erholung von der Inaktivierung und die Spannungsabhängigkeit der *Steady-State*-Inaktivierung der neuronalen Auswärtsströme bestimmt. Um einen Hinweis auf die somatodendritische Oberflächenverteilung von $K_v4.2$ zu erhalten wurde der I_{SA} in *Nucleated-Patch*-Messungen mit dem der *Whole-Cell*-Ableitungen verglichen. Eine KChIP Beteiligung an der aktivitätsabhängigen Internalisierung von $K_v4.2$ wurde mittels Induktion synaptischer Aktivität durch AMPA überprüft. Da KChIP ein calciumbindendes Protein ist wurde zusätzlich die Calciumabhängigkeit der $K_v4.2$ /KChIP2.1-Interaktion mit verschiedenen Intrazellulärlösungen untersucht.

2 Material und Methoden

Zur Untersuchung der Kaliumströme an Neuronen wurden die Experimente mittels *Patch-Clamp*-Technik an mit Plasmid-DNA transfizierten, hippocampalen Neuronen durchgeführt.

2.1 Heterologe Expression von Plasmid-DNA in kultivierten hippocampalen Neuronen

2.1.1 *Primärkultur hippocampaler Neurone*

Die kultivierten hippocampalen Neurone wurden von Michaela Schweizer und Frank Heisler (Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg) bereitgestellt. Neugeborene Ratten (P0) wurden durch Dekapitation getötet und die Hippokampi präpariert, anschließend erfolgte die Vereinzelung der Neurone durch Zugabe von Papain. Nach Entfernen der Peptidase durch mehrere Waschstschritte wurden die Zellen mit einer rund geschmolzenen Pasteurpipette trituriert. Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen (12 mm) wurden die Neurone mit Plattierungsmedium in 24-well-Kulturplatten ausgesät. Nach 3 Stunden Inkubation wurde das Medium gegen Neurobasalmedium A mit B27 Supplement und dem Zusatz von AraC 5 μ M ausgetauscht. Ein Mediumwechsel fand zweimal in der Woche mit Neurobasalmedium A mit B27 Supplement statt, wobei jeweils nur 2/3 des Mediums ersetzt wurde, um die von den Zellen abgegebenen Faktoren nicht vollständig auszuwaschen. Insgesamt befanden sich die Deckgläschen in jeweils circa 2 ml Medium. Aufbewahrt wurden die Neuronen bei 37°C und 5% CO₂. Die Zeit, in der die Zellen sich in Kultur befinden wird in DIV (Days in Vitro) angegeben.

2.1.2 *Verwendete Plasmid-DNA*

Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten DNA, sowie Herstellung von kompetenten Bakterien, Transformation und Isolation der DNA erfolgten durch Kamila Szlachta (Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf).

Enhanced-Green-Fluorescent-Protein (BD Biosciences, Heidelberg) (nachfolgend als EGFP bezeichnet): Dieses Protein wurde zur Herstellung der unten aufgeführten Fusionsproteine verwendet und als Transfektionskontrolle eingesetzt.

hK_v4.2wt-HA-EGFP (nachfolgend als WT bezeichnet): Ein humaner Klon der K_v4.2- α -Untereinheit mit einem Hämagglutinin-Epitop (HA) in der ersten extrazellulären Schleife (zwischen AS 216 und 217) (Callsen et al., 2005) wurde mit einem EGFP am C-Terminus fusioniert (Abbildung 7).

hK_v4.2A14K-HA-EGFP (nachfolgend als A14K bezeichnet): Dieses Konstrukt enthält zusätzlich zum HA-Epitop und EGFP eine Punktmutation, welche die Interaktion mit KChIP2 verhindert (Callsen et al., 2005).

hK_v4.2600 Δ -HA-EGFP (nachfolgend als 600 Δ bezeichnet): Die letzten 30 Aminosäuren des Kanals wurden durch EGFP ersetzt. Durch diese Mutation soll der Kif17 vermittelte dendritische Transport verhindert werden (Chu et al., 2006).

hKChIP2.1 (nachfolgend als KChIP2 bezeichnet): Ein Klon des humanen KChIP2.1 (An et al., 2000).

Für alle Klone wurde pcDNA3 als Expressionsvektor verwendet.

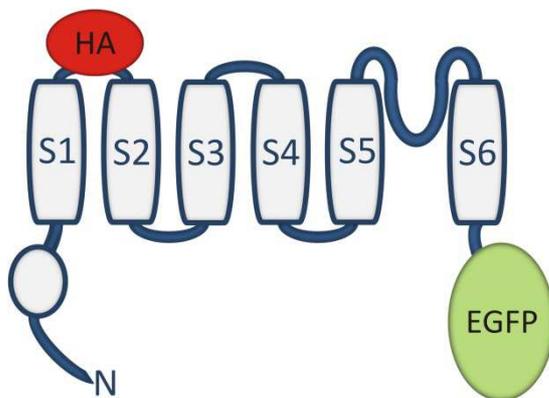


Abbildung 7: hK_v4.2 mit HA-Epitop und EGFP.

Schematische Darstellung eines Klonen der humanen K_v4.2- α -Untereinheit mit einem Hämagglutinin-Epitop in der ersten extrazellulären Schleife und einem EGFP am C-Terminus.

2.1.3 Transfektion primärer Neurone

In kultivierte Neurone wurde zwischen DIV 7 und DIV 10 Plasmid DNA durch Transfektion mit Calciumphosphat eingebracht. Bei längerem Bestehen der Neuronenkultur kam es zu vermehrt apoptotischen Zellen, jedoch wurden die Neurone

möglichst lange kultiviert, damit sie so weit wie möglich aussprossen konnten. Die Transfektion mit Calciumphosphat stellt, gerade für Neurone, ein relativ schonendes und kostengünstiges Vorgehen dar. Bei dieser Methode bildet die zu übertragende DNA mit Calciumphosphat Kopräzipitate und kann somit durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Probleme können durch den hydrolytischen Abbau der DNA und die toxische Wirkungen der Calciumphosphat-Präzipitate auf die Zelle entstehen. Die folgenden Maßangaben beziehen sich auf die Transfektion von zwei, mit Neuronen beschichteten Deckgläschen in jeweils etwa 1 ml Medium. Für die Herstellung des Transfektionsmix wurden 4 µg Plasmid DNA mit H₂O auf 18,75 µl aufgefüllt. Bei Kotransfektion wurden jeweils gleiche Anteile Plasmid DNA gemischt. Anschließend wurden 6,25 µl einer frisch angesetzten 1 M Calciumchloridlösung hinzugegeben und durch vorsichtiges Auf- und Absaugen mit der Pipettenspitze durchmischt bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Danach wurde die Lösung durch Zugabe von 25 µl HBS Pufferlösung (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 12 mM Dextrose, 50 mM HEPES, pH 7,05) auf das doppelte Volumen aufgefüllt und mit Luftblasen aus der Pipette durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden 25 µl des Transfektionsmix auf die Neurone gegeben. Dafür wurde zunächst circa 3/4 des Mediums von den Neuronen abgenommen und bei 37°C aufbewahrt. Nach einer Inkubationszeit von etwa 45 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Neurone zweimal mit HEPES gewaschen, wobei jeweils 1/4 des Medium in den Kulturschalen belassen wurde. Abschließend wurde das anfänglich abgenommene Medium wieder auf die Neurone gegeben. Die elektrophysiologische Untersuchung der Zellen erfolgte frühestens 18 Stunden und spätestens 48 Stunden nach Transfektion.

Unter Anwendung dieses Verfahrens wurden Neurone mit Enhanced-Green-Fluorescent-Protein (Kontrolle, Kontrollneurone), hKChIP2.1 (KChIP2, KChIP2-Neurone), hK_v4.2wt-HA-EGFP (WT, WT-Neurone), hK_v4.2A14K-HA-EGFP (A14K, A14K-Neurone), hK_v4.2600Δ-HA-EGFP (600Δ, 600Δ-Neurone), hK_v4.2wt-HA-EGFP und hKChIP2.1 (WT+KChIP2, WT+KChIP2-Neurone), hK_v4.2A14K-HA-EGFP und hKChIP2.1 (A14K+KChIP2, A14K+KChIP2-Neurone) transfiziert. Die Eigenfluoreszenz der Proteine war nicht stark genug um am Messplatz zweifelsfrei erkannt zu werden. Daher wurde bei allen Experimenten EGFP kotransfiziert um Plasmid tragende Zellen eindeutig zu erkennen.

2.2 Elektrophysiologische Untersuchungen

Die 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelte und mit dem Nobelpreis ausgezeichnete *Patch-Clamp*-Technik eignet sich gut um Leitfähigkeiten von Ionenkanälen in kleinen Zellen darzustellen. Die Vorgabe einer gewünschten Spannung und das synchrone Messen des Stroms lassen Rückschlüsse auf den Ionenfluss über die Zellmembran zu (Numberger und Draguhn, 1996; Neher und Sakmann, 1976).

2.2.1 Prinzip der Patch-Clamp-Technik

Das Prinzip dieser Technik besteht darin, das Membranpotential mit Hilfe eines Kompensationsstroms bei einem definierten Wert zu halten. Aus der Größe des notwendigen Kompensationsstromes sind unmittelbar Schlüsse auf die Leitfähigkeit der Zellmembran möglich. Eine Elektrode in einer, mit Elektrolytlösung (Intrazellulärlösung) gefüllten Mikropipette aus Glas (*Patchpipette*), stellt die Intrazellulärableitung dar. Am Messstand ist in unmittelbarer räumlicher Nähe zur *Patchpipette* der Vorverstärker angebracht. Seine Aufgabe ist, die Spannung konstant zu halten und den Kompensationsstrom zu messen (Abbildung 8 zeigt ein vereinfachtes Schaltbild).

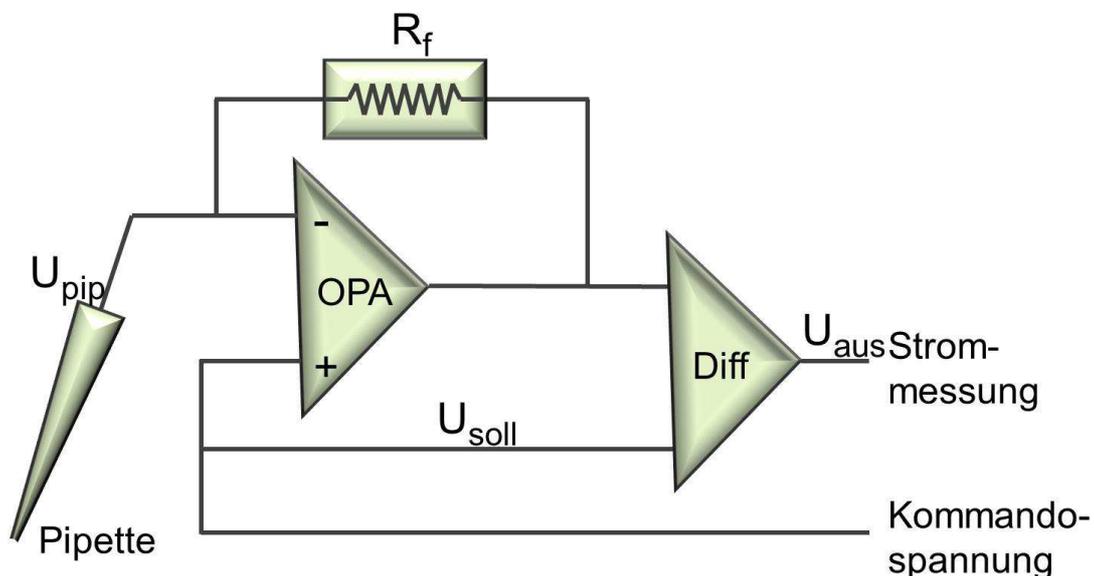


Abbildung 8: Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers.

Der Operationsverstärker (OPA) erzeugt aus der Differenz von Sollspannung (U_{soll}) und Pipettenpotential (U_{pip}) einen Kompensationsstrom, der über einen Rückkopplungswiderstand (R_f) in die Pipette fließt. Der Differentialverstärker (Diff) kann aus Sollspannung und Kompensationsstrom die Ausgangsspannung (U_{aus}) errechnen (modifiziert nach Numberger und Draguhn 1996).

Die wichtigsten Elemente des Vorverstärkers sind der Operationsverstärker (OPA) und der Rückkopplungswiderstand (R_f). An den beiden Eingängen des OPA werden die Pipettenspannung (U_{Pip}) und die Sollspannung (U_{Soll}) gemessen. An seinem Ausgang wird eine Spannung erzeugt, die proportional zu der Differenz der beiden Eingangsspannungen jedoch stark verstärkt ist. Da der Eingangswiderstand des OPA unendlich hoch ist, fließt der gesamte Strom in die Pipette und zwar genau so lange, bis die beiden Eingangsspannungen des OPA, also U_{Pip} und U_{Soll} exakt gleich groß sind. Aus der Spannungsdifferenz von U_{Soll} und der vom OPA generierten Spannung erzeugt der Differentialverstärker eine Ausgangsspannung (U_{Aus}). Die Steuerungseinheit kann nun aus der Ausgangsspannung und einem (von R_f abhängigem) Kalibrierungsfaktor den über die Zellmembran fließenden Strom berechnen. Kapazitive Eigenschaften von R_f werden durch Korrekturschaltkreise im Verstärker ausgeglichen.

2.2.2 Aufbau des Messstandes

Mit der *Patch-Clamp*-Technik können sehr kleine Ionenströme (im Bereich weniger pA) bestimmt werden. Daher ist es besonders wichtig das Rauschen mit einer sehr dichten und stabilen Bindung zwischen Zelle und Pipette so gering wie möglich zu halten. Der gesamte Messstand muss also sowohl elektrisch durch einen Faradaykäfig als auch mechanisch durch einen schwingungsgedämpften Messtisch abgeschirmt werden. Als Messkammern wurden 35 mm Zellkulturschalen verwendet, die auf dem beweglichen Objektstisch eines inversen Mikroskops (Axiovert, Zeiss) mit bis zu 400-facher Vergrößerung und Phasenkontrastoptik fixiert wurden. EGFP exprimierende Zellen wurden mit Hilfe einer HBO-UV-Lichtquelle detektiert. Die *Patchpipetten* wurden mit Intrazellulärlösung (ic) befüllt und direkt am Vorverstärker befestigt, wobei die Verbindung zum Verstärker über einen in die Pipette eingeführten chlorierten Silberdraht hergestellt wurde. Als Badelektrode dienten ein Ag/AgCl-Pellet oder eine mit Agar befüllte Glaskapillare. Die Pipettenbewegungen während des Experiments wurden mit Hilfe eines elektronischen Mikromanipulators durchgeführt, der ein exaktes Aufsetzen der Pipette auf die zu untersuchende Zelle ermöglichte. Während der Messungen erfolgten eine langsame Superfusion der Zellen mit Messlösung und ein Absaugen an der Oberfläche mittels Vakuumpumpe.

2.2.3 Messpipetten

Patchpipetten wurden mit einem horizontalen Pipettenziehgerät (DMZ-Puller, Zeitz) aus Borosilikatglaskapillaren mit Filament (Science Products) gezogen und poliert. Die Kapillaren hatten eine Länge von 80 mm, einem Außendurchmesser von 1,50 mm und einem Innendurchmesser von 1,05 mm. Um einen hohen *Seal*-Widerstand zu erreichen wurde für jedes Experiment eine saubere, unbenutzte Pipette bis zu wenige Stunden nach ihrer Herstellung verwendet. Für die *Nucleated-Patch*-Ableitungen wurden Pipetten eingesetzt, welche beim Eintauchen in die Versuchslösung einen Widerstand von 3-5 M Ω zeigten. In allen anderen Experimenten wurden Pipetten mit einem Widerstand von 2-4 M Ω eingesetzt.

2.2.4 Messlösungen

Alle Intrazellulärlösungen (ic) wurden mit KOH auf einen pH von 7,2 eingestellt, steril filtriert, bei 4°C gelagert und direkt vor dem Einfüllen in die *Patchpipette* nochmals steril filtriert. Alle Extrazellulärlösungen (ec) wurden steril filtriert und bei Raumtemperatur gelagert. Das *Liquid-Junction*-Potential der Lösungen wurde bestimmt und korrigiert.

ic1: 140 mM K-MeSO₃, 5 mM KCl, 0,5 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES; direkt vor der Messung wurden 2 mM MgATP (507,2 g/mol; 0,01g/10ml) zugegeben und der pH Wert nochmals mit KOH Lösung auf 7,2 eingestellt.

ec1: 160 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose; der pH-Wert der ec wurde mit 1 M NaOH Lösung auf 7,3 eingestellt.

ic2 (Sather et al., 1992): 98 mM KCl, 7 mM HEPES, 7 mM EGTA

ec2 (Sather et al., 1992): 140 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 10 mM Hepes; der pH-Wert der ec wurde mit 1 M NaOH Lösung auf 7,2 eingestellt und die Lösung steril filtriert.

ic3: 98 mM KCl, 0,5 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, 5 mM EGTA

Nucleated-Patch-Experimente wurden mit ic2 und ec2 durchgeführt, Experimente zur Bestimmung der Calciumabhängigkeit mit ic2 oder ic3 und ec2. Alle anderen Experimente erfolgten mit ic1 und ec1.

2.2.5 Durchführung der Experimente

Alle Experimente fanden bei Raumtemperatur (20-25°C) statt. Die mit Neuronen beschichteten Deckgläschen wurden in, mit Extrazellulärlösung befüllten, 35 mm Zellkulturschalen am Mikroskop befestigt. Plasmid-DNA tragende Neurone wurden an einer grün fluoreszierenden Farbe unter einer HBO-UV Lichtquelle am Messstand erkannt. Eine frische *Patchpipette* wurde luftblasenfrei mit Intrazellulärlösung befüllt und an der Silberchloridelektrode am Vorverstärker angebracht. Vor Beginn des Experiments wurde das *Liquid-Junction*-Potential der Messlösungen ausgeglichen. Sobald sich die Pipette in der Badlösung befand, wurde ein Nullwert für das Potential festgelegt. Dies ist normalerweise der Wert an dem kein Strom zwischen Pipetten- und Badelektrode fließt. Nach der Nullpunkteinstellung wurde ein repetitiver Spannungspuls erzeugt, der registrierte Strom wurde am Computer dargestellt. Unabdingbar für ein gelungenes *Patch-Clamp*-Experiment ist die Bildung eines sogenannten *Gigaseals*, durch den Leckströme und Rauschen stark verringert werden (Hamill et al., 1981). Dieser *Gigaseal* ist ein im Gigaohm Bereich liegender Abdichtungswiderstand zwischen Pipettenöffnung und Zellmembran. Er kommt zustande, indem ein Membranstück vorsichtig an die Pipettenöffnung angesaugt wird und sich zwischen Pipetenglas und Zellmembran ein stabiler Kontakt bildet. Durch diesen *Gigaseal* werden nach Anlegen einer Spannung die Leckströme sehr klein gehalten und das Rauschen wird stark reduziert. Worauf genau diese feste Bindung beruht, ist nicht vollständig geklärt (Milton und Caldwell, 1990). Voraussetzung für einen *Gigaseal* ist eine unbenutzte und saubere *Patchpipette*, die möglichst genau an eine intakte Zelle herangefahren wird. Um ein Verschmutzen der Pipette in der Badlösung zu verhindern, wird vor dem Eintauchen ein Überdruck angelegt, so dass kontinuierlich Flüssigkeit aus der Pipette ausströmt. Sobald sich die Pipettenöffnung in der Nähe der ausgewählten Zelle befindet, wird der Überdruck reduziert und durch Anlegen eines moderaten Unterdrucks die Zellmembran an die Pipette herangesaugt. Dass die zur Reduktion des Überdrucks notwendige Nähe zur Zelle erreicht ist, kann zum einen im Mikroskop, zum

anderen an einer Änderung des Stromsignals auf dem Bildschirm erkannt werden. Im Mikroskop sieht man eine Verformung der Zellmembran (hierzu ist eine Kontrastverstärkung des Objektivs notwendig). Gleichzeitig wird eine Erhöhung des Pipettenwiderstandes, die sich als Abnahme der Stromamplitude darstellt, beobachtet. Sobald sich ein *Gigaseal* gebildet hat wird der Unterdruck abgelassen. Um bei Neuronen in den *Whole-Cell*-Modus zu gelangen, wurde nach Erhalt des *Gigaseals* eine Spannung von -70 mV angelegt und durch einen erneuten, diesmal jedoch stärkeren Unterdruck die unter der Pipettenöffnung liegende Zellmembran zerstört. Auch nach Öffnung der Zellmembran und zwischen den einzelnen Untersuchungen wurde eine Spannung von -70 mV vorgegeben. An dem Übergang zwischen Pipette und Zellinneren entsteht der Serienwiderstand (R_S). Im Idealfall würde R_S dem Pipettenwiderstand (R_{pip}) entsprechen. Dies ist praktisch nicht realisierbar, da beim Öffnen der Zelle Membranbestandteile oder sogar Zellorganellen in die Pipettenöffnung gesogen werden. An R_S kommt es zu einem Spannungsabfall und einer Geschwindigkeitsverzögerung der Strominjektion. Dies führt zu einer verzerrten Wiedergabe von Leitfähigkeitsänderungen der Zelle und einer Abweichung der tatsächlichen Spannung von der Sollspannung. Daher sollte R_S möglichst klein gehalten, beziehungsweise kompensiert werden. Der Serienwiderstand lag in der *Whole-Cell*-Konfiguration typischerweise zwischen 6 und 15 M Ω . In der *Nucleated-Patch*-Konfiguration waren die Serienwiderstände teilweise deutlich höher. Kompensiert wurde in sehr unterschiedlichem Ausmaß (meist zwischen 30% und 70%), da die Messungen häufig sehr empfindlich auf die Kompensation reagierten. Bei der Ganzzelleableitung an stark verzweigten Zellen wie Neuronen entsteht ein weiteres Problem: es gibt sehr viele Engpässe innerhalb der Zelle, die sich wie einzelne Serienwiderstände auswirken können. Die dahinter liegenden Teile werden nicht ausreichend von der Spannungsklemme erfasst. Dieses Phänomen ist als sogenanntes *Space-Clamp*-Problem bekannt. Daher ist es schwierig in solchen Zellen transiente Ströme mit hoher Amplitude als Ganzzellströme zu messen (Armstrong und Gilly, 1992). Schnelle (Pipettenkapazität) und langsame (Zellkapazität) kapazitive Artefakte wurden vom Verstärker kompensiert.

2.2.6 Ableitkonfigurationen

Patch-Clamp-Experimente können in verschiedenen Ableitkonfigurationen durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurden Experimente in der *Whole-Cell*- und *Nucleated-Patch*-Konfiguration durchgeführt (Abbildung 9). Gleich nach Ausbildung des *Gigaseals* befindet sich die Ableitung in der *Cell-Attached*-Konfiguration. Die Zellmembran bleibt bei dieser Ableitmethode intakt. So können ausschließlich in der unter der Pipettenöffnung liegenden Membran Ströme gemessen und Spannungen vorgegeben werden. Weder das gesamte Membranpotential noch die Zytoplasmazusammensetzung sind bekannt. Die *Cell-Attached*-Konfiguration ist darüber hinaus die Ausgangsposition für die weiteren *Patch-Clamp*-Konfigurationen. Wird die Zellmembran eröffnet, erhält man zunächst die *Whole-Cell*-Konfiguration. Dazu wird die unter der Pipettenöffnung liegende Zellmembran durch einen an der Pipette anliegenden Unterdruck (oder einen kurzen Spannungspuls) mechanisch zerstört. Alternativ können auch durch Verwendung von beispielsweise Nystatin künstliche Poren in diesen Bereich der Zellmembran eingebaut werden. Durch die Öffnung der Zellmembran kommt es zu einem Austausch von Zytoplasma und Pipettenlösung. Da die Menge der Pipettenlösung die des Zytoplasmas bei weitem übersteigt, entspricht die Intrazellulärflüssigkeit praktisch der Pipettenlösung. Die *Whole-Cell*-Konfiguration ermöglicht es, eine Kommandospannung für die ganze Zelle vorzugeben und Ströme in der gesamten Zellmembran zu messen. Es ist jedoch nicht möglich, die Ströme einzelner Kanäle zu differenzieren. Es werden sogenannte makroskopische Ströme gemessen, welche sich aus der Summe aller Einzelkanalströme bilden. Einzelkanalströme und Ströme eines definierten Membranstücks können mittels *Outside-Out*-Konfiguration bestimmt werden. Indem, von der Ganzzelle ableitung ausgehend, die Pipette langsam und axial von der Zelle zurückgezogen wird, löst sich ein Stück Membran und schließt sich als Vesikel um die Pipettenöffnung. Die Membranaußenseite bleibt der Badlösung zugewandt. Eine Mischung aus *Whole-Cell*- und *Outside-Out*-Konfiguration ist der *Nucleated-Patch*. Zunächst wird eine *Whole-Cell*-Konfiguration hergestellt, wobei die Pipette möglichst nahe dem Nucleus aufgesetzt werden sollte. Nach Eröffnen der Zellmembran wird die Pipette mit Anlage eines moderaten Unterdrucks langsam axial zurückgezogen. Dabei sollte sich der Zellkern an die Pipettenöffnung legen und in einem Membranvesikel an der Pipettenspitze haften bleiben. Somit ist der *Nucleated-Patch* etwas größer als der

Outside-Out-Patch, aber definierter als die *Whole-Cell*-Ableitung. Hilfreich beim Erlangen dieser Konfiguration kann eine hypoosmolare Pipettenlösung sein, um das Ablösen eines größeren Membranvesikels zu erleichtern (Sather et al., 1992). Eine weitere gängige Messmethode ist die *Inside-Out*-Konfiguration. Hier ist die ursprünglich intrazelluläre Seite der Zellmembran zur Badlösung und die ursprünglich extrazelluläre Seite zur Pipettenlösung hin exponiert.

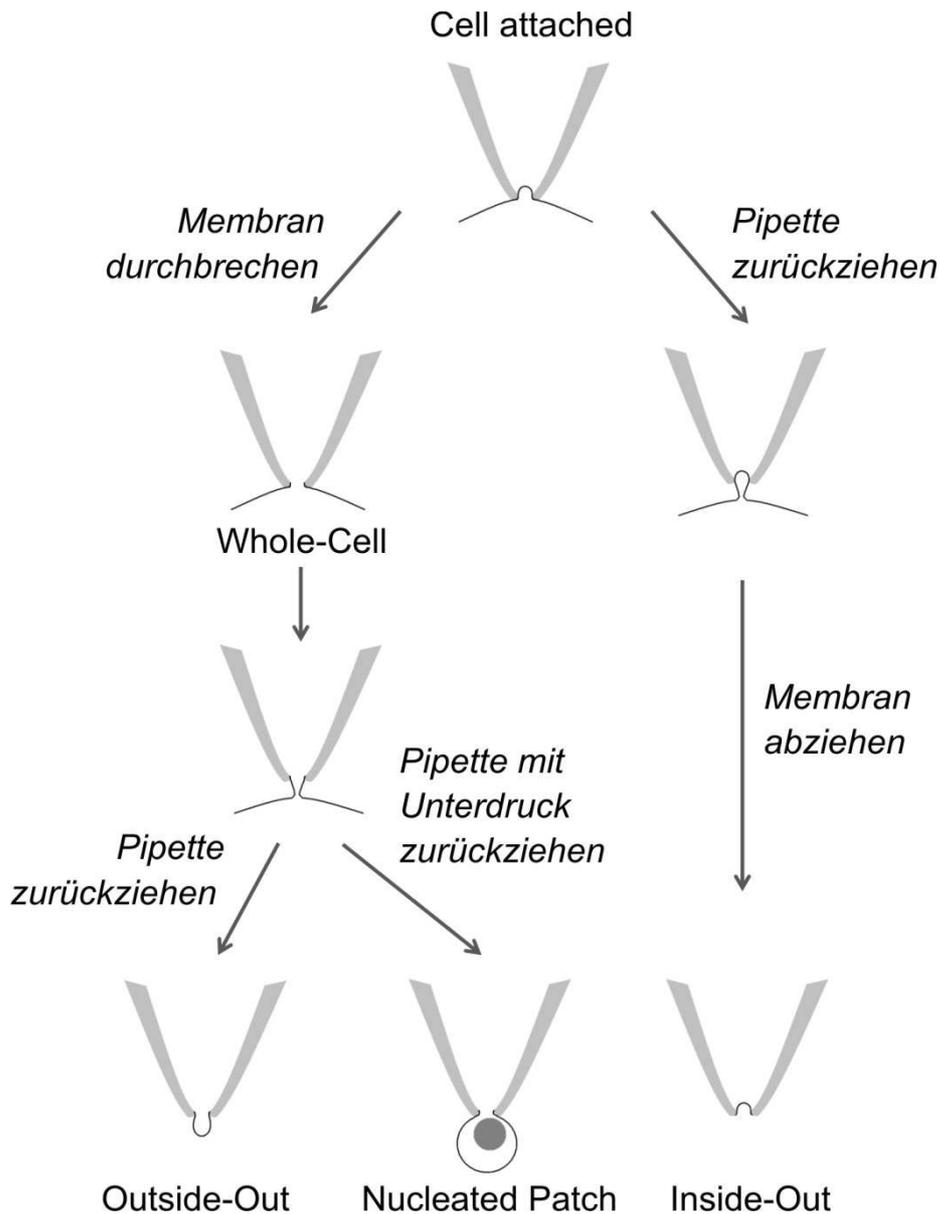


Abbildung 9: Verschiedene Patch-Clamp Messkonfigurationen.

Diese Abbildung zeigt schematisch verschiedene Messkonfigurationen der *Patch-Clamp*-Technik und ihre Herstellung. Modifiziert nach (Hamill et al. 1981).

2.2.7 AMPA-Behandlung der Neuronenkulturen

Um synaptische Aktivität zu induzieren, wurden Neurone unmittelbar vor der elektrophysiologischen Untersuchung mit AMPA stimuliert. AMPA bindet an die extrasynaptischen AMPA-Rezeptoren der Neurone und löst dadurch eine Depolarisation aus, wodurch die Glutamatausschüttung stimuliert wird. Somit kommt es zu einer erhöhten Konzentration von Glutamat im synaptischen Spalt, welche mit einer vermehrten Stimulation der postsynaptischen AMPA und NMDA-Rezeptoren einhergeht (Kim et al., 2007). Vor der Messung wurden die Neurone einen Tag nach Kotransfektion von WT+KChIP2 oder A14K+KChIP2 mit 100 μ M AMPA im Nährmedium bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank 12 Minuten inkubiert. Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten 5-60 Minuten nach Abschluss der Inkubation. Es wurden jeweils mehrere Messungen an einem Neuron durchgeführt. Aus den einzelnen Messungen wurde ein Mittelwert für das entsprechende Neuron gebildet, welcher in die Gesamtauswertung einfließt. AMPA-Behandlung und Messungen der Neurone wurden von Daniel Minge durchgeführt.

2.3 Verwendete Stimulationsprotokolle und Datenauswertung

Für die Programmierung der Messprotokolle wurde PULSE (HEKA Elektronik) verwendet. Zur Auswertung der Daten dienten die Programme PULSE FIT (HEKA Elektronik), KaleidaGraph (Synergy Software) und Excel 2010 (Microsoft). Abbildungen wurden mit Hilfe von KaleidaGraph (Synergy Software), Office 2010 (Microsoft) und CorelDRAW (Corel Corporation) erstellt.

2.3.1 Auswertung der einzelnen Experimente

Kaliumstromkomponenten

Um sowohl den I_{SA} als auch die langsam inaktivierenden Kaliumströme (I_K) zu aktivieren, erfolgte nach einem 200 ms langen Vorpuls bei -110 mV ein Spannungssprung auf +40 mV. Durch einen 200 ms langen Vorpuls bei -30 mV wurde der I_{SA} inaktiviert und durch einen anschließenden Spannungssprung auf +40 mV nur der I_K aktiviert. Der I_{SA} wurde durch Subtraktion des I_K vom Gesamtstrom ermittelt.

Inaktivierungskinetik makroskopischer Ströme

Um die makroskopische Inaktivierung des I_{SA} zu untersuchen, wurde der Inaktivierungskinetik eine zweifach-exponentielle Funktion angepasst. So konnten eine erste und zweite Zeitkonstante (τ_1 und τ_2) der makroskopischen Inaktivierung ermittelt werden. Konnte keine passende Funktion ermittelt werden, wurde das Experiment nicht in die Wertung einbezogen. Zusätzlich wurde mit der relativen Amplitude des τ_1 ($A\tau_1$) (%) der prozentuale Anteil der ersten Komponente an der Gesamtamplitude bestimmt:

$$A\tau_1 (\%) = \frac{A_1}{A_1 + A_2} \cdot 100$$

A = relative Amplitude, τ_1 = Erste Zeitkonstante der Inaktivierung

Erholung von der Inaktivierung

Die Erholung von der Inaktivierung (*recovery*) wurde mit einem Doppelpuls-Protokoll bestimmt. Nach einem Kontrollpuls von -80 mV auf +40 mV wurde das Membranpotential bei -80 mV für eine Dauer von $t_1=5$ ms bis $t_{11}=5120$ ms mit $t_n=2(t_{n-1})$ gehalten, bevor ein Testpuls auf +40 mV folgte. Die *Peak-Amplitude* des vom Testpuls erzeugten Stroms wurde auf die des Kontrollpulses normiert und logarithmisch gegen die Dauer von t_n aufgetragen. An diese Werte wurde eine zweifach-exponentielle Funktion angeglichen. Daraus ergaben sich mit τ_{rec1} und τ_{rec2} zwei Komponenten der Erholung von der Inaktivierung. Konnte keine passende Funktion ermittelt werden, wurde das Experiment nicht in die Wertung einbezogen. Die relative Amplitude von τ_{rec1} ($A\tau_{rec1}$) (%) drückt den prozentualen Anteil der ersten Komponente (τ_{rec1}) an der gesamten Erholung von der Inaktivierung aus:

$$A\tau_{rec1} (\%) = \frac{A\tau_{rec1}}{A\tau_{rec1} + A\tau_{rec2}} \cdot 100$$

Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung

Die Spannungsabhängigkeit der *Steady-State*-Inaktivierung wurde untersucht, indem nach einem 2500 ms langen, variablen Vorpuls ein Testpuls auf +40 mV folgte. Eine Änderung des Vorpulses erfolgte in 5 mV Schritten von -110 mV bis +20 mV. Das Haltepotential zwischen Testpuls und Vorpuls betrug -110 mV. Die mit Testpulsen ermittelten Stromamplituden wurden auf die größte erzielte Stromamplitude (I_{max}) normiert (I/I_{max}) und gegen die Spannung des Vorpulses aufgetragen. Hieraus ergab sich eine Kurve, die zwei Komponenten der Spannungsabhängigkeit von der Inaktivierung

darstellte. An diese Kurve wurde eine doppelte Boltzmannfunktion angepasst. So konnte die Spannung der halbmaximalen Inaktivierung für die erste ($V_{1/21}$) und zweite ($V_{1/22}$) Komponente der Inaktivierung, sowie der *Slope-Faktor* ($k1$) und ($k2$) ermittelt werden.

2.3.2 *Statistische Auswertung*

Die Daten werden in Mittelwerten (mean) und dem entsprechenden Standardfehler (SEM = Standard Error of the Mean) gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte zum Vergleich zweier Experimentengruppen mit einem zweiseitigen t-Test. Bei mehreren Vergleichsgruppen wurde statistische Signifikanz anhand der einzelnen Datenpunkte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit Post Hoc Test (Tukey) ermittelt. Ein Unterschied wurde bei $p < 0,05$ als signifikant und $p < 0,0001$ als hoch signifikant angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Whole-Cell-Ableitungen nativer A-Typ-Ströme von kultivierten hippocampalen Neuronen

Um die funktionellen Aspekte des somatodendritischen A-Typ-Stroms (I_{SA}) in hippocampalen Neuronen zu untersuchen, wurden mittels *Patch-Clamp*-Technik in der *Whole-Cell*-Konfiguration folgende Komponenten des I_{SA} bestimmt: die Amplitude, die schnelle (τ_1) und die langsame (τ_2) Komponente der makroskopischen Inaktivierung. Weiterhin wurden die Erholung von der Inaktivierung mit erster und zweiter Komponente (τ_{rec1} und τ_{rec2}) und die *Steady-State*-Inaktivierung der Kaliumströme mit der Spannung der halbmaximalen Inaktivierung und *Slope-Faktor* für eine erste und eine zweite Komponente ($V_{1/21}$ und $V_{1/22}$, sowie k_1 und k_2) bestimmt. Zudem wurde die Amplitude der langsam inaktivierenden Kaliumströme (I_K) ermittelt. Als Kontrollzellen dienten ausschließlich mit EGFP transfizierte Neurone (n=22).

3.1.1 Stromamplituden nativer Kaliumströme

Zunächst wurden die Stromamplituden des I_{SA} und des I_K an Kontrollneuronen ermittelt. I_{SA} und I_K , sowie der Gesamtauswärtsstrom sind in Abbildung 10 A-C dargestellt. Die durchschnittliche Amplitude des I_{SA} betrug $3,01 \pm 0,49$ nA (n=22). Die durchschnittliche Amplitude des I_K betrug $3,08 \pm 0,28$ nA (n=22). Die relative Amplitude I_{SA}/I_K ergab einen Wert von $0,89 \pm 0,08$ (n=22) (Abbildung 10 D).

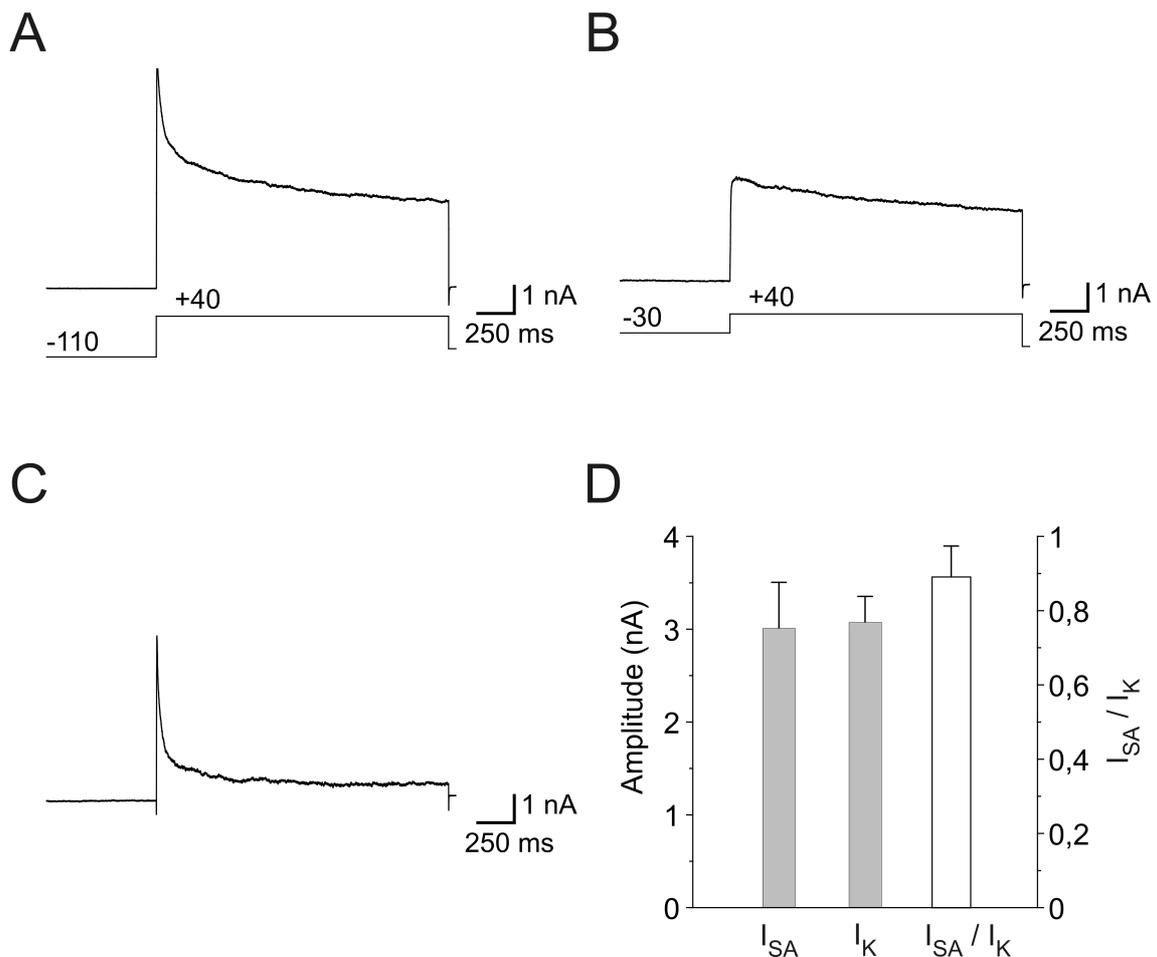


Abbildung 10: Subtraktion der Kaliumstromkurven.

A: Aktivierung sowohl der langsam inaktivierenden (I_K) und schnell inaktivierenden (I_{SA}) Kaliumströme durch einen Vorpuls von -110 mV und einem anschließenden Spannungssprung auf +40 mV. **B:** Durch einen depolarisierenden Vorpuls von -30 mV wird der I_{SA} inaktiviert und beim nachfolgenden Testpuls auf +40 mV nur die I_K Komponente aktiviert. **C:** Isolierte I_{SA} Stromkurve, die durch Subtraktion des I_K von dem Gesamtstrom erhalten wurde. **D:** Durchschnittliche I_{SA} und I_K Peak-Amplituden und relative I_{SA}/I_K -Amplitude der Kontrollneurone (n=22).

3.1.2 Inaktivierungskinetik makroskopischer Ströme

Für die Quantifizierung der makroskopischen Inaktivierung des nativen I_{SA} wurde an dessen Inaktivierungskinetik eine zweifach-exponentielle Funktion modelliert. Somit wurden die erste (τ_1) und die zweite (τ_2) Zeitkonstante der makroskopischen Inaktivierung ermittelt. Bei den Kontrollneuronen betrug die durchschnittliche Zeitkonstante τ_1 $16,5 \pm 1,7$ ms (n=22). Das durchschnittliche τ_2 betrug 439 ± 74 ms (n=22). Die relative Amplitude des τ_1 an der Gesamtamplitude ($A\tau_1$) betrug $76,42 \pm 2,07\%$ (n=22) (Abbildung 11).

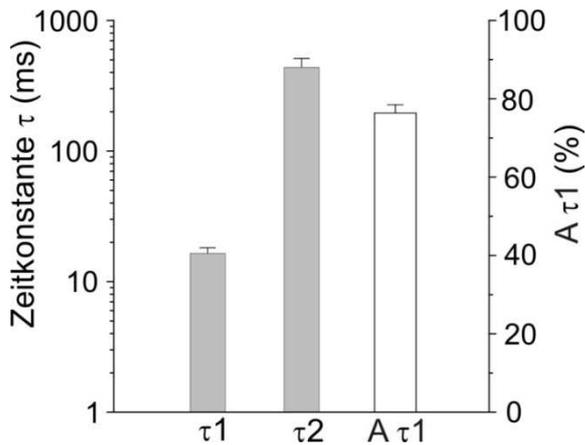


Abbildung 11: Inaktivierungskinetik des I_{SA} .

Graphische Darstellung der schnellen (τ_1) und langsamen (τ_2) Komponente der makroskopischen Inaktivierung in Kontrollneuronen, sowie der prozentuale Anteil der Amplitude der schnellen Inaktivierung an der Gesamtamplitude ($A \tau_1$) ($n=22$).

3.1.3 Erholung von der Inaktivierung

Die Erholung von der Inaktivierung wurde mit Hilfe eines Doppelpuls-Protokolls bestimmt (Abbildung 12 A). Mit einer, den Daten angepassten, zweifach-exponentiellen Funktion konnten zwei verschiedene Komponenten der Erholung von der Inaktivierung dargestellt werden (τ_{rec1} und τ_{rec2}) (Abbildung 12 B). Für die Kontrollneurone ($n=12$) wurde τ_{rec1} mit $56,5 \pm 5,7$ ms und τ_{rec2} mit $1483,8 \pm 237,8$ ms ermittelt. Die relative Amplitude τ_{rec1} ($A \tau_{rec1}$) ergab in der Kontrolle einen Wert von $72,5 \pm 4,4\%$.

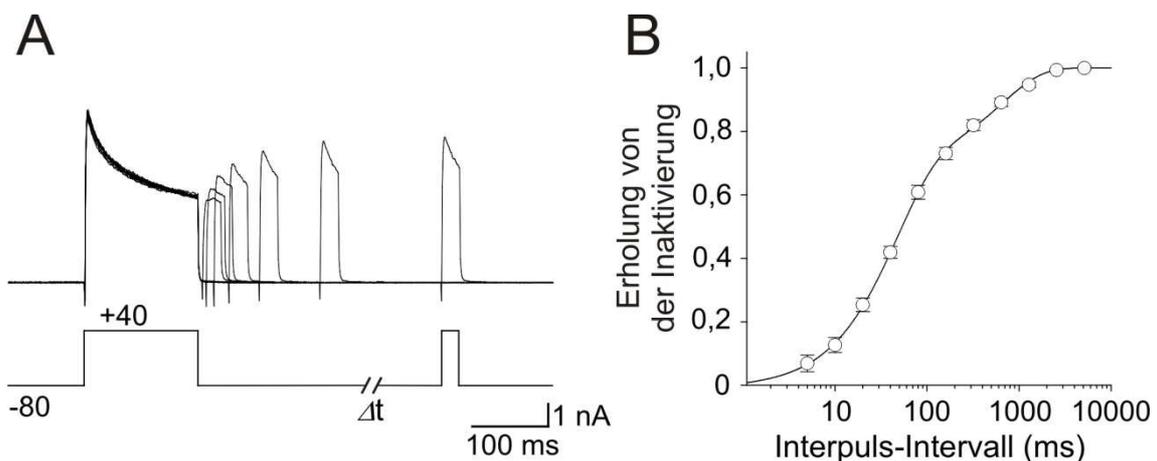


Abbildung 12: Erholung von der Inaktivierung nativer Kaliumströme.

In **A** ist die Ermittlung der Erholung von der Inaktivierung dargestellt. Unten eingezeichnet ist die Sollspannung, darüber ist die gemessene Stromspur zu sehen. **B**: Erholung von der Inaktivierung, die durch Testpulse ermittelten Stromamplituden sind auf den Kontrollpuls normiert und logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen ($n=12$). Eine, den Daten angepasste, zweifach-exponentielle Funktion ist durch eine durchgezogene Linie dargestellt.

3.1.4 Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung

Abbildung 13 A zeigt das Spannungsprotokoll der *Steady-State*-Inaktivierung und eine dazugehörige Stromspur. In Abbildung 13 B ist die normierte Stromamplitude I/I_{max} gegen die Spannung des Vorpulses aufgetragen; es sind zwei Komponenten zu erkennen, an die eine doppelte Boltzmannfunktion angepasst wurde. In den Kontrollneuronen ($n=5$) war für die erste Komponente die halbmaximale Spannung der Inaktivierung $V_{1/21} -65,6 \pm 4,6$ mV und der *Slope-Faktor* $k1$ $12,2 \pm 1,2$ mV ($n=5$). $V_{1/22}$ lag bei $-20,3 \pm 1,1$ mV ($n=5$) und $k2$ betrug $9,5 \pm 1,3$ mV ($n=5$).

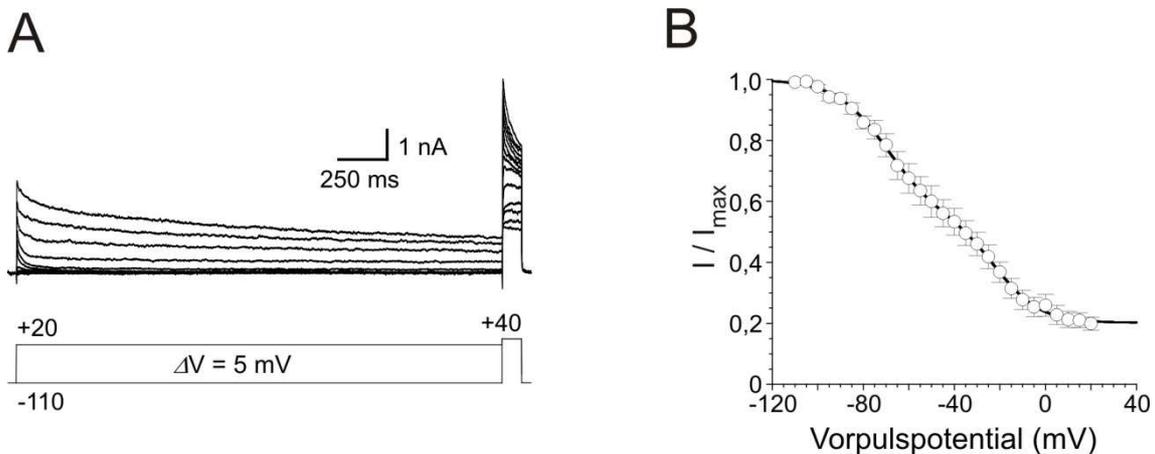


Abbildung 13: Steady-State-Inaktivierung nativer Kaliumströme.

A: Ermittlung der *Steady-State*-Inaktivierung. Unten eingezeichnet die Sollspannung, darüber die gemessenen Stromspuren. **B:** *Steady-State*-Inaktivierungskurve von Kontrollneuronen ($n=5$), an welche eine doppelte Boltzmannfunktion angepasst wurde.

3.2 Effekte heterolog exprimierter Kaliumkanaluntereinheiten in hippocampalen Neuronen

Um die Rolle der $K_v4.2/KChIP2$ -Interaktion bei der funktionellen I_{SA} -Expression zu untersuchen, wurden die Neuronenkulturen mit verschiedenen cDNAs transfiziert: h $K_v4.2$ wt-HA-EGFP (WT), h $K_v4.2A14K$ -HA-EGFP (A14K), hKChIP2.1 (KChIP2) h $K_v4.2$ wt-HA-EGFP und hKChIP2.1 (WT+KChIP2), oder h $K_v4.2A14K$ -HA-EGFP und hKChIP2.1 (A14K+KChIP2).

3.2.1 Stromamplituden heterolog exprimierter A-Typ-Ströme

Zunächst wurde untersucht, ob zusätzliche KChIP2 Expression in Neuronen eine Erhöhung der I_{SA} -Amplitude bewirkt. KChIP2-Neurone hatten eine tendenziell größere

I_{SA} -Amplitude von $3,84 \pm 0,26$ nA (n=20) als Kontrollneurone. Die Amplitude des I_K betrug in KChIP2-Neuronen $3,96 \pm 0,18$ nA (n=20). In WT exprimierenden Neuronen wurde eine signifikant ($p < 0,05$) größere I_{SA} -Amplitude von $5,81 \pm 0,52$ nA (n=21) als in Kontrollneuronen ($3,01 \pm 0,49$ nA; n=22) gemessen, während die I_K -Amplitude mit $3,39 \pm 0,30$ nA (n=21) annähernd dem I_K der Kontrollneurone entsprach. Wurde WT+KChIP2 koexprimiert, steigerte sich die durchschnittliche I_{SA} -Amplitude weiter auf $7,07 \pm 0,49$ nA (n=28), wobei eine mittlere Stromamplitude des I_K von $3,87 \pm 0,26$ nA (n=28) gemessen wurde (Abbildung 14 A-C, E). Um zu beobachten, inwiefern eine Bindung an KChIP für den Transport und den funktionellen Membraneinbau von $K_v4.2$ notwendig ist, wurden Kaliumströme in Neuronen bei heterologer Expression der KChIP bindungsdefizienten Mutante A14K untersucht. Es zeigte sich eine, im Vergleich zur Kontrolle, signifikante ($p < 0,05$) Zunahme der durchschnittlichen I_{SA} -Amplitude auf $5,48 \pm 0,63$ nA (n=15) und eine I_K -Amplitude von $3,79 \pm 0,35$ nA (n=15). Bei Koexpression von A14K+KChIP2 zeigte sich eine leichte zusätzliche Zunahme der I_{SA} -Amplitude auf $5,96 \pm 0,51$ nA (n=20) und ein, im Vergleich zur Kontrolle signifikant ($p < 0,05$) erhöhtes I_K auf $4,35 \pm 0,39$ nA (n=20) (Abbildung 14 D, F). Die relative Amplitude I_{SA}/I_K stellt das Verhältnis der schnellen (I_{SA}) und langsamen Komponente des Kaliumausstromes (I_K) dar. Sie betrug in der Kontrolle $0,89 \pm 0,08$ (n=22) und stieg in KChIP2-Neuronen leicht auf $0,97 \pm 0,05$ (n=20). Eine signifikante Erhöhung des I_{SA}/I_K Verhältnisses gegenüber der Kontrolle fand bei Expression von WT $1,75 \pm 0,01$ (n=21) ($p < 0,0001$) und A14K $1,42 \pm 0,08$ (n=15) ($p < 0,05$) statt. Bei einer Koexpression von WT+KChIP2 war das Verhältnis mit $1,90 \pm 0,13$ (n=28) etwas höher als bei einer Koexpression von A14K und KChIP2 $1,51 \pm 0,12$ (n=20) (Abbildung 14 G-I und Tabelle 1). Insgesamt zeigte eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) ein hoch signifikantes Ergebnis sowohl für die Amplitude der I_{SA} Ströme ($p < 0,0001$) und die relative Amplitude I_{SA}/I_K ($p < 0,0001$), als auch ein signifikantes Ergebnis für die I_K Ströme ($p < 0,05$).

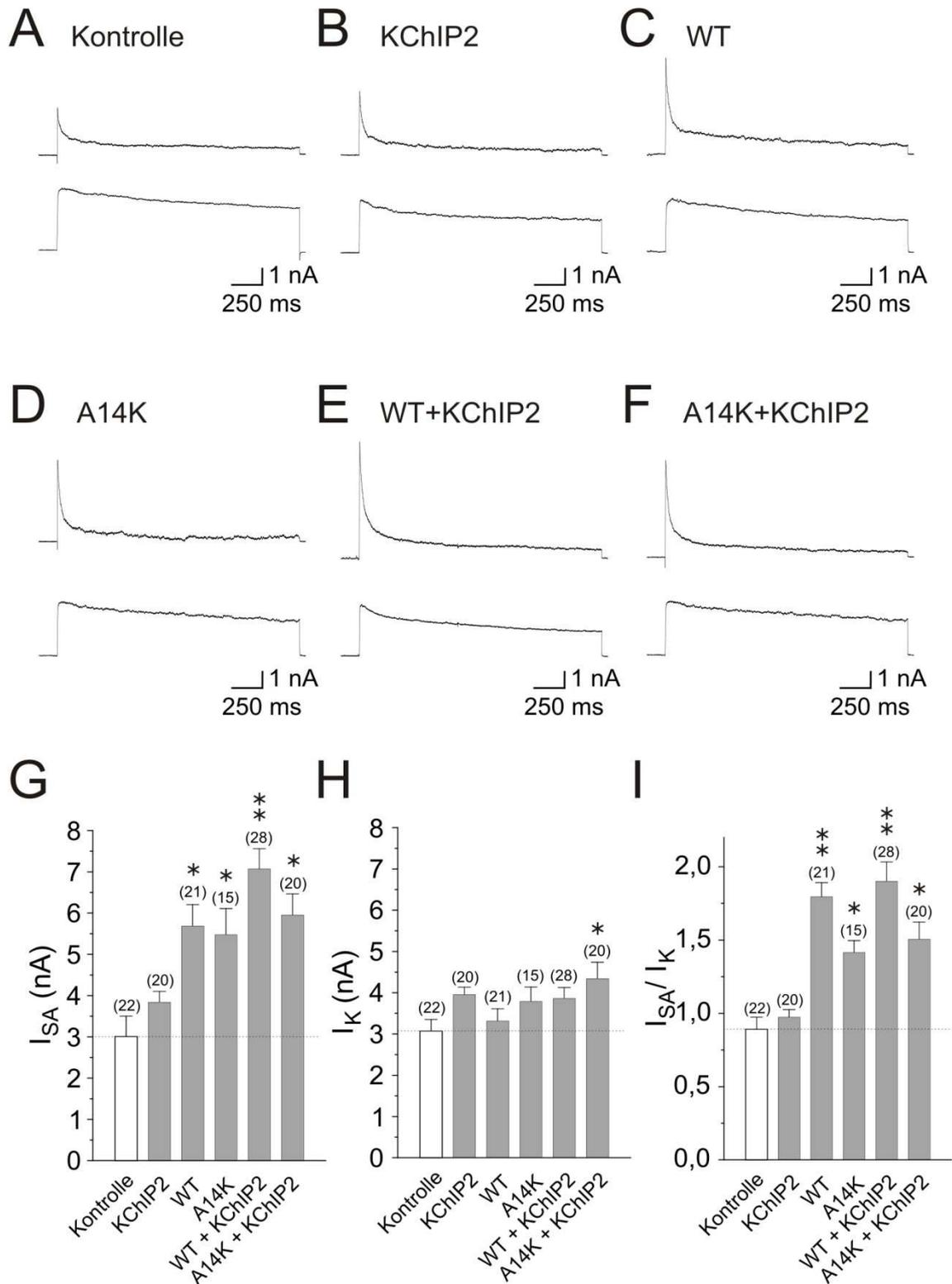


Abbildung 14: Stromkurven und Amplituden des I_{SA} und I_K .

Diese Abbildung zeigt beispielhaft Kaliumstromkurven für Kontrolle (A), KChIP2 (B), WT (C), A14K (D), WT+KChIP2 (E) und A14K+KChIP2 (F). Die I_{SA} Stromkurve ist jeweils oben abgebildet, die I_K Stromkurve darunter. G zeigt die Amplituden der verschiedenen Transfektionskonstrukte für den I_{SA} , H die Amplituden des I_K und I die relative Amplitude I_{SA}/I_K . Die gestrichelte Linie in G-I zeigt jeweils den Mittelwert der Kontrolle an. * bezeichnet signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich zur Kontrolle, ** bezeichnet hoch signifikant ($p < 0,0001$) unterschiedlich zur Kontrolle.

Tabelle 1: Peak-Amplituden für I_{SA} und I_K .

	I_{SA} [nA]	I_K [nA]	I_{SA}/I_K
Kontrolle n=22	$3,01 \pm 0,49$	$3,08 \pm 0,28$	$0,89 \pm 0,08$
KChIP2 n=20	$3,84 \pm 0,26$	$3,96 \pm 0,18$	$0,97 \pm 0,05$
WT n=21	$5,81 \pm 0,52$	$3,39 \pm 0,30$	$1,75 \pm 0,10$
A14K n=15	$5,48 \pm 0,63$	$3,79 \pm 0,35$	$1,42 \pm 0,08$
WT+KChIP2 n=28	$7,07 \pm 0,49$	$3,87 \pm 0,26$	$1,90 \pm 0,13$
A14K+KChIP2 n=20	$5,96 \pm 0,51$	$4,35 \pm 0,39$	$1,51 \pm 0,12$

3.2.2 Inaktivierung makroskopischer Ströme

In Neuronen führte die Überexpression von KChIP2 (n=18) zu einer tendenziell langsameren makroskopischen Inaktivierung, wobei sich die erste Komponente (τ_1) auf $18,6 \pm 1,7$ ms vergrößerte. Der prozentuale Anteil der Amplitude von τ_1 am gesamten Stromabfall ($A\tau_1$) lag kaum verändert bei $75,7 \pm 3,1\%$. Die zweite Komponente der Inaktivierung (τ_2) vergrößerte sich auf 878 ± 411 ms, jedoch zeigte sich in diesen Experimenten eine große Variabilität zwischen den einzelnen Zellen. Abbildung 15 A zeigt die initiale Phase der Inaktivierung von WT überexprimierenden Neuronen (n=20): Das τ_1 vergrößerte sich signifikant ($p < 0,0001$) auf $32,0 \pm 1,5$ ms, wobei auch $A\tau_1$ zunahm ($81,5 \pm 1,3\%$), τ_2 vergrößerte sich auf 603 ± 140 ms. Bei alleiniger Expression von A14K (n=15) lag τ_1 bei $24,6 \pm 3,2$ ms, τ_2 betrug 426 ± 74 ms und $A\tau_1$ entsprach $79,8 \pm 2,2\%$. Bei Koexpression von WT+KChIP2 (n=27) konnte ein τ_1 von $29,1 \pm 2,0$ ms und ein τ_2 von 395 ± 41 ms ermittelt werden, das $A\tau_1$ betrug $83,0 \pm 0,9\%$. Koexpression von A14K+KChIP2 (n=20) ergab ein τ_1 von $23,2 \pm 1,8$ ms, ein τ_2 von 364 ± 38 ms und eine $A\tau_1$ von $81,8 \pm 1,5\%$. Eine Darstellung der

Mittelwerte ist in Tabelle 2 zu finden. Eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) zeigte ein signifikantes Ergebnis für die Mittelwerte von τ_1 ($p < 0,0001$) und $A\tau_1$ ($p < 0,05$), nicht jedoch für τ_2 .

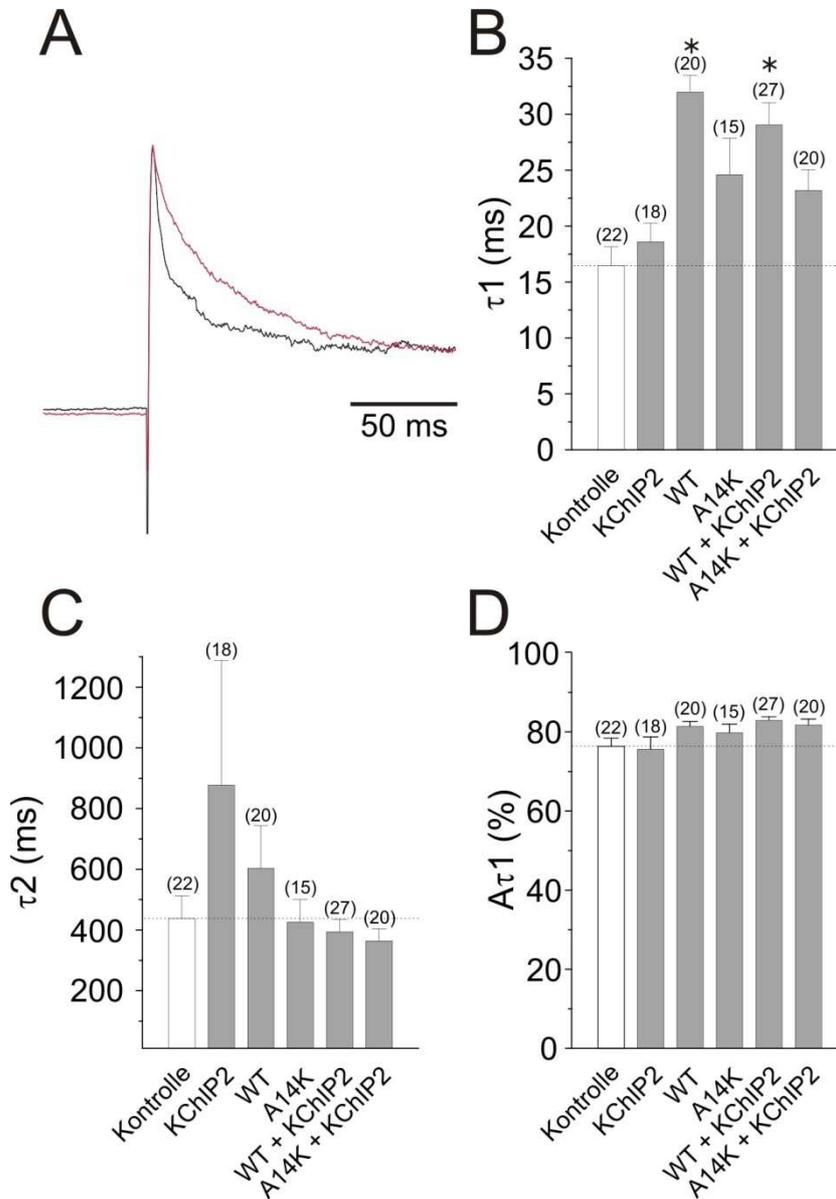


Abbildung 15: I_{SA} Inaktivierungskinetik.

A zeigt die initiale Phase der Inaktivierung für ein Kontrollneuron und ein WT überexprimierendes Neuron: hier ist deutlich eine Verlangsamung der Inaktivierung bei WT Überexpression (rot) zu sehen. In **B** sind die Durchschnittlichen Werte des τ_1 , in **C** des τ_2 dargestellt. **D** zeigt den prozentualen Anteil der Amplitude von τ_1 an der Gesamtamplitude ($A\tau_1$). Die gestrichelte Linie gibt jeweils den Wert der Kontrolle an. * bezeichnet signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich zur Kontrolle.

Tabelle 2: Makroskopische Inaktivierung des I_{SA} .

	τ_1 [ms]	τ_2 [ms]	$A\tau_1$ [%]
Kontrolle n=22	$16,5 \pm 1,7$	439 ± 74	$76,4 \pm 2,1$
KChIP2 n=18	$18,6 \pm 1,7$	878 ± 411	$75,7 \pm 3,1$
WT n=20	$32,0 \pm 1,5$	603 ± 140	$81,5 \pm 1,3$
A14K n=15	$24,6 \pm 3,2$	426 ± 74	$79,8 \pm 2,2$
WT+KChIP2 n=27	$29,1 \pm 2,0$	395 ± 41	$83,0 \pm 0,9$
A14K+KChIP2 n=20	$23,2 \pm 1,8$	364 ± 38	$81,8 \pm 1,5$

3.2.3 Erholung von der Inaktivierung

Die Erholung von der Inaktivierung wurde wie unter 2.3.1 beschrieben untersucht. In der Darstellung der normierten und logarithmisch gegen die Zwischenpulsdauer aufgetragenen Stromamplituden zeigt sich ein zweifach-exponentieller Verlauf der Erholung von der Inaktivierung (Abbildung 16). Bei den Kontrollneuronen und bei Überexpression von KChIP2 (Abbildung 16 A, B) sind die beiden Komponenten der Erholung von der Inaktivierung deutlich zu erkennen, während bei alleiniger WT Überexpression sowie bei A14K Expression (Abbildung 16 C und D) kaum eine zweifache Einteilung erkennbar ist. Eine Rechtsverschiebung der Kurve ist bei Überexpression von A14K und Koexpression von A14K+KChIP2 zu beobachten (Abbildung 16 D und F). τ_{rec1} verkleinert sich in KChIP2-Neuronen (n=10) tendenziell auf $44,9 \pm 8,3$ ms, während sich auch die relative Amplitude des τ_{rec1} ($A\tau_{rec1}$) auf $62,5 \pm 2,8\%$ verringerte. τ_{rec2} blieb mit $1371,6 \pm 143,5$ ms relativ konstant.

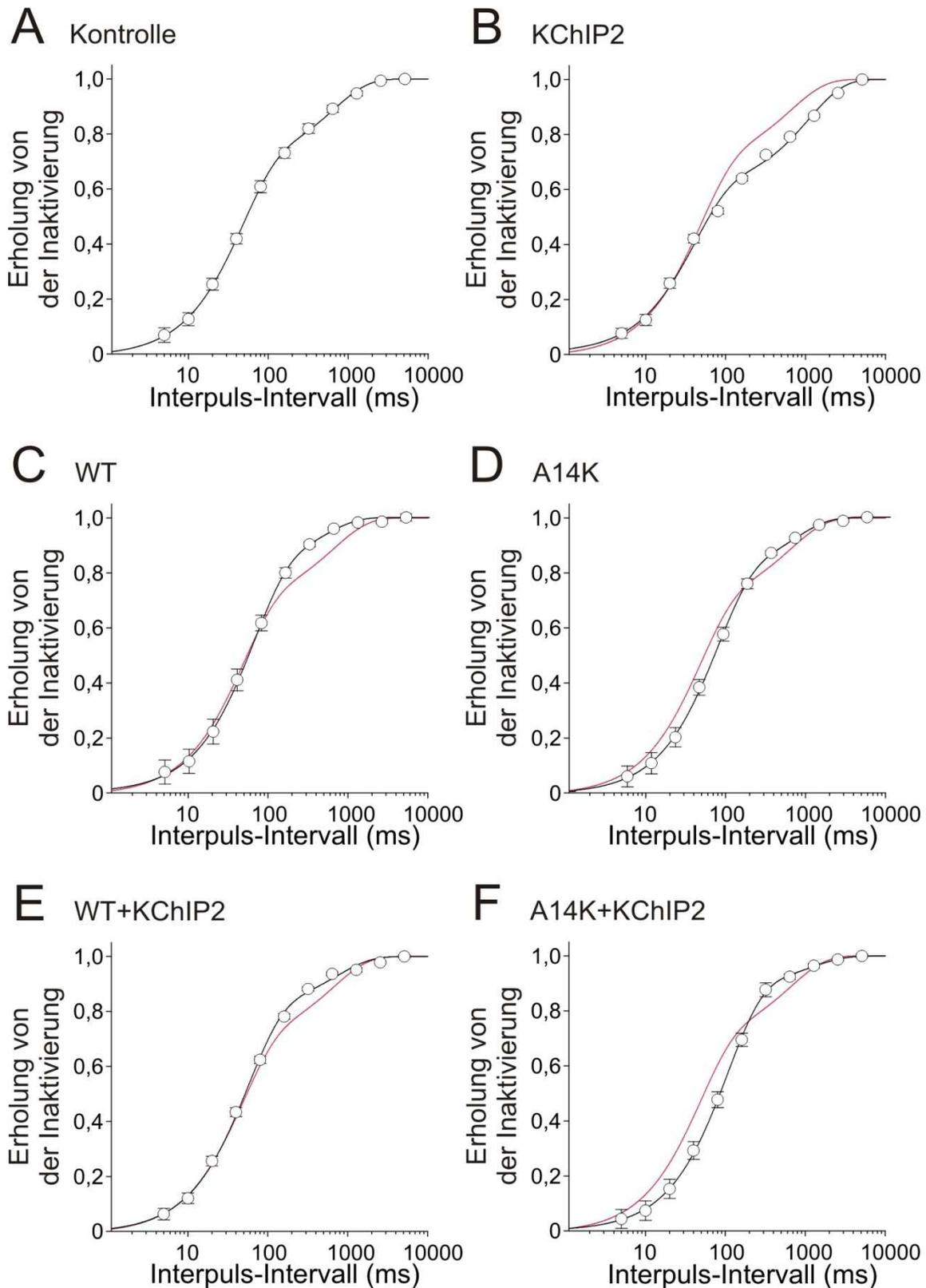


Abbildung 16: Erholung von der Inaktivierung.

Logarithmische Darstellung der Erholung von der Inaktivierung; es wurde jeweils ein zweifach exponentieller Fit angeglichen, rot dargestellt ist jeweils der Kurvenverlauf der Kontrolle. **A:** Kontrolle (n=12); **B:** KChIP2 (n=10); **C:** WT (n=8); **D:** A14K (n=9); **E:** WT+KChIP2 (n=12); **F:** A14K+KChIP2 (n=11).

Bei alleiniger Überexpression von WT (n=8) vergrößerte sich τ_{rec1} wiederum auf $68,1 \pm 11,4$ ms, ebenso in A14K-Neuronen (n=9) $73,1 \pm 8,0$ ms. τ_{rec2} lag bei $1031,0 \pm 492,7$ ms in WT überexprimierenden Neuronen und bei $1854,8 \pm 210,9$ ms in A14K Neuronen. Die $A\tau_{rec1}$ betrug $78,0 \pm 6,8\%$ in WT- und $83,0 \pm 0,9\%$ in A14K-Neuronen. Koexpression von WT+KChIP2 (n=12) ergab ein τ_{rec1} , welches mit $56,0 \pm 5,6$ ms signifikant ($p < 0,05$) kleiner war als das τ_{rec1} bei Koexpression von A14K+KChIP2 $115,5 \pm 19,6$ ms (n=11), allerdings war das τ_{rec1} bei A14K+KChIP2 Überexpression auch zu den Kontroll- und KChIP2-Neuronen signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich. τ_{rec2} betrug in WT+KChIP2-Neuronen $1307,5 \pm 352,7$ ms und in A14K+KChIP2-Neuronen $822,6 \pm 170,6$ ms, wobei $A\tau_{rec1}$ mit $77,5 \pm 2,7$ ms (WT+KChIP2-Neurone) und $76,3 \pm 4,4$ ms (A14K+KChIP2-Neurone) relativ ähnlich waren (Abbildung 17 und Tabelle 2). Eine ANOVA ergab ein signifikantes Ergebnis sowohl für τ_{rec1} als auch für die für $A\tau_{rec1}$ Werte ($p < 0,05$), jedoch nicht für τ_{rec2} . Insgesamt konnten eine Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung in Anwesenheit und bei Bindungsmöglichkeit von KChIP beobachtet werden, sowie die Verstärkung einer zweiten, langsamen Komponente der Erholung von der Inaktivierung.

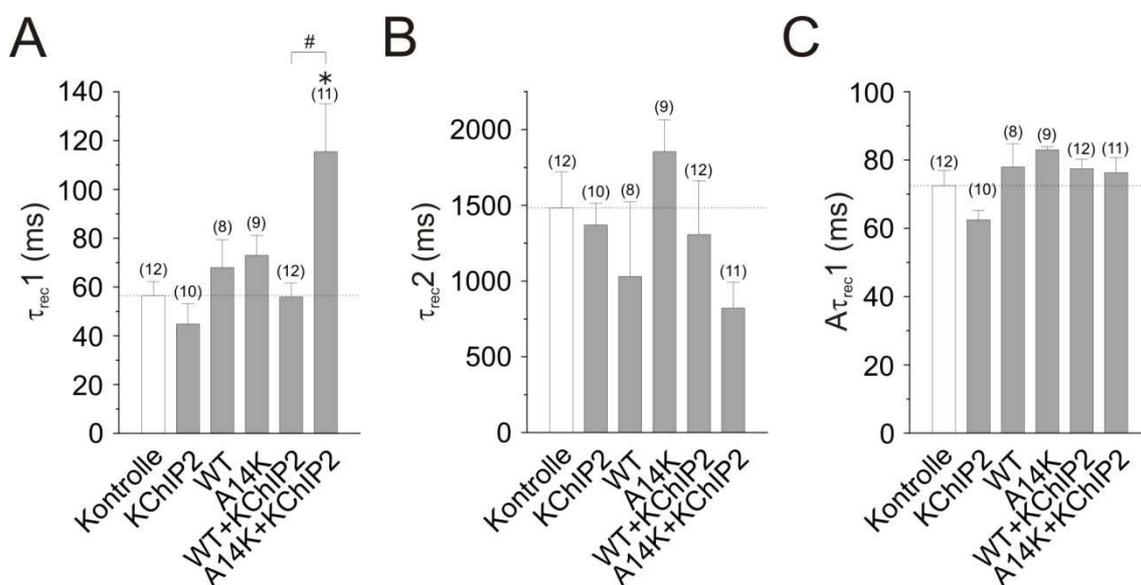


Abbildung 17: τ_{rec1} und τ_{rec2} der Erholung von der Inaktivierung.

Graphische Darstellung der Mittelwerte von τ_{rec1} (A) und τ_{rec2} (B). C bildet die prozentualen relativen Amplituden des τ_{rec1} ($A\tau_{rec1}$) an der Gesamtamplitude der Erholung aus der Inaktivierung ab. Die gestrichelte Linie zeigt jeweils den Wert der Kontrolle an. * bezeichnet signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich zur Kontrolle, # bezeichnet signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich zueinander.

Tabelle 3: Erholung von der Inaktivierung.

	τ_{rec1} [ms]	τ_{rec2} [ms]	A τ_{rec1} [%]
Kontrolle n=12	56,5 ± 5,7	1483,8 ± 237,8	72,5 ± 4,4
KChIP2 n=10	44,9 ± 8,3	1371,6 ± 143,5	62,5 ± 2,8
WT n=8	68,1 ± 11,4	1031,0 ± 492,7	78,0 ± 6,8
A14K n=9	73,1 ± 8,0	1854,8 ± 210,9	83,0 ± 0,9
WT+KChIP2 n=12	56,0 ± 5,6	1307,5 ± 352,7	77,5 ± 2,7
A14K+KChIP2 n=11	115,5 ± 19,6	822,6 ± 170,6	76,3 ± 4,4

3.2.4 Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung

Die für die *Steady-State*-Inaktivierung ermittelten Kurven sind in Abbildung 18 graphisch dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass es bei KChIP2 Überexpression zu einer leichten Rechtsverschiebung der Inaktivierungskurve kam, während WT Überexpression eher zu einer Linksverschiebung der Kurve führte (Abbildung 18 A-F). Bei Betrachtung der ersten Komponente der *Steady-State*-Inaktivierung $V_{1/21}$ konnte eine tendenzielle Verschiebung zu positiveren Potentialen für die KChIP/K_v4.2-Interaktion beobachtet werden. Die erste Komponente der *Steady-State*-Inaktivierung $V_{1/21}$ ist für KChIP2-Neurone (n=4) mit $-56,6 \pm 4,8$ mV tendenziell zu positiveren Potentialen verschoben als das $V_{1/21}$ der Kontrollneurone ($-65,6 \pm 4,6$ mV (n=5)). Das $V_{1/21}$ der WT überexprimierenden Neurone (n=3) lag bei $-77,8 \pm 3,2$ mV, Koexpression von WT+KChIP2 (n=8) führte zu einer leichten Positivverschiebung mit $-66,6 \pm 1,6$ mV. In A14K exprimierenden Neuronen (n=2) wurde ein $V_{1/21}$ von $-68,5$ mV und $-62,3$ mV bestimmt, ähnlich in A14K+KChIP2-Neuronen (n=4) mit $-68,5 \pm 1,9$ mV (Abbildung 19 und Tabelle 4).

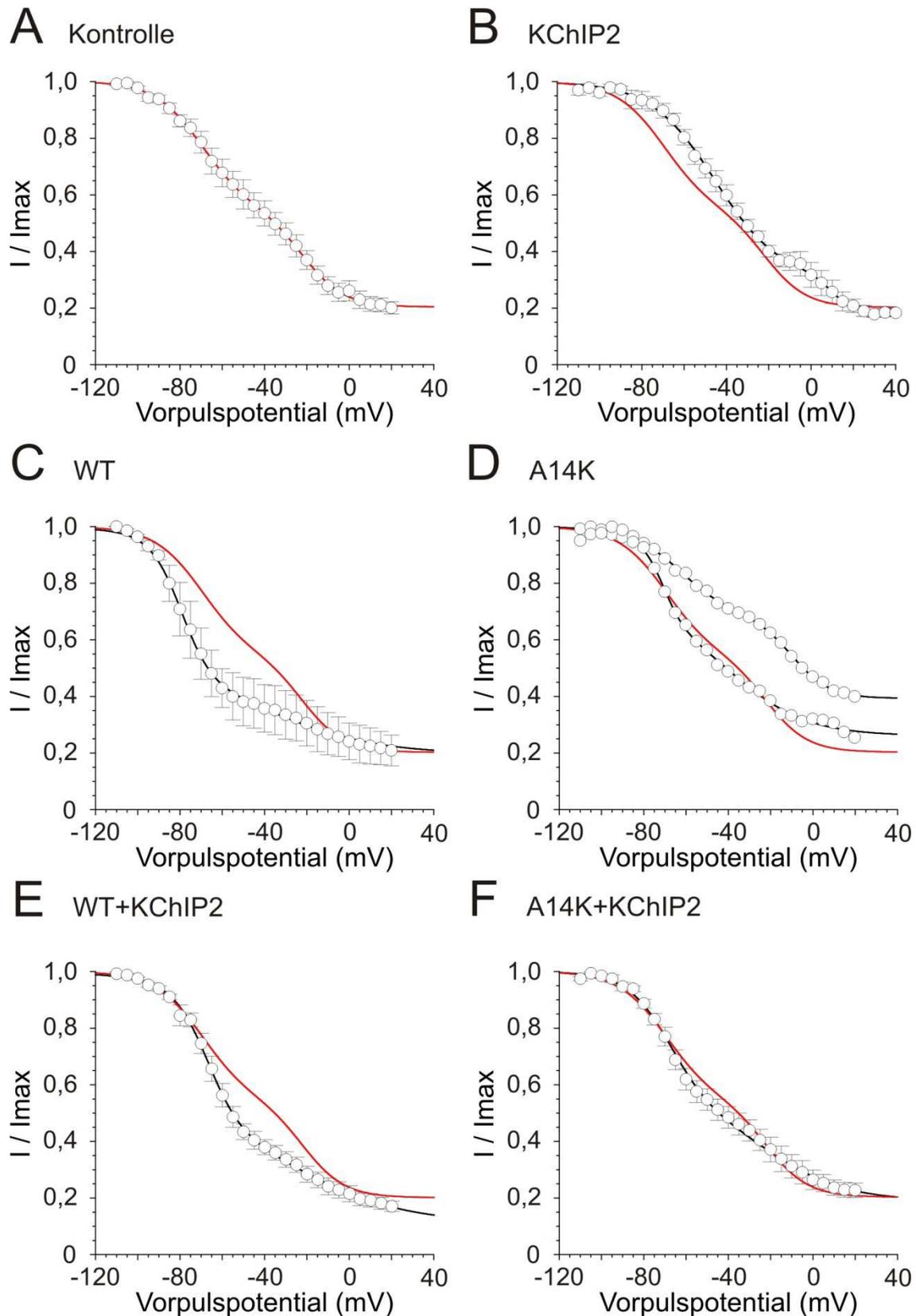


Abbildung 18: Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung.

Hier werden die gemittelten *Steady-State*-Inaktivierungskurven gezeigt. **A:** Kontrolle (n=5); **B:** KChIP2 (n=4); **C:** WT (n=3); **D:** A14K (n=2); **E:** WT+KChIP2 (n=8); **F:** A14K+KChIP2 (n=4). An die Werte wurde je eine doppelte Boltzmannfunktion angeglichen. In Rot ist die Inaktivierungskurve der Kontrollneurone dargestellt.

Der *Slope-Faktor* k_1 betrug $7,5 \pm 1,4$ mV bei alleiniger KChIP2 Überexpression und $7,2 \pm 1,2$ mV in WT überexprimierenden Neuronen, bei Kotransfektion von WT+KChIP2 lag k_1 bei $9,2 \pm 0,6$ mV. In A14K-Neuronen wurde ein k_1 von 7,4 mV und 12,0 mV gemessen, bei Kotransfektion von A14K+KChIP2 ergab sich $9,5 \pm 2,0$ (Abbildung 19 und Tabelle 4). Eine ANOVA zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Experimentgruppen für $V_{1/21}$ ($p < 0,05$), nicht jedoch für den *Slope-Faktor*- k_1 . Auch bei der zweiten Komponente der *Steady-State*-Inaktivierung $V_{1/22}$ und dem dazugehörigem *Slope-Faktor* k_2 konnten keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Transfektionskonstrukten beobachtet werden, eine ANOVA ergab kein signifikantes Ergebnis. $V_{1/22}$ lag für KChIP2-Neurone bei $-12,1 \pm 12,5$ mV, das dazugehörige k_2 betrug $17,4 \pm 4,8$ mV. Bei Überexpression von WT zeigte sich ein $V_{1/22}$ von $-22,3 \pm 11,2$ mV und ein k_2 von $13,1 \pm 2,8$ mV. Für A14K-Neurone ergaben sich ein $V_{1/22}$ von $-23,7$ mV und $-9,4$ mV sowie ein k_2 von $13,2$ mV und $8,9$ mV. Die Kotransfektion von WT+KChIP2 ergab ein $V_{1/22}$ von $-11,3 \pm 4,4$ mV und ein k_2 von $11,2 \pm 2,2$ mV, bei Kotransfektion von A14K+KChIP2 wurden ein $V_{1/22}$ von $-18,4 \pm 4,0$ mV und ein k_2 von $11,4 \pm 1,8$ mV ermittelt (Abbildung 19 und Tabelle 4).

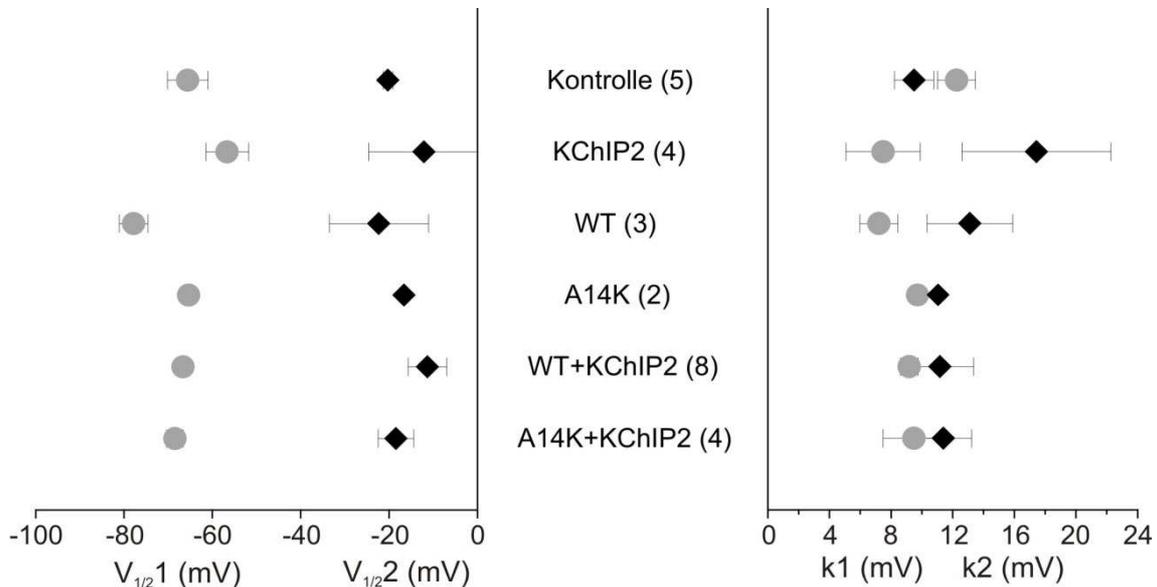


Abbildung 19: Spannung der halbmaximalen Inaktivierung und Slope-Faktor der Steady-State-Inaktivierung.

Dargestellt sind rechts die erste und zweite Komponente der Spannung der halbmaximalen Inaktivierung $V_{1/21}$ (graue Punkte) und $V_{1/22}$ (schwarze Rauten). Links die dazugehörigen *Slope-Faktoren* k_1 (graue Punkte) und k_2 (schwarze Rauten).

Tabelle 4: Mittelwerte von $V_{1/21}$ und $V_{1/22}$, sowie $k1$ und $k2$.

	$V_{1/21}$ [mV]	$k1$ [mV]	$V_{1/22}$ [mV]	$k2$ [mV]
Kontrolle n=5	$-65,6 \pm 4,6$	$12,2 \pm 1,2$	$-20,3 \pm 1,1$	$9,5 \pm 1,3$
KChIP2 n=4	$-56,6 \pm 4,8$	$7,5 \pm 1,4$	$-12,1 \pm 12,5$	$17,4 \pm 4,8$
WT n=3	$-77,8 \pm 3,2$	$7,2 \pm 1,2$	$-22,3 \pm 11,2$	$13,1 \pm 2,8$
A14K n=2	$-68,5$ $-62,3$	$7,4$ $12,0$	$-23,7$ $-9,4$	$13,2$ $8,9$
WT+KChIP2 n=8	$-66,6 \pm 1,6$	$9,2 \pm 0,6$	$-11,3 \pm 4,4$	$11,2 \pm 2,2$
A14K+KChIP2 n=4	$-68,5 \pm 1,9$	$9,5 \pm 2,0$	$-18,4 \pm 4,0$	$11,4 \pm 1,8$

3.3 Charakterisierung von somatischen und dendritischen Strömen mittels Nucleated-Patch-Ableitungen

Nucleated-Patch-Ableitungen sind eine Methode, um einen definierten Membranabschnitt (somatische Membran in der Nähe des Nucleus) isoliert von der Gesamtzelle zu betrachten. Der *Nucleated-Patch* wird wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben, produziert, indem sich der Zellkern in einem Membranvesikel von der Zelle lösen lässt. Im Gegensatz zu den *Outside-Out-Patches* besteht hier der Vorteil, dass ein größeres Stück Membran der Messung zur Verfügung steht (Abbildung 20). Für diese Experimente wurde genutzt, dass beim *Nucleated-Patch* vorwiegend somatische Zellmembran analysiert wird, während in der *Whole-Cell*-Ableitung Ströme der somatischen und dendritischen (sowie axonalen) Membran registriert werden. Wie zu erwarten waren die Ströme in der *Nucleated-Patch*-Ableitung deutlich kleiner als in der *Whole-Cell*-Konfiguration. Auch der I_{SA} in Kontrollneuronen (n=6) war mit $0,50 \pm 0,11$ nA in der *Nucleated-Patch*-Ableitung deutlich geringer als der zuvor

gemessene I_{SA} der *Whole-Cell*-Ableitung von durchschnittlich $3,02 \pm 0,54$ nA. Die Ströme in der *Nucleated-Patch*-Ableitung waren im Vergleich zum Hintergrundrauschen relativ klein.

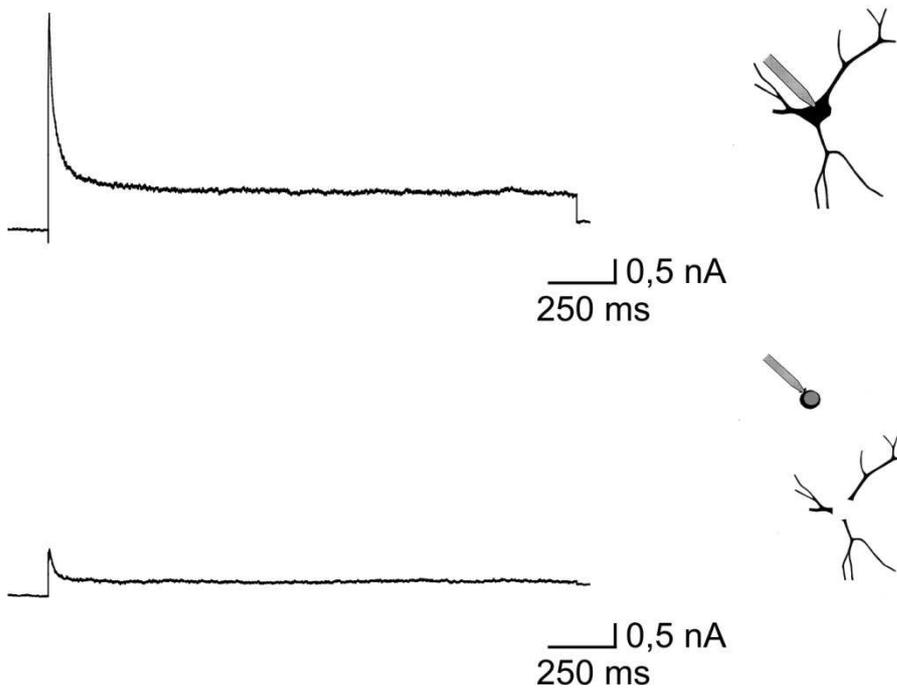


Abbildung 20: I_{SA} in der Nucleated-Patch-Technik.

Oben dargestellt ist der I_{SA} in der *Whole-Cell*-Ableitung, darunter der des *Nucleated-Patch*, in welchem eine deutlich geringere Amplitude als in der *Whole-Cell*-Ableitung gemessen wurde. Daneben die schematische Darstellung der Messkonfiguration.

Zusätzlich konnten Messungenauigkeiten durch Beschädigung der Zellmembran beim Herstellen des *Patches* nicht vermieden werden. Abbildung 21 A-F zeigt exemplarische I_{SA} Stromspuren für die verschiedenen Experimentengruppen: die Amplitude des I_{SA} der gesamten Zelle (I_{SA} Cell) (Abbildung 21 G) ist jeweils deutlich höher als die I_{SA} Amplitude der *Nucleated-Patch*-Ableitung (I_{SA} Patch) (Abbildung 21 H). Bei Überexpression von WT (n=7) zeigte sich eine signifikante Zunahme von I_{SA} Cell auf $6,12 \pm 0,57$ nA ($p < 0,05$) und I_{SA} Patch auf $0,77 \pm 0,09$ nA. In A14K-Neuronen (n=6) lag der I_{SA} Cell bei $3,69 \pm 0,39$ nA und der I_{SA} Patch bei $0,64 \pm 0,18$ nA. Bei Koexpression von WT+KChIP2 (n=5) betrug der I_{SA} Cell $5,30 \pm 0,51$ nA, der I_{SA} Patch $0,86 \pm 0,11$ nA. Bei der Kotransfektion von A14K+KChIP2 (n=4) wurde ein I_{SA} Cell von $3,41 \pm 0,38$ nA und ein I_{SA} Patch von $0,58 \pm 0,19$ nA gemessen. Zum Vergleich wurde der $K_{v4.2600\Delta}$ -Kanal untersucht, der aufgrund einer fehlenden Aminosäuresequenz am C-Terminus nicht durch Kif17 in den Dendriten transportiert

werden kann. Neurone, die 600Δ exprimierten (n=10) hatten einen I_{SA} Cell von $3,33 \pm 0,53$ nA und einen I_{SA} Patch von $0,56 \pm 0,08$ nA.

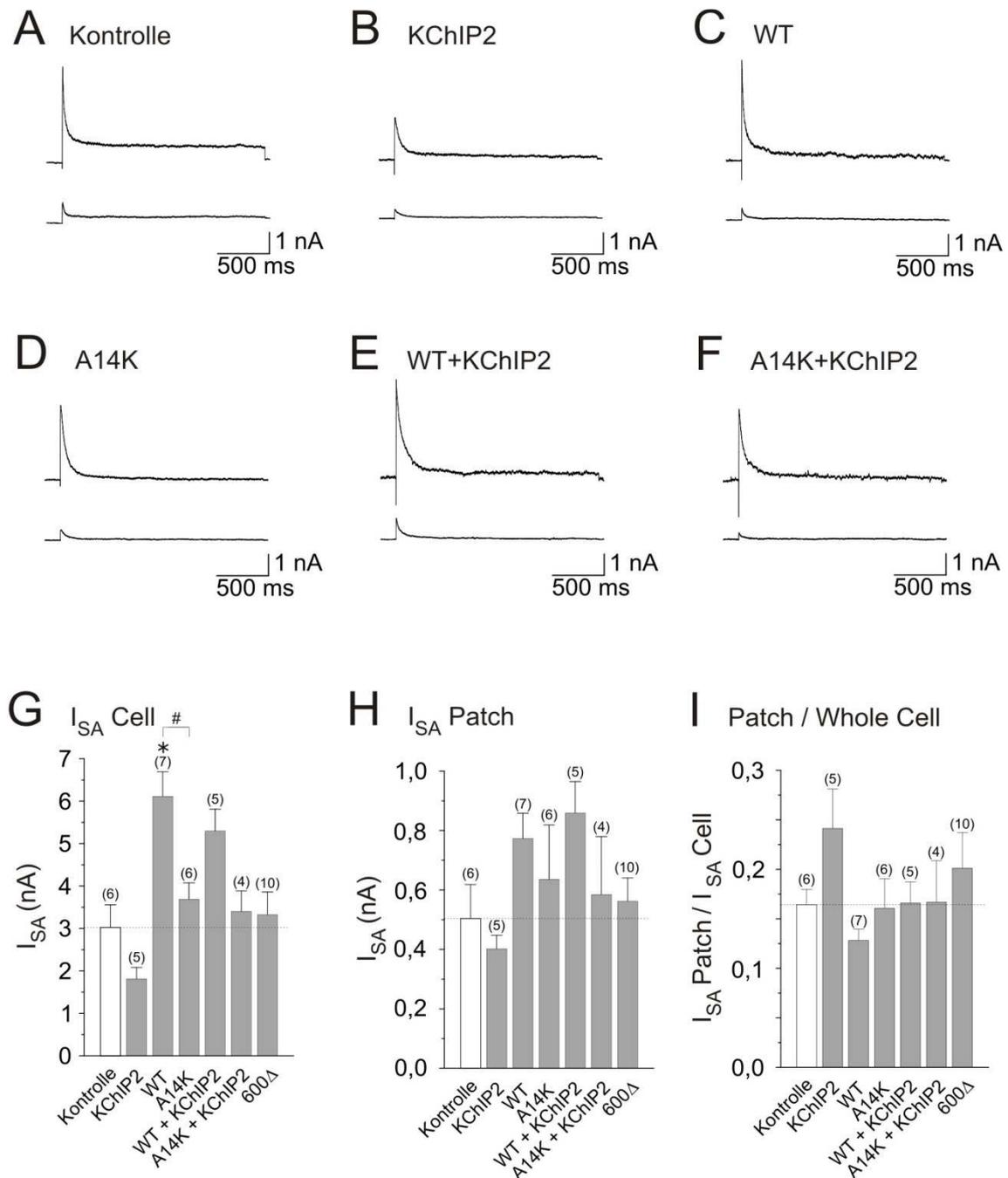


Abbildung 21: I_{SA} der Whole-Cell- und Nucleated-Patch-Ableitung.

In **A-F** sind jeweils der I_{SA} der Whole-Cell-Ableitung (obere Stromspur) und der I_{SA} der Nucleated-Patch-Ableitung (untere Stromspur) dargestellt. **A**: EGFP; **B**: KChIP2; **C**: WT; **D**: A14K; **E**: WT+KChIP2; **F**: A14K+KChIP2. **G** zeigt den durchschnittlichen I_{SA} der Whole-Cell-Ableitungen (I_{SA} Cell) und **H** den durchschnittlichen I_{SA} der Nucleated-Patch-Ableitungen (I_{SA} Patch). In **I** ist das Verhältnis von I_{SA} Patch / I_{SA} Cell dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt jeweils den Wert der Kontrolle an. * bezeichnet signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich zur Kontrolle, # bezeichnet signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich zueinander.

Eine ANOVA ergab ein signifikantes Ergebnis für die Amplituden des $I_{SA} Cell$ ($p < 0,0001$), nicht jedoch für die des $I_{SA} Patch$. Bei Expression von KChIP2 ($n=5$) kam es im Vergleich zu den Kontrollneuronen nicht wie erwartet zu einer Zunahme des I_{SA} , sondern zu einer tendenziellen Reduktion des $I_{SA} Cell$ auf $1,82 \pm 0,27$ nA und des $I_{SA} Patch$ auf $0,40 \pm 0,04$ nA (Abbildung 21 G, H und Tabelle 5). Um eventuelle Veränderungen der subzellulären Verteilung des I_{SA} zu detektieren, wurde der I_{SA} des *Nucleated-Patch* ($I_{SA} Patch$) zu dem I_{SA} der *Whole-Cell*-Ableitung ($I_{SA} Cell$) ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 21 I). Eine Umverteilung des Kanals in die Peripherie des Neurons müsste sich in einer Verringerung dieses Verhältnisses abbilden.

Tabelle 5: Nucleated-Patch-Ableitungen.

	$I_{SA} Cell$ [nA]	$I_{SA} Patch$ [nA]	$I_{SA} Patch /$ $I_{SA} Cell$
Kontrolle n=6	$3,02 \pm 0,54$	$0,50 \pm 0,11$	$0,16 \pm 0,02$
KChIP2 n=5	$1,82 \pm 0,27$	$0,40 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,04$
WT n=7	$6,12 \pm 0,57$	$0,77 \pm 0,09$	$0,13 \pm 0,01$
A14K n=6	$3,69 \pm 0,39$	$0,64 \pm 0,18$	$0,16 \pm 0,03$
WT+KChIP2 n=5	$5,30 \pm 0,51$	$0,86 \pm 0,11$	$0,17 \pm 0,02$
A14K+KChIP2 n=4	$3,41 \pm 0,38$	$0,58 \pm 0,19$	$0,17 \pm 0,04$
600 Δ n=10	$3,33 \pm 0,53$	$0,56 \pm 0,08$	$0,20 \pm 0,04$

In der Kontrolle ($n=6$) betrug es $0,16 \pm 0,02$, bei Überexpression von KChIP2 ($n=5$) $0,24 \pm 0,04$, bei Überexpression von WT ($n=7$) $0,13 \pm 0,01$ und bei Überexpression von A14K ($n=6$) $0,16 \pm 0,03$. In WT+KChIP2-Neuronen ($n=5$) ergab sich $0,17 \pm 0,02$ und

bei Koexpression von A14K+KChIP2 (n=4) $0,17 \pm 0,04$. Expression von 600 Δ ergab ein Verhältnis von $0,20 \pm 0,04$ (Abbildung 21 und Tabelle 5). Eine ANOVA war nicht signifikant. Auf einen Unterschied in der somatodendritischen Verteilung kann daher aus den Experimenten nicht geschlossen werden.

3.4 Induktion synaptischer Aktivität durch AMPA-Behandlung

Induktion synaptischer Aktivität mittels AMPA führt zu einer Internalisierung von K_v4.2 (Kim et al., 2007). Es wurde untersucht, inwiefern KChIP-Interaktion einen Einfluss auf die aktivitätsabhängige Internalisierung von K_v4.2-Kanälen hat. Hierzu wurden Neuronenkulturen vor der elektrophysiologischen Untersuchung 12 Minuten in 100 μ M AMPA inkubiert, um eine höhere präsynaptische Aktivität mit einer erhöhten synaptischen Glutamatausschüttung zu induzieren. In unbehandelten Kontrollneuronen (n=12) wurde ein I_{SA} von $3,90 \pm 0,52$ nA gemessen, nach AMPA Behandlung (n=15) lag die I_{SA} Amplitude bei $2,56 \pm 0,44$ nA. Die Stromamplitude des restlichen Auswärtsstroms I_K war in unbehandelten Kontrollneuronen $2,79 \pm 0,53$ nA und nach AMPA Behandlung $1,95 \pm 0,39$ nA. Bei Koexpression von WT+KChIP2 wurde durch die AMPA-Behandlung eine hoch signifikante ($p < 0,0001$) Abnahme der I_{SA} Amplitude von $6,40 \pm 0,75$ nA (n=14) auf $2,31 \pm 0,21$ nA (n=16) gemessen (Abbildung 22 A, C, Tabelle 6). Der I_K war unbehandelt und mit AMPA gleich ($0,96 \pm 0,08$ nA bzw. $0,96 \pm 0,31$ nA). Auch bei Koexpression von A14K+KChIP2 kam es zu einer Abnahme ($p < 0,05$) der I_{SA} Amplitude von $4,10 \pm 0,46$ nA (n=14) auf $2,66 \pm 0,20$ nA (n=16) nach AMPA-Behandlung (Abbildung 22 B, C, Tabelle 6). Auch bei diesen Messungen war der I_K kaum verändert $0,76 \pm 0,08$ nA unbehandelt und $0,81 \pm 0,09$ nA nach AMPA-Behandlung. Das Verhältnis I_{SA}/I_K war in unbehandelten Kontrollneuronen $1,95 \pm 0,36$ und nach Stimulation mit AMPA $1,59 \pm 0,18$. Bei WT+KChIP2-Neuronen konnte ein signifikanter Rückgang ($p < 0,05$) von $7,12 \pm 1,24$ ohne Behandlung auf $3,51 \pm 0,41$ nach AMPA-Behandlung nachgewiesen werden. Bei A14K+KChIP2-Neuronen kam es hingegen nur zu einem tendenziellen Rückgang von $5,88 \pm 0,69$ bei unbehandelten Neuronen auf $4,51 \pm 1,02$ nach AMPA-Behandlung.

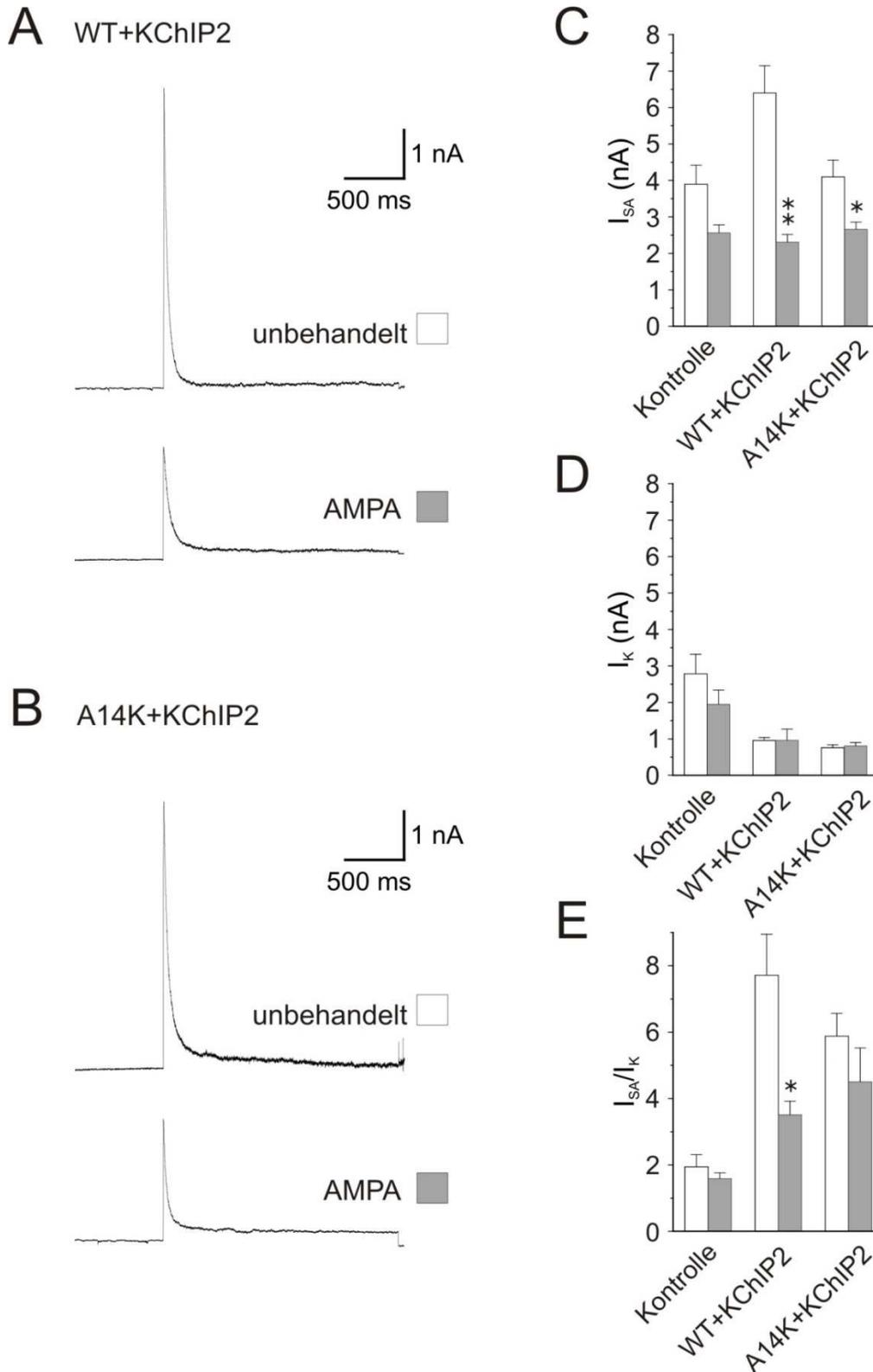


Abbildung 22: Effekte von AMPA-Behandlung auf den ISA.

In **A** ist der ISA eines WT+KChIP2-Neurons in unbehandeltem Medium und nach Inkubation mit AMPA dargestellt. **B** zeigt den I_{SA} für unbehandelte und AMPA-behandelte A14K+KChIP2-Neuronen. In **C** sind die durchschnittlichen I_{SA} Amplituden für unbehandelte (weiß) und mit AMPA inkubierte (grau) Neurone dargestellt, **D** zeigt den I_K von Neuron mit (grau) und ohne (weiß) AMPA Behandlung. Der Quotient I_{SA}/I_K ist in **E** dargestellt. Signifikanzen im T-Test zwischen unbehandelt und AMPA-behandelt sind mit * ($p < 0,05$), bzw. ** ($p < 0,0001$) gekennzeichnet.

Tabelle 6: Kaliumströme nach AMPA-Behandlung.

	I_{SA} [nA]	I_K [nA]	I_{SA}/I_K
Kontrolle unbehandelt n=12	$3,90 \pm 0,52$	$2,79 \pm 0,53$	$1,95 \pm 0,36$
Kontrolle AMPA-behandelt n=15	$2,56 \pm 0,44$	$1,95 \pm 0,39$	$1,59 \pm 0,18$
WT+KChIP2 unbehandelt n=14	$6,40 \pm 0,75$	$0,96 \pm 0,08$	$7,72 \pm 1,24$
WT+KChIP2 AMPA-behandelt n=16	$2,31 \pm 0,21$	$0,96 \pm 0,31$	$3,51 \pm 0,41$
A14K +KChIP2 unbehandelt n=14	$4,10 \pm 0,46$	$0,76 \pm 0,08$	$5,88 \pm 0,69$
A14K+KChIP2 AMPA-behandelt n=16	$2,66 \pm 0,20$	$0,81 \pm 0,09$	$4,51 \pm 1,02$

3.5 KChIP-Aktivität in Abhängigkeit der Calcium- und Magnesiumkonzentration

Ein Einfluss von Calcium- und Magnesiumionen auf die Aktivität von KChIP ist bislang nicht vollständig geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit fiel auf, dass sich bei den *Nucleated-Patch*-Experimenten in der *Whole-Cell*-Ableitung mit divalentenfreier Intrazellulärlösung die I_{SA} Amplitude bei KChIP2 Überexpression nicht, wie erwartet, vergrößerte. Es kam sogar zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Reduktion der I_{SA} -Amplitude von $3,02 \pm 0,19$ nA in den Kontrollzellen ($n=47$) auf $2,38 \pm 0,14$ nA in KChIP2 ($n=31$) exprimierenden Zellen unter Verwendung von calcium- und magnesiumfreier Lösung (ic2). Um diese Beobachtung zu überprüfen wurde der I_{SA} von KChIP2-Neuronen unter Verwendung von divalentenfreier Intrazellulärlösung mit dem I_{SA} von KChIP2-Neuronen mit einer Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen enthaltender Intrazellulärlösung (ic3) verglichen (Abbildung 23 A, Tabelle 7). Bei Abwesenheit von Calcium und Magnesium ($n=31$) wurde eine tendenziell kleinere I_{SA} Amplitude gemessen

($2,38 \pm 0,14$ nA) als bei Anwesenheit von Calcium und Magnesium ($n=19$) ($2,84 \pm 0,24$ nA). Die durchschnittliche Amplitude des I_K war in calcium- und magnesiumhaltiger Lösung mit $3,05 \pm 0,34$ nA unverändert zu dem I_K in divalentenfreier Intrazellulärlösung ($3,00 \pm 0,22$ nA). Auch die Ergebnisse der makroskopischen Inaktivierung waren in beiden Lösungen ähnlich: in divalentenfreier Lösung ($n=29$) lag τ_1 bei $31,2 \pm 1,9$ ms und τ_2 789 ± 205 ms. $A\tau_1$ betrug in divalentenfreier Lösung $76,48 \pm 1,82\%$. In calcium- und magnesiumhaltiger Lösung ($n=19$) betrug τ_1 $31,8 \pm 2,5$ ms, τ_2 654 ± 91 ms und $A\tau_1$ $70,7 \pm 4,0\%$ ($n=19$) (Abbildung 23 B, Tabelle 7).

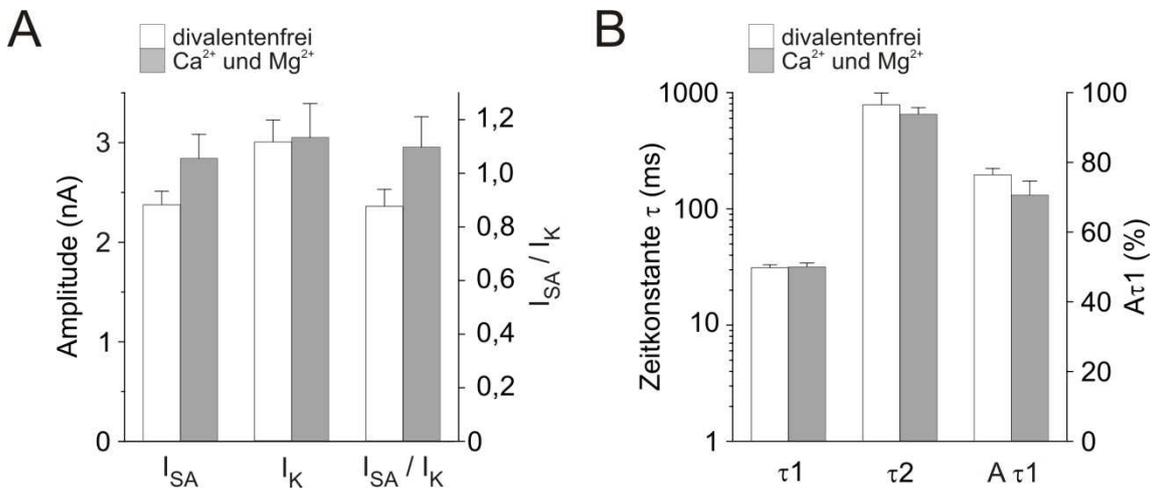


Abbildung 23: Einfluss divalenter Ionen auf die KChIP/Kv4.2 Interaktion.

In **A** dargestellt sind die durchschnittlichen Amplituden des I_{SA} und I_K von KChIP2-Neuronen in Calcium- und Magnesiumfreier (weiß) und Calcium- und Magnesiumhaltiger Lösung (grau). Rechts in Abbildung **A** ist das Verhältnis des I_{SA} zu I_K abgebildet. **B** zeigt die durchschnittlichen Zeiten für die schnelle (τ_1) und die langsame Komponente (τ_2) der makroskopischen Inaktivierung und die relative Amplitude des τ_1 an der Gesamtamplitude ($A\tau_1$), je in divalentenfreier (weiß) und Calcium- und Magnesiumhaltiger Lösung (grau).

Tabelle 7: KChIP Überexpression in divalentenreicher und divalentenfreier Intrazellulärlösung.

	I_{SA} [nA]	I_K [nA]	I_{SA}/I_K
Divalentenfrei n=19	$2,38 \pm 0,14$	$3,00 \pm 0,22$	$0,88 \pm 0,06$
Ca^{2+} und Mg^{2+} n=31	$2,84 \pm 0,24$	$3,05 \pm 0,34$	$1,10 \pm 0,11$
	τ_1 [ms]	τ_2 [ms]	A τ_1 [%]
Divalentenfrei n=19	$30,6 \pm 2,0$	789 ± 205	$76,5 \pm 1,8$
Ca^{2+} und Mg^{2+} n=29	$31,8 \pm 2,5$	654 ± 91	$70,7 \pm 4,0$

4 Diskussion

Sowohl Überexpression von WT als auch von A14K führen zu einer signifikanten Erhöhung der A-Typ-Stromamplitude. Durch KChIP2 Expression, beziehungsweise Koexpression konnte lediglich ein tendenziell positiver Effekt auf die I_{SA} Amplitude beobachtet werden. Die Inaktivierungskinetik wird durch WT Überexpression verlangsamt, ein eindeutiger zusätzlicher Effekt von KChIP2 ist nicht auszumachen. Die Ergebnisse der Erholung von der Inaktivierung sind nicht eindeutig, jedoch scheint sie durch KChIP2 beschleunigt zu werden. Die Spannung der halbmaximalen Inaktivierung und die *Steady-State*-Inaktivierungskurve werden durch KChIP2 Überexpression nur wenig zu positiveren Potentialen verschoben. Die Ergebnisse der *Nucleated-Patch*-Messungen sprechen gegen einen Einfluss von KChIP2 auf die somatodendritische Verteilung des I_{SA} . Allerdings scheint die Interaktion mit KChIP2 die aktivitätsabhängige Internalisierung von $K_V4.2$ zu begünstigen. Ein Einfluss der Calciumkonzentration auf die $K_V4.2$ /KChIP2-Interaktion konnte nicht nachgewiesen werden.

4.1 Heterologe Expression von epitopmarkierten Kanälen

Die $K_V4.2$ /KChIP2-Interaktion wurde mittels heterologer Expression einer epitopmarkierten, KChIP-bindungsdefizienten $K_V4.2$ -Variante (A14K) untersucht (Callsen et al., 2005). Bereits zuvor wurden Studien mit KChIP2-*Knock-Out*-Modellen durchgeführt (Norris et al. 2010; Wang et al., 2013). Vorteile des bindungsdefizienten Kanals $K_V4.2A14K$ sind der für alle KChIPs geltende Verlust der Interaktionsfähigkeit und der Erhalt anderer (nicht $K_V4.2$ bezogener) KChIP Funktionen. Allerdings stellt die Überexpression von Plasmid-DNA eine ungewöhnliche Beanspruchung der Zelle dar, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollte. Weiterhin kommt es sehr wahrscheinlich zusätzlich zur heterologen Expression von A14K zu einer weiteren endogenen Produktion von Wildtyp-Kanalprotein in den Neuronen. Eventuell könnte daher bei einem bevorzugten Membraneinbau der mit KChIP2 interagierenden Kanäle die Beurteilung der Kinetik erschwert sein, da das im Zellinneren verbleibende Kanalprotein nicht in die Messung miteinbezogen wird. Aus

diesen Gründen wären zur Untersuchung der $K_V4.2/KChIP$ -Interaktion zusätzlich Messungen mit einer A14K *Knock-In-Mouse* von Vorteil, da so ein direkter Vergleich zwischen Wildtyp und A14K-Neuronen möglich wäre. Heterolog exprimierte, epitopmarkierte Ionenkanäle können mit spezifischen Bindungspartnern unkompliziert nachgewiesen werden. Es besteht aber die Möglichkeit, dass durch das Epitop *Ionenkanal gating*, *Proteintargeting* und der Proteintransport beeinflusst werden (Maue et al., 2007). Die in dieser Arbeit heterolog exprimierten Kanalproteine waren mit einem C-terminalen EGFP-Epitop und einem extrazellulären HA-Epitop zwischen S1 und S2 versehen. In vorangegangenen Experimenten an CHO Zellen wurde gezeigt, dass Kanäle mit HA-Epitop normal exprimiert wurden und typische A-Typ-Ströme erzeugten. Durch KChIP2 konnten diese Ströme moduliert werden, wenn nicht eine Bindungsdefizienz durch die A14K-Mutation vorlag (Callsen et al., 2005). Auch das fusionierte EGFP scheint die KChIP2-Interaktion und die davon abhängige Modulation nicht zu stören (Hartmann, 2007), wie auch bereits für KChIP1 und $K_V4.3$ gezeigt (Hatano et al., 2002). Wie für native Kanäle beschrieben (Shibata et al., 2003; Jinno et al., 2005), konnte auch bei den epitopmarkierten Kanälen die Bildung von dendritischen Clustern beobachtet werden (Hartmann, 2007). Nichtsdestotrotz weichen die Bedingungen während der Messungen von denen im lebendigen System ab, allein durch die Veränderung der Temperatur kommt es zu einer veränderten Kanalkinetik (Brouillette et al., 2004).

4.2 Kontrolle der funktionellen $K_V4.2$ Oberflächenexpression

Eine der wichtigsten Funktionen von KChIP2 als akzessorische $K_V4.2$ Untereinheit ist die Verstärkung des Membraneinbaus von $K_V4.2$ und damit die Erhöhung der A-Typ Stromamplitude (An et al., 2000; Bähring et al., 2001a). Vorherige Untersuchungen weisen in hippokampalen Pyramidenzellen auf einen durch KChIP2-Assoziation verstärkten $K_V4.2$ Transport in die Dendriten und vermehrte Membraninsertion hin (Hartmann, 2007). Daher wäre durch KChIP2 Überexpression eine verstärkte, funktionelle Oberflächenexpression des $K_V4.2/KChIP2/DPP$ -Kanalkomplexes mit Erhöhung der I_{SA} Amplitude zu erwarten. Eine Erhöhung der A-Typ-Stromamplitude durch $K_V4.2$ Überexpression ist bereits belegt (Chen et al., 2006b; Coetzee et al., 1999;

Kim und Hoffman, 2008). Weiterhin wurde die Funktionalität von A14K in HEK Zellen bereits überprüft (Callsen et al., 2005). Wie zu erwarten führte in hippokampalen Pyramidenzellen die Überexpression des WT-Kanals, aber auch die Expression der A14K Mutante zu einer signifikanten Erhöhung der I_{SA} Amplitude gegenüber der Kontrolle. Hieraus lässt sich schließen, dass sowohl der Klon des humanen $K_{V4.2}$ -Kanals als auch der Klon der bindungsdefizienten Mutante A14K in hippokampalen Neuronen der Ratte funktionell exprimiert wird und zu einer erhöhten A-Typ-Stromamplitude beiträgt. Eine KChIP Interaktion scheint daher für den funktionellen Membraneinbau nicht obligat zu sein. Eine tendenziell erhöhte I_{SA} Amplitude bei KChIP2 Assoziation weist dennoch auf einen positiven Einfluss von KChIP2 hin. Da auch in nativen hippokampalen Neuronen KChIP2 exprimiert wird (Rhodes et al., 2004), ist allerdings nicht sicher, wie stark der Effekt von zusätzlichem KChIP2 überhaupt ist. In kortikalen Neuronen wurden Wechselwirkungen zwischen KChIP2, KChIP3 und KChIP4 beobachtet: war die Expression eines der KChIPs gestört, wurden die anderen beiden hochreguliert (Norris et al., 2010). An Experimenten mit hippokampalen Neuronen einer KChIP2 *Knock-Out*-Maus konnte dieser Effekt jedoch nicht bestätigt werden (Wang et al., 2013), doch passt der dort nur leichte Effekt von KChIP2 auf die I_{SA} Amplitude zu unseren Beobachtungen. Koexpression von KChIP2 führte sowohl mit WT als auch mit A14K zu einer weiteren, nicht signifikanten zusätzlichen Erhöhung der I_{SA} Amplitude. Die Amplitudenzunahme war bei A14K+KChIP2 jedoch deutlich geringer als bei WT+KChIP2. Das Verhältnis von I_{SA}/I_K war bei WT und WT+KChIP2 Koexpression hoch signifikant ($p < 0,0001$) größer als in der Kontrolle und bei A14K und A14K+KChIP2 signifikant ($p < 0,05$) höher als in der Kontrolle. In WT+KChIP2-Neuronen war I_{SA}/I_K tendenziell größer als in A14K+KChIP2-Neuronen. Es ist nicht auszuschließen, dass ein eventuell eindeutigerer Effekt von KChIP durch die verbliebene endogene Kanalproduktion abgeschwächt ist. Daher wäre nach diesen Ergebnissen ein positiver KChIP Einfluss auf die $K_{V4.2}$ Oberflächenexpression in Neuronen denkbar. Bisherige Untersuchungen zeigen in hippokampalen CA1 Neuronen vornehmlich eine Interaktion von KChIP2 mit $K_{V4.2}$ (Rhodes et al., 2004). Daher bestand die Annahme, dass der I_K durch unterschiedliche Transfektion von $K_{V4.2}$ -Kanalprotein und KChIP2 nicht beeinflusst wird. Trotzdem ergab eine ANOVA ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$) für die I_K Amplitude und einen signifikant ($p < 0,05$) höheren I_K bei A14K+KChIP Koexpression als bei

Kontrollneuronen. Dies könnte darauf hindeuten, dass durch den Vorpuls auf -30 mV nicht alle $K_{V4.2}$ -Kanäle inaktiviert wurden. Dazu passt allerdings nicht, dass es diesen Effekt gerade bei A14K+KChIP2-Neuronen gibt. Eine andere Möglichkeit wäre ein Einfluss von KChIP2, insbesondere Überexpression, auf weitere spannungsaktivierte Kaliumkanäle. Denkbar wäre in diesem Fall eine Assoziation mit anderen K_V -Kanälen durch das künstlich hervorgerufene Überangebot von KChIP2. In heterologen Systemen konnten bereits verschiedene Interaktionen zwischen α - und β -Untereinheiten beobachtet werden, die im nativen System nicht auftreten würden, beispielsweise zwischen dem normalerweise im Axon vorhandenem $K_V\beta$ und dendritischen K_V4 (Maffie und Rudy 2008). Auch wurde bereits die Interaktion von KChIP2 mit $K_{V1.5}$ beobachtet (Li et al., 2005).

In den durchgeführten Experimenten inaktivierte der I_{SA} mit einem zweifach exponentiellen Abfall der Stromkurve, wobei die erste Komponente je nach Transfektionsgruppe durchschnittlich zwischen 75% und 83% des Stromabfalls ausmachte. Die Zeitkonstante der ersten Komponente war ähnlich der zuvor beschriebenen Zeitkonstanten in hippocampalen Rattenneuronen und HEK-Zellen mit KChIP (Klee et al., 1995; Bähring et al., 2001c), in Myozyten sind langsamere Zeitkonstanten bekannt (Brouillette et al., 2004; Waldschmidt et al., 2017). In HEK Zellen wurde nachgewiesen, dass es durch KChIP Bindung zu einer Verlangsamung der initialen Phase der Inaktivierung kommt (Bähring et al., 2001a). Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass möglicherweise auch in hippocampalen Neuronen die schnelle Zeitkonstante τ_1 durch die KChIP2 Interaktion verlangsamt wird. Bei Koexpression von WT+KChIP2 war das τ_1 langsamer als bei Koexpression von A14K+KChIP2, auch alleinige KChIP2 Expression verlangsamte τ_1 tendenziell gegenüber der Kontrolle. Interessant ist zudem auch eine deutliche Verlangsamung der initialen Phase der Inaktivierung bei Überexpression von WT ($p < 0,0001$) (Abbildung 15A und 15B). Dies könnte an einem nicht ausreichenden Angebot von DPP β -Untereinheiten für die $K_{V4.2}$ -Kanal überexprimierenden Neuronen liegen, da DPP Bindung zu einer starken Beschleunigung der makroskopischen Inaktivierung führt (Nadal et al., 2003). Auch in A14K-Neuronen zeigte sich eine Verlangsamung, jedoch weniger ausgeprägt als bei WT-Überexpression.

Nicht nur die schnelle Inaktivierung, auch die zügige Erholung von der Inaktivierung erlauben dem $K_{v4.2}$ -Kanal modulierend auf postsynaptische Erregungen einzuwirken. Durch KChIP-Bindung kommt es zu einer beschleunigten Erholung von der Inaktivierung mit Linksverschiebung der Erholungskurve (An et al., 2000; Bähring et al., 2001a; Gebauer et al., 2004; Jerng et al., 2005; Wang et al., 2013). Die Erholungskinetik verlief zweifach exponentiell und bildete damit mehrere Komponenten des Gesamtauswärtsstroms ab (Witzel et al., 2012). Die erste, schnellere Komponente scheint den Anteil des I_{SA} am Gesamtauswärtsstrom abzubilden, sie ist mit $56,5 \pm 5,7$ ms etwas langsamer als die in der Literatur beschriebenen Werte in Neuronen (32,1 ms) und Myozyten (34,6 ms) (Klee et al., 1995; Brouillette et al., 2004). Die zweite Komponente (τ_{rec2}) veränderte sich in den Gruppen kaum, was zusätzlich dafür spricht, dass sie nicht am I_{SA} beteiligte Kanäle abbildet. Eine Beschleunigung der ersten Komponente (τ_{rec1}) der Erholung von der Inaktivierung konnte in den Neuronen nachgewiesen werden: KChIP2 Überexpression führte zwar lediglich zu einer tendenziellen Beschleunigung des τ_{rec1} im Vergleich zur Kontrolle. In WT+KChIP2-Neuronen hingegen war das τ_{rec1} signifikant ($p < 0,05$) schneller als in A14K+KChIP2-Neuronen. Bei alleiniger WT und A14K Überexpression gab es jedoch keinen Unterschied. In den Kontrollneuronen und bei KChIP2 Überexpression konnte eine deutliche Verteilung in zwei Komponenten beobachtet werden, bei WT- und A14K-Überexpression hingegen war kaum die Aufteilung in zwei Komponenten erkennbar. Ursächlich dafür könnte gegebenenfalls der verstärkte Anteil des I_{SA} am Gesamtstrom bei WT- und A14K-Überexpression sein. Dies bildet sich jedoch nur leicht in der relativen Amplitude ($A\tau_{rec1}(\%)$) der ersten Erholungskomponente am Gesamtstrom ab. Allerdings gab es eine interessante Entwicklung bei Koexpression von A14K+KChIP2: in diesen Neuronen kam es zu der stärksten Veränderung der τ_{rec1} , gleichzeitig war das τ_{rec2} schneller als in den anderen Gruppen (Abbildung 16 und 17). Auch wenn es keine signifikanten Unterschiede für die Verteilung der langsamen Komponente (τ_{rec2}) gibt, spricht diese Beobachtung zusätzlich für den Verdacht, dass es bei Überexpression von KChIP2 zu einer Interaktion mit anderen spannungsabhängigen Kaliumkanälen kommt. Gegen eine solche Beeinflussung sprechen allerdings Untersuchungen von Wang et al., die in einem *Knock-Out*-Modell keinen KChIP2 Einfluss auf die Kinetik anderer K_v Ströme fanden (Wang et al., 2013). Auch über die *Steady-State*-Inaktivierung kann der $K_{v4.2}$ -Kanal modulierend auf die neuronale

Plastizität einwirken. Beispielsweise wurde eine Verschiebung der Inaktivierungskurve zu negativeren Potentialen bei LTP Induktion nachgewiesen (Frick et al., 2004). Durch KChIP Interaktion kommt es zu einer Vergrößerung des Aktivierungsfensters von $K_{V4.2}$ durch eine deutliche Positivverschiebung der *Steady-State*-Inaktivierung des $K_{V4.2}$ -Kanals (An et al., 2000; Bähring et al., 2001a; Gebauer et al., 2004; Wang et al., 2013). An die *Steady-State*-Inaktivierungskurve konnte eine doppelte Boltzmannfunktion angepasst werden, die die Inaktivierung des Gesamtauswärtsstroms darstellte. Auch zuvor wurde eine *Steady-State*-Inaktivierungskurve in Form einer doppelten Boltzmannfunktion beschrieben (Witzel et al., 2012). Die erste Komponente ($V_{1/21}$) scheint durch die I_{SA} Komponente bestimmt zu sein. Einerseits sind die Werte ähnlich den in der Literatur beschrieben für HEK Zellen (-57,4 mV), Neuronen (-85,5 mV; -56 mV) und Myozyten (-55,8 mV) (Bähring et al., 2001c; Klee et al., 1995; Hoffman et al., 1997; Brouillette et al., 2004; Waldschmidt et al., 2017). Weiterhin liegt die zweite Komponente der Inaktivierung ($V_{1/22}$) bei Potentialen deutlich über -40mV, bei denen der I_{SA} bereits vollständig inaktiviert sein sollte. Leichte Veränderungen konnten nur für $V_{1/21}$, nicht jedoch für $V_{1/22}$ oder den *Slope-Faktor* beobachtet werden. In KChIP2-Neuronen konnte eine leichte Rechtsverschiebung der Inaktivierungskurve beobachtet werden, während es bei alleiniger WT Überexpression, aber auch bei WT+KChIP2 Koexpression zu einer Linksverschiebung der Inaktivierungskurve kam. Bei den Untersuchungen zur Erholung von der Inaktivierung und der Spannungsabhängigkeit der *Steady-State*-Inaktivierung sind, dadurch das der Gesamtauswärtsstrom betrachtet wird, isolierte Veränderungen des I_{SA} eventuell nur unzureichend zu erkennen.

4.3 Kontrolle der subzellulären $K_{V4.2}$ Verteilung in Neuronen

Eine wichtige Eigenschaft des I_{SA} ist seine somatodendritische Verteilung. Es tritt ein Gradient auf, die I_{SA} Dichte nimmt in den Dendriten nach distal zu. Über diesen Mechanismus kann verstärkt Einfluss auf rückwärtsgerichtete Aktionspotentiale (bAPs) genommen werden. Wird der I_{SA} mit 4-AP blockiert, ist die Abschwächung der bAPs im Dendriten nur noch gering (Hoffman et al., 1997) und es kommt während der bAPs zu einem erhöhtem Calciumeinstrom (Chen et al., 2006a). Ebenso ist bei genetischem *Knock-Down* des I_{SA} der Calciumeinstrom in den Dendriten während eines bAP erhöht

(Chen et al., 2006b; Kim et al., 2005). Der für den I_{SA} beschriebene somatodendritische Gradient scheint hauptsächlich durch die Interaktion mit DPP bedingt zu sein, da er in DPP6 *Knock-Out*-Mäusen nicht nachweisbar ist (Sun et al., 2011). Auch die Eigenschaften des I_{SA} können innerhalb eines Neurons variieren. In Dendriten hippocampaler Pyramidenzellen wurde ein hyperpolarisierender Shift um 10 mV in der Aktivierungskurve bei einer Entfernung von mehr als 100 μm distal des Soma gemessen (Birnbaum et al., 2004; Hoffman et al., 1997). Dies deutet ebenfalls auf eine zusätzliche Modifikation durch akzessorische β -Untereinheiten hin. Interessant wären analog zu den A14K-Neuronen Untersuchungen zur $K_{V4.2}$ /DPP-Interaktion, jedoch konnte bisher keine DPP-bindungsdefiziente $K_{V4.2}$ -Mutante erzeugt werden. Auch im Zellverband existiert ein durch β -Untereinheiten hervorgerufener Gradient des Kaliumstroms. In Myozyten leitet der K_{V4} /KChIP-Komplex den transienten Auswärtsstrom (I_{TO}) und KChIP2 scheint dort den transmuralen I_{TO} Gradienten zu bestimmen (Rosati et al. 2001). Für das dendritische *targeting* ist vor allem ein Di-Leucin-Motiv am C-Terminus (Rivera et al., 2003) verantwortlich, eine weitere C-terminale Aminosäuresequenz bedingt den dendritischen Transport durch Interaktion mit Kif17 (Chu et al., 2006). Auch KChIP interagiert mit $K_{V4.2}$ im Bereich des Di-Leucin-Motivs, nicht jedoch mit der weiter distal gelegenen Transportdomäne (Callsen et al., 2005), daher ist ein Einfluss von KChIP2 auf die somatodendritische Verteilung nicht auszuschließen. Per Immunfluoreszenz konnten dendritische Cluster sowohl von WT als auch von A14K nachgewiesen werden, wobei lediglich die Oberflächenexpression von WT durch KChIP2 Koexpression erhöht werden konnte (Hartmann, 2007). Zusätzlich wurde eine Verbindung zwischen der $K_{V4.2}$ und der KChIP Expression beobachtet (Chen et al., 2006b; Menegola und Trimmer, 2006). Es stellt sich die Frage, ob und in wie weit eine Interaktion von KChIP mit $K_{V4.2}$ den somatodendritischen Gradienten des I_{SA} beeinflusst. In dieser Arbeit wurde versucht, mittels *Nucleated-Patch*-Ableitungen zwischen somatischen und dendritischen A-Typ-Strömen zu differenzieren. Änderungen durch KChIP2-Interaktion konnten weder in der I_{SA} Amplitude noch in der Änderung des Verhältnis von I_{SA} *Patch* zu I_{SA} *Cell* beobachtet werden. Die Ergebnisse sprechen eher dafür, dass KChIP2 den dendritischen Transport nicht wesentlich beeinflusst. Allerdings blieb das Verhältnis von I_{SA} *Patch* zu I_{SA} *Cell* auch in Neuronen, die 600Δ exprimierten konstant. Insgesamt müssen die Ergebnisse der *Nucleated-Patch*-Experimente vorsichtig interpretiert werden. Durch das sogenannte

Space-Clamp-Problem sind dendritische Ströme generell schwieriger zu messen als somatische, da der Widerstand durch die Aufzweigungen der Dendriten deutlich ansteigt und somit Ströme in den distal gelegenen Dendriten nicht oder nur schwer erfasst werden können (Numberger und Draguhn, 1996). Daher ist eine Umverteilung in insbesondere distale Dendriten durch eine somatische Ableitung schwer nachzuweisen. Zusätzlich ist die Beurteilbarkeit der KChIP2-Interaktion in den *Nucleated-Patch*-Experimenten eventuell durch veränderte KChIP Eigenschaften in der hypoosmolaren, divalentenfreien Intrazellulärlösung eingeschränkt.

4.4 Aktivitätsabhängige Modulierung der $K_V4.2$ Expression

Durch Induktion synaptischer Aktivität mittels AMPA-Stimulation sollte die Wirkung der $K_V4.2$ /KChIP-Interaktion auf die synaptische Plastizität untersucht werden. Denn für neuronale Plastizität spielt die aktivitätsabhängige Modulation von Ionenkanälen eine wichtige Rolle. Durch aktivitätsabhängigen Calciumeinstrom im Rahmen von beispielsweise Langzeitpotenzierung oder eines Status epilepticus können Ionenkanäle beeinflusst werden. Eine solche Regulation kann funktionell auf veränderten Ionenkanaleigenschaften beruhen oder aus einer geänderten Ionenkanaldichte in der Membran resultieren. Durch seine Wirkung auf EPSPs und bAPs (Hoffman et al., 1997) kann der I_{SA} bereits in einer sehr frühen Phase Einfluss auf die neuronale Erregungsleitung nehmen. Es wurden bereits mehrere Formen der aktivitätsabhängigen I_{SA} -Modulation beschrieben. Die Inaktivierungskurve des I_{SA} verschiebt sich durch Langzeitpotenzierung zu negativeren Potentialen (Frick et al., 2004). Zusätzlich kommt es zu einer Positivverschiebung der Aktivierungskurve durch PKA und PKC, was wiederum zu einer verstärkten bAP-Amplitude führt (Hoffman und Johnston, 1998; Hoffman und Johnston, 1999). Stimulation des Glutamat-Rezeptors führte über NMDA-Rezeptoraktivierung und Calciumeinstrom zu einer Clathrin-vermittelten Endozytose von durch PKA phosphorylierten $K_V4.2$ sowie zu einem Transport aus den dendritischen Spines (Kim et al., 2007; Hammond et al., 2008). Der Effekt von Glutamat-Rezeptorstimulation über NMDA-Rezeptoraktivierung und Calciumeinstrom, nicht jedoch über AMPA-Rezeptorstimulation, wurde in einer weiteren Studie reproduziert (Lei et al., 2008). Weiterhin kommt es bei Induktion eines Status epilepticus zu einer Herabregulation von $K_V4.2$ über Phosphorylierung von

extracellular-signal-regulated-kinases (Bernard et al., 2004; Lugo et al., 2008). Hier konnte durch Induktion synaptischer Aktivität mittels AMPA sowohl in WT+KChIP2 als auch in A14K+KChIP2 Neuronen ein signifikanter Rückgang der I_{SA} -Amplitude beobachtet werden, der wahrscheinlich auf eine Internalisierung von $K_{V4.2}$ -Kanälen zurückgeführt werden kann. Auffallend war, dass die I_{SA} -Amplitude vor AMPA-Behandlung bei WT+KChIP2 höher als bei A14K+KChIP2 ($p < 0,05$) war, nach AMPA-Behandlung jedoch kein wesentlicher Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen bestand. Der Quotient I_{SA}/I_K war nach AMPA Behandlung nur bei WT-KChIP2-Neuronen signifikant ($p < 0,05$) reduziert. Dies könnte bedeuten, dass KChIP den $K_{V4.2}$ -Kanal empfänglicher für aktivitätsabhängige Modulation macht. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass durch eine Interaktion mit β -Untereinheiten die Phosphorylierung von $K_{V4.2}$ gefördert wird (Schrader et al., 2002; Seikel und Trimmer, 2009). Aufgrund der vorhandenen Calcium-Bindungsstellen der KChIPs wäre auch eine Beeinflussung der $K_{V4.2}$ /KChIP-Interaktion durch erhöhten Calciumeinstrom denkbar. KChIP2.1 besitzt drei funktionelle EF-Hand Motive, die Calcium binden können. In NCS Proteinen wie KChIP führt die Bindung von Calcium zu einer Konformationsänderung (Craig et al., 2002; Burgoyne et al., 2004). KChIP3 ist auch als DREAM bekannt, ein durch Calcium regulierter Transkriptions-Repressor. Durch Calciumbindung an den EF-Händen kommt es zu einer Konformationsänderung und Abdissoziation von der DNA. Hierüber nimmt DREAM Einfluss auf zahlreiche zelluläre Prozesse, unter anderem auf die Regulation von Schmerzempfindlichkeit (Carrión et al., 1999; Cheng et al., 2002). Auch für KChIP2 wurde bereits eine Funktion als Transkriptions-Repressor in Myozyten vermutet (Nassal et al., 2017). Die Calciumsensitivität von KChIP, zusammen mit der aktivitätsabhängigen Modulation und der postsynaptischen Lokalisation von $K_{V4.2}$ verleiten zu der Annahme, dass synaptische Aktivität mit einhergehend veränderter Calciumkonzentration über KChIP Einfluss auf den I_{SA} nimmt. Inwiefern die Calciumbindung zu einer Änderung der Interaktion mit K_{V4} führt, und ob die Bindung von Calcium an KChIP notwendig für die Bildung eines $K_{V4.2}$ /KChIP-Komplexes ist, wurde bisher nicht abschließend geklärt (Burgoyne und Weiss, 2001; Craig et al., 2002; Pioletti et al., 2006; Anderson et al., 2010; Groen und Bähring 2017). Wang et al. beobachteten eine, möglicherweise durch KChIP induzierte, Zunahme der I_{SA} -Amplitude in Rattenneuronen wenn sie die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhten (Wang et al., 2005). Funktionelle

Eigenschaften des $K_v4.3/KChIP2$ -Komplexes können durch direkte Calciumbindung an KChIP und Aktivierung der CaMKII verändert werden (Groen und Bähring 2017). Während der Experimente mit hypoosmolarer calcium- und magnesiumfreier Intrazellulärlösung fiel auf, dass sich der I_{SA} in KChIP2 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht wie erwartet vergrößerte. Es kam sogar zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Reduktion der I_{SA} Amplitude. In Experimenten mit einer isoosmolaren, calcium- und magnesiumhaltigen Lösung beziehungsweise divalentenfreier Lösung konnten diese Ergebnisse nicht sicher reproduziert werden. Es wurden lediglich tendenziell kleinere I_{SA} Amplituden in divalentenfreier Intrazellulärlösung gemessen. Möglich sind jedoch auch andere Ursachen für die abweichenden Ergebnisse. Beispielsweise ist ein Einfluss auf den I_{SA} nicht nur bei Änderung der Zusammensetzung der Intrazellulärlösung denkbar sondern auch bei unterschiedlicher Zusammensetzung der Extrazellulärlösung bereits beschrieben (Mayer und Sugiyama, 1988). Weiterhin wären gegebenenfalls mechanische Einflüsse aufgrund der Hypoosmolarität der Lösung denkbar.

5 Zusammenfassung

In Nervenzellen spielt der durch den $K_{V4.2}$ /KChIP/DPP-Kanal-Komplex vermittelte somatodendritische A-Typ-Strom (I_{SA}) eine bedeutende Rolle für die Kontrolle dendritischer Erregbarkeit. Die schnelle, unterschwellige Aktivierung und rasche Inaktivierung des I_{SA} ist zusammen mit dem aktivitätsabhängigen Ein- und Ausbau von $K_{V4.2}$ in die Zellmembran eine Voraussetzung für wesentliche Prozesse der neuronalen Plastizität. KChIPs sind β -Untereinheiten, welche die $K_{V4.2}$ Oberflächenexpression verstärken und die Eigenschaften des I_{SA} mitbedingen. Die Auswirkung der Interaktion von $K_{V4.2}$ mit KChIPs wurde bereits in Zellkulturlinien erforscht. In dieser Arbeit wurde mittels heterologer Expression von epitopmarkierten, KChIP-bindungsfähigen und -bindungsdefizienten $K_{V4.2}$ -Kanälen untersucht, in wieweit sich diese Ergebnisse auf die $K_{V4.2}$ /KChIP-Interaktion in kultivierten hippocampalen Neuronen übertragen lassen. Es wurden elektrophysiologische Untersuchungen mittels *Patch-Clamp* mit *Whole-Cell*- und *Nucleated-Patch*-Ableitungen an hippocampalen Neuronen der Ratte durchgeführt, welche zuvor mit EGFP, h $K_{V4.2}$ wt-HA-EGFP, h $K_{V4.2}$ A14K-HA-EGFP, beziehungsweise h $K_{V4.2}$ 600 Δ -HA-EGFP oder hKChIP2.1 transfiziert worden waren. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass KChIP-Interaktion keine notwendige Voraussetzung für die $K_{V4.2}$ Membraninsertation ist, diese jedoch vermutlich positiv beeinflusst. Zusätzlich deuten die Ergebnisse darauf hin, dass KChIPs die Erholung von der Inaktivierung begünstigen und die *Steady-State*-Inaktivierung zu positiveren Potentialen verschieben. Ob durch KChIP-Interaktion eine Umverteilung von $K_{V4.2}$ in die Dendriten stattfindet konnte durch die *Nucleated-Patch*-Messungen nicht nachgewiesen werden. Es zeigen sich aber Hinweise, dass KChIP die AMPA-induzierte, aktivitätsabhängige Internalisierung von $K_{V4.2}$ begünstigt. Ob es durch Calciumbindung zu veränderten Eigenschaften des $K_{V4.2}$ /KChIP-Komplexes kommt bleibt offen. Insgesamt scheint KChIP in hippocampalen Neuronen geeignet, wenn auch nicht essentiell, die neuromodulatorischen Effekte des $K_{V4.2}$ -Kanals zu unterstützen.

Abstract

The somatodendritic A-type current (I_{SA}) evoking $K_v4.2/KChIP/DPP$ channel complex plays an important role in the control of dendritic excitability in neurons. Fast and subthreshold I_{SA} activation as well as fast inactivation, in combination with activity-dependent membrane insertion and removal of $K_v4.2$, are critical involved in neuronal plasticity. $KChIPs$ are auxiliary β -subunits, which enhance the $K_v4.2$ surface expression and modify properties of the I_{SA} . The effects of the $K_v4.2/KChIP$ -interaction have been investigated in immortalized cell lines. Using heterologous expression of epitope-tagged $KChIP$ binding and $KChIP$ binding-deficient $K_v4.2$ channels, this thesis investigates to which extent the results can be transferred to the $K_v4.2/KChIP$ -interaction in cultured hippocampal neurons. Electrophysiological experiments were performed with *Patch-Clamp* in *Whole-Cell* and *Nucleated-Patch* technique, using hippocampal rat neurons which have been transfected before with EGFP, $hK_v4.2_{wt}$ -HA-EGFP, $hK_v4.2A14K$ -HA-EGFP, $hK_v4.2600\Delta$ -HA-EGFP, respectively or $hKChIP2.1$. The results indicate that $KChIP$ -interaction is not a prerequisite for $K_v4.2$ membrane insertion, but may affect membrane insertion positively. Additionally, the results indicate that $KChIP$ promotes the recovery from inactivation and shifts the *steady-state* inactivation curve to more positive potentials. *Nucleated-Patch* experiments did not provide evidence of $K_v4.2$ redistribution into dendrites through $KChIP$ binding. There is an indication that $KChIP$ promotes AMPA induced, activity-dependent internalization of $K_v4.2$. If calcium binding leads to modified properties of the $K_v4.2/KChIP$ complex still remains unsettled. Altogether, even if not essential, $KChIP$ appears to support the neuromodulatory effects of $K_v4.2$.

6 Abkürzungsverzeichnis

600Δ	Kurzform für hKv4.2600Δ-HA-EGFP sowie Bezeichnung für Neurone, die mit EGFP und hKv4.2600Δ-HA-EGFP kotransfiziert sind.
A14K	Kurzform für hKv4.2A14K-HA-EGFP sowie Bezeichnung für Neurone, die mit EGFP und hKv4.2A14K-HA-EGFP kotransfiziert sind.
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
AP	Aktionspotential
bAP	Rückwärtsgerichtetes Aktionspotential (backpropagating action potential)
C-Terminus	Carboxyterminales Ende
CA1	Region 1 des Hippokampus (cornu ammonis)
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin abhängige Kinase II
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid)
DPP	Dipeptidyl-Aminopeptidase-Protein
ec	Extrazellulärlösung
EGFP	Enhanced-Green-Fluorescent-Protein sowie Bezeichnung für Neurone, die lediglich mit EGFP transfiziert sind.
EPSC	Exzitatorischer postsynaptischer Strom
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
GABA	γ-Aminobuttersäure
HEK	Humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney)
<i>I</i>	Stromstärke
<i>I_K</i>	langsam inaktivierender Kaliumstrom
<i>I_{SA}</i>	unterschwelliger, schnell inaktivierender Kaliumstrom (subthreshold activating)
ic	Intrazellulärlösung
<i>k</i> ₁	<i>Slope-Faktor</i> der frühen Phase der <i>Steady-State</i> -Inaktivierung
<i>k</i> ₂	<i>Slope-Faktor</i> der späten Phase der <i>Steady-State</i> -Inaktivierung

K_v	Spannungsabhängige Kaliumkanäle
KChIP	Kaliumkanal interagierendes Protein (K^+ -channel-interacting-Protein), hier Kurzform für hKChIP2.1 und Abkürzung für mit hKChIP2.1 und EGFP kotransfizierte Neurone.
LTP	Langzeitpotenzierung
MAPK	Mitogen abhängige Proteinkinase
mean	Mittelwert
n	Stichprobengröße
N-Terminus	Aminoterminalendes Ende
NCS	Neuronale-Calcium-Sensoren
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit/Signifikanz
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
S(1-6)	Membrandurchspannendes Segment der K_v -Kanäle (1-6)
SEM	Standardfehler (Standard Error of the mean)
t	Zeit
T1	Tetramerisierungsdomäne der K_v -Kanäle
τ_1	Schnelle Komponente der makroskopischen Inaktivierung
τ_2	Langsame Komponente der makroskopischen Inaktivierung
τ_{rec1}	Schnelle Komponente der Erholung von der Inaktivierung
τ_{rec2}	Langsame Komponente der Erholung von der Inaktivierung
$V_{1/21}$	frühe Phase der <i>Steady-State</i> -Inaktivierung
$V_{1/22}$	späte Phase der <i>Steady-State</i> -Inaktivierung
WT	Kurzform für hKv4.2wt-HA-EGFP, sowie damit und EGFP kotransfizierte Neurone
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 Literaturverzeichnis

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

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

Armstrong, C.M., Gilly, W.F. (1992). Access resistance and space clamp problems associated with whole-cell patch clamping. *Methods Enzymol.* 207, 100–122.

Aronica, E., Boer, K., Doorn, K.J., Zurolo, E., Spliet, W.G.M., van Rijen, P.C., Baayen, J.C., Gorter, J.A., Jeromin, A. (2009). Expression and localization of voltage dependent potassium channel Kv4.2 in epilepsy associated focal lesions. *Neurobiol. Dis.* 36, 81–95.

Bähring, R., Milligan, C.J., Vardanyan, V., Engeland, B., Young, B.A., Dannenberg, J., Waldschutz, R., Edwards, J.P., Wray, D., Pongs, O. (2001a). Coupling of voltage-dependent potassium channel inactivation and oxidoreductase active site of Kvbeta subunits. *J. Biol. Chem.* 276, 22923–22929.

Bähring, R., Boland, L.M., Varghese, A., Gebauer, M., Pongs, O. (2001b). Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels. *J. Physiol.* 535, 65–81.

Bähring, R., Dannenberg, J., Peters, H.C., Leicher, T., Pongs, O., Isbrandt, D. (2001c). Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *J. Biol. Chem.* 276, 23888–23894

Bannister, N.J., Larkman, A.U. (1995). Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: I. Branching patterns. *J. Comp. Neurol.* 360, 150–160.

Baranauskas, G. (2007). Ionic channel function in action potential generation: current perspective. *Mol. Neurobiol.* 35, 129–150.

Barghaan, J., Tozakidou, M., Ehmke, H., Bähring, R. (2008). Role of N-terminal domain and accessory subunits in controlling deactivation-inactivation coupling of Kv4.2 channels. *Biophys. J.* 94, 1276–1294.

Beck, H., Yaari, Y. (2008). Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 357–369.

Bernard, C., Johnston, D. (2003). Distance-dependent modifiable threshold for action potential back-propagation in hippocampal dendrites. *J. Neurophysiol.* 90, 1807–1816.

- Bernard, C., Anderson, A., Becker, A., Poolos, NP., Beck, H., (2004). Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science*. 305, 532-535
- Bezanilla, F. (2002). Voltage sensor movements. *J. Gen. Physiol.* 120, 465–473.
- Birnbaum, S.G., Varga, A.W., Yuan, L.-L., Anderson, A.E., Sweatt, J.D., Schrader, L.A. (2004). Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. *Physiol. Rev.* 84, 803–833.
- Bliss, T.V., Gardner-Medwin, A.R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 357–374.
- Brouillette, J., Clark, R.B., Giles, W.R., Fiset C. (2004). Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J. Physiol.* 559, 777-98.
- Burgoyne, R.D., Weiss, J.L. (2001). The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem. J.* 353, 1–12.
- Burgoyne RD, O'Callaghan DW, Hasdemir B, Haynes LP, Tepikin AV (2004) Neuronal Ca²⁺-sensor proteins: multitalented regulators of neuronal function. *Trends Neurosci.* 27, 203–209.
- Buxbaum, J.D., Choi, E.K., Luo, Y., Lilliehook, C., Crowley, A.C., Merriam, D.E., Wasco, W. (1998). Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat. Med.* 4, 1177–1181.
- Callsen, B., Isbrandt, D., Sauter, K., Hartmann, L.S., Pongs, O., Bähring, R. (2005). Contribution of N- and C-terminal Kv4.2 channel domains to KChIP interaction. *J. Physiol.* 568, 397–412.
- Carrión, A.M., Link, W.A., Ledo, F., Mellström, B., Naranjo, J.R. (1999). DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* 398, 80–84.
- Chen, C.-P., Lee, L., Chang, L.-S. (2006a). Effects of metal-binding properties of human Kv channel-interacting proteins on their molecular structure and binding with Kv4.2 channel. *Protein J.* 25, 345–351.
- Chen, X., Yuan, L.-L., Zhao, C., Birnbaum, S.G., Frick, A., Jung, W.E., Schwarz, T.L., Sweatt, J.D., Johnston, D. (2006b). Deletion of Kv4.2 gene eliminates dendritic A-type K⁺ current and enhances induction of long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 12143–12151.
- Cheng, H.Y., Pitcher, G.M., Laviolette, S.R., Wishaw, I.Q., Tong, K.I., Kockeritz, L.K., Wada, T., Joza, N.A., Crackower, M., Goncalves, J., Sarosi, I., Woodgett, J.R., Oliveira-dos-Santos, A.J., Ikura, M., van der Kooy, D., Salter, M.W., Penninger, J.M. (2002). DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation. *Cell* 108, 31–43.

- Chu, P.-J., Rivera, J.F., Arnold, D.B. (2006). A role for Kif17 in transport of Kv4.2. *J. Biol. Chem.* 281, 365–373.
- Coetzee, W.A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M.S., Ozaita, A., Pountney, D., et al. (1999). Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868, 233–285.
- Connor, J.A., Stevens, C.F. (1971). Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J. Physiol.* 213, 21–30.
- Covarrubias, M., Bhattacharji, A., De Santiago-Castillo, J.A., Dougherty, K., Kaulin, Y.A., Na-Phuket, T.R., Wang, G. (2008). The neuronal Kv4 channel complex. *Neurochem. Res.* 33, 1558–1567.
- Craig, T.A., Benson, L.M., Venyaminov, S.Y., Klimtchuk, E.S., Bajzer, Z., Prendergast, F.G., Naylor, S., Kumar, R. (2002). The metal-binding properties of DREAM: evidence for calcium-mediated changes in DREAM structure. *J. Biol. Chem.* 277, 10955–10966.
- Cui, Y.Y., Liang, P., Wang, K.W. (2008). Enhanced trafficking of tetrameric Kv4.3 channels by KChIP1 clamping. *Neurochem. Res.* 33, 2078–2084.
- Daoudal, G., Debanne, D. (2003). Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 10, 456–465.
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69–77.
- Ebbinghaus, J., Legros, C., Nolting, A., Guette, C., Celerier, M.L., Pongs, O., Bähring, R. (2004). Modulation of Kv4.2 channels by a peptide isolated from the venom of the giant bird-eating tarantula *Theraphosa leblondi*. *Toxicon* 43, 923–932
- Flores-Soto, M.E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgado, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R.E., Beas-Zarate, C. (2012). Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurol. Barc. Spain.* 5, 301–10
- Frick, A., Johnston, D. (2005). Plasticity of dendritic excitability. *J. Neurobiol.* 64, 100–115.
- Frick, A., Magee, J., Johnston, D. (2004). LTP is accompanied by an enhanced local excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nat. Neurosci.* 7, 126–135.
- Gasparini, S., Migliore, M., Magee, J.C. (2004). On the initiation and propagation of dendritic spikes in CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 11046–11056.
- Gebauer, M., Isbrandt, D., Sauter, K., Callsen, B., Nolting, A., Pongs, O., Bähring, R. (2004). N-type inactivation features of Kv4.2 channel gating. *Biophys. J.* 86, 210–223.

- Goldstein, S.A., Wang, K.W., Ilan, N., Pausch, M.H. (1998). Sequence and function of the two P domain potassium channels: implications of an emerging superfamily. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 76, 13–20.
- Groen, C., Bähring, R. (2017). Modulation of human Kv4.3/KChIP2 channel inactivation kinetics by cytoplasmic Ca(2)(+). *Pflugers Arch: Eur J. physiol.* 469, 1457–1470.
- Gu, C., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (2003). A conserved domain in axonal targeting of Kv1 (Shaker) voltage-gated potassium channels. *Science* 301, 646–649.
- Gulbis, J.M., Zhou, M., Mann, S., MacKinnon, R. (2000). Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science* 289, 123–127.
- Hagiwara, S., Kusano, K., Saito, N. (1961). Membrane changes of Onchidium nerve cell in potassium-rich media. *J. Physiol.* 155, 470–489.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 391, 85–100.
- Hammond, R.S., Lin, L., Sidorov, M.S., Wikenheiser, A.M., Hoffman, D.A. (2008). Protein kinase a mediates activity-dependent Kv4.2 channel trafficking. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 7513–7519.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.
- Hanna, M.G. (2006). Genetic neurological channelopathies. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 252–263.
- Hartmann, L.S. (2007). Funktionelle Interaktion des Kv4.2-Proteins mit akzessorischen Untereinheiten - Rolle für die somatodendritische A-Typ-Kaliumkanal-Expression in hippokampalen Neuronen von Maus (*Mus musculus*, Linné, 1758) und Ratte (*Rattus norvegicus*, Berkenhout, 1769). Dissertation. Universität Hamburg.
- Hatano, N., Ohya, S., Imaizumi, Y. (2002). Functional interaction between KChIP1 and GFP-fused Kv4.3L co-expressed in HEK293 cells. *Pflugers Arch.* 444, 80–88.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev.* 90, 291–366.
- Hille, B. (2001). Ion channels of excitable membranes. 3. Auflage, Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500–544.

- Hoffman, D.A., Magee, J.C., Colbert, C.M., Johnston, D. (1997). K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387, 869–875.
- Hoffman, D.A., Johnston, D. (1998). Downregulation of transient K⁺ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC. *J. Neurosci.* 18, 3521–3528.
- Hoffman, D. A., Johnston, D. (1999). Neuromodulation of dendritic action potentials. *J. Neurophysiol.* 81, 408–411.
- Holmqvist, M.H., Cao, J., Hernandez-Pineda, R., Jacobson, M.D., Carroll, K.I., Sung, M.A., Betty, M., Ge, P., Gilbride, K.J., Brown, M.E., et al. (2002). Elimination of fast inactivation in Kv4 A-type potassium channels by an auxiliary subunit domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1035–1040.
- Jerng, H.H., Pfaffinger, P.J. (2008). Multiple Kv channel-interacting proteins contain an N-terminal transmembrane domain that regulates Kv4 channel trafficking and gating. *J. Biol. Chem.* 283, 36046–36059.
- Jerng, H.H., Pfaffinger, P.J., Covarrubias, M. (2004a). Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 343–369.
- Jerng, H.H., Qian, Y., Pfaffinger, P.J. (2004b). Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys. J.* 87, 2380–2396.
- Jerng, H.H., Kunjilwar, K., Pfaffinger, P.J. (2005). Multiprotein assembly of Kv4.2, KChIP3 and DPP10 produces ternary channel complexes with ISA-like properties. *J. Physiol.* 568, 767–788.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., MacKinnon, R. (2002). The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417, 523–526.
- Jinno, S., Jeromin, A., Kosaka, T. (2005). Postsynaptic and extrasynaptic localization of Kv4.2 channels in the mouse hippocampal region, with special reference to targeted clustering at gabaergic synapses. *Neurosci.* 134, 483–494.
- Johnston, D., Magee, J.C., Colbert, C.M., Cristie, B.R. (1996). Active properties of neuronal dendrites. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 165–186.
- Johnston, D., Hoffman, D.A., Magee, J.C., Poolos, N.P., Watanabe, S., Colbert, C.M., Migliore, M. (2000). Dendritic potassium channels in hippocampal pyramidal neurons. *J. Physiol.* 525 Pt 1, 75–81.
- Kamb, A., Iverson, L.E., Tanouye, M.A. (1987). Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. *Cell* 50, 405–413.

- Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., Goldstein, S.A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376, 690–695.
- Kim, J., Wei, D.-S., Hoffman, D.A. (2005). Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J. Physiol.* 569, 41–57.
- Kim, J., Jung, S.-C., Clemens, A.M., Petralia, R.S., Hoffman, D.A. (2007). Regulation of dendritic excitability by activity-dependent trafficking of the A-type K⁺ channel subunit Kv4.2 in hippocampal neurons. *Neuron* 54, 933–947.
- Kim, J., Hoffman, D.A. (2008). Potassium channels: newly found players in synaptic plasticity. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 14, 276–286.
- Kin, Y., Misumi, Y., Ikehara, Y. (2001). Biosynthesis and characterization of the brain-specific membrane protein DPPX, a dipeptidyl peptidase IV-related protein. *J. Biochem. (Tokyo)* 129, 289–295.
- Klee, R., Ficker, E., Heinemann, U. (1995). Comparison of voltage-dependent potassium currents in rat pyramidal neurons acutely isolated from hippocampal regions CA1 and CA3. *J. Neurophysiol.* 74, 1982–1995.
- Kreusch, A., Pfaffinger, P.J., Stevens, C.F., Choe, S. (1998). Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* 392, 945–948.
- Lei, Z., Deng, P., Xu, ZC. (2008). Regulation of Kv4.2 channels by glutamate in cultured hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 106, 182–192.
- Li, H., Guo, W., Mellor, R.L., Nerbonne, J.M. (2005). KChIP2 modulates the cell surface expression of Kv 1.5-encoded K(+) channels. *J. Mol. Cell Cardiol.* 39, 121–32.
- Lugo, J.N., Barnwell, L.F., Ren, Y., Lee, W.L., Johnston, L.D., (2008). Altered phosphorylation and localization of the A-type channel, Kv4.2 in status epilepticus. *J. Neurochem.* 106, 1929–1940.
- Ma, D., Jan, L.Y. (2002). ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 287–292.
- Maffie, J., Rudy, B. (2008). Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K⁺ currents in neurons. *J. Physiol.* 586, 5609–5623.
- Magee, J.C., Johnston, D. (1997). A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* 275, 209–213.
- Maue, R.A. (2007). Understanding ion channel biology using epitope tags: progress, pitfalls, and promise. *J. cell. physiol.* 213, 618–625.
- Mayer, M.L., Sugiyama, K. (1988). A modulatory action of divalent cations on transient outward current in cultured rat sensory neurones. *J. Physiol.* 396, 417–433.

- Menegola, M., Trimmer, J.S. (2006). Unanticipated region and cell-specific downregulation of individual KChIP auxiliary subunit isoforms in Kv4.2 knock-out mouse brain. *J. Neurosci.* *26*, 12137-12142.
- Migliore, M., Hoffman, D.A., Magee, J.C., Johnston, D. (1999). Role of an A-type K⁺ conductance in the back-propagation of action potentials in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *J. Comput. Neurosci.* *7*, 5–15.
- Milton, R.L., Caldwell, J.H. (1990). How do patch clamp seals form? A lipid bleb model. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *416*, 758–762.
- Nadal, M.S., Ozaita, A., Amarillo, Y., Vega-Saenz de Miera, E., Ma, Y., Mo, W., Goldberg, E.M., Misumi, Y., Ikehara, Y., Neubert, T.A., et al. (2003). The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron* *37*, 449–461.
- Nadal, M.S., Amarillo, Y., Vega-Saenz de Miera, E., Rudy, B. (2006). Differential characterization of three alternative spliced isoforms of DPPX. *Brain Res.* *1094*, 1–12.
- Nakamura, T.Y., Pountney, D.J., Ozaita, A., Nandi, S., Ueda, S., Rudy, B., Coetzee, W.A. (2001). A role for frequenin, a Ca²⁺-binding protein, as a regulator of Kv4 K⁺ currents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 12808–12813.
- Nassal, D. M., Wan, X., Liu, H., Maleski, D., Ramirez-Navarro, A., Moravec, C. S., Ficker, E., Laurita, K.R., Deschênes, I. (2017). KChIP2 is a core transcriptional regulator of cardiac excitability. *eLife* *6*, e17304.
- Neher, E., Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* *260*, 799–802.
- Nerbonne, J.M., Kass, R.S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol. Rev.* *85*, 1205–1253.
- Norris, A.J., Foeger, N.C., Nerbonne, J.M. (2010). Interdependent roles for accessory KChIP2, KChIP3, and KChIP4 subunits in the generation of Kv4-encoded IA channels in cortical pyramidal neurons. *J. Neurosci.* *30*, 13644-13655.
- Numberger, M. Draguhn, A. (1996). Patch-Clamp-Technik. Spektrum, Akad. Verl. Heidelberg).
- O’Callaghan, D.W., Hasdemir, B., Leighton, M., und Burgoyne, R.D. (2003). Residues within the myristoylation motif determine intracellular targeting of the neuronal Ca²⁺ sensor protein KChIP1 to post-ER transport vesicles and traffic of Kv4 K⁺ channels. *J. Cell Sci.* *116*, 4833–4845.
- Pioletti, M., Findeisen, F., Hura, G.L., Minor, D.L. (2006). Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 987–995.

- Pruunsild, P., Timmusk, T. (2005). Structure, alternative splicing, and expression of the human and mouse KCNIP gene family. *Genomics* 86, 581–593.
- Ramakers, G.M.J., Storm, J.F. (2002). A postsynaptic transient K(+) current modulated by arachidonic acid regulates synaptic integration and threshold for LTP induction in hippocampal pyramidal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10144–10149.
- Ren, X., Shand, S.H., Takimoto, K. (2003). Effective association of Kv channel-interacting proteins with Kv4 channel is mediated with their unique core peptide. *J. Biol. Chem.* 278, 43564–43570.
- Rivera, J.F., Ahmad, S., Quick, M.W., Liman, E.R., Arnold, D.B. (2003). An evolutionarily conserved dileucine motif in Shal K⁺ channels mediates dendritic targeting. *Nat. Neurosci.* 6, 243–250.
- Rivera, J.F., Chu, P.-J., Arnold, D.B. (2005). The T1 domain of Kv1.3 mediates intracellular targeting to axons. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1853–1862.
- Rosati, B., Pan, Z., Lypen, S., Wang, H.S., Cohen, I., Dixon, J.E., (2001). Regulation of KChIP2 potassium channel β subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J. Physiol.* 533,119-25.
- Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C., Wei, A. (2006). High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 921–931.
- Sanguinetti, M.C., Johnson, J.H., Hammerland, L.G., Kelbaugh, P.R., Volkmann, R.A., Saccomano, N.A., Mueller, A.L. (1997). Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. *Mol. Pharmacol.* 51, 491-498.
- Sather, W., Dieudonné, S., MacDonald, J.F., Ascher, P. (1992). Activation and desensitization of N-methyl-D-aspartate receptors in nucleated outside-out patches from mouse neurones. *J. Physiol.* 450, 643–672.
- Schoppa, N.E., Westbrook, G.L. (1999). Regulation of synaptic timing in the olfactory bulb by an A-type potassium current. *Nat. Neurosci.* 2, 1106–1113.
- Schrader, L.A., Anderson, A.E., Mayne, A., Pfaffinger, P.J., Sweatt, J.D. (2002). PKA modulation of Kv4.2-encoded A-type potassium channels requires formation of a supramolecular complex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 10123–10133.
- Schulz, D.J. (2006). Plasticity and stability in neuronal output via changes in intrinsic excitability: it's what's inside that counts. *J. Exp. Biol.* 209, 4821–4827.
- Seikel, E., Trimmer, JS (2009). Convergent modulation of Kv4.2 channel alpha subunits by structurally distinct DPPX and KChIP auxiliary subunits. *Biochem.* 48, 5721–5730.
- Serôdio, P., Kentros, C., Rudy, B. (1994). Identification of molecular components of A-type channels activating at subthreshold potentials. *J. Neurophysiol.* 72, 1516–1529.

- Serôdio, P., Vega-Saenz de Miera, E., Rudy, B. (1996). Cloning of a novel component of A-type K⁺ channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J. Neurophysiol.* 75, 2174–2179.
- Shibata, R., Misonou, H., Campomanes, C.R., Anderson, A.E., Schrader, L.A., Doliveira, L.C., Carroll, K.I., Sweatt, J.D., Rhodes, K.J., Trimmer, J.S. (2003). A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J. Biol. Chem.* 278, 36445–36454.
- Singh, B., Ogiwara, I., Kaneda, M., Tokonami, N., Mazaki, E., Baba, K., Matsuda, K., Inoue, Y., Yamakawa, K. (2006). A Kv4.2 truncation mutation in a patient with temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 24, 245–253.
- Smith, S.E.P., Xu, L., Kasten, M.R., Anderson, M.P. (2012). Mutant LGI1 inhibits seizure-induced trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J. Neurochem.* 120, 611–621.
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 206–221.
- Steinlein, O.K. (2004). Genetic mechanisms that underlie epilepsy. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 400–408.
- Sun, W., Maffie, J.K., Lin, L., Petralia, R.S., Rudy, B. (2011). DPP6 Establishes the A-Type K(+) Current Gradient Critical for the Regulation of Dendritic Excitability in CA1 Hippocampal Neurons. *Neuron* 71, 1102-1115.
- Tseng, G.N., Jiang, M., Yao, J.A. (1996). Reverse use dependence of Kv4.2 blockade by 4-aminopyridine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 865-876.
- Vacher, H., Mohapatra, D.P., Trimmer, J.S. (2008). Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol. Rev.* 88, 1407–1447.
- Varga, A.W., Yuan, L.-L., Anderson, A.E., Schrader, L.A., Wu, G.-Y., Gatchel, J.R., Johnston, D., Sweatt, J.D. (2004). Calcium-calmodulin-dependent kinase II modulates Kv4.2 channel expression and upregulates neuronal A-type potassium currents. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 3643–3654.
- Vetter, P., Roth, A., Häusser, M. (2001). Propagation of action potentials in dendrites depends on dendritic morphology. *J. Neurophysiol.* 85, 926–937.
- Wada, K., Yokotani, N., Hunter, C., Doi, K., Wenthold, R.J., uShimasaki, S. (1992). Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 197–201.
- Waldschmidt, L., Junkereit, V., Bähring, R. (2017). KChIP2 genotype dependence of transient outward current (I_{to}) properties in cardiomyocytes isolated from male and female mice. *PLoS ONE.* 12(1), e0171213.

Wang, H., Yan, Y., Liu, Q., Huang, Y., Shen, Y., Chen, L., Chen, Y., Yang, Q., Hao, Q., Wang, K., et al. (2007). Structural basis for modulation of Kv4 K⁺ channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat. Neurosci.* *10*, 32–39.

Wang, H.G., He, X.P., Li, Q., Madison, R.D., Moore, S.D., (2013). The auxiliary subunit KChIP2 is an essential regulator of homeostatic excitability. *J. Biol. Chem.* *288*, 13258-13268.

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

Witzel, K., Fischer, P., Bähring, R. (2012). Hippocampal A-type current and Kv4.2 channel modulation by the sulfonylurea compound NS5806. *Neuropharm.* *63*, 1389-1403.

Zagha, E., Ozaita, A., Chang, S.Y., Nadal, M.S., Lin, U., Saganich, M.J., McCormack, T., Akinsanya, K.O., Qi, S.Y., Rudy, B. (2005). DPP10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels. *J. Biol. Chem.* *280*, 18853–18861.

8 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Robert Bähring für die geduldige und hilfsbereite Betreuung dieser Arbeit. Nicht nur für die wertvollen Ratschläge und Korrekturen, sondern auch für die ansteckende Begeisterung bei der praktischen und theoretischen Einführung in die Elektrophysiologie bin ich sehr dankbar.

Den Mitgliedern des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie möchte ich für die Zusammenarbeit herzlich danken. Nicht zuletzt aufgrund des angenehmen Arbeitsklimas und der großen Hilfsbereitschaft habe ich mit Freude am experimentellen Teil dieser Dissertation gearbeitet. Insbesondere Dr. Daniel Minge und Dr. Kamila Szlachta haben mich nicht nur praktisch unterstützt, sondern hatten auch für meine vielen Fragen immer ein offenes Ohr. Mein Dank gilt nicht zuletzt Prof. Dr. Heimo Ehmke für die Möglichkeit an seinem Institut zu lernen und zu forschen.

Dr. Michaela Schweizer und Dr. Frank Heisler vom Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg danke ich für das Bereitstellen der Neuronenkulturen.

Bei meinen Eltern Kerstin Thormann-Hofmann und Prof. Dr. Peter Hofmann möchte ich mich für die unermüdliche Unterstützung und den langjährigen Ansporn bedanken.

Dass ich neben dem Familienalltag Zeit zum Schreiben dieser Arbeit gefunden habe, verdanke ich meinem Ehemann Dr. Felix Prechtel. Er hat mich intensiv unterstützt und verständnisvoll begleitet, dafür danke ich von ganzem Herzen.

9 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: