

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologie I

Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hans-Christian Pape

**Charakterisierung von hERG-Kaliumkanalmutationen  
bei Patienten mit LQT2-Syndrom:  
Elektrophysiologische Untersuchungen  
im heterologen Expressionssystem**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Buhler, geb. Vogt, Katja

aus Lünen

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt

1. Berichterstatter: em. Univ.-Prof. Dr. med. Erwin-Josef Speckmann

2. Berichterstatter: Hdoz. Prof. Dr. med. Lars Eckardt

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Physiologie I  
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hans-Christian Pape  
Referent: em. Univ.-Prof. Dr. med. Erwin-Josef Speckmann  
Koreferent: Hdoz. Prof. Dr. med. Lars Eckardt

## ZUSAMMENFASSUNG

### Charakterisierung von hERG-Kaliumkanalmutationen bei Patienten mit LQT2-Syndrom: Elektrophysiologische Untersuchungen im heterologen Expressionssystem

Buhler, geb. Vogt, Katja

Das *human ether-à-go-go related gene* (hERG) kodiert für die poren-bildende  $\alpha$ -Untereinheit eines Kaliumkanals, der den Ionenstrom  $I_{Kr}$  des verzögerten Gleichrichters in Herzmuskelzellen mediiert. HERG-Mutationen können zum LQT2-Syndrom mit einem verlängerten QT-Intervall führen, das Arrhythmien bis hin zum Herzstillstand auslösen kann. Für diese Studie wurden die Mutationen T623I, G628S, K638Q, Y611X, Q688X und R1055Q elektrophysiologisch charakterisiert. Hierzu wurde deren cDNA transkribiert und die so gewonnene cRNA in *Xenopus laevis*-Oozyten injiziert, die als heterologes Expressionssystem dienen. Es wurden Stromamplituden sowie Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik gemessen und analysiert.

Die Expressionen des Wildtyps (WT) und aller Coexpressionen zeigten hERG-typische Membranströme. Bei den mutierten cRNA-Klonen konnten sie nicht nachgewiesen werden. Keine Coexpression führte zu einer vollständigen Hemmung des Gesamtstroms, deshalb scheint ein dominant-negativer Mechanismus auf molekularer Ebene ausgeschlossen. Bei T623I und Y611X zeigte sich mit 50% bezogen auf den Wildtyp ein rezessives Verhalten. Bei G628S, K638Q, Q688X und R1055Q zeigte sich mit Werten zwischen 70% und 100% eine gewisse Wiederherstellung der Kanalfunktionalität. Die Mutanten dieser Studie scheinen zum Teil in der Lage zu sein, mit den Untereinheiten des Wildtyps heterotetramere funktionelle Kanäle auszubilden.

Bei der Gleichgewichtsaktivierung der Coexpressionen zeigte nur Q688X eine Rechtsverschiebung ( $\Delta = 4,8$  mV). Bei der Inaktivierung zeigten sich Linksverschiebungen bei T623I ( $\Delta = 12,7$  mV), K638Q ( $\Delta = 11,3$  mV) und Y611X ( $\Delta = 34,3$  mV), was physiologisch zu einem verringerten Repolarisierungspotential führen würde. Zudem zeigte Q688X ( $\Delta = 10,7$  mV) zeigte Rechtsverschiebung. In der Ansprechbarkeit der Aktivierung/Inaktivierung traten keine Veränderungen auf.

Für den Gesamtstrom und die Gleichgewichtsaktivierung lässt sich kein direkter Zusammenhang zwischen Position und Art der Mutation einerseits und elektrophysiologischer Charakterisierung andererseits ableiten. Wie von anderen Autoren für Mutationen in der S6-Helix und dem C-Terminus beschrieben, zeigten auch die Mutationen dieser Studie Verschiebungen in der Inaktivierung, womit eine mögliche Struktur-Funktions-Beziehung besteht. Lediglich R1055Q zeigte keine Veränderung, womit sie als neutrale Mutation bzw. als Polymorphismus eingeordnet werden kann. Für weitergehende Aussagen über Struktur-Funktions-Korrelationen müssten zusätzliche Experimente auf molekularer Ebene, wie z.B. Protein-Immunoassays und Immunofluoreszenz-Mikroskopie, durchgeführt und mit weiteren elektrophysiologischen Messungen abgeglichen werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2008

Die Tierversuche wurden vom Regierungspräsidenten Münster genehmigt (AZ 23.0835.1.0 (G 32/97) vom 23.10.1997).

---

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Elektrophysiologie des Herzens und elektromechanische Kopplung.	1
1.2 Das Long QT-Syndrom .....	4
1.3 Struktur und Funktion von humanem ERG .....	6
1.4 Genese und Maturierung von Ionenkanalproteinen.....	12
1.5 Ziel der Arbeit .....	13
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1 Arbeitsablauf .....	14
2.2 Molekularbiologie.....	15
2.2.1 hERG-cDNA-Klone .....	15
2.2.2 Plasmid-Linearisierung .....	15
2.2.3 DNA-Extraktion .....	16
2.2.4 DNA-Gel und Dokumentation.....	16
2.2.5 Synthese von <i>in-vitro</i> cRNA .....	17
2.2.6 Denaturierendes RNA-Agarosegel.....	17
2.2.7 Fluorimetrische Quantifizierung von RNA .....	18
2.2.8 Verwendete Lösungen für die Molekularbiologie .....	19
2.3 Kultivierung von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	20
2.4 RNA-Injektion in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten .....	22
2.4.1 Herstellen der Injektionskapillaren .....	22
2.4.2 RNA-Injektion Oozyten mit Druckluft.....	22
2.5 Elektrophysiologie .....	23
2.5.1 Messung der Ionenströme mit der Voltage-Clamp-Methode.....	23
2.5.2 Aufbau des Oozytenmessstandes .....	25
2.5.3 Herstellung der Ableitelektroden.....	26

---

2.5.4	Experimentelle Durchführung der Versuche .....	28
2.5.5	Messprotokolle und Datenanalyse .....	28
2.5.6	Statistische Bewertung der Messdaten .....	35
2.5.7	Verwendete Lösungen für Elektrophysiologie .....	35
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Punktmutation T623I in der Porenregion .....</b>	<b>38</b>
3.1.1	Analyse der Ganzzellströme nach Hyperpolarisation (Abb. 3.1.1)	38
3.1.2	Vergleich der Ganzzellströme während Aktivierung und Inaktivierung (Abb. 3.1.2).....	40
3.1.3	Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften (Abb. 3.1.3) .....	42
<b>3.2</b>	<b>Punktmutation G628S in der Porenregion .....</b>	<b>45</b>
3.2.1	Analyse der Ganzzellströme nach Hyperpolarisation (Abb. 3.2.1)	45
3.2.2	Vergleich der Ganzzellströme während Aktivierung und Inaktivierung (Abb. 3.2.2).....	47
3.2.3	Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften (Abb. 3.2.3) .....	49
<b>3.3</b>	<b>Punktmutation K638Q in der Porenregion .....</b>	<b>52</b>
3.3.1	Analyse der Ganzzellströme nach Hyperpolarisation (Abb. 3.3.1)	52
3.3.2	Vergleich der Ganzzellströme während Aktivierung und Inaktivierung (Abb. 3.3.2).....	54
3.3.3	Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften (Abb. 3.3.3) .....	56
<b>3.4</b>	<b>Punktmutation R1055Q am C-Terminus .....</b>	<b>58</b>
3.4.1	Analyse der Ganzzellströme nach Hyperpolarisation (Abb. 3.4.1)	58
3.4.2	Vergleich der Ganzzellströme während Aktivierung und Inaktivierung (Abb. 3.4.2).....	61

---

3.4.3	Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften (Abb. 3.4.3).....	63
<b>3.5</b>	<b>Abbruchmutation Q688X in der Porenregion.....</b>	<b>66</b>
3.5.1	Analyse der Ganzzellströme nach Hyperpolarisation (Abb. 3.5.1)66	
3.5.2	Vergleich der Ganzzellströme während Aktivierung und Inaktivierung (Abb. 3.5.2).....	68
3.5.3	Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften (Abb. 3.5.3).....	70
<b>3.6</b>	<b>Abbruchmutation Y611X in der Porenregion.....</b>	<b>72</b>
3.6.1	Analyse der Ganzzellströme nach Hyperpolarisation (Abb. 3.6.1)72	
3.6.2	Vergleich der Ganzzellströme während Aktivierung und Inaktivierung (Abb. 3.6.2).....	74
3.6.3	Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften (Abb. 3.6.3).....	75
<b>3.7</b>	<b>Vergleichende Auswertung der Mutanten.....</b>	<b>77</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>82</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>91</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>93</b>
6.1	Literaturverzeichnis .....	93
6.2	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	99
6.3	Abkürzungsverzeichnis .....	101

## 1. Einleitung

Herzrhythmusstörungen haben einen Anteil von 10% an allen natürlichen Todesfällen. Dazu gehören auch plötzliche Herztodesfälle [71] ohne erkennbare strukturelle Abnormalitäten wie Herzklappenfehler oder zelluläre Veränderungen [11, 13, 102]. Die Ursachen hierzu werden in der Elektrophysiologie des Herzens gesucht. Besonders gravierend stellen sich die Long QT-Syndrome dar, denen Ionenkanalerkrankungen zugrunde liegen [14]. Um die wirksam werdenden Pathomechanismen herausstellen zu können, wird im Folgenden auf die Elektrophysiologie des Herzens und das Zustandekommen des kardiogenen Aktionspotentials eingegangen.

### 1.1 Elektrophysiologie des Herzens und elektromechanische Kopplung

Das Herz hat als muskuläres Hohlorgan die Aufgabe, durch den Wechsel von Kontraktion (Systole) und Erschlaffung (Diastole) der Vorhöfe und Kammern, den Blutstrom in den Gefäßen in Bewegung zu halten.

Die Grundelemente der Herzfunktion sind die Herzmuskelfasern. Hierbei wird zwischen dem Arbeitsmyokard für die mechanische Pumpleistung und dem Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem unterschieden. Die Muskelkontraktion beruht auf dem Aneinandervorbeigleiten (Filamentgleittheorie) der dicken Myosinfilamente an den dünnen Aktinfilamenten [34, 39]. Troponin und Tropomyosin (ebenfalls Bestandteile des dünnen Filamentes) dienen als Regulatorproteine im sog. Querbrückenzyklus [35, 40]. Die Kopplung zwischen elektrischer Erregung und mechanischer Kontraktion wird durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vermittelt: Die Erregung an der motorischen Endplatte führt zur Depolarisierung der Myozytenmembran und somit zur Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität. Calciumionen dringen über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ins Faserinnere ein. Das Aktionspotential setzt sich bis in die Transversalen Tubuli fort, wo es eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den Zisternen des Sarkoplasmatischen Retikulums hervorruft. Der Anstieg der zytosolischen Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelt die elektromechanische Kopplung [49].  $\text{Ca}^{2+}$  wird an Troponin gebunden, wodurch die Hemmwirkung des Tropomyosins auf die Interaktion zwischen Aktin- und

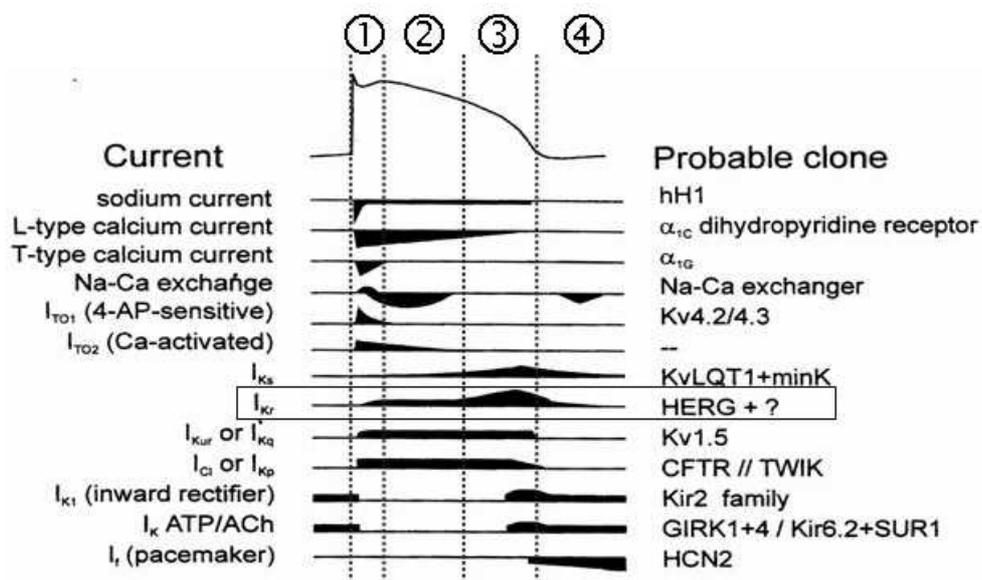
Myosinfilamenten aufgehoben wird. Solange die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $\geq 10^{-5}$  mol/l und die Konzentration des verfügbaren ATP 4 – 5 mmol/l beträgt, bleibt der Querbrückenzyklus stabil und aktiv und der Muskel kann sich kontrahieren. Im Unterschied zum Skelettmuskel ist am Myokard ein zusätzlicher transmembranaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom unverzichtbar. Dieser erfolgt entlang dem hohen chemischen Konzentrationsgefälle über die Zellmembran. Die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den terminalen Zisternen des Sarkoplasmatischen Retikulums spielt hier hingegen eine untergeordnete Rolle.

Die Herzmechanik wird induziert durch elektrische Erregungen des Myokards. Diese breitet sich ungehindert über das elektrische Synzytium des Myokards aus. Ein typisches Aktionspotential einer Zelle des Arbeitsmyokards ist in **Abb. 1.1** dargestellt.

Das Zustandekommen des kardiogenen Aktionspotentials (AP) wird durch die zeitlich fein abgestimmte Aktivierung von Ionenkanälen vermittelt [2, 12, 46]. Diese membranständigen Proteine regeln den transmembranen Fluss von Ionen, wobei Form und Dauer des AP durch die Verteilung von Einwärts- und Auswärtsströmen über die Membran bestimmt werden. Dieses Potential entsteht aufgrund der selektiven Permeabilität der Myozytenmembran für die einzelnen Ionenspezies und liegt im Ruhezustand bei ca. -90 mV.

Die initiale Depolarisation des Membranpotentials (Aufstrichphase) beruht wie an Nerv und Skelettmuskel auf einer erhöhten  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit. Dies führt zu einer Umpolarisation des Membranpotentials auf etwa +30 mV [89]. Charakteristisch für das Arbeitsmyokard ist die darauf folgende lange Plateauphase von ca. 200-400 ms [65], die auf einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom beruht. Dieser ist wesentlich für die elektromechanische Kopplung und somit für die mechanische Kontraktion des Arbeitsmyokards. Für die abschließende Repolarisation ist eine erhöhte  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit maßgeblich, die bei Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit gegen Ende des AP wirksam werden kann [2]. Nach Ablauf des AP ist die Herzmuskelzelle nicht sofort wieder erregbar. Sie ist refraktär. Dies schützt den Herzmuskel vor einer Dauerkontraktion und vor kreisenden Erregungen.

Bei der Depolarisation erhöht sich initial schlagartig die Permeabilität der Zellmembran für  $\text{Na}^+$ -Ionen. Dem Konzentrationsgefälle folgend strömen die  $\text{Na}^+$ -Ionen von außen in die Zelle ein. Diese erhöhte  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit ist für die rasche Depolarisation (Phase 0, Aufstrich) verantwortlich. Mit zunehmender Depolarisation stellt sich bezüglich der  $\text{Na}^+$ -Ionen schnell ein neues Gleichgewicht ein. Der  $\text{Na}^+$ -Einstrom verlangsamt sich (Phase 1). Durch diese Inaktivierung des schnellen  $\text{Na}^+$ -Systems würden sich die Potentialverhältnisse durch Repolarisation rasch wieder in Richtung Ruhemembranpotential verschieben.



**Abb. 1.1:** Ionenströme im AP und AP des Kammermyokards [72]. Aufgrund einer intrinsischen Inaktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle wird das Membranpotential in den Aktivierungsbereich der  $\text{K}^+$ -Kanäle verschoben. Hier wird  $I_{Kr}$  in Phase 3 entscheidend (dritte Reihe von unten). HERG entspricht  $\text{K}_v\text{LQT2}$ , es ist noch nicht genau bekannt, mit welchen  $\beta$ -Untereinheiten er agiert.

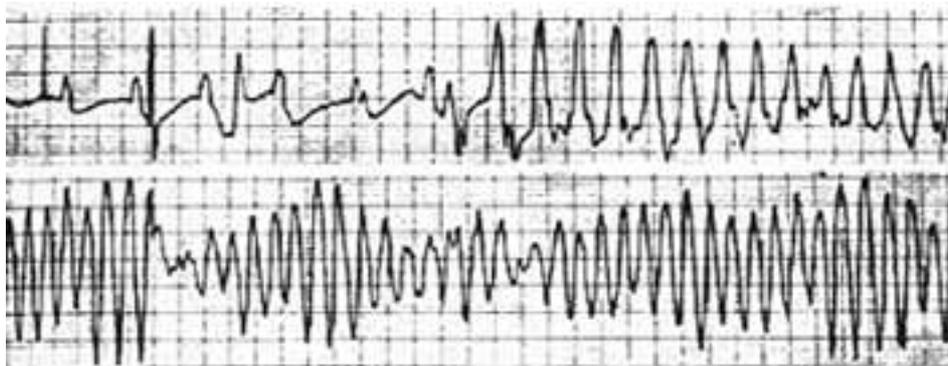
Jedoch folgt dem initialen schnellen  $\text{Na}^+$ -Einstrom als Besonderheit der Kardiomyozyten ein ebenfalls depolarisierender langsamer Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ins Cytosol [5, 31]. Dieser zeichnet verantwortlich für die Plateau-Phase (Phase 2). Die Repolarisation beruht auf einer Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit mit einer Verlangsamung des Einstroms positiv geladener  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und einem Wiederansteigen der  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit. Es kommt zu einem verstärkten Auswärtsstrom von  $\text{K}^+$ -Ionen [2, 12] entlang des Konzentrationsgradienten (Phase 3). Neben dem Natriumeinwärtsstrom in der Depolarisationsphase sind

für diese Arbeit vor allem die Ionenströme von großem Interesse, die während der Plateau- und Repolarisationsphase des AP fließen.

Mutationen in Genen, die für diese Kanäle kodieren, sind als Ursache von kongenitalen Störungen der myokardialen Erregungsausbreitung und –rückbildung, die zu Herzrhythmusstörungen führen, anzusehen [8, 36, 83]. Darunter nimmt das Long QT-Syndrom aufgrund seiner gravierenden klinischen Symptomatik eine herausragende Stellung ein.

## 1.2 Das Long QT-Syndrom

Die Beobachtung von Fällen plötzlichen Herztodes ohne strukturelle Abnormalitäten [51, 102, 106] führte zur Suche nach primär elektrischen Mechanismen als Ursache. Viele Patienten erleiden rezidivierende Synkopen (plötzlicher Bewusstseinsverlust), üblicherweise im Schlaf, aber auch bei Anstrengung und emotionaler Aufregung [86]. In der Literatur sind Fälle von Patienten beschrieben worden, bei denen Synkopen am Nachmittag ausgelöst wurden durch einen auditiven Auslöser (Trigger, auditiver Stress) am frühen Morgen [86]. Die mechanische Herzfunktion ist normal, die Histologie unauffällig [11, 13].



**Abb. 1.2:** EKG mit Rhythmusstörungen, Torsade de pointes [62].

Ein Drittel der Patienten hat keine Symptome. In der Literatur wurden mehrere Krankheiten beschrieben, die auf Fehlfunktionen von Ionenkanälen beruhen. Über humangenetische Methoden wurden Gene auf chromosomaler Ebene identifiziert und isoliert, die für die entsprechenden Ionenkanäle kodieren. Aus dieser Gruppe heraus wird das Long QT-Syndrom (LQTS) als besonders

schwerwiegend angesehen und deshalb in den vergangenen Jahren zunehmend untersucht [72]. Das LQTS äußert sich im Elektrokardiogramm durch eine Verlängerung des QT-Intervalls [98], klinisch durch Tachykardie oder bei älteren Menschen auch Bradykardie, Extrasystolen, frühe Nachdepolarisierungen (*early afterdepolarizations*, EAD), Kammerflimmern und die sogenannte *Torsade de pointes* (**Abb. 1.2**).

Kennzeichen für diesen Typ der Arrhythmie ist ein Drehen des QRS-Komplexes um die isoelektrische Achse des EKG.

Dem LQTS zugrunde liegen Mutationen in den Aminosäuresequenzen (vergleiche **Tab 1.1**) der entsprechenden Kanalproteine [14]. Für diese Arbeit wurde der hERG-Kanal (KCNH2) untersucht. Sein molekulares Korrelat ist der einwärtsrektifizierende  $I_{Kr}$  in den Kardiomyozyten [76, 96].

**Tab. 1.1:** Molekulare Grundlagen des Long QT-Syndroms [36].

Gene und Genotyp-spezifische Befunde. aut.-dom., autosomal-dominant; aut.-rez., autosomal-rezessiv; JLN, Jervell & Lange-Nielsen-Syndrom.

	Chromosom	Erbgang	Gen	Änderung des Ionenflusses	Häufigkeit	Auslöser
LQT1	11p15.5	Aut.-dom.	KCNQ1 (KVLQT1)	↓ $I_{Ks}$	40-50%	Aufregung, physisch und psychisch
LQT2	7q35-q36	Aut.-dom.	KCNH2 (hERG)	↓ $I_{Kr}$	20-30%	auditorischer Stress
LQT3	3q21-p24	Aut.-dom.	SCN5A	↑ $I_{Na}$	10%	Ruhe, Schlaf
LQT4	4q25-q27	Aut.-dom.	ankyrin B	$I_{Ca}$	Selten	
LQT5	21q22.1	Aut.-dom	KCNE1 (minK)	↓ $I_{Ks}$	Selten	
LQT6	21q22.1	Aut.-dom.	KCNE2 (MIRP1)	↓ $I_{Kr}$	Selten	
LQT7	?	Aut.-dom.	KCNJ2	↓ $I_{Kir2.1}$	Selten	
LQTn	?	?	?	?		
JLN1	11p15.5	Aut.-rez.	KCNQ1 (KVLQT1)	↓ ↓ $I_{Ks}$	Selten	
JLN2	21q22.1	Aut.-rez.	KCNE1	↓ ↓ $I_{Ks}$	Selten	

Das LQTS ist eine genetisch heterogene Erkrankung. Am häufigsten finden sich Mutationen von KCNQ1 (40-50%) und hERG / KCNH2 (20-30%). Zentrale Fragestellung derzeit laufender klinischer Studien bei Patienten mit LQTS ist, inwieweit sich, in Abhängigkeit vom zugrunde liegenden genetischen Defekt, Unterschiede in der klinischen Manifestation der Erkrankung ergeben (Genotyp-Phänotyp-Beziehung). Patienten mit einem LQT1S scheinen nahezu ausschließlich unter erhöhter sympathischer Stimulation (physische oder psychische Belastung) Synkopen zu entwickeln; bei Patienten mit einem LQT3S treten die Ereignisse bevorzugt in Ruhe, bei LQT2S-Patienten sowohl in Ruhe als auch unter Belastung auf [85].

Bei der vererbaren Form der LQTS kommen vor allem das Romano-Ward-Syndrom (RWS) und das Jervell & Lange-Nielsen-Syndrom (JLNS) vor. Das RWS [73, 99] hat einen autosomal dominanten Erbgang, das JLNS [43] einen autosomal rezessiven Erbgang. Beim LQT1S kommen beide Formen vor, beim LQT2S nur das RWS in verschiedener Ausprägung, je nach Penetranz. Die Prävalenz bei der kongenitalen Form wird in der Literatur mit 1:7000 bis 1:10000 angegeben [36, 83]. Die erworbene Form wird meist durch die Einnahme von Medikamenten offenbart [10, 61], wie z.B. Klasse III-Antiarrhythmika, Antidiabetika, Antihistaminika, Neuroleptika, trizyklische Antidepressiva sowie durch Betäubungsmittel [18, 92, 94].

### 1.3 Struktur und Funktion von humanem ERG

Kaliumkanäle stellen eine komplexe Großfamilie integraler Membranproteine dar, die je nach Zahl der Transmembrandomänen (TM) und der Porenregion (P) in verschiedene Strukturklassen unterteilt werden. Es werden unterschieden: Kanäle mit der Struktur 2TM-1P, 4TM-2P, 6TM-1P (**Abb. 1.3**) und 6TM-2P [91].

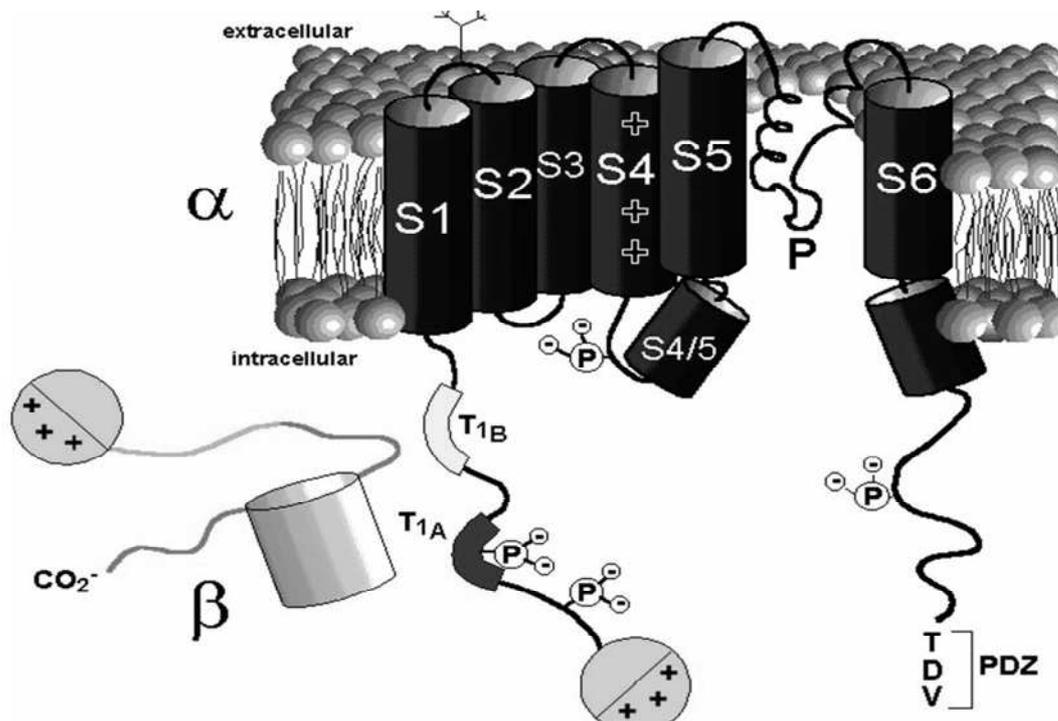
Die *eag*-Familie (*ether-à-go-go*) ist im Rahmen eines Experimentes 1987 mit der Taufliede *Drosophila melanogaster* entdeckt worden, als unter Äthernarkose die Gliedmaßen der Fliege plötzlich zuckten [100], was auf einem Überschuss an Neurotransmitter an neuromuskulären Endplatten beruht, der auf eine verzögerte Repolarisation des AP durch einen Defekt eines Kaliumkanals zurückzuführen ist. Klonierung des Gens und dessen anschließende, funktionelle

Expression führten zum Nachweis eines spannungsabhängigen Kaliumkanals [101]. Durch die Klonierung weiterer, verwandter Kaliumkanalgene ergab sich eine Aufteilung der Familie der *eag*-Kaliumkanäle in drei Gensubfamilien: *eag*, *erg* (*eag-related gene*) und *elk* (*eag-like*) [4]. Die ersten geklonten Säuger-Kanäle waren Maus-EAG-1 und hERG (humanes ERG). HERG kodiert für die porenformende  $\alpha$ -Untereinheit der schnellen Komponente des *delayed rectifier*  $I_{Kr}$  in Kardiomyozyten [76]. Die Aufgabe dieses Kanals besteht darin, Extrasystolen am Ende der Repolarisation abzufangen.

HERG gehört zu einer Untergruppe von spannungsgesteuerten  $K^+$ -Kanälen ( $K_v$ ). Er besteht wie der typische *shaker*-Kanal [20] aus vier  $\alpha$ -Untereinheiten mit jeweils sechs Transmembransegmenten (S1 – S6), einem zytoplasmatischen C- und einem zytoplasmatischen N-Terminus. Zwischen S5 und S6 befindet sich der P-Loop, auch H5-Domäne genannt [57, 69], die in die Membran hineinragt, sie aber nicht durchspannt. Vier H5-Domänen, eine aus jeder  $\alpha$ -Untereinheit, bilden die Pore aus. S4 ist der Spannungssensor, der eine regelmäßige Abfolge positiv geladener (hydrophober) Aminosäuren (4-7x R/KXX) aufweist [54, 70]. Eine Neutralisierung dieser Ladungen verändert die Spannungsabhängigkeit der Kanalöffnung [103]. Es werden nach wie vor verschiedene Aktivierungsmodelle wie das *paddle-model* [44] und das *original helical screw model* [19] diskutiert. Fest steht, dass eine Depolarisierung zu einer Positionsveränderung von S4 führt, wahrscheinlich durch eine Rotation [6]. Die so erzeugte Konformationsänderung ermöglicht die Öffnung des Kanals.

Zur Ausbildung aktiver Kanäle lagern sich vier  $K_v\alpha$ -Untereinheiten zu tetrameren Komplexen [56] zusammen (vermittelt durch Tetramerisierungsdomänen, **Abb. 1.3**), die dann zur Zellmembran transportiert werden. Neben homotetrameren Kanälen aus vier gleichen Untereinheiten können sich auch heterotetramere Kanäle aus verschiedenen Untereinheiten zusammenlagern [66]. Die  $\alpha$ -Untereinheiten ordnen sich symmetrisch an und bilden so die zentrale Pore aus. Die Pore (P) ist ein für Alkalimetallionen permeabler Bereich, der eine deutlich höhere Selektivität für Kaliumionen gegenüber den kleineren Natriumionen aufweist [16]. Die Selektivität wird durch eine in allen Kaliumkanälen

konservierte so genannte Signatursequenz [70] vermittelt, die innerhalb der P-Region liegt. Die Kristallstrukturen in verschiedenen ionischen Lösungen zeigen, dass der Selektivitätsfilter zwei verschiedene Konformationen einnehmen kann: leitend und nicht-leitend.



**Abb. 1.3:** Schematische Darstellung der Topologie einer *shaker*-Typ-Kaliumkanaluntereinheit [70].

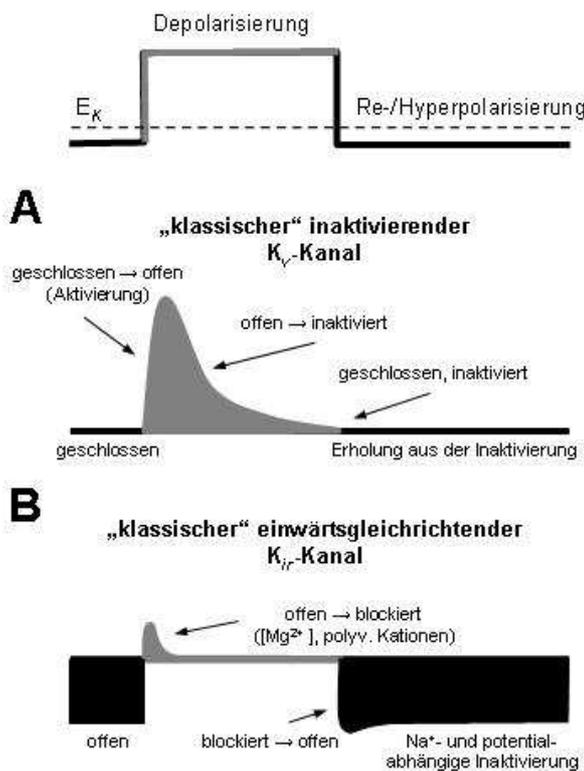
Vier Untereinheiten bilden den funktionellen Kaliumkanal. Gezeigt wird eine  $\alpha$ -Untereinheit mit ihren sechs Transmembransegmenten (S1-S6), dem Spannungssensor S4 mit seinen positiven Ladungen, der Porenregion (P), dem intrazellulären N-Terminus mit den Tetramerisierungsdomänen T1A und T1B und dem Ballmodell am Ende, bei dem man vermutet, dass er in die Pore hineinschwingt und diese dadurch verstopft. Desweiteren der C-Terminus mit der PDZ-Domäne am Ende und eine assoziierende  $\beta$ -Untereinheit, die ebenfalls eine Art Ball bildet, die in die Pore hineinschwingen kann. Der innere Poreneingang wird wahrscheinlich von Aminosäuren des S4-S5-Loops unter Beteiligung von Aminosäuren am C-Terminus des S6-Segementes gebildet.

Die Ionenbindungsstellen im leitenden Zustand sind nicht kompatibel mit dem kleineren Radius von  $\text{Na}^+$ -Ionen ( $0,95 \text{ \AA}$ ), nur  $\text{K}^+$  ( $1,33 \text{ \AA}$ ) passt [53, 57, 58, 97]. Der innere Poreneingang wird wahrscheinlich von Aminosäuren des S4-S5-Loops unter Beteiligung von Aminosäuren am C-Terminus des S6-Segementes gebildet [87]. Eine Erhöhung der Diversität wird durch die Interaktion der

porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheiten mit akzessorischen  $\beta$ -Untereinheiten wie MiRP1 und minK erreicht, die wesentlichen Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften des induzierten Stroms nehmen können [1, 41, 60]. Die  $\beta$ -Untereinheiten sind zytoplasmatische, an die  $\alpha$ -Untereinheit assoziierte Proteine [21]. Für die Sekundärstruktur lagern sich acht  $\beta$ -Faltblattstrukturen parallel an, denen je eine  $\alpha$ -Helix folgt. Dadurch bildet sich eine Faserstruktur aus (sog. TIM-Triosephosphatisomerase-Barrel). Die  $\beta$ -Untereinheiten interagieren über eine konservierte C-terminale Domäne mit einem Teilbereich des N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheiten. Der Mechanismus der Interaktion ist bislang ungeklärt.

Bei den spannungsgesteuerten Ionenkanälen ist die Offenwahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) der Kanäle abhängig vom Potential und dem Inaktivierungsmechanismus. Es existieren zwei Mechanismen, die, je nach der Beteiligung des N-Terminus oder eines mehr am C-Terminus gelegenen Bereichs des Kanalproteins als N- oder C-Typ-Inaktivierung bezeichnet werden. Für die N-Typ-Inaktivierung wurde ein Ball-Kette-Mechanismus [7] beschrieben, bei der eine Inaktivierungsdomäne in die Pore hineinschwingt und diese verschließt [38, 74]. Bei der C-Typ-Inaktivierung, die meist langsamer erfolgt als die N-Typ-Inaktivierung, führt eine Änderung der Porenkonformation an der extrazellulären Seite zu einem Schließen des Kanals. Für hERG ist noch nicht genau geklärt, welcher Inaktivierungstyp vorliegt. Es konnte nachgewiesen werden, dass es nicht die N-Typ-Inaktivierung ist. Versuche, in denen das N-terminale Ende gekappt wurde, zeigten in der Folge kein Fehlen von Inaktivierungsmechanismen [81]. Vereinzelte Änderungen in der Porenregion jedoch konnten die Inaktivierung aufheben, was dafür spricht, dass hERG eine C-Typ-Inaktivierung zugrunde liegt. Die biophysikalischen Eigenschaften des hERG-Kanalproteins weisen eine sehr hohe Übereinstimmung mit denen der schnell aktivierenden Komponente des repolarisierenden Kaliumstromes der AP-Plateauphase,  $I_{Kr}$ , auf. Mutationen im hERG reduzieren den  $I_{Kr}$ -Strom und resultieren so in einer Verlängerung des kardialen Aktionspotentials und der ventrikulären Repolarisation sowie einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Extrasystolen.

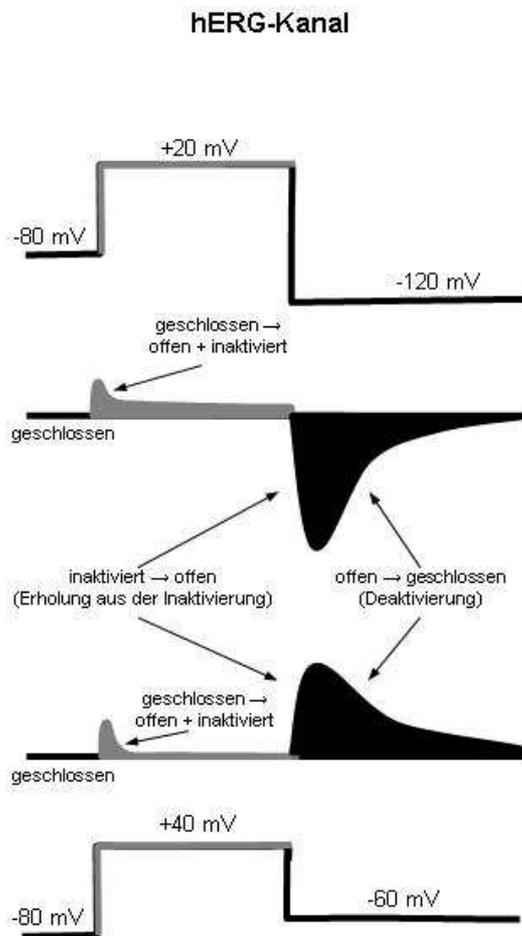
Der Mechanismus der Einwärtsrektifizierung ist unter *voltage clamp*-Bedingungen mit dem besonderen Schaltverhalten des hERG-Kanals zu erklären (vergleiche **Abb. 1.4** mit **Abb. 1.5**): Die Inaktivierung erfolgt schneller als die Aktivierung und die Erholung aus der Inaktivierung ist schneller als die Deaktivierung [88, 93, 95].



**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung des Schaltverhaltens eines klassischen  $K_v$ -Kanals mit N-Typ-Inaktivierung (**A**) und eines klassischen Einwärtsgleichrichters (**B**) [78].

**A** Bei Membranpotentialen negativ vom Nernstpotential für Kalium ( $E_K$ ) liegt der Kanal unter physiologischen Bedingungen in einem geschlossenen Zustand vor. Bei Depolarisierung öffnet er transient, geht aus dem offenen, aktivierten Zustand in den geschlossenen inaktivierten Zustand über. In der Repolarisierung erholt sich der Kanal aus der Inaktivierung und geht über in den aktivierbaren, geschlossenen Zustand. **B** Bei Membranpotentialen negativ von  $E_K$  leitet der einwärtsgerichtete Kaliumkanal Membranströme in Einwärtsrichtung. Bei Depolarisierung auf Potentiale positiv von  $E_K$  treten nur sehr kleine Auswärtsströme auf, da der Kanal durch intrazelluläres  $Mg^{2+}$  und polyvalente Kationen blockiert wird. Durch Repolarisierung wird die Blockierung aufgehoben und der Kanal geht wieder über in einen einwärtsleitenden offenen Zustand.

Aufgrund dieser Eigenschaften wird durch eine Depolarisierung auf Potentiale positiv zum Umkehrpotential für Kalium ( $E_K$ ) nur ein kleiner Auswärtsstrom erhalten, da die Kanäle, sobald sie aktiviert wurden, sofort wegen der schnellen Inaktivierung wieder schließen. Durch die schnelle Erholung aus der Inaktivierung und die daran anschließende langsame Deaktivierung wird durch eine Repolarisierung positiv vom  $E_K$  ein transienter Auswärtsstrom und negativ vom  $E_K$  ein großer, transienter Einwärtsstrom ausgelöst [90]. Dieser transiente Auswärtsstrom des hERG-Kanals hat für die Repolarisierung des Herzaktionspotentials eine große Bedeutung: Dort ist er als schnell aktivierender Kaliumstrom ( $I_{Kr}$ ) an der Repolarisation beteiligt [76].



**Abb. 1.5:** Schaltverhalten des hERG-Kanals [78].

Bei Membranpotentialen negativ von  $-60$  mV liegt der hERG-Kanal in einem geschlossenen, deaktivierten Zustand vor. Depolarisierung auf Potentiale positiv von  $E_K$  lässt nur sehr kleine Auswärtsströme zu (schnellere Inaktivierung als Aktivierung). Eine Hyperpolarisierung negativ zum  $E_K$  bewirkt eine Erholung aus der Inaktivierung und leitet Membranströme in Einwärtsrichtung, die infolge der eintretenden Deaktivierung kleiner werden bis der Kanal schließt. Durch eine Repolarisierung im Anschluss an die Depolarisierung auf Potentiale positiv zum  $E_K$  wird durch die gleichen Mechanismen ein transienter Auswärtsstrom registriert.

Die Funktion der Ionenkanäle ist mittlerweile recht gut charakterisiert. Hierzu beigetragen hat die Möglichkeit die klonierten Kanäle in heterologen Expressionssystemen zu untersuchen. Ein solches heterologes Expressionssystem ist z.B. die Oozyte des Südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* [59]. Alternativ kommen humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) oder auch Eizellen des chinesischen Hamsters (CHO) in Frage. Injiziert man mRNA, die für einen Ionenkanal kodiert, in die Eizelle, so wird die hierin verborgene genetische Information auf den Ribosomen der Eizelle abgelesen. Die oozyten-eigenen Organellen produzieren das Kanalprotein, das nachfolgend in die Zellmembran der Oozyte eingebaut wird. Mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode (*two electrode voltage clamp*-Technik, TEVC) lassen sich die resultierenden Ionenströme untersuchen. Die eigenen Ionenströme der Oozyte sind in diesem Entwicklungsstadium so gering, dass sie im Vergleich zu

den Strömen, die von den klonierten Kanälen produziert werden, vernachlässigt werden können. Der mutierte Kanal wird im heterologen Expressionssystem exprimiert und die resultierenden Ionenströme mit denen des unmutierten Kanals (Wildtyp, WT) verglichen.

#### 1.4 Genese und Maturierung von Ionenkanalproteinen

Bei der Proteinbiosynthese werden die Untereinheiten per Translation (Initiation, Elongation, Termination) an den Ribosomen gebildet, womit sie jedoch noch keine funktionsfähigen Proteine darstellen. Hierzu muss die neu entstandene Aminosäurekette noch ihre für sie spezifische Konformation einnehmen. Diese Faltung wird durch spezifische Enzyme (Proteindisulfidisomerase, Prolyl-Cis-Trans-Isomerasen) sowie durch molekulare Chaperone erleichtert und beschleunigt [29]. Nach einer posttranslationalen Modifikation (z.B. Glycolisierung, Anheftung von Lipidankern und Proteolyse) entscheiden sogenannte Signalpeptidsequenzen, die meist N-terminal gelegen sind, über die Adressierung der Proteine [27]. Dieser Prozess, die Verteilung der neu synthetisierten Proteine auf die entsprechenden Zellkompartimente, wird im Englischen *trafficking* genannt und umfasst folgende Schritte: Das Protein wird in das Endoplasmatische Retikulum (ER, 1.) eingefädelt, danach wird die Signalsequenz durch sogenannte Signalpeptidase abgetrennt und das Protein kann, korrekte Faltung und Abtrennung der Glucosereste vorausgesetzt, entsprechend weiterer Strukturmerkmale durch vesikulären Transport in den Golgi-Apparat befördert werden. Transmembranproteine wie der hERG-Kanal bleiben mit ihrer Transmembranhelix in der Membran des rauen Endoplasmatischen Retikulums (rER, 2.) stecken, gelangen dann aber auch von dort über Vesikeltransport erst an den Cis- (3.), dann an den Trans-Golgi-Apparat (4.). Im Golgi-Apparat werden weitere Modifizierungen vorgenommen wie z.B. Phosphorylierungen und Anheftung oder Abspaltung von Zuckerresten. Durch Exozytose wird das Protein mittels Vesikeltransport (5.) an seine Bestimmungsstelle, die Zellmembran (6.) transportiert, und es kommt zur Fusion.

Zusammenfassend gehören zur Proteinbiosynthese ergo die Synthese von ungefalteten Peptidketten, deren Maturierung, welche verschiedene Modifizie-

rungen und die korrekte Faltung des Proteins umfasst, sowie das *trafficking* mit dem Erreichen der Zellmembran als Zieladresse.

### 1.5 Ziel der Arbeit

Aufgabe dieser Arbeit ist es, aus den zur Verfügung gestellten cDNA-Klonen die zur heterologen Expression nötige cRNA zu generieren. Nach der funktionellen Expression der Ionenkanäle sollen die elektrophysiologische Charakterisierung und Analyse der Daten erfolgen zwecks Beschreibung einer Beziehung Struktur-Funktion.

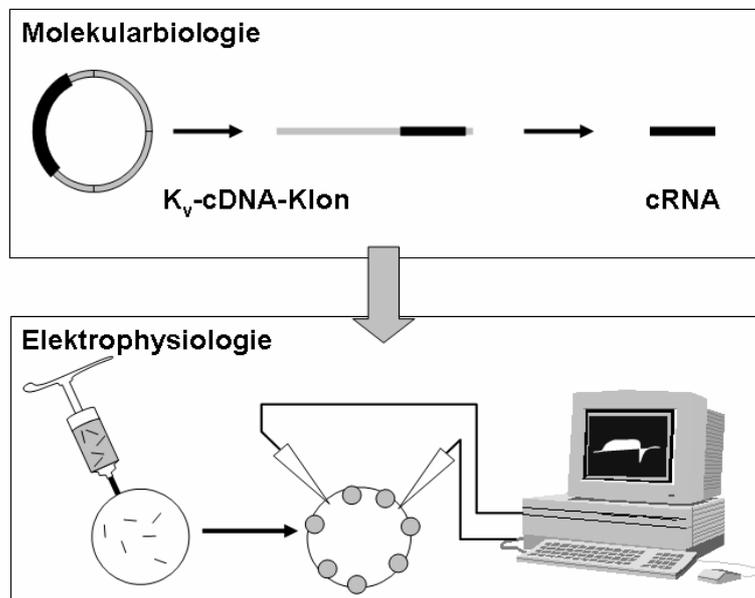
Hinter jeder Mutation verbirgt sich ein Patient mit klinisch diagnostiziertem LQT2-Syndrom. Hier soll nun geklärt werden, ob die entsprechende Mutation die Ströme des hERG-Kanals am Herzen völlig hemmt (dominant-negativer Effekt), ob ein eher rezessives Verhalten vorliegt oder ob sie keinen nennenswerten Einfluss auf den Gesamtstrom hat. Man weiß aus der Literatur heraus, dass bei einem Patienten mit einem LQT-Syndrom sowohl gesunde als auch mutierte Ionenkanäle nebeneinander vorkommen [42, 77]. Dadurch wirkt sich dieses Syndrom auch unterschiedlich stark aus. Elektrophysiologisch können hERG-charakteristische Ströme normalen Ausmaßes gemessen werden, hERG-charakteristische Ströme geringeren Ausmaßes, atypische Ströme oder keine Ströme (nur endogene Ströme). Dies, sowie das Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten der hERG-Kanäle, soll für die in dieser Studie untersuchten Mutationen graphisch dargestellt und analysiert werden.

Schließlich ist es das Ziel dieser Arbeit, basierend auf den humangenetischen Grundlagen der Literatur sowie den heterologen (elektrophysiologischen) Daten dieser Studie, eine Aussage über eine mögliche Struktur-Funktions-Beziehungen sowie Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu treffen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Arbeitsablauf

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Projekts SFB 556 in Zusammenarbeit mit der Molekularen Kardiologie des Universitäts-Klinikums Münster, Prof. Dr. E. Schulze-Bahr durchgeführt. Patienten mit klinisch diagnostiziertem LQT2-Syndrom wurde eine Blutprobe entnommen, DNA isoliert und mittels human-genetischer und molekularbiologischer Methoden mögliche Mutationen in Ionenkanalgenen dargestellt.



**Abb. 2.1:** Durchgeführte Arbeiten des Forschungsprojektes im Rahmen des SFB 556 am Universitäts-Klinikum Münster.

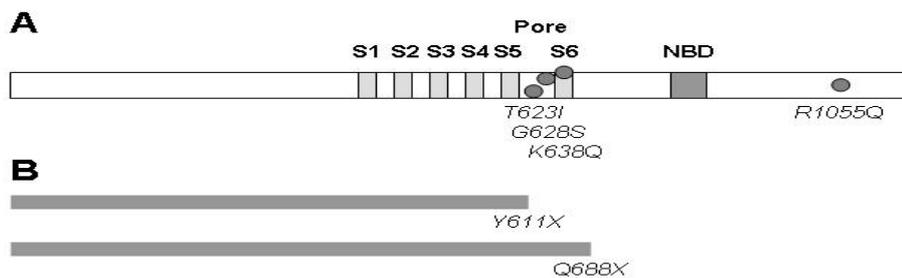
Die Plasmid-DNA wurde linearisiert, extrahiert und daraus *in-vitro* cRNA synthetisiert (Molekularbiologie). Von den vorbereiteten RNA-Proben wurden jeweils 50 nl (2,5 ng/ $\mu$ l) in eine Oozyte injiziert. Die Zellorganellen der Oozyte begannen mit der Proteinbiosynthese und mittels Voltage-Clamp-Technik konnten Ionenströme der hERG-Mutanten gemessen und am Computer analysiert werden (Elektrophysiologie).

Diese Klone wurden von Boris Skryabin freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Daraufhin wurden die in dieser Studie zu untersuchenden Mutationen auf cDNA-Ebene mittels PCR generiert. Die DNA wurde im Chemischen Labor des Instituts für Physiologie I auf RNA transkribiert (siehe Kap. 2.2.5), und stand so für die weiteren elektrophysiologischen Experimente zur Verfügung.

## 2.2 Molekularbiologie

### 2.2.1 hERG-cDNA-Klone

Die Klone wurden freundlicherweise von Boris Skryabin überlassen. Die Mutationen wurden unter Standard-PCR-Bedingungen erzeugt (Expend High Fidelity PCR System der Firma Roche).



**Abb. 2.2:** Schema der Lokalisation der Klone, Klassifizierung der Mutationen. **A** Darstellung einer  $\alpha$ -Untereinheit mit Lokalisation der Punktmutationen T623I, G628S, K638Q und R1055Q. S1 bis S6: Transmembransegmente; Pore; NBD: Nukleotidbindungsdomäne. **B** Abbruchmutationen Y611X und Q688X.

### 2.2.2 Plasmid-Linearisierung

Für die spätere *in-vitro* Transkription wurde zunächst die Plasmid-DNA linearisiert. Die Polymerasebindungsstelle SP6 und die Promoterregion pSP64 wurden aus dem Kit SP6 (mMessage mMachin *in-vitro* Transkriptionssystem, Ambion) entnommen. Es wurden 2,5  $\mu$ L (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) des Plasmids mit 10-fach Enzympuffer und 1  $\mu$ L Restriktionsenzym (10 u/ $\mu$ L) in 100  $\mu$ L Reaktionsvolumen ( $H_2O$ ) versetzt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Zur Überprüfung der Linearisierung wurde ein 5  $\mu$ L Aliquot auf einem Agarosegel analysiert (siehe 2.2.4).

Restriktionsansatz			
2,5	$\mu$ L	DNA	(1 $\mu$ g/ $\mu$ L)
10,0	$\mu$ L	Enzympuffer	(10x)
1,0	$\mu$ L	Restriktionsenzym	(10 u/ $\mu$ l)
86,5	$\mu$ L	$H_2O$	
100,0	$\mu$ L	Ansatzvolumen	

### 2.2.3 DNA-Extraktion

Zur Proteinfällung im Linearisierungsansatz wurden die Proteine mit 100  $\mu\text{L}$  Phenol gefällt. Der wässrige Überstand wurde nach rigorosem Durchmischen und anschließender Phasentrennung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der DNA wurden 300  $\mu\text{L}$  Ethanol und 30  $\mu\text{L}$  Natriumacetat (3 M) zugegeben und für 30 min bei  $-70^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (15.300 rpm,  $4^\circ\text{C}$ , 20 min) und Waschen mit 500  $\mu\text{L}$  70%igem Ethanol wurde das DNA-Pellet an der Luft getrocknet und in 6,5  $\mu\text{L}$  RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Nach fünf Minuten Lösungszeit wurde ein 0,5  $\mu\text{L}$  Aliquot zur Überprüfung in einem Agarosegel analysiert (siehe 2.2.4).

### 2.2.4 DNA-Gel und Dokumentation

Die elektrophoretische Auftrennung der linearisierten und extrahierten DNA erfolgte jeweils in einem horizontalen 0,75%igen Agarosegel (35 mL) in TAE-Puffer mit 20  $\mu\text{L}$  Ethidiumbromid (10 mg/ $\mu\text{L}$ ) als Nachweisreagenz. Für die optimale Auftrennung der DNA, die je nach Klon ca. 5 - 7,5 kb lang war, wurde eine Agarose-Konzentration von 0,75% gewählt. Der Kalibrierstandard ( $\lambda$ -Phagen-DNA, geschnitten mit BstEII) war eine freundliche Spende von Dr. Boris Skryabin, UK Münster.

Ansätze						
	DNA aus 2.2.2		DNA aus 2.2.3		Standard	
DNA	5,0	$\mu\text{L}$	0,5	$\mu\text{L}$		
6x Beladungspuffer	2,0	$\mu\text{L}$	2,0	$\mu\text{L}$	2,0	$\mu\text{L}$
$\text{H}_2\text{O}$			4,5	$\mu\text{L}$		
Standard					5,0	$\mu\text{L}$
Ansatzvolumen:	7,0	$\mu\text{L}$	7,0	$\mu\text{L}$	7,0	$\mu\text{L}$

Die Ansätze wurden gut durchgemischt, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgte über 90 min bei 50 mV. Die Dokumentation der Gele erfolgte auf einem UV-Tisch (Biometra TI 3) bei  $\lambda = 254 \text{ nm}$  mit dem dazugehörigen Video-Kamera-System und der Software BioDocAnalyse (Biometra).

### 2.2.5 Synthese von *in-vitro* cRNA

Es wurde das *mMessage mMachine* in-vitro-Transkriptionssystem (Ambion) verwendet. In einem Reaktionsvolumen von 20  $\mu\text{L}$  wurde die aufgereinigte, linearisierte DNA (6  $\mu\text{L}$ , 1-2  $\mu\text{g}$ ) mit 2  $\mu\text{L}$  10-fach Enzym Mix, 2  $\mu\text{L}$  10-fach Transkriptionspuffer und 10  $\mu\text{L}$  2-fach Ribonucleotide-Mix für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Zum Abbau der Matrizen-DNA wurde 1  $\mu\text{L}$  DNase hinzugegeben, 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend 80  $\mu\text{L}$  DEPC -H<sub>2</sub>O zugefügt. Für die Fällung der RNA wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurden die Proteine mit 100  $\mu\text{l}$  Phenol gefällt. Der wässrige Überstand wurde nach Durchmischen und Phasentrennung abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann erfolgte eine zweite Proteinfällung mittels 100  $\mu\text{l}$  Chloroform. Wieder wurde der Überstand in ein neues Gefäß aufgenommen. Zur Präzipitation der RNA wurden 330  $\mu\text{l}$  Ethanol und 10  $\mu\text{l}$  Natriumacetat hinzugegeben und über eine Stunde bei -70°C inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (15.300 rpm, 4°C, 20 min) wurde der Überstand abgenommen und mit 500  $\mu\text{l}$  70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem erneuten Zentrifugieren (15.300 rpm, 4°C, 5 min) wurde der Überstand abgenommen, das RNA-Pellet getrocknet und in 20  $\mu\text{l}$  RNase-freies H<sub>2</sub>O aufgenommen. Davon wurden je 1  $\mu\text{L}$  für ein RNA-Agarosegel (siehe 2.2.6) und 1  $\mu\text{L}$  für eine Ribo-Green-Bestimmung (siehe 2.2.7) abgenommen.

### 2.2.6 Denaturierendes RNA-Agarosegel

Zur Analyse der RNA wurde ein 1  $\mu\text{L}$  Aliquot mit 19,4  $\mu\text{L}$  Premixpuffer (s.u.) und 4  $\mu\text{L}$  RNase-freiem H<sub>2</sub>O versetzt und für 10 min bei 60°C denaturiert, dann auf Eis abgekühlt. Zur Probe wurden noch 5  $\mu\text{l}$  Beladungspuffer (*mMessage mMachine-Kit*) hinzugegeben. Als Marker wurden 2  $\mu\text{l}$  einer Mausleber-RNA-Präparation (~0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wie die Probe behandelt und auf das Gel aufgetragen. Der Marker war eine freundliche Spende von Dr. D. Isbrandt (ZMNH Hamburg, UKE). Die Gelkammer wurde mit 0,3% Wasserstoffsuperoxid ausgewaschen. Die Auftrennung erfolgte in einem horizontalen 0,75%igen Formamid-Agarosegel mit MOPS als Laufpuffer und Ethidiumbromid (20  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) als Nachweisreagenz.

Probe			Standard		
1,0	μL	RNA-Aliquot	2,0	μL	RNA-Marker
19,4	μL	Premix	19,4	μL	Premix
4,0	μL	DEPC-H <sub>2</sub> O	3,0	μL	DEPC-H <sub>2</sub> O
5,0	μL	Beladungspuffer	5,0	μL	Beladungspuffer

Die Auftrennung erfolgte über 90 min. bei einer angelegten Spannung von 50 V.

### 2.2.7 Fluorimetrische Quantifizierung von RNA

Die Konzentration der transkribierten RNA wurde mit dem RiboGreen RNA Quantification Kit (Molecular Probes) bestimmt. Die Detektion beruht auf der chemischen Umsetzung der RNA mit einem fluoreszierenden Farbstoff. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### Probenvorbereitung

Zunächst wurde 1 μL RNA-Aliquot 1:1000 mit Tris-EDTA-Puffer (TE) verdünnt (Probenverdünnung, P1) und dann in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte auf ein Endvolumen von 100 μL weiter auf 1:50 und 1:20 mit TE-Puffer verdünnt (Probenverdünnung, P2). Für die Farbreaktion wurde das gleiche Volumen an verdünntem RiboGreen-Reagenz (1:2000 mit TE-Puffer) zugefügt.

#### *Probenverdünnung, P2:*

1:20			1:50		
10,0	μL	P1	4,0	μL	P1
90,0	μL	1x TE	96,0	μL	1x TE
100,0	μL	RiboGreen	100,0	μL	RiboGreen

#### Erstellung einer RNA-Eichgeraden

Unter Verwendung der mitgelieferten Standard-RNA (16S und 23S rRNA aus *E.coli*) und dem Lösungspuffer TE wurde eine Eichgerade erstellt (0-50 ng/mL RNA) und die Konzentrationen der Transkriptionsansätze anhand dieser ermittelt. Dazu wurde den hergestellten Eichverdünnungen (s.u.) das gleiche Volumen an verdünntem RiboGreen-Reagenz (s.o.) zugefügt.

*RNA-Vorverdünnungen:*

V1		(1,0 ng/μL)	
1,0	μL	Stammlösung	(100 ng/μL)
99,0	μL	TE	(1x)
V2(0,1 ng/μL)			
40,0	μL	V1	(1,0 ng/μL)
360,0	μL	TE	(1x)

*RNA-Eichlösungen:*

Konz.		V2		1xTE		RiboGreen	
0,0	ng/μL	0,0	μL	100,0	μL	100,0	μL
1,0	ng/μL	2,0	μL	98,0	μL	100,0	μL
5,0	ng/μL	10,0	μL	90,0	μL	100,0	μL
25,0	ng/μL	50,0	μL	50,0	μL	100,0	μL
50,0	ng/μL	100,0	μL	0,0	μL	100,0	μL

Probenmessung

Die Proben wurden mit RiboGreen-Reagenz versetzt und 5 min. bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mit einem automatischen 96 Well- Mikrotiterplatten- Lesegerät (Fluorocan, Fa. Thermo Labsystems) bei  $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$  gemessen.

**2.2.8 Verwendete Lösungen für die Molekularbiologie**10x MOPS- Laufpuffer

Fertigkonzentrat entspricht:

10,00	mL	1,0 M	MOPS	pH 7,0
0,83	mL	3,0 M	NaAcetat	pH 4,8
1,00	mL	0,5 M	EDTA	pH 8,0
38,17	mL		DEPC-H <sub>2</sub> O	

Premixpuffer

12,9	μL	10x MOPS-Laufpuffer
22,6	μL	37% Formaldehyd
64,5	μL	Formamid, deionisiert
DEPC-H <sub>2</sub> O (RNAse freies Aqua bi-distillata)		
100,0	μL	DEPC-H <sub>2</sub> O auf 1 L H <sub>2</sub> O
über Nacht rühren und anschließend autoklavieren		

DNA-Probenpuffer (5x)

20,0	% (w/v)	Ficoll
100,0	mM	EDTA
0,025	% (w/v)	Bromphenolblau
0,025	% (w/v)	Xylenxyanol

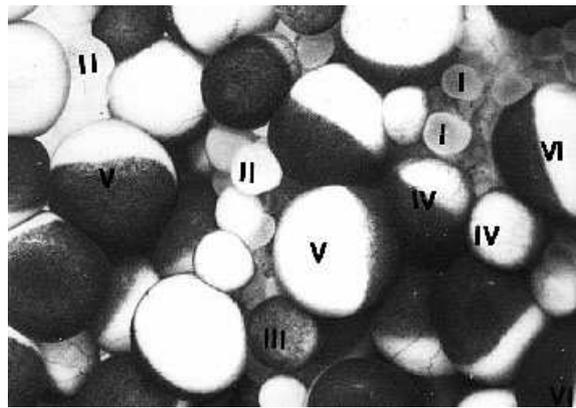
Tris-Acetat Laufpuffer (50x)

2,0	M	Tris-Acetat, pH 8
100,0	mM	EDTA

**2.3 Kultivierung von *Xenopus laevis* Oozyten**

Für die Experimente wurden weit entwickelte, aber noch unreife Eizellen (Stadium V und VI) des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) verwendet [17]. Die ausgewachsenen, nicht hormonbehandelten Tiere wurden im Tierkeller des Instituts für Physiologie in Münster in Tanks mit 2-3 L Wasser pro Frosch und einem zwölfstündigen alternierenden Wechsel zwischen Dunkelheit und Kunstlicht gehalten. Zweimal die Woche wurden die Frösche mit Fisch-Pellets und einmal monatlich mit Rinderherz gefüttert. Anschließend wurde das Wasser in den Tanks ausgetauscht. Montags und Freitags wurde jeweils ein Frosch zur Entnahme eines Ovarlobulus herangezogen. Vor dem chirurgischen Eingriff wurde der Frosch in einem Tauchbad mit dem Lokalanästhetikum Tricain (MS 222, Sigma), 0,26%, anästhesiert (ca. 10 bis 20 min, je nach Größe des Frosches). Dann wurde eine ca. 1 cm lange Inzision diagonal durch das Abdomen von der Mitte ausgehend zur Flanke hin vorge-

nommen. Nach Durchtrennung der Fascia kamen die Ovarien zum Vorschein. Nach Entnahme eines Ovarlobulus mit Schere und Pinzette wurden die Wundränder schichtgerecht von innen nach außen adaptiert und mit einem 5-0-Faden vernäht. Der Frosch wurde in ein kleines Becken gesetzt, in dem er sich, solange die Anästhesie noch wirkte, von dem Eingriff erholen konnte. Erst dann wurde er zurück in den Tank zu den anderen Fröschen gesetzt.



**Abb. 2.3:** Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* in den Reifestadien I bis VI (nach Dumont, 1972; Foto aus dem Institut für Physiologie I in Münster, Prof. Madeja).

Von den so entnommenen Oozyten, die vergleichbar Weintrauben an einer Rebe aufgehängt und von zellulären und bindegewebigen Hüllen umgeben waren, wurden solche der Entwicklungsstadien V und VI ausgewählt. Diese waren aufgrund ihrer Größe (Durchmesser > 1mm) und der scharfen Trennung in eine dunkle animalische und eine helle vegetative Hälfte schon makroskopisch leicht zu identifizieren [26, 59]. Sie wurden durch manuelle Präparation mit Hilfe zweier Uhrmacherpinzetten (Dumont #5) unter einem Binokular (40-fache Vergrößerung) vereinzelt. Die separierten Zellen wurden in eine Petrischale mit dem Kulturmedium (siehe 2.4.7) gegeben und wurden, unter Zugabe von Penicillin (10 mg/mL) und Streptomycin (100 mg/mL) zur Verhinderung einer bakteriellen oder mykotischen Infektion, bei einer Temperatur von 19°C kultiviert. Für die geplanten Experimente war es nicht nötig, die isolierten Zellen von den Follikelzellen zu befreien. Den operierten

Fröschen konnten nach einer Erholungszeit von mindestens zwei Monaten erneut Oozyten entnommen werden, da diese regeneriert werden können [59].

Die tierexperimentellen Arbeiten wurden im Rahmen des Versuchsvorhabens Experimentelle Epilepsieforschung vom Regierungspräsidenten Münster genehmigt (Az.:23.0835.1.0 (G 32/97)).

## **2.4 RNA-Injektion in *Xenopus laevis* Oozyten**

### **2.4.1 Herstellen der Injektionskapillaren**

Die Glaspipetten für die mRNA-Injektion wurden mit einem vollautomatischen programmierbaren Pipettenziehgerät (DMZ Universal Puller, Zeitz Instrumente GmbH) hergestellt. Hierzu wurden Kapillaren aus Borosilikatglas (Fa. Hilgenberg) mit einem Außendurchmesser von 1 mm, einer Wandstärke von 0,21 mm und einer Länge von 100 mm in die Halter des Pullers gelegt. Nach Auswahl des entsprechenden Ziehprogramms wurde die Glaskapillare an beiden Enden fixiert. In ihrer Mitte wurde die Kapillare von einem glühenden Filament umschlossen, und unter kontrollierter Hitzewirkung und Zug (Kraft-Weg) wurde die Kapillare in drei Ziehschritten zu Pipetten mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. 2 µm ausgezogen. Die Spitzen wurden nun noch auf eine 12-16 µm große Öffnung unter einem Lichtmikroskop (Micro Zoom, Bausch und Lomb) mit Hilfe eines Manipulators zurückgebrochen und bis zu ihrer Verwendung staubgeschützt in einer Schale aufbewahrt.

### **2.4.2 RNA-Injektion Oozyten mit Druckluft**

Die tiefgefrorene RNA wurde aufgetaut und mit Hilfe von Unterdruck luftblasenfrei in die Injektionskapillare aufgesogen. Anschließend brachte man die Kapillare in eine Halterung ein, die mit einem einachsigen Manipulator verbunden war. Die Oozyte wurde zentriert in die Mulde eines Plexiglasblockes gelegt. Die Kapillare wurde über die Manipulatorfunktion an die Oozyte angenähert und diese wurde unter Sicht angestochen. Durch Druckluft auf die Kapillare (1-3 bar) wurden 50 nl (2,5 ng/µl) RNA-Lösung in die Oozyte unter visueller Kontrolle injiziert. Für eine Versuchsreihe wurden jeweils 20-30

Oozyten mit Wildtyp-RNA, mit Mutanten-RNA und mit einem 1:1 (v/v)-Gemisch von Wildtyp und der jeweiligen mutierten RNA injiziert (Coexpressions-Experiment). Eine weitere, nicht-injizierte Fraktion (native Oozyten) wurden als Negativkontrolle engagiert. Die elektrophysiologischen Messungen wurden am dritten und am vierten Tag nach der Injektion durchgeführt.

## 2.5 Elektrophysiologie

### 2.5.1 Messung der Ionenströme mit der Voltage-Clamp-Methode

Ströme über die Membran werden durch integrale Membranproteine (Ionenkanäle) vermittelt. Eine direkte Messung dieser Membranströme erlaubt die Spannungsklemme. Da der tatsächlich geflossene Membranstrom nicht direkt messbar ist, wurde die Methode der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmentchnik (*two electrode voltage clamp*, TEVC) entwickelt.

Ziel der *voltage-clamp*-Messung ist es, ein der Zelle extern aufgezwungenes Klemmpotential aufrecht zu erhalten und dabei den dazu nötigen Kompensationsstrom zu messen, der ein Maß für den tatsächlich geflossenen Membranstrom ist. Hierdurch wird die wechselseitige Beeinflussung von Membranpotential und Strömen über die Oozytenmembran verhindert.

Bei der Messung von schnellen Membranpotentialveränderungen entstehen Ströme durch die Membrankapazität  $C_m$ , ebenso wie durch Ladungsverschiebungen vermittelt durch Ionenkanäle  $I_{ion}$ . Der Gesamtmembranstrom  $I_m$  ist die Summe aus diesen beiden Komponenten:

$$I_m = I_{ion} + C_m \delta V / \delta t \quad (1)$$

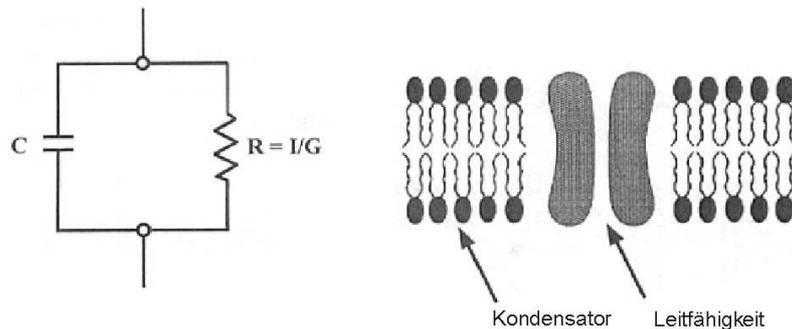
Bei den Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme hält man das Membranpotential auf einem bestimmten konstanten Wert, so dass die Änderung des Membranpotentials über die Zeit ( $\delta V / \delta t$ ) gleich Null ist. Somit hat man keinen Kapazitätsstrom und der gemessene Strom ist rein ionisch [3].

Unter der Spannungsklemmenbedingung ( $U = \text{konst.}$ ) bedeutet dies für die Abhängigkeit des Stromes vom Widerstand ( $1/\text{Leitwert}$ ), dass der Leitwert  $G$  proportional zum gemessenen Strom  $I$  ist. Das Ohm'sche Gesetz beschreibt

diesen Zusammenhang. Eine biologische Membran kann als ein geregelter (veränderbarer) Widerstand angesehen werden.

$$\frac{I}{U} = \frac{1}{R} = G \quad (2) \quad \text{wenn } U = \text{konstant} \Rightarrow I \sim G$$

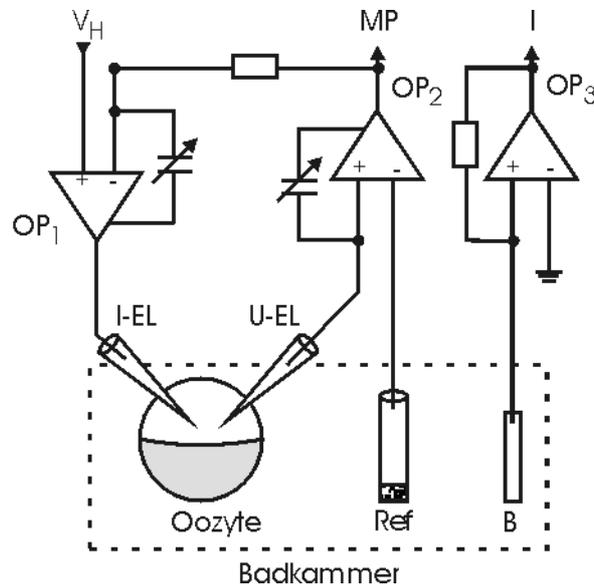
Eine biologische Zelle kann somit als ein einfacher Schaltkreis aus Stromquelle, Kondensator und Widerstand beschrieben werden.



**Abb. 2.4:** Äquivalenter Schaltkreis für eine biologische Zelle ( $C = R$ ) [3].

Technisch wurde dieses Prinzip über einen doppelrückgekoppelten Operationsverstärker (siehe **Abb. 2.5**) umgesetzt. Das Ruhemembranpotential wurde als Potentialdifferenz zwischen dem Intrazellulärraum und einer extrazellulären Referenzelektrode (Ref.) über die Spannungselektrode (U-EL) abgegriffen und mit Hilfe des 1. Operationsverstärkers ( $OP_1$ ) verstärkt. Noch kam es dem Betrag nach nicht zu einem Ionenfluss über die Membran, d.h. der transmembrane Ionenstrom war konstant null. Dieser Modus wurde auch als Stromklemmen-Modus (*current-clamp*-Modus) bezeichnet. Beim Umschalten in den *voltage-clamp*-Modus wurde über die Stromelektrode so viel Strom in die Zelle injiziert, dass diese konstant auf einem Membranpotential von  $-80$  mV (Haltepotential  $V_h$ ) gehalten wurde. Dazu war eine Kopplung beider Elektroden nötig, die über die Verbindung des Verstärkers der Spannungselektrode ( $OP_1$ ) und des Verstärkers der Stromelektrode ( $OP_2$ ) erreicht wurde. Dadurch war es möglich, eventuell auftretende Abweichungen des Membranpotentials vom Haltepotential ( $-80$  mV) durch eine entsprechende Injektion von Strom auszugleichen. Der Betrag an Strom, der zur Aufrechterhaltung des

vorgegebenen Potentials in die Zelle injiziert werden muss, ist der aufgezeichnete Parameter, der dem transmembranen Ionenfluss entspricht.



**Abb. 2.5:** Blockschaltbild zum elektrophysiologischen Versuchsaufbau der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik. (OP<sub>1</sub>, Operationsverstärker zur Messung des Membranpotentials; OP<sub>2</sub>, Operationsverstärker zur Einstellung des Haltepotentials  $V_h$ . OP<sub>3</sub>: Operationsverstärker zur Messung des injizierten Stroms. Ref.: Referenzelektrode. U-EL: Spannungselektrode. I-EL: Stromelektrode. B: Badelektrode. MP: abgegriffenes Membranpotential. I: abgelesener Strom).

### 2.5.2 Aufbau des Oozytenmessstandes

Der TEVC-Messplatz bestand aus mechanischen, optischen und elektronischen Komponenten:

- Zu den mechanischen Komponenten zählten ein Faraday-Käfig (Eigenbau aus dem Institut für Physiologie), ein schwingungsgedämpfter Eisentisch (Eigenbau), eine Durchflussmesskammer, Magnetstative und Manipulatoren.
- Zu den optischen Komponenten zählten ein Binokular (Carl Zeiss, Jena) und eine Kaltlichtquelle.

- Die elektronischen Komponenten umfassten einen Verstärker für die elektrischen Signale, ein Oszilloskop, einen Analog-Digital-Wandler und einen Computer mit der dazugehörigen Software.

Der Faraday-Käfig schützte die gesamte Messeinrichtung vor externen Störsignalen, wie z.B. „Netzbrumm“. Die Messkammer selber stand auf einem schwingungsgedämpften Eisentisch.

Die Eizelle wurde in die Vertiefung der Messkammer (Eigenbau) platziert. Das Volumen der Kammer betrug ~1,5 mL. Sie war über einen Perfusionsschlauch an ein Reservoir gefüllt mit ND96-Elektrolyt (siehe 2.5.7) angeschlossen; auf der gegenüberliegenden Seite wurde die Lösung über eine Glaskapillare kontinuierlich wieder aufgesaugt. Die Superfusionsrate war auf 1 mL/min eingestellt.

Um das Einstechen der Elektroden in die Oozyten zu erleichtern, war eine Halogen-Kaltlichtquelle (Fa. Schott, Mainz, KL150B) auf die Zelle ausgerichtet. Der schrittweisen Translation der Elektroden dienten mechanische 3-Wege-Manipulatoren (M-33, Fa. Märzhäuser), die über magnetische Standfüße am Tisch fixiert waren.

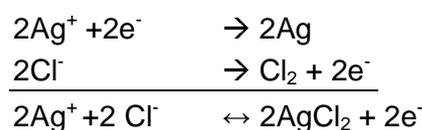
Zur Registrierung des Membranstroms und der tatsächlichen Membranspannung diente ein Verstärker für elektrische Signale (TURBO TEC-05, NPI-Electronics). Über einen Analog-Digital-Wandler (DigiData 1200, Axon Instruments) wurde das Signal zum Computer (IBM-Typ Computer) geleitet. Umgekehrt konnte man über den PC der Zelle ein Kommandopotential software-gesteuert (Clampex 8.2, Axon Instruments) auferlegen. Für die visuelle Kontrolle wurde ein digitales Speicheroszilloskop (Hameg HM 205-3) verwendet.

### 2.5.3 Herstellung der Ableitelektroden

Die Mikroelektroden für die Experimente mit der *voltage clamp*-Technik wurden mit einem vollautomatischen programmierbaren Pipettenziehgerät hergestellt. Dazu wurden Glaskapillaren aus Borosilikatglas (Fa. Hilgenberg) mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm, einer Wandstärke von 0,315 mm und einer

Länge von 100 mm in die Glashalter des Pullers gelegt. Nachdem ein passendes Ziehprogramm ausgewählt worden war, wurden die Borosilikatkapillaren in drei Ziehschritten zu Pipetten mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. 1  $\mu\text{m}$  ausgezogen. Für die Spannungselektrode wurde ein elektrischer Widerstand von 1-2  $\text{M}\Omega$  und für die Stromelektrode ein Widerstand von 0,5-1,5  $\text{M}\Omega$  benötigt [82]. Um diese Werte zu erreichen, mussten die Spitzen der Pipetten unter einem Mikroskop noch manuell mit einem Manipulator (Ernst Lutz, Wetzlar) auf einen Außendurchmesser von 3-4  $\mu\text{m}$  (Spannungselektrode) bzw. 4-6  $\mu\text{m}$  (Stromelektrode) abgebrochen werden. Bis zu ihrem Gebrauch wurden sie staubgeschützt in einer Schale aufbewahrt. Für die Experimente wurden sie dann luftblasenfrei mit 2 M KCl als Elektrolyt gefüllt.

Um das Herauslecken der hochkonzentrierten KCl-Lösung in die Oozyte zu vermeiden, wurden die gezogenen Pipetten zu sogenannten „cushion“- Messelektroden weiterentwickelt [82]. Dazu wurde 1%ig niedrignschmelzende Agarose (Fluka) in 2 M KCl gelöst und in die Elektroden mit Unterdruck aufgenommen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode war, dass die Elektroden über den ganzen Tag einen stabilen Widerstand hatten und ein „driften“ der Elektrodenpotentiale vermieden werden konnte. Die Glaselektroden wurden in Elektrodenhaltern (Warner Instruments) mittels Quetschdichtung fixiert. Als eigentliche Elektroden fungierten Silberdrähte, die in 1 N HCl-Lösung mit einem kontrollierten Spannungsgerät (Eigenbau, Institut für Physiologie I, Münster) chloriert wurden. Hierbei lagerte sich bei 1,6 V in einem zeitbegrenzten Rahmen Silberchlorid auf der Oberfläche des Silberdrahtes an. Bei 6 V und umgekehrter Polung erfolgte eine Reinigung der Elektroden. Die nachfolgende Redox- Reaktionsgleichung zeigt die Elektrochemie einer Silber-/Silber-Chlorid-Elektrode.



Hierbei handelte es sich um ein Daniell- Element, einem Beispiel einer elektrochemischen Zelle, in dem es zu einer Redox- Reaktion kommt. Bringt man einen Silberdraht in eine wässrige Lösung mit HCL, so gehen Chloridionen in

Lösung und elementares Silber geht eine Verbindung mit dem Chlorid aus der Salzsäure ein, womit sich Silberchlorid am Silberdraht anlagert.

#### **2.5.4 Experimentelle Durchführung der Versuche**

Nach der Positionierung in der Durchflusskammer wurden die Messelektroden unter optischer Kontrolle mittels der Mikromanipulatoren in einem 45°-Winkel an die Oozyte herangeführt. Dann wurde die Superfusion mit ND96 mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min eingestellt. Eventuell auftretende „offset“-Elektrodenpotentiale wurden durch Anlegen einer Korrekturspannung abgeglichen, so dass bei einem nicht angelegten Kommandopotential die Elektrodenpotentiale ebenso wie der gemessene Strom Null waren.

Unter optischer Kontrolle wurde nun die Oozyte von den beiden Messelektroden angestochen und das Ruhemembranpotential (RMP) beobachtet. Es erfolgte das stufenweise Klemmen des Membranpotentials auf das Haltepotential -80 mV. Dieser Wert entspricht in etwa dem Ruhemembranpotential von Nervenzellen. Traten zu große unspezifische Leckströme auf ( $>0,3 \mu\text{A}$ ), ein Hinweis auf eine gestörte Membranintegrität, so wurde die Zelle verworfen. Waren alle Parameter akzeptiert, wurde das jeweils ausgewählte Pulsprotokoll über den Computer gestartet und aufgezeichnet. Dabei wurden die registrierten Ionenströme mit einer oberen Grenzfrequenz von 1 kHz gefiltert.

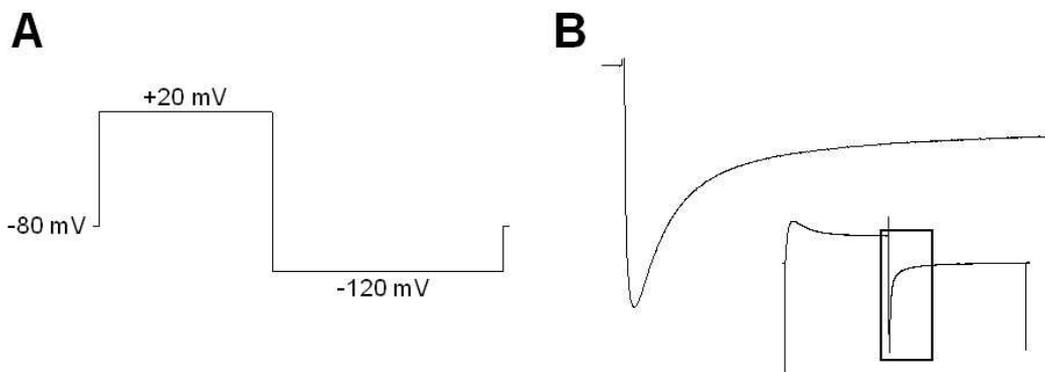
#### **2.5.5 Messprotokolle und Datenanalyse**

Am 3.Tag nach der RNA-Injektion wurden die Stromamplituden gemessen um die Funktionalität des hERG- Wildtyps mit der seiner Mutanten zu vergleichen. Am 4.Tag wurden die Pulsprotokolle durchlaufen, aus denen die Strom-Spannungskennlinien (I-V-Kennlinien) und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung sowie der Inaktivierung hervorging. Alle Messungen wurden mit der Software Clampex 8.2 (Axon Instruments) vorgenommen. Die Auswertung der Registrierungen erfolgte mit Hilfe von Clampfit 8.2 (Axon Instruments). Die so gewonnenen Daten wurden in Excel (Microsoft) zusammengestellt und weiterbearbeitet. Die Anpassungskurven und die Berechnung ihrer Parameter erfolgten mit der IGOR Pro (WaveMetrics) Software.

Im Folgenden werden die einzelnen Messprotokolle und Datenanalysen detailliert dargestellt:

### Stromamplituden (Protokoll I, Abb. 2.6)

Ausgehend vom Haltepotential ( $V_h = -80$  mV) erfolgte ein Potentialsprung ( $V_p$ ) auf  $+20$  mV für 3 s, der die Kanäle aktivierte. Durch die gleichzeitig auftretende schnelle Inaktivierung war nur ein geringer Strom zu beobachten. Die nachfolgende 4 s-Hyperpolarisierung („tail-Puls“,  $V_{tail}$ ) auf  $-120$  mV bewirkte durch die sehr schnelle Freisetzung der Kanäle aus ihrer Inaktivierung einen instantanen Einstrom von  $K^+$ , der anschließend aufgrund der einsetzenden Kanaldeaktivierung transient gegen Null ging.



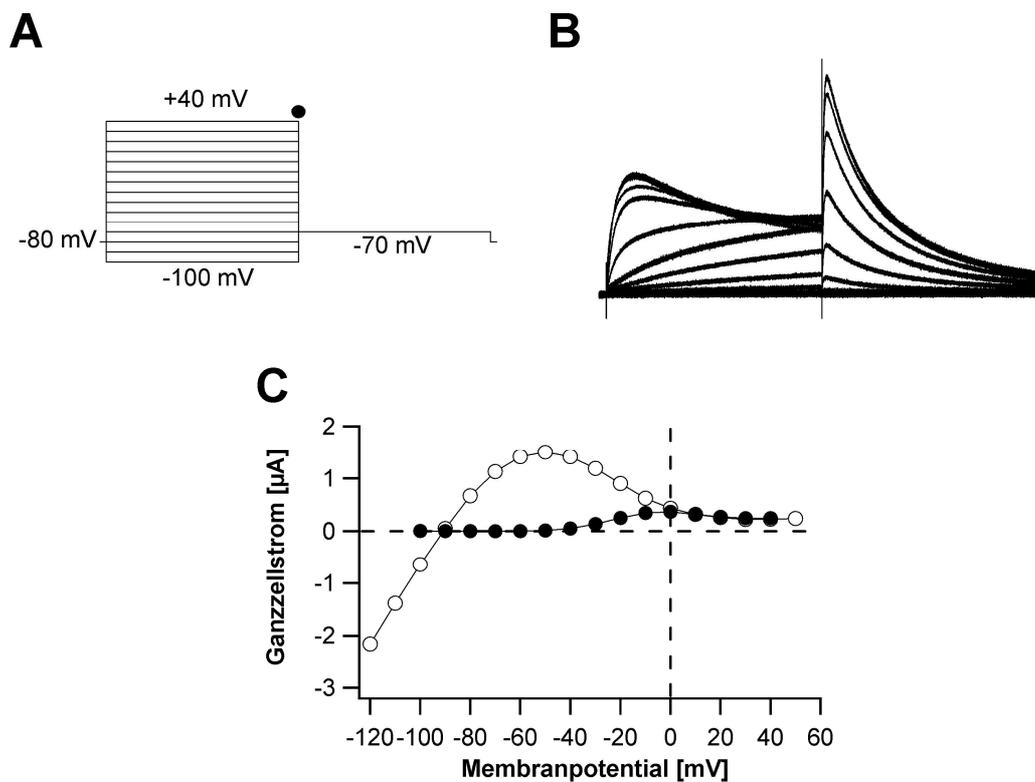
**Abb. 2.6:** Darstellung des Spitzenstroms.

**A** Verwendetes Messprotokoll, wobei  $V_h = -80$  mV,  $V_p = 20$  mV für 3 s,  $V_{tail} = -120$  mV für 4 s. **B** Daraus resultierender Ganzzellstrom. Aus dem grau unterlegten Bereich wurde der Spitzenstrom, hier vergrößert dargestellt, gemessen, der beim Potentialsprung von  $V_p$  auf  $V_{tail}$  induziert wurde.

Von fünf aufeinander folgenden Pulsen wurde jeweils der Spitzenstrom beim Sprung auf  $-120$  mV und die Zeit bis zur Spitze bestimmt und gemittelt (= Mittelwert der Einzelmessung,  $x_{EM}$ ). Aus  $x_{EM}$  wurde der Mittelwert der Messreihe ( $x_{MR}$ ) berechnet und nachfolgend alle Mittelwerte der Einzelmessungen auf  $x_{MR}$  normiert und in Prozent dargestellt. Dieses Verfahren ermöglicht ein Zusammenführen von Messreihen, die an unterschiedlichen Tagen mit unterschiedlichen Oozytenchargen durchgeführt wurden.

### Darstellung der Strom-Spannungsabhängigkeiten (Protokoll II und III)

Zur Charakterisierung von Ionenkanälen kann eine Strom-Spannungs-Kennlinie (I-V-Kennlinie) aufgezeigt werden. Aufgrund der schnelleren Inaktivierung im Vergleich zur Aktivierung des hERG-Kanals wurden zwei unterschiedliche Protokolle angewendet. Protokoll II (**Abb. 2.7**) wurde zur Darstellung der Fließgleichgewicht- (steady-state) I-V-Kennlinie und Protokoll III (**Abb. 2.8**) zur Darstellung der instantanen I-V-Kennlinie herangezogen.



**Abb. 2.7:** Darstellung der Strom-Spannungs-Kennlinie im Fließgleichgewicht. **A** Verwendetes Messprotokoll:  $V_h$ : -80 mV,  $V_{test}$ : von -100 mV bis +40 mV in 10 mV-Inkrementen für 2 s,  $V_{tail}$ : -70 mV für 2 s; ● zeigt den Messpunkt an **B** Daraus resultierende Membranströme. **C** Für die Erstellung der I-V-Kurven wurden die Ganzzellströme von mehreren Zellen gemittelt und gegen die entsprechenden Membranpotentiale aufgetragen. ● Steady-state I-V-Kurve. ○ Instantane I-V-Kurve (aus Abb. 2.8). Die Messergebnisse von -120 mV bis -90 mV zeigen den einwärtsrektifizierenden Charakter des Kanals.

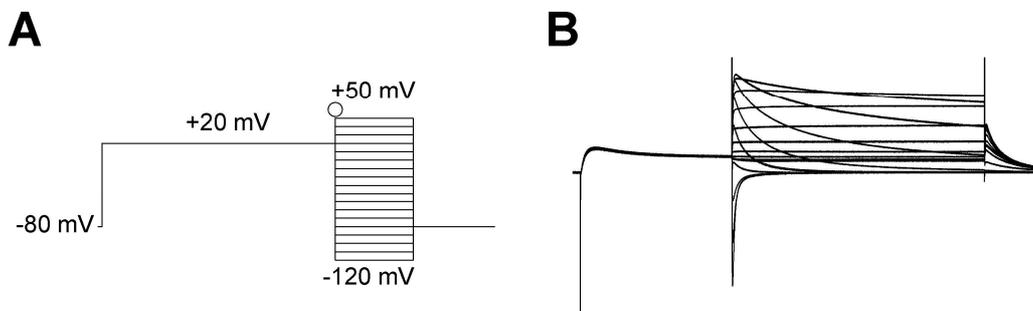
### Darstellung der Fließgleichgewichts-Strom-Spannungs-Kennlinie (Protokoll II)

Ausgehend vom Haltepotential ( $V_h = -80$  mV) wurden 2 s lange Testpulse von  $-100$  mV bis  $+40$  mV in  $10$  mV-Inkrementen appliziert. Nach den Testpulsen schloss sich ein 2 s langer Nachpuls (tail-Puls) auf  $-70$  mV an (**Abb. 2.7**).

Mit zunehmender Depolarisierung öffneten sich zunächst die Kanäle. Die Stromentwicklung war dabei aufgrund der einsetzenden Inaktivierung jedoch relativ gering, mit dem anschließenden „tail“-Puls kam es zu einer Freisetzung der Kanäle aus der Inaktivierung (*release of inactivation*) und größere Ströme über die Membran konnten aufgezeichnet werden.

### Darstellung der instantanen Strom-Spannungskennlinie (Protokoll III)

Nach der standardmäßigen Voraktivierung auf  $+20$  mV für  $1$  s erfolgten Sprünge auf Testpotentiale von  $-120$  mV bis  $+50$  mV für  $20$  ms. Für  $40$  ms folgte ein Nachpuls auf  $+40$  mV. Gemessen wurde der Spitzenstrom, nach der potentialabhängigen Freisetzung aus der Inaktivierung ( $V_{\text{test}}$ ). Somit konnte der einwärtsrektifizierende Charakter des hERG-Kanals freigelegt werden.

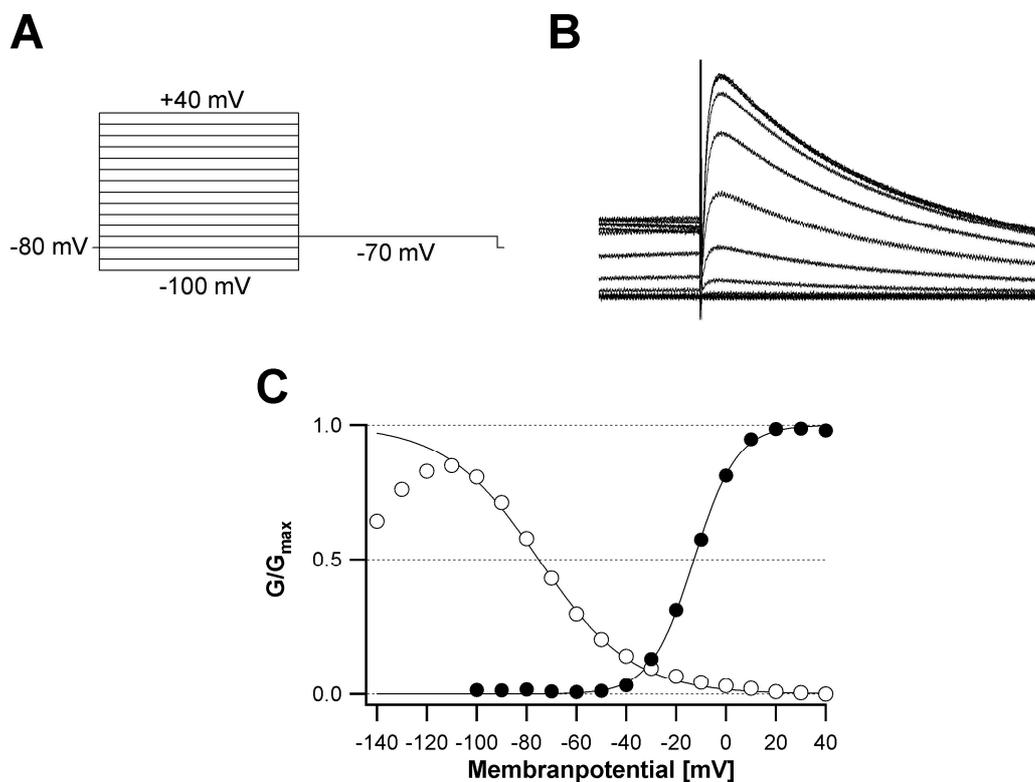


**Abb. 2.8:** Darstellung der instantanen Strom-Spannungskennlinie.

**A** Verwendetes Messprotokoll:  $V_h$ :  $-80$  mV,  $V_p$ :  $20$  mV für  $3$  s,  $V_{\text{test}}$ : von  $-120$  mV bis  $+50$  mV in  $10$  mV-Inkrementen, dann  $V_h$ :  $-80$  mV.  $\circ$  zeigt den Messpunkt zur Ermittlung des Spitzenstromes an. **B** Daraus resultierende Membranströme. Die instantane I-V-Kurve wurde für einen besseren Vergleich zusammen mit der Gleichgewichts- I-V-Kurve in **Abb. 2.7 C** dargestellt. Die Messpunkte  $-120$  mV bis  $-90$  mV zeigen den einwärtsrektifizierenden Charakter des Kanals.

### Spannungsabhängigkeit der Fließgleichgewichts-Aktivierung und –Inaktivierung

Spannungsgesteuerte Ionenkanäle sind nur in einem bestimmten, für den jeweiligen Kanaltyp charakteristischen Potentialbereich leitend. Der leitende Zustand resultiert aus dem Gleichgewicht der geschlossenen Kanäle (deaktiven, „C“) zu den offenen (aktiven, „O“) sowie zu den offenen-nichtleitenden (inaktiven, „I“) Kanälen ( $C \leftrightarrow O \leftrightarrow I$ ). Die Aktivierung wurde aus den Daten, die durch das Protokoll II gewonnen wurden, ermittelt. Mit steigender Depolarisierung durch den Testpuls werden sukzessive alle rekrutierbaren hERG-Kanäle aktiviert.



**Abb. 2.9:** Darstellung der Gleichgewichts-Aktivierung und -Inaktivierung des Kanalstroms.

**A** Das verwendete Pulsprotokoll ist identisch mit dem aus Abb. 2.7.  $V_h$ : -80 mV,  $V_{\text{test}}$ : von -100 mV bis +40 mV in 10 mV-Inkrementen für 2 s, dann  $V_{\text{tail}}$ : -70 mV für 2 s. Gemessen wird bei  $V_{\text{tail}}$ : -70 mV. **B** Daraus resultierende Membranströme. Vor dem Messpunkt sind mit steigender Depolarisierung zwar zunehmend Kanäle aktiviert, jedoch sind die Ströme gering, da gleichzeitig eine Inaktivierung einsetzt. Der Nachpuls führt zu einer schnellen Freisetzung der Kanäle aus der Inaktivierung, wodurch größere Ströme fließen. **C** Isochronale Aktivierungskurve (●) und Inaktivierungskurve (○, siehe Protokoll V und Abb. 2.10). Es wird der normierte Leitwert  $[G/G_{\text{max}}]$  gegen das applizierte Membranpotential aufgetragen. Die mit der Boltzmann-Funktion angepassten Kurven geben für den jeweiligen Prozess die Offenwahrscheinlichkeit des hERG-Kanals an.

Jedoch ist das Ausmaß des auftretenden Stroms aufgrund der ebenfalls einsetzenden Inaktivierung gering, so dass der gemessene Strom nicht dem potentiell entstehenden Strom entspricht, der seinerseits der Fraktion der aktivierten Kanäle entsprechen würde. Der Nachpuls führt zu einer schnellen Freisetzung aus der Inaktivierung und somit zu einer Demaskierung der aktivierten Kanäle. Der „freigesetzte“ Strom entspricht nun der Fraktion der offenen und nicht-inaktiven Kanäle.

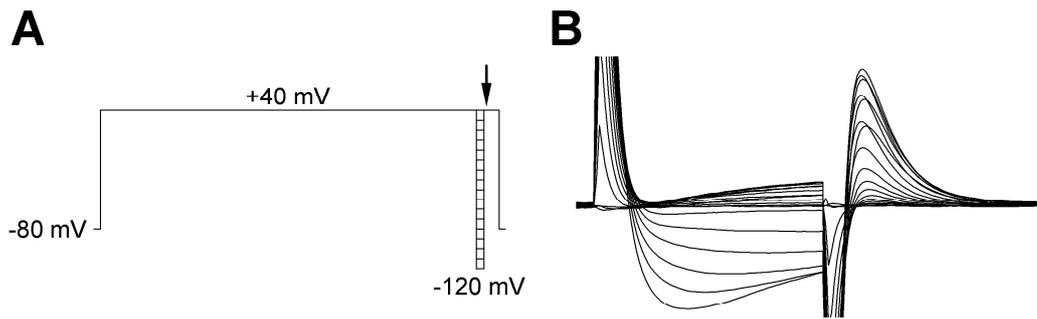
Die so gewonnene isochronale Aktivierungskurve stellt die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle dar, die mit einer Boltzmann-Funktion angepasst wurde.

$$\frac{G}{G_{\max}} = \frac{\text{Amplitude}}{1 + e^{\frac{(V-V_{1/2})}{k}}} \quad (3)$$

Die Daten wurden daraufhin auf die so ermittelte maximale Amplitude normiert. Der Anpassungsparameter  $V_{1/2}$  stellt den Wendepunkt der Funktion dar und gibt das Membranpotential an, bei dem 50% ( $G/G_{\max} = 0.5$ ) der Kanäle geöffnet sind. Der Parameter  $k$  gibt die Steilheit im Wendepunkt an und steht für die Ansprechbarkeit der Aktivierung.

#### Inaktivierung (Protokoll V)

Ausgehend vom Haltepotential ( $V_h = -80$  mV) wurden die hERG-Kanäle mit einem Potentialsprung auf +40 mV aktiviert. Nach 1 s, der Zeit, in der die zuvor aktivierten Kanäle in die Inaktivierung übergegangen waren, erfolgten 20 ms dauernde Sprünge auf Testpotentiale von -120 mV bis auf +40 mV. Diese Testpulse bewirkten eine spannungsabhängige Freisetzung aus der Inaktivierung. Der nachfolgende Sprung auf +40 mV für 40 ms induzierte einen Strom durch die jetzt geöffneten Kanäle. Dieser wurde gemessen.



**Abb. 2.10:** Darstellung der Gleichgewichts-Inaktivierung des hERG-Stroms.  
**A** Pulsprotokoll:  $V_h$ : -80 mV,  $V_p$ : +40 mV für 1 s,  $V_{test}$ : von -120 mV bis +40 mV für 20 ms,  $V_{tail}$ : +40 mV für 40 ms. Der Pfeil zeigt die Stelle an, an der gemessen wurde. Bei diesem Sprung auf +40 mV waren die Kanäle aus der Inaktivierung befreit und offen. **B** Daraus resultierende Membranströme. **C** in Abb. 2.9: isochronale Inaktivierungskurve.

Die so gewonnene isochronale Inaktivierungskurve kann ebenfalls durch eine Boltzmannverteilung beschrieben werden. Hier jedoch wird die Inaktivierungswahrscheinlichkeit dargestellt, die mit einer Boltzmann-Funktion angepasst wurde (s.o.).

**Tab. 2.1:** Zusammenfassung der Pulsparameter.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die verwendeten Pulsparameter der Protokolle I-V entsprechend den Abbildungen 2.6 - 2.10 auf einen Blick zum besseren Vergleich.  $V_h$  = Haltepotential,  $V_p$  = Präpuls,  $V_{test}$  = Testpotential,  $V_{tail}$  = Tailpotential, MP = Membranpotential.

Protokol I	Abbildung	$V_h$		$V_p$		$V_{test}$		$V_{tail}$		$V_h$
		MP [mV]	time [s]	MP [mV]	time [s]	MP [mV]	time [s]	MP [mV]	MP [mV]	
I	2.6	-80	3.000	20	4.000	-120				-80
II	2.7	-80			2.000	-100 - +40	2.000	-70		-80
III	2.8	-80	3.000	20	1.000	-120 - +50				-80
II	2.9	-80			2.000	-100 - +40	2.000	-70		-80
IV	2.10	-80	1.000	40	0.020	-120 - +40	0.040	40		-80

### 2.5.6 Statistische Bewertung der Messdaten

Zur Klärung, ob zwischen den Mittelwerten der Stromamplituden des Wildtyps und der verschiedenen Mutanten eine statistisch signifikante Diskrepanz besteht, wurde ein ungepaarter ANOVA (*analysis of variances*)-Test mit anschließenden *Holm-Sidak*-Nachtest angewendet (SigmaStat 3.0, SPSS Inc.). In den Abbildungen steht „n.s.“ für nicht signifikant, „\*“ für eine Signifikanzwahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$ , „\*\*“ für eine Signifikanzwahrscheinlichkeit von  $p < 0,01$  und „\*\*\*“ für eine Signifikanzwahrscheinlichkeit von  $p < 0,001$ .

### 2.5.7 Verwendete Lösungen für Elektrophysiologie

#### Anästhetikum für die Frösche

3-Aminobenzoic Acid Ethyl Ester Methanesulfonate Salt (MS 222)  
0,26% in Leitungswasser gelöst (5 mM)

#### Kulturmedium

88,0	mM	NaCl
1,0	mM	KCl
0,8	mM	MgSO <sub>4</sub>
1,4	mM	CaCl <sub>2</sub>
5,0	mM	HEPES

plus Penicillin (10 mg/mL) und Streptomycin (100 mg/mL)

#### Messlösung (ND96)

96,0	mM	NaCl
2,0	mM	KCl
1,0	mM	MgCl <sub>2</sub>
1,8	mM	CaCl <sub>2</sub>
5,0	mM	HEPES

Durch Zugabe von 1N NaOH wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 7,3 titriert.

Intrazelluläre Pipettenlösung

2,0            M            KCl

Hersteller- und Bezugsquellenverzeichnis

Ambion  
Axon Instruments  
Bausch und Lomb  
Biometra  
Dumont  
Eppendorf  
Hameg  
Fa. Hilgenberg  
Fa. IKA Labortechnik  
Ernst Lutz, Wetzlar  
Fa. Märzhäuser  
Microsoft  
Molecular Probes  
NPI Electronics  
Fa. Schott, Mainz  
TAMM Electronics, Thüringen  
ThermoLabsystems  
Warner Instruments  
Wave Metrics  
Zeiss, Carl  
Zeitz Instrumente GmbH

### 3. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten die charakteristischen elektrophysiologischen Eigenschaften des hERG-Kaliumkanals mit der Voltage-Clamp-Technik quantitativ analysiert werden. Hierzu wurden sechs Mutationen untersucht, die sich in drei Gruppen einteilen lassen (**Kap. 1.3**). Zur ersten Gruppe gehören die Punktmutationen T623I, G628S und K638Q, die im Bereich der Porenregion des Kaliumkanals liegen. Gruppe zwei beinhaltet die C-terminale Punktmutation R1055Q. Zur letzten Gruppe gehören die beiden Abbruchmutationen Y611X und Q688X.

Die Charakterisierung der Mutanten erfolgte jedes Mal nach folgendem Schema:

- Zuerst wurden die Amplituden unter Verwendung von Messprotokoll I (**Kap. 2.5.5**) gemessen. **Abb. 3.X.1 A** zeigt jeweils charakteristische Originalregistrierungen, die den Wildtyp mit der Mutante, der Coexpression und der Kontrolle qualitativ vergleichen. Die Größenunterschiede sind im Ausschnitt, in dem Wildtyp, Mutation, Coexpression und Kontrolle übereinander liegend eingetragen worden sind, gut zu erkennen. Die Darstellung der quantitativen Analyse wird durch Balkendiagramme in **Abb. 3.X.1 B** veranschaulicht. Die Amplituden sind ein Maß für die Funktionalität und Expression des Kanals. Ein Auswirken der Mutationen in den Latenzzeiten wird in den Balkendiagrammen in **Abb. 3.X.1 C** analysiert. Veränderte Latenzzeiten können einen ersten Hinweis auf Veränderungen in der Kinetik geben. Signifikante Unterschiede in Amplitude oder Latenz wurden mittels ANOVA-Test ermittelt (**Kap. 2.5.6**).
- Anschließend werden in den **Abb. 3.X.2** und **Abb. 3.X.3** die Spannungsabhängigkeiten der Kanaleigenschaften analysiert, wobei **3.X.2** jeweils charakteristische Originalmessungen (Primärdaten) zeigt und **3.X.3** die Analyse (Sekundärdaten). So wird die quantitative Analyse von **3.X.2 A** in **Abb. 3.X.3 A** gezeigt, die quantitative Analyse von **3.X.2 B** in **Abb. 3.X.3 B**, wie in **Kap. 2.5.5** beschrieben.

- Schließlich werden die **Abb. 3.X.2 A** und **Abb. 3.X.2 C** zusammen in der **Abb. 3.X.3 C** analysiert, die die isochronalen Aktivierungs- und Inaktivierungskurven zeigt.

Am Ende des Kapitels werden zwei Tabellen mit den Parametern der Amplituden und Aktivierung bzw. Inaktivierung aller gemessenen Mutationen zur vergleichenden Auswertung angefügt.

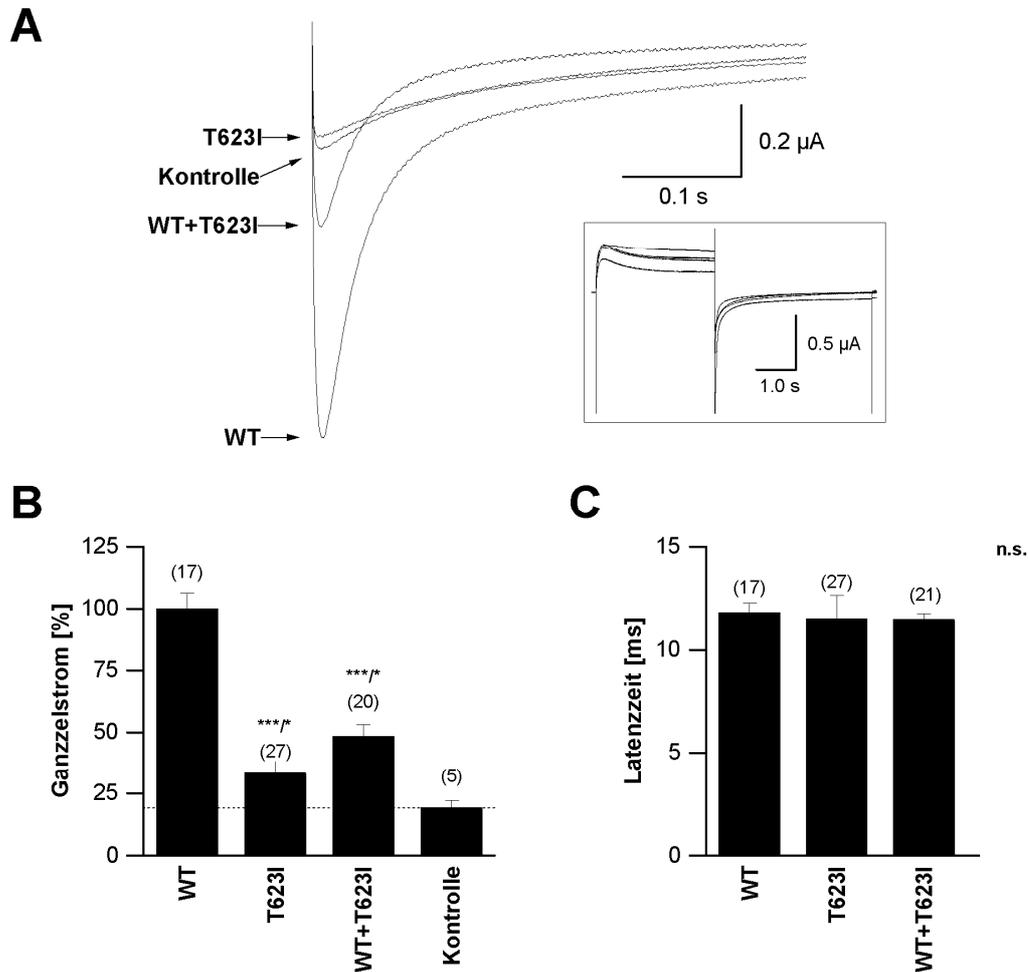
### 3.1 Punktmutation T623I in der Porenregion

Die Mutation T623I, bei der Tyrosin durch Isoleucin an der Position 623 ausgetauscht ist, befindet sich mitten in der Porenregion des hERG-Kanals.

#### 3.1.1 Analyse der Ganzzellströme nach Hyperpolarisation (Abb. 3.1.1)

Ausgehend vom Haltepotential ( $V_h = -80$  mV) erfolgte ein Potentialsprung ( $V_p$ ) auf +20 mV für 3 s, der die Kanäle aktivierte (**Messprotokoll I, Kap. 2.5.5**). Die nachfolgende 4 s dauernde Hyperpolarisierung ( $V_{tail}$ ) auf -120 mV setzte den Spitzenstrom frei. Es wurden fünf Registrierungen nacheinander aufgezeichnet. Die gemittelte Registrierung zeigt der Kasten in Teil **A** der Abbildung. Der für die Analyse wichtige Teil ist vergrößert dargestellt. Er zeigt die Registrierungen von Wildtyp, T623I, Coexpression und Kontrolle übereinander liegend. Man sieht auf einen Blick, dass die Mutante einen deutlich geringeren Spitzenstrom zeigt, der im Bereich der Kontrolle liegt. Die Coexpression zeigt in etwa ein Drittel des Stroms im Vergleich zum Wildtyp.

Die quantitative Analyse ist in Teil **B** der Abbildung dargestellt. Sie stellt die vier Ansätze prozentual vergleichend dar. Die Werte wurden auf den Wildtyp normiert und betragen für den Wildtyp  $100 \pm 6,36\%$  ( $I = -1,31$   $\mu$ A,  $n = 17$ ), für die Mutante T623I  $33,15 \pm 4,98\%$  ( $I = -0,343$   $\mu$ A,  $n = 27$ ), für die Coexpression  $42,7 \pm 4,66\%$  ( $I = -0,56$   $\mu$ A,  $n = 20$ ) und für die Kontrolle  $19,3 \pm 3,0\%$  ( $I = -0,25$   $\mu$ A,  $n = 5$ ). Der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante sowie zwischen Wildtyp und Coexpression zeigt laut ANOVA-Test eine hohe Signifikanz ( $<0,001$ , \*\*\*). Zwischen Mutante und Coexpression gibt es einen Unterschied von geringerer Signifikanz ( $<0,05$ , \*).



**Abb. 3.1.1:** Darstellung und Analyse von Ganzzellströmen nach Hyperpolarisation der Punktmutation T623I.

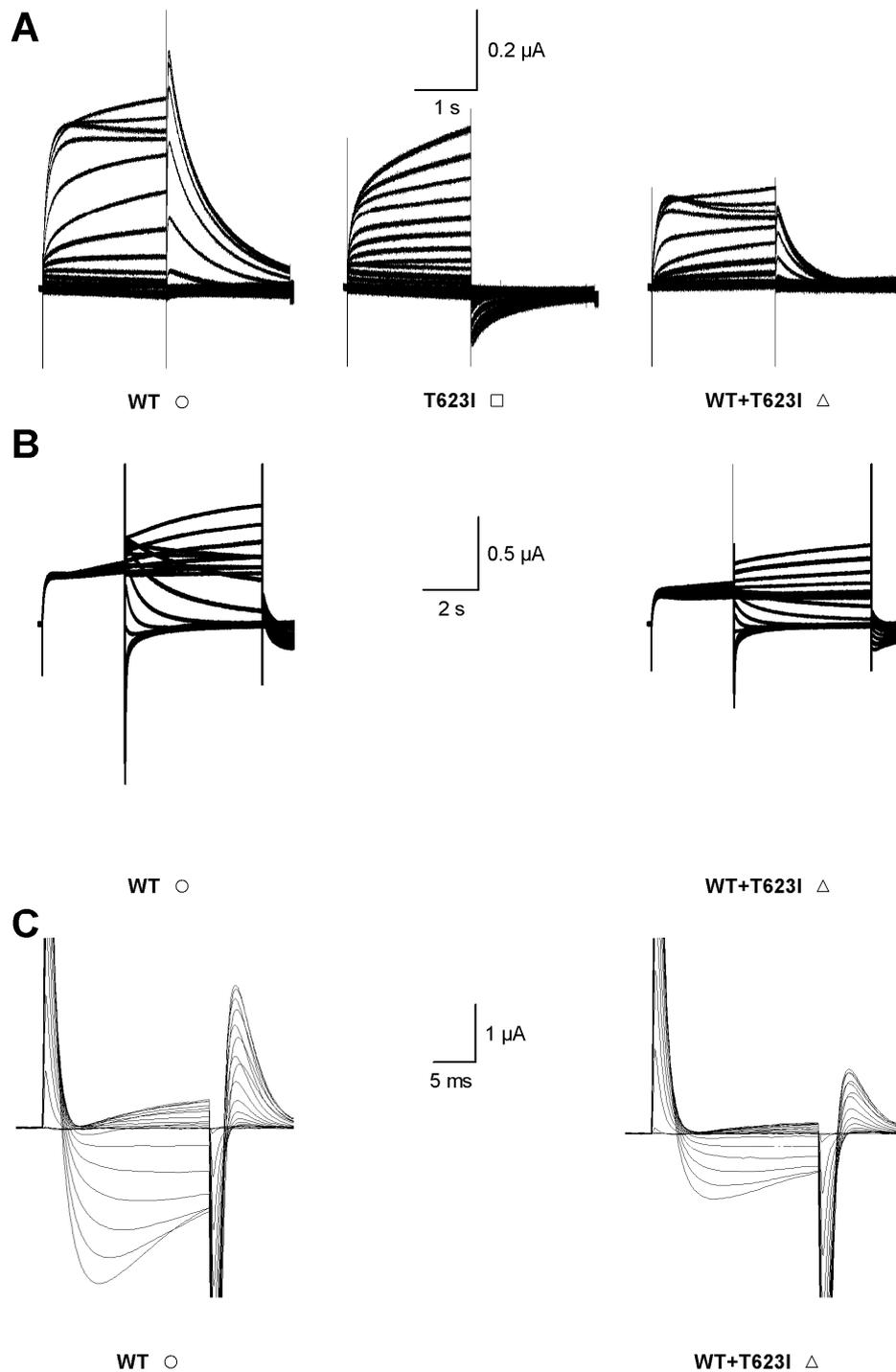
**A** Vergleich auf den WT normierter *tail*-Ströme von WT, T623I, WT+T623I und nicht injizierter Oozyten (Kontrolle). Dargestellt ist ein vergrößerter Ausschnitt. Der Kasten zeigt die komplette Registrierung unter Verwendung von Messprotokoll I (**Kap. 2.5.5**). **B** Analyse der Spitzenströme von WT, T623I, WT+T623I und Kontrolle. Die Werte wurden auf den WT normiert. WT =  $100 \pm 6,36\%$  ( $-1,31 \mu$ A); T623I =  $33,15 \pm 4,98\%$  ( $-0,343 \mu$ A); WT+T623I =  $42,7 \pm 4,66\%$  ( $-0,56 \mu$ A) und Kontrolle =  $19,3 \pm 3,0\%$  ( $-0,25 \mu$ A). Der Unterschied zwischen WT und Mutante sowie zwischen WT und Coexpression zeigt eine hohe Signifikanz ( $<0,001$ ). Zwischen Mutante und Coexpression zeigt der Unterschied eine geringe Signifikanz ( $<0,05$ ) (**Kap. 2.5.6**). Die Zahlen in Klammern über den Balken geben die Anzahl (n) der gemessenen Oozyten an. **C** Analyse der Latenzzeit bis zum Spitzenstrom. WT =  $11,90 \pm 0,46$  ms; T623I =  $11,49 \pm 1,13$  ms; WT+T623I =  $11,47 \pm 0,28$  ms. Unterschiede in der Latenzzeit sind nicht gegeben (n.s.) (**Kap. 2.5.6**). Die Zahlen in Klammern über den Balken zeigen die Anzahl (n) der gemessenen Oozyten an.

Der Wert der Mutante ist mit 33,15% im Vergleich zur Kontrolle mit 19,3% recht hoch, wodurch die 42,7% der Coexpression etwas relativiert werden. Das Balkendiagramm in Teil **C** der Abbildung vergleicht die Latenzzeiten von Wildtyp, T623I und Coexpression bis zum Erreichen des Spitzenstroms in ms. Da die Kontrolle nicht-injizierte Oozyten waren, kann auch keine Latenzzeit gemessen werden. Die Werte im Einzelnen betragen für den Wildtyp  $11,90 \pm 0,46$  ms ( $n = 17$ ), für die Mutante T623I  $11,49 \pm 1,13$  ms ( $n = 27$ ) und für die Coexpression  $11,47 \pm 0,28$  ms ( $n = 21$ ). Signifikante Unterschiede in der Latenzzeit sind nicht gegeben (n.s. für nicht signifikant).

### 3.1.2 Vergleich der Ganzzellströme während Aktivierung und Inaktivierung (Abb. 3.1.2)

Abbildungsteil **A** zeigt die qualitative Analyse der spannungsabhängigen Gleichgewichtsaktivierung von Wildtyp, T623I und Coexpression. Hierzu wurde **Messprotokoll II** verwendet (**Kap. 2.5.5**), bei dem ausgehend vom Haltepotential ( $V_h = -80$  mV) 2 s lange Testpulse ( $V_t$ ) von -100 mV bis +40 mV in 10 mV-Schritten appliziert wurden. Anschließend erfolgt ein 2 s langer Nachpuls ( $V_{tail}$ ) auf -70 mV, der zu einer Freisetzung der Kanäle aus ihrer Inaktivierung und somit zu größeren Strömen über die Membran führt. Wildtyp und Coexpression zeigen typische, für den Kanal charakteristische Ströme, wohingegen die Mutante atypische Ströme zeigt, möglicherweise durch das Auftreten endogener Ströme. Wildtyp und Coexpression sehen gleich aus, jedoch sind die Ströme der Coexpression kleiner als die des Wildtyps. Die quantitative Auswertung erfolgt in **Abb. 3.1.3 A**.

Die Darstellung der instantanen Aktivierung des Wildtyps und der Coexpression, in **Abb. 3.1.2 B** gezeigt, wurde unter der Verwendung von **Messprotokoll III** (**Kap. 2.5.5**) durchgeführt. Dazu erfolgten ausgehend vom Haltepotential ( $V_h = -80$  mV) nach einer standardmäßigen Voraktivierung auf +20 mV für 1 s Sprünge auf Testpotentiale ( $V_{test}$ ) von -120 mV auf +40 mV in 10 mV-Inkrementen für 20 ms. Dann erfolgte für 40 ms ein Nachpuls ( $V_{tail}$ ) auf +40 mV. Gemessen wurde der Spitzenstrom nach der potentialabhängigen Freisetzung aus der Inaktivierung.



**Abb. 3.1.2:** Vergleich der Ganzzellströme der Punktmutation T623I während der Aktivierung und Inaktivierung.

**A** Fließgleichgewichts-Aktivierung von WT, T623I und WT+T623I unter Verwendung von Messprotokoll II. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.1.3 A. **B** Instantane Aktivierung von WT und WT+T623I unter Verwendung von Messprotokoll III. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.1.3 B. **C** Schnelle Inaktivierung von WT und WT+T623I unter Verwendung von Messprotokoll IV. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.1.3 C.

Hierdurch wird der einwärtsgerichtete Charakter des hERG-Kanals demaskiert. Der Wildtyp zeigt wiederum die für dieses Messprotokoll typischen Registrierungen. Die Ströme der Coexpression sind ungefähr halb so groß wie die des Wildtyps. Offensichtliche Unterschiede in der Kinetik sind nicht zu erkennen. Die instantane Aktivierung der Mutante fehlt aufgrund sehr schlechter Abdichtungseigenschaften der Oozyten am Messtag.

**Abb. 3.1.2 C** vergleicht die spannungsabhängige Gleichgewichtsinaktivierung von Wildtyp und Coexpression miteinander unter Verwendung von **Messprotokoll IV (Kap. 2.5.5)**. Die Kanäle wurden ausgehend vom Haltepotential ( $V_h = -80$  mV) mit einem Potentialsprung auf +40 mV aktiviert. Nach 1 s, der Zeit, in der die zuvor aktivierten Kanäle wieder inaktivierten, erfolgten 20 ms dauernde Sprünge auf Testpotentiale ( $V_{\text{test}}$ ) von -120 mV bis +40 mV. Diese Testpotentiale bewirkten eine spannungsabhängige Freisetzung der Kanäle aus ihrer Inaktivierung. Der nachfolgende Sprung auf +40 mV für 20 ms induzierte einen Strom durch die jetzt geöffneten Kanäle, welcher gemessen wurde. Die gleichzeitig einsetzende Deaktivierung bewirkt einen Abfall der Ströme. Die prominenten abgeschnittenen vermeintlichen Peaks stellen rein kapazitive Effekte durch Potentialänderung an der Membran dar (Kap. 2.5.1, Abb. 2.3, Äquivalenter Schaltkreis für eine biologische Zelle), die aufgrund der zeitlichen Auflösung des Graphen deutlich sichtbar werden. Wildtyp und Coexpression zeigen beide für den Kanal typische Ströme, wobei die der Coexpression kleiner sind. Da die Mutante keine Ströme generiert, kann auch keine schnelle Inaktivierung aufgezeichnet werden. Die Analyse der Spannungsabhängigkeit erfolgt in der **Abb. 3.1.3 C**.

### **3.1.3 Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften (Abb. 3.1.3)**

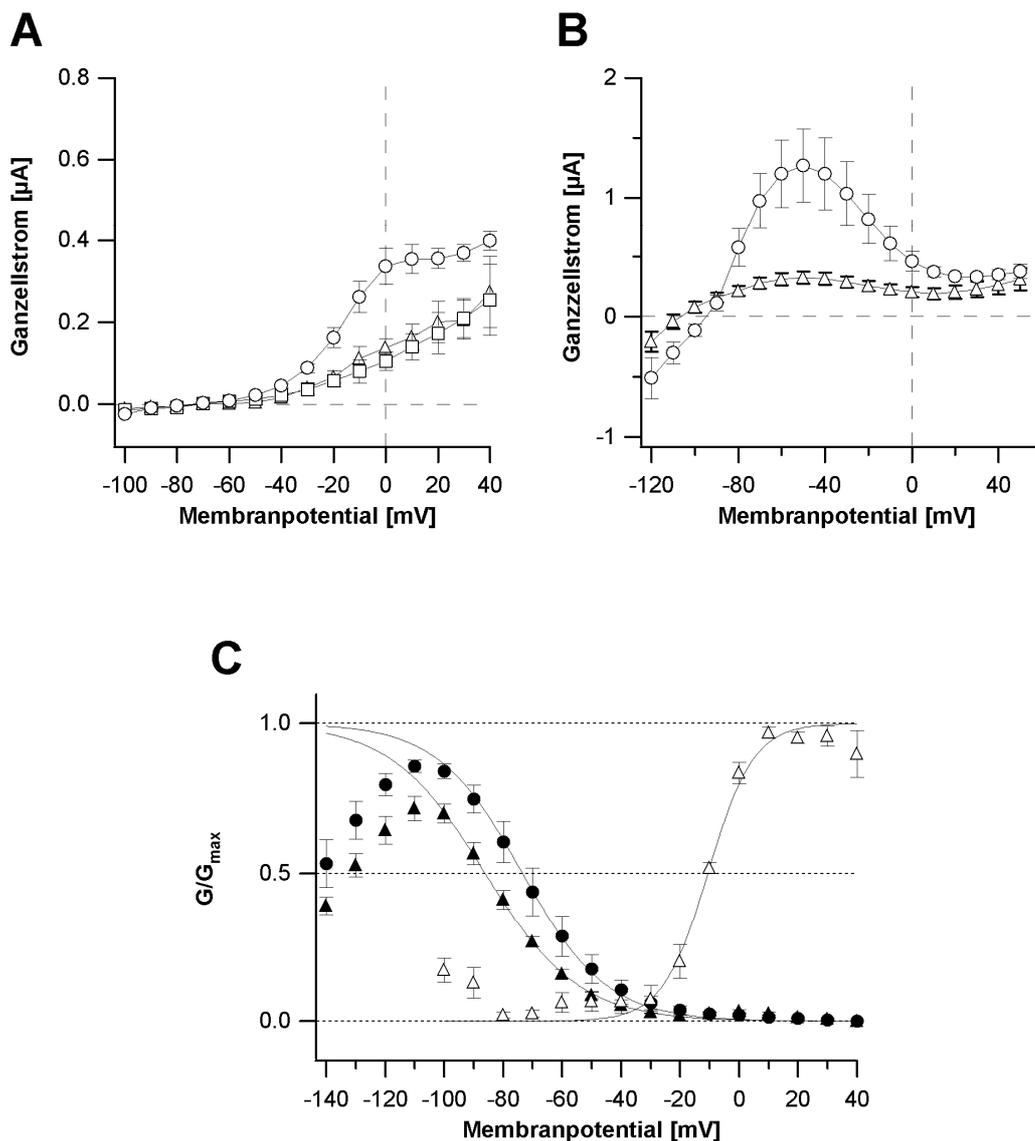
Aus der Analyse von Ganzzellströmen wie in **Abb. 3.1.2 A** dargestellt, wurden die im Gleichgewicht gemessenen und gemittelten Ströme von Wildtyp ( $\circ$ ,  $n = 5$ ), Mutante ( $\square$ ,  $n = 5$ ) und Coexpression ( $\triangle$ ,  $n = 3$ ) gegen das entsprechende Testpulspotential aufgetragen (**Kap. 2.5.5**). Ab -50 mV zeigt der

Wildtyp eine spannungsabhängige Zunahme des Stroms gegenüber der Mutante, wohingegen die Coexpression nur eine sehr geringe Zunahme zeigt, was an dem relativ hohen nicht-hERG-charakteristischen Grundstrom liegt. Der größte Unterschied zwischen Wildtyp / Mutante ( $\Delta = 0,23 \mu\text{A}$ ) und Coexpression / Mutante ( $\Delta = 0,033 \mu\text{A}$ ) liegt bei 0 mV. Der Wildtyp zeigt hier  $0,336 \mu\text{A}$ , die Mutante  $0,105 \mu\text{A}$  und die Coexpression  $0,138 \mu\text{A}$ . Bis 40 mV steigen die Stromspuren aller drei Fraktionen weiter an.

Aus der Analyse von **Abb. 3.1.2 B**, die die Membranströme über die Zeit zeigt, wurden nun für **Abb. 3.1.3 B** alle Datenpunkte von Wildtyp ( $\circ$ ) und Coexpression ( $\triangle$ ) gemittelt und daraus dieser Graph für die instantane Aktivierung erstellt.

Bei -50 mV ist der Unterschied zwischen Wildtyp ( $1,266 \mu\text{A}$ ) und Coexpression ( $0,324 \mu\text{A}$ ) mit  $\Delta = 0,942 \mu\text{A}$  am größten. Zwischen -120 mV und -90 mV zeigt der Wildtyp seinen einwärtsrektifizierenden Charakter mit negativen Ganzzellstromwerten. Die Coexpression zeigt ihn von -120 mV bis -110 mV.

Der Graph, der eine Auswertung der Abbildungen **3.1.2 C** und **3.1.3 A** darstellt, wird nun in **Abb. 3.1.3 C** gezeigt. Er stellt die Spannungsabhängigkeit der isochronalen Aktivierung (aus **Abb. 3.1.3 A**) und Inaktivierung (aus **Abb. 3.1.2 C**) von Wildtyp ( $\circ$  bzw.  $\bullet$ ) und Coexpression ( $\triangle$  bzw.  $\blacktriangle$ ) dar. Zur Anpassung der Ausgleichskurven wurde eine Boltzmann-Funktion (**Gleichung 3, Kap. 2.5.5**) verwendet. Der Parameter  $k$  gibt die Steilheit der Funktion im Wendepunkt ( $= V_{1/2}$ ) an und steht für die Ansprechbarkeit der Funktion. Am Wendepunkt sind 50% der Kanäle geöffnet ( $G/G_{\text{max}} = 0.5$ ). Es ergibt sich eine Schnittfläche, die das aktive Fenster der Kanäle zeigt. Je größer die Schnittfläche, desto höher die Offenwahrscheinlichkeit. Die ermittelten Parameter der Aktivierung für die Coexpression ( $\triangle$ ) sind:  $v_{1/2} = -10,6 \pm 0,4 \text{ mV}$ ,  $k = 7,7 \pm 1,7 \text{ mV}$ ,  $n = 5$ . Die Parameter der Inaktivierung für den Wildtyp ( $\bullet$ ) sind:  $v_{1/2} = -73,5 \pm 4,4 \text{ mV}$ ,  $k = -14,4 \pm 0,5 \text{ mV}$ ,  $n = 5$ ; für die Coexpression ( $\blacktriangle$ ):  $v_{1/2} = -86,2 \pm 2,2 \text{ mV}$ ,  $k = -16,4 \pm 0,5 \text{ mV}$ ,  $n = 5$ . Bei der Inaktivierung zeigt die Mutante T623I in der Coexpression im Vergleich zum Wildtyp eine Linksverschiebung um 12,7 mV.



**Abb. 3.1.3:** Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der Punktmutation T623I.

**A** Vergleich der Strom-Spannungskennlinien im Fließgleichgewicht von WT ( $\circ$ ,  $n = 5$ ), T623I ( $\square$ ,  $n = 5$ ) und WT+T623I ( $\triangle$ ,  $n = 2$ ) (Messprotokoll II).

**B** Vergleich der instantanen Strom-Spannungskennlinien von WT ( $\circ$ ,  $n = 5$ ) und WT+T623I ( $\triangle$ ,  $n = 5$ ) (Messprotokoll III).

**C** Spannungsabhängigkeit der isochronalen Aktivierung (Messprotokoll II) und Inaktivierung (Protokoll IV) von WT und WT+T623I. Ermittelte Parameter der Aktivierung für WT+T623I ( $\triangle$ ):  $v_{1/2} = -10,6 \pm 0,4$  mV,  $k = 7,7 \pm 1,7$  mV,  $n = 5$ . Parameter der Inaktivierung für WT ( $\bullet$ ):  $v_{1/2} = -73,5 \pm 4,4$  mV,  $k = -14,4 \pm 0,5$  mV,  $n = 5$ ; für WT+T623I ( $\blacktriangle$ ):  $v_{1/2} = -86,2 \pm 2,2$  mV,  $k = -16,0 \pm 0,5$  mV,  $n = 5$ . Zur Anpassung der Ausgleichskurven an die Werte wurde eine Boltzmann-Funktion verwendet (**Gleichung 3**).

In der Steilheit liegen keine Unterschiede vor. Es gibt keine Kurve für die Aktivierung des Wildtyps, da die vorliegenden Daten in diesem Fall fehlerhaft waren und nicht mehr korrigiert werden konnten.

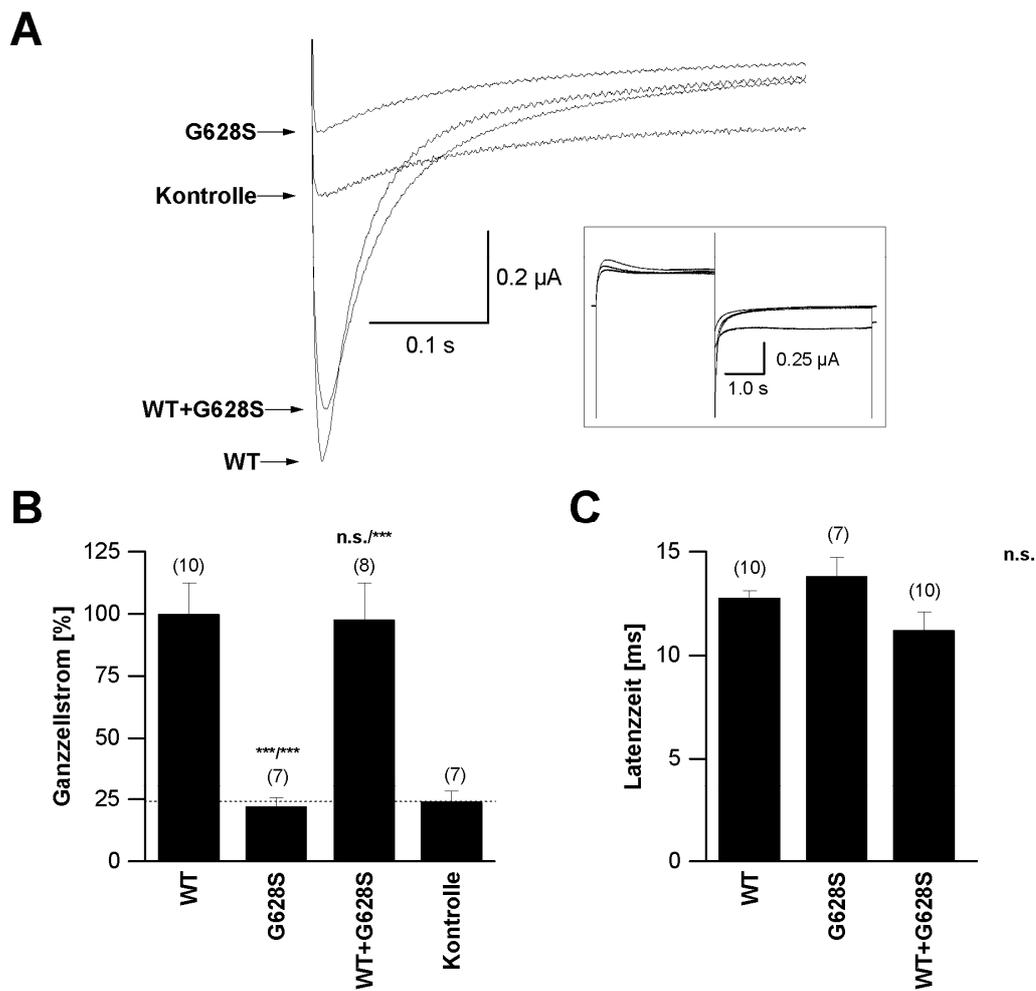
Zusammenfassend wird deutlich, dass die Mutante T623I mit  $-0,343 \mu\text{A}$  (33,15%) einen hohen Grundstrom aufweist und dass die Coexpression mit 42,7% knapp unter der 50%-Grenze liegt. Der Vergleich der Gleichgewichts-Membranströme zeigt typische hERG-charakteristische Ströme von Wildtyp und Coexpression, wobei der Wildtyp Ströme größeren Ausmaßes zeigt. Die Ströme der Mutante sind atypisch, womöglich aufgrund des Auftretens endogener Ströme. Die Registrierungen der instantanen Aktivierung sind sowohl beim Wildtyp als auch bei der Coexpression hERG-typisch, die der Coexpression in etwa halb so groß wie die des Wildtyps. Die Registrierungen der Gleichgewichts-Inaktivierung sind sowohl beim Wildtyp als auch bei der Coexpression hERG-typisch, die der Coexpression sind kleiner als die des Wildtyps. Die größten Unterschiede zwischen Wildtyp, Mutante und Coexpression liegen bei der Gleichgewichts-Aktivierung bei 0 mV, bei der instantanen Aktivierung bei -50 mV. Zwischen -90 mV und -120 mV zeigt der Wildtyp seinen einwärtsrektifizierenden Charakter, die Coexpression zwischen -110 mV und -120 mV. Bei der Inaktivierung zeigt die Coexpression eine Linksverschiebung um 12,7 mV. Es gibt es keine Veränderungen in der Ansprechbarkeit der Aktivierung bzw. Inaktivierung.

### 3.2 Punktmutation G628S in der Porenregion

Die Mutation G628S, bei der Glycin durch Serin an der Position 628 ausgetauscht ist, befindet sich im Selektivitätsfilter der Porenregion des hERG-Kanals.

#### 3.2.1 Analyse der Ganzzellströme nach Hyperpolarisation (Abb. 3.2.1)

Es wurden wieder fünf Registrierungen der Spitzenströme (**Messprotokoll I, Kap. 2.5.5**) nacheinander aufgezeichnet. Die gemittelte Registrierung zeigt der Kasten in Teil **A** der Abbildung. Der für die Analyse wichtige Teil ist vergrößert dargestellt. Er zeigt die Registrierungen von Wildtyp, G628S, Coexpression und Kontrolle übereinander liegend. Man sieht auf einen Blick, dass die Mutante einen deutlich geringeren Spitzenstrom zeigt, noch geringer als der der Kontrolle. Die Coexpression zeigt fast genauso viel Strom wie der Wildtyp.



**Abb. 3.2.1:** Darstellung und Analyse der Ströme nach Hyperpolarisation der Punktmutation G628S.

**A** Vergleich auf den WT normierter *tail*-Ströme von WT, G628S, WT+G628S und nicht injizierter Oozyten (Kontrolle). Dargestellt ist ein vergrößerter Ausschnitt. Der Kasten zeigt die komplette Registrierung unter Verwendung von Messprotokoll I (**Kap. 2.5.5**). **B** Analyse der Spitzenströme von WT, G628S, WT+G628S und Kontrolle. Die Werte wurden auf den WT normiert. WT =  $100 \pm 12,4\%$  ( $-0,92 \mu\text{A}$ ); G628S =  $22,1 \pm 3,46\%$  ( $-0,20 \mu\text{A}$ ); WT+G628S =  $97,8 \pm 14,68\%$  ( $-0,90 \mu\text{A}$ ) und Kontrolle =  $24,2 \pm 4,26\%$  ( $-0,22 \mu\text{A}$ ). Der Unterschied zwischen WT und Mutante sowie Mutante und Coexpression zeigt eine hohe Signifikanz ( $<0,001$ ). Zwischen WT und Coexpression zeigt der Unterschied keine Signifikanz (n.s.) (**Kap. 2.5.6**). Die Zahlen in Klammern über den Balken geben die Anzahl (n) der gemessenen Oozyten an. **C** Analyse der Latenzzeit bis zum Spitzenstrom. WT =  $12,77 \pm 0,34 \text{ ms}$ ; G628S =  $13,82 \pm 0,91 \text{ ms}$ ; WT+G628S =  $11,22 \pm 0,89 \text{ ms}$ . Die Unterschiede in der Latenzzeit sind nicht gegeben (n.s.) (**Kap. 2.5.6**). Die Zahlen in Klammern über den Balken zeigen die Anzahl (n) der gemessenen Oozyten an.

Die quantitative Analyse ist in Teil **B** der Abbildung dargestellt. Die Werte im Einzelnen betragen für den Wildtyp  $100 \pm 12,4\%$  ( $I = -0,92 \mu\text{A}$ ,  $n = 10$ ), für die Mutante G628S  $22,1 \pm 3,46\%$  ( $I = -0,20 \mu\text{A}$ ,  $n = 7$ ), für die Coexpression  $97,8 \pm$

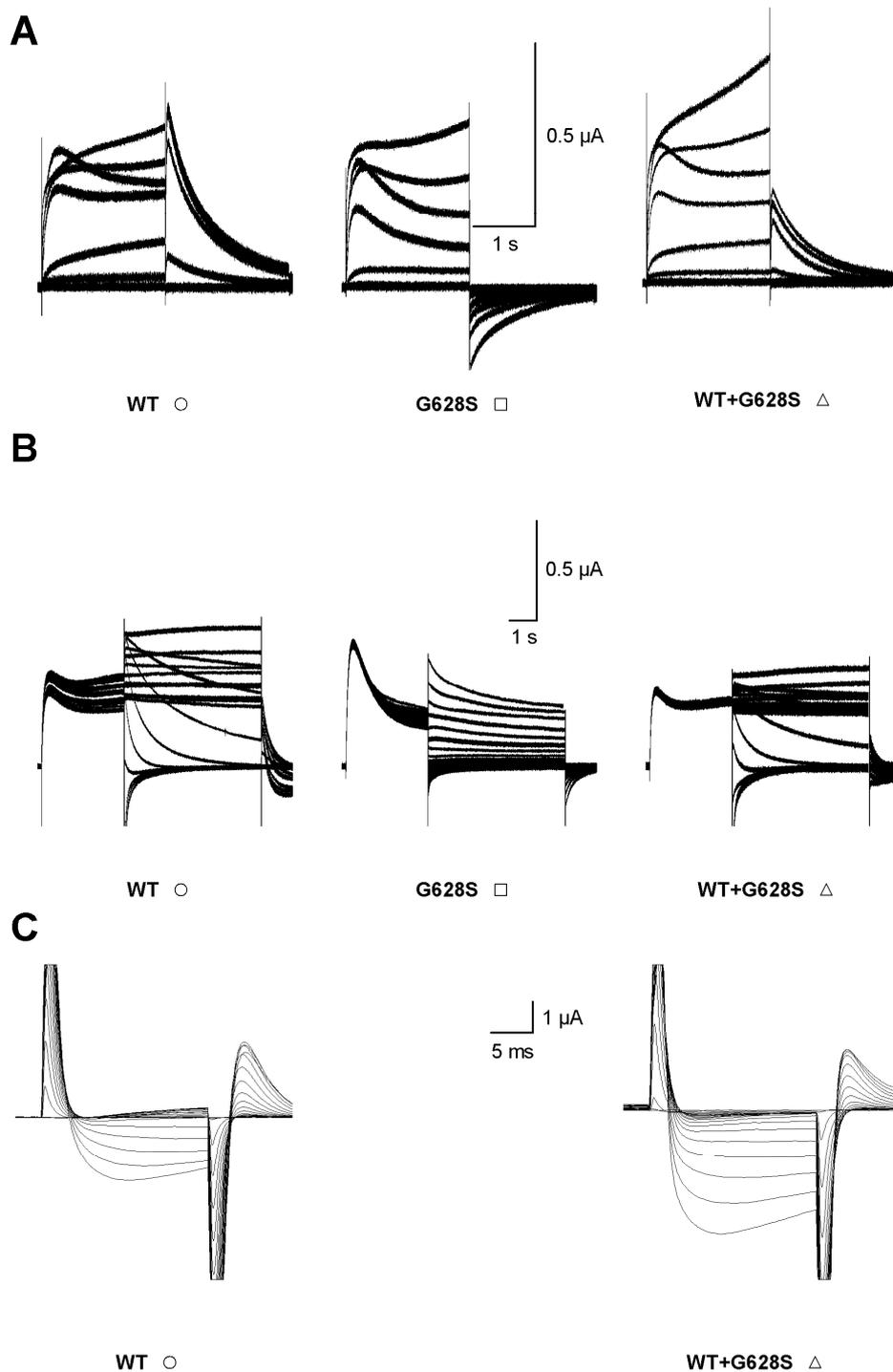
14,68% ( $I = -0,90 \mu\text{A}$ ,  $n = 8$ ) und für die Kontrolle  $24,2 \pm 4,26\%$  ( $I = -0,22 \mu\text{A}$ ,  $n = 7$ ). Der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante sowie zwischen Mutante und Coexpression zeigt laut ANOVA-Test eine hohe Signifikanz ( $<0,001$ , \*\*\*), zwischen Wildtyp und Coexpression besteht kein signifikanter Unterschied (n.s.). Der Wert der Mutante entspricht mit 22,1% in etwa dem der Kontrolle mit 24,2%. Die Coexpression generiert mit 97,8% nahezu soviel Strom wie der Wildtyp.

Das Balkendiagramm in Teil **C** der Abbildung vergleicht die Latenzzeiten von Wildtyp, G628S und Coexpression bis zum Erreichen des Spitzenstroms in ms. Die Werte im Einzelnen betragen für den Wildtyp  $12,77 \pm 0,34$  ms ( $n = 10$ ), für die Mutante G628S  $13,82 \pm 0,91$  ms ( $n = 7$ ) und für die Coexpression  $11,22 \pm 0,89$  ms ( $n = 10$ ). Signifikante Unterschiede in der Latenzzeit sind nicht gegeben (n.s. für nicht signifikant).

### 3.2.2 Vergleich der Ganzzellströme während Aktivierung und Inaktivierung (Abb. 3.2.2)

**Abb. 3.2.2 A** zeigt die qualitative Analyse der spannungsabhängigen Gleichgewichtsaktivierung von Wildtyp, G628S und Coexpression (**Messprotokoll II, Kap. 2.5.5**). Wildtyp und Coexpression zeigen typische, für den Kanal charakteristische Ströme, wohingegen die Mutante atypische Ströme zeigt, möglicherweise durch das Auftreten endogener Ströme. Wildtyp und Coexpression sehen gleich aus, jedoch sind die Ströme der Coexpression kleiner als die des Wildtyps. Die quantitative Auswertung erfolgt in **Abb. 3.2.3 A**.

Die Darstellung der instantanen Aktivierung des Wildtyps, der Mutante G628S und der Coexpression, in **Abb. 3.2.2 B** gezeigt, wurde wieder unter der Verwendung von **Messprotokoll III (Kap. 2.5.5)** durchgeführt. Der Wildtyp zeigt wiederum die für dieses Messprotokoll typischen Registrierungen. Die Ströme der Coexpression sind ungefähr um ein Drittel kleiner als die des Wildtyps. Offensichtliche Unterschiede in der Kinetik sind nicht zu erkennen.



**Abb. 3.2.2:** Vergleich der Ganzzellströme der Punktmutation G628S während der Aktivierung und Inaktivierung.

**A** Fließgleichgewichts-Aktivierung von WT, G628S und WT+G628S unter Verwendung von Messprotokoll II. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.2.3 A. **B** Instantane Aktivierung von WT und WT+G628S unter Verwendung von Messprotokoll III. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.2.3 B. **C** Schnelle Inaktivierung von WT und WT+G628S unter Verwendung von Messprotokoll IV. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.2.3 C.

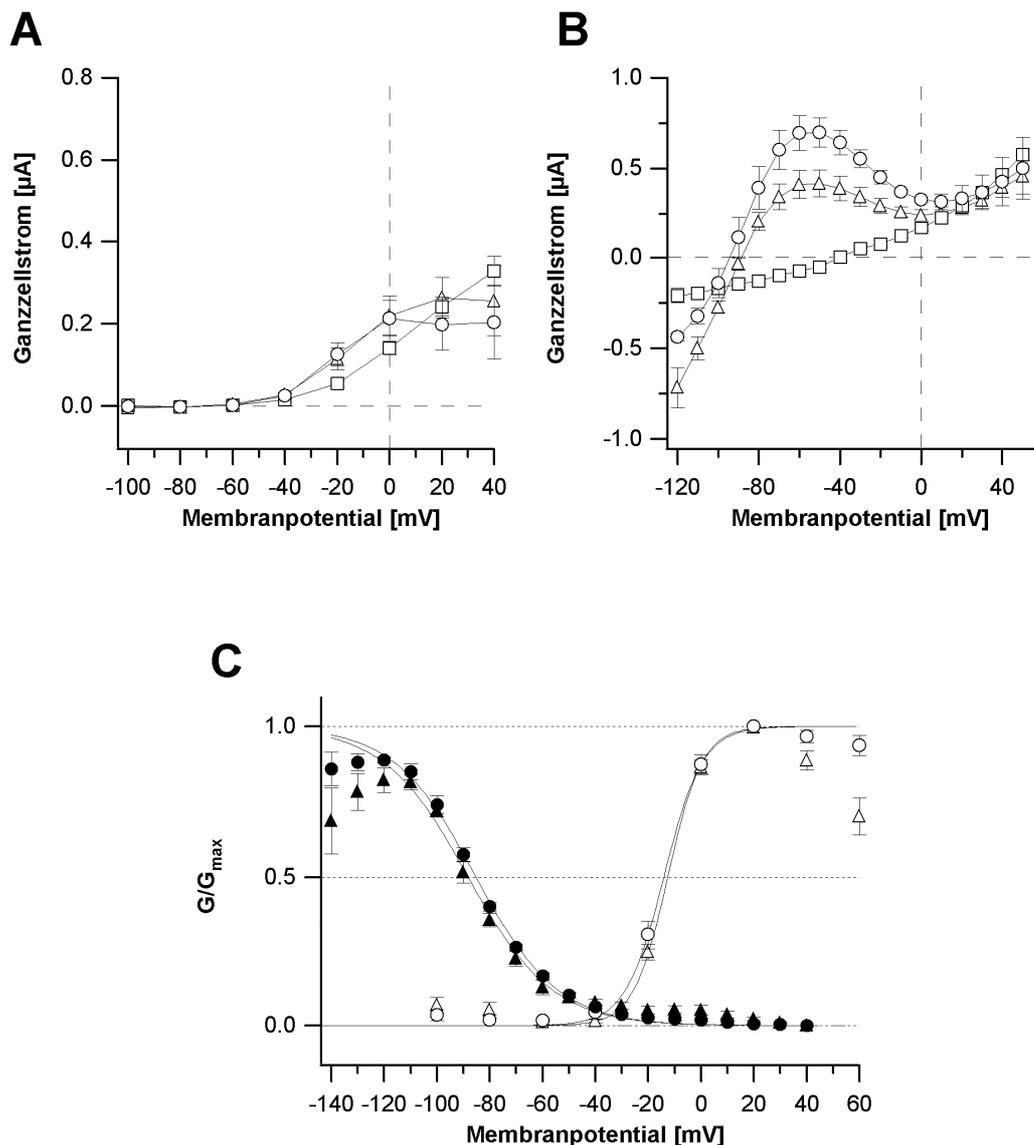
Die instantane Aktivierung der Mutante zeigt eher uncharakteristische Registrierungen.

**Abb. 3.2.2 C** vergleicht die spannungsabhängige Gleichgewichtsinaktivierung von Wildtyp und Coexpression miteinander (**Messprotokoll IV, Kap. 2.5.5**). Wildtyp und Coexpression zeigen beide für den Kanal typische Ströme, wobei die der Coexpression um in etwa ein Drittel kleiner sind. Da die Mutante keine Ströme generiert, kann auch keine schnelle Inaktivierung aufgezeichnet werden. Die Analyse der Spannungsabhängigkeit erfolgt in der **Abb. 3.2.3 C**.

### **3.2.3 Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften (Abb. 3.2.3)**

Aus der Analyse von Ganzzellströmen wie in **Abb. 3.2.2 A** dargestellt, wurden die im Gleichgewicht gemessenen und gemittelten Ströme von Wildtyp ( $\circ$ ,  $n = 3$ ), Mutante ( $\square$ ,  $n = 3$ ) und Coexpression ( $\triangle$ ,  $n = 8$ ) gegen das entsprechende Testpulsopotential aufgetragen (**Kap. 2.5.5**). Ab  $-50$  mV zeigt der Wildtyp eine spannungsabhängige Zunahme des Stroms gegenüber der Mutante, wohingegen die Coexpression nur eine sehr geringe Zunahme zeigt, was an dem relativ hohen nicht-hERG-charakteristischen Grundstrom liegt. Der größte Unterschied zwischen Wildtyp / Mutante ( $\Delta = 0,073 \mu\text{A}$ ) und Coexpression / Mutante ( $\Delta = 0,079 \mu\text{A}$ ) liegt bei  $0$  mV. Der Wildtyp zeigt hier  $0,213 \mu\text{A}$ , die Mutante  $0,140 \mu\text{A}$  und die Coexpression  $0,219 \mu\text{A}$ . Bis  $40$  mV steigen die Stromspuren aller drei Ansätze weiter an.

Aus der Analyse von **Abb. 3.2.2 B**, die die Membranströme über die Zeit zeigt, wurden nun für **Abb. 3.2.3 B** alle Datenpunkte von Wildtyp ( $\circ$ ) und Coexpression ( $\triangle$ ) gemittelt und daraus dieser Graph für die instantane Aktivierung erstellt. Bei  $-60$  mV ist der Unterschied zwischen Wildtyp / Mutante ( $\Delta = 0,769 \mu\text{A}$ ) und Coexpression / Mutante ( $\Delta = 0,484 \mu\text{A}$ ) am größten. Hier beträgt der Wert des Wildtyps  $0,695 \mu\text{A}$ , der der Mutante  $-0,074 \mu\text{A}$  sowie der der Coexpression  $0,41 \mu\text{A}$ .



**Abb. 3.2.3:** Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der Punktmutation G628S.

**A** Vergleich der Strom-Spannungskennlinien im Fließgleichgewicht von WT (○, n = 3), G628S (□, n = 3) und WT+G628S (△, n = 8) (Messprotokoll II). **B** Vergleich der instantanen Strom-Spannungskennlinien von WT (○; n = 2), G628S (□, n = 3) und WT+G628S (△, n = 6) (Messprotokoll III). **C** Spannungsabhängigkeit der isochronalen Aktivierung (Messprotokoll II) und Inaktivierung (Messprotokoll IV) von WT und WT+G628S. Ermittelte Parameter der Aktivierung für WT (○):  $v_{1/2} = -14,1 \pm 1,8$  mV,  $k = 7,3 \pm 0,2$  mV, n = 3; für WT+G628S (△):  $v_{1/2} = -12,6 \pm 1,0$  mV,  $k = 6,5 \pm 0,5$  mV, n = 7. Parameter der Inaktivierung für WT (●):  $v_{1/2} = -85,2 \pm 1,1$  mV,  $k = -15,5 \pm 1,1$  mV, n = 3; für WT+G628S (▲):  $v_{1/2} = -88,2 \pm 1,5$  mV,  $k = -16,0 \pm 1,8$  mV, n = 5. Zur Anpassung der Ausgleichskurven an die Werte wurde eine Boltzmann-Funktion verwendet (**Gleichung 3**).

Zwischen -120 mV und -90 mV zeigen Wildtyp und Coexpression ihren einwärtsrektifizierenden Charakter mit negativen Ganzzellstromwerten. Der Graph, der eine Auswertung der Abbildungen 3.2.2 C und 3.2.3 A darstellt, wird

nun in **Abb. 3.2.3 C** gezeigt. Er stellt die Spannungsabhängigkeit der isochronalen Aktivierung (aus **Abb. 3.2.3 A**) und Inaktivierung (aus **Abb. 3.2.2 C**) von Wildtyp (○ bzw. ●) und Coexpression (△ bzw. ▲) dar. Zur Anpassung der Ausgleichskurven wurde wieder eine Boltzmann-Funktion (**Gleichung 3, Kap. 2.5.5**) verwendet. Die ermittelten Parameter der Aktivierung für den Wildtyp (○) sind:  $v_{1/2} = -14,1 \pm 1,8$  mV,  $k = 7,3 \pm 0,2$  mV,  $n = 3$ ; für die Coexpression (△):  $v_{1/2} = -12,6 \pm 1,0$  mV,  $k = 6,5 \pm 0,5$  mV,  $n = 7$ . Die Parameter der Inaktivierung für den Wildtyp (●) sind:  $v_{1/2} = -85,2 \pm 1,1$  mV,  $k = -15,5 \pm 1,1$  mV,  $n = 3$ ; für die Coexpression (▲):  $v_{1/2} = -88,2 \pm 1,5$  mV,  $k = -16,0 \pm 1,8$  mV,  $n = 5$ . Sowohl bei der Aktivierung als auch bei der Inaktivierung zeigt die Mutante G628S in der Coexpression im Vergleich zum Wildtyp weder eine Links- noch eine Rechts-Verschiebung.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Mutante G628S keinen Strom leitet und dass die Coexpression mit 97,8% quasi genauso viel Strom leitet wie der Wildtyp. Der Vergleich der Gleichgewichts-Aktivierungs-Membranströme zeigt typische hERG-charakteristische Ströme von Wildtyp und Coexpression, wobei der Wildtyp Ströme größeren Ausmaßes zeigt. Die Ströme der Mutante sind atypisch, weil sie keinen Strom leitet und somit eventuell vorhandene endogene Ströme sichtbar werden. Die Registrierungen der instantanen Aktivierung sind sowohl beim Wildtyp als auch bei der Coexpression hERG-typisch, die der Coexpression in etwa ein Drittel kleiner als die des Wildtyps. Die Mutante zeigt keine hERG-typischen Registrierungen. Die Registrierungen der Gleichgewichts-Inaktivierung sind sowohl beim Wildtyp als auch bei der Coexpression hERG-typisch, die der Coexpression sind um etwa ein Drittel kleiner als die des Wildtyps. Die größten Unterschiede zwischen Wildtyp, Mutante und Coexpression liegen bei der Gleichgewichts-Aktivierung bei 0 mV, bei der instantanen Aktivierung bei -60 mV. Zwischen -90 mV und -120 mV zeigen Wildtyp und Coexpression ihren einwärtsrektifizierenden Charakter. Bei der Aktivierung und Inaktivierung zeigen sich keine Links- oder Rechtsverschiebungen der Kurven der Coexpression in Bezug auf den Wildtyp. Es gibt es keine Veränderungen in der Ansprechbarkeit der Aktivierung und Inaktivierung.

### 3.3 Punktmutation K638Q in der Porenregion

Die Mutation K638Q, bei der Lysin durch Glutamin an der Position 638 ausgetauscht ist, befindet sich in S6 der Porenregion des hERG-Kanals.

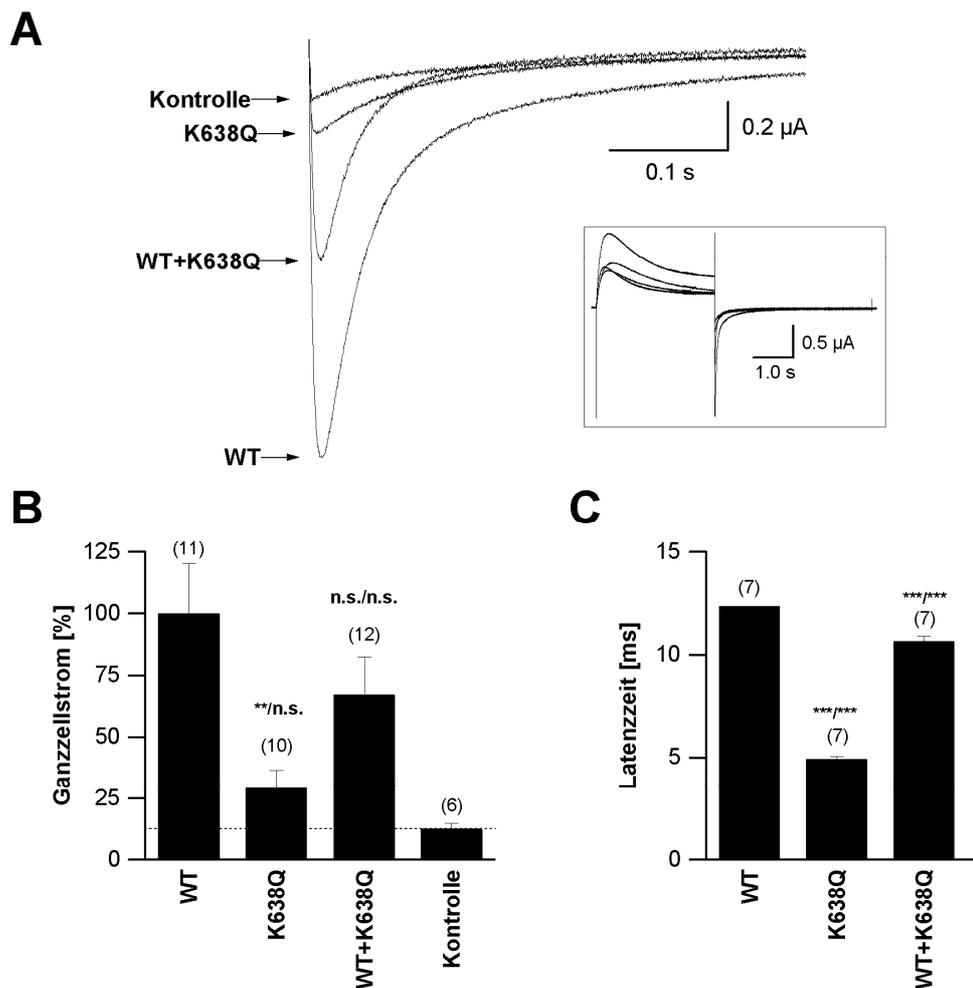
#### 3.3.1 Analyse der Ganzzellströme nach Hyperpolarisation (Abb. 3.3.1)

Es wurden wieder fünf Registrierungen der Spitzenströme (**Messprotokoll I, Kap. 2.5.5**) nacheinander aufgezeichnet. Die gemittelten Registrierungen von Wildtyp, K638Q, Coexpression und Kontrolle zeigt Teil **A** übereinander liegend. Es ist auf einen Blick ersichtlich, dass die Mutante einen deutlich geringeren Spitzenstrom zeigt, der im Bereich der Kontrolle liegt. Die Coexpression zeigt in etwa halb so viel Strom wie der Wildtyp.

Die quantitative Analyse ist in Teil **B** der Abbildung dargestellt. Die Werte im Einzelnen betragen für den Wildtyp  $100 \pm 20,11\%$  ( $I = -1,47 \mu\text{A}$ ,  $n = 11$ ), für die Mutante K638Q  $25,01 \pm 7,32\%$  ( $I = -0,32 \mu\text{A}$ ,  $n = 10$ ), für die Coexpression  $67,02 \pm 15,18\%$  ( $I = -0,98 \mu\text{A}$ ,  $n = 12$ ) und für die Kontrolle  $18,2 \pm 2,35\%$  ( $I = -0,27 \mu\text{A}$ ,  $n = 6$ ).

Der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante zeigt laut ANOVA-Test eine mittlere Signifikanz ( $<0,01$ , \*\*), zwischen Wildtyp und Coexpression sowie zwischen Mutante und Coexpression besteht kein signifikanter Unterschied (n.s.). Der Wert der Mutante liegt mit 25,01% etwas höher als der der Kontrolle mit 18,2%. Die Coexpression generiert mit 67,02% etwas mehr als die Hälfte des Stroms des Wildtyps.

Das Balkendiagramm in Teil **C** der Abbildung vergleicht die Latenzzeiten von Wildtyp, K638Q und Coexpression. Die Werte im Einzelnen betragen für den Wildtyp  $12,36 \pm 0,004 \text{ ms}$  ( $n = 7$ ), für die Mutante K638Q  $4,92 \pm 0,13 \text{ ms}$  ( $n = 7$ ) und für die Coexpression  $10,66 \pm 0,23 \text{ ms}$  ( $n = 7$ ). Es bestehen hohe signifikante Unterschiede in der Latenzzeit sowohl zwischen Wildtyp und Mutante, als auch zwischen Wildtyp und Coexpression und zwischen Mutante und Coexpression ( $<0,001$ ; \*\*\*). Die Latenzzeit der Mutante ist hier mit 4,92 ms auffällig stark verkürzt.



**Abb. 3.3.1:** Darstellung und Analyse der Ströme nach Hyperpolarisation der Punktmutation K638Q.

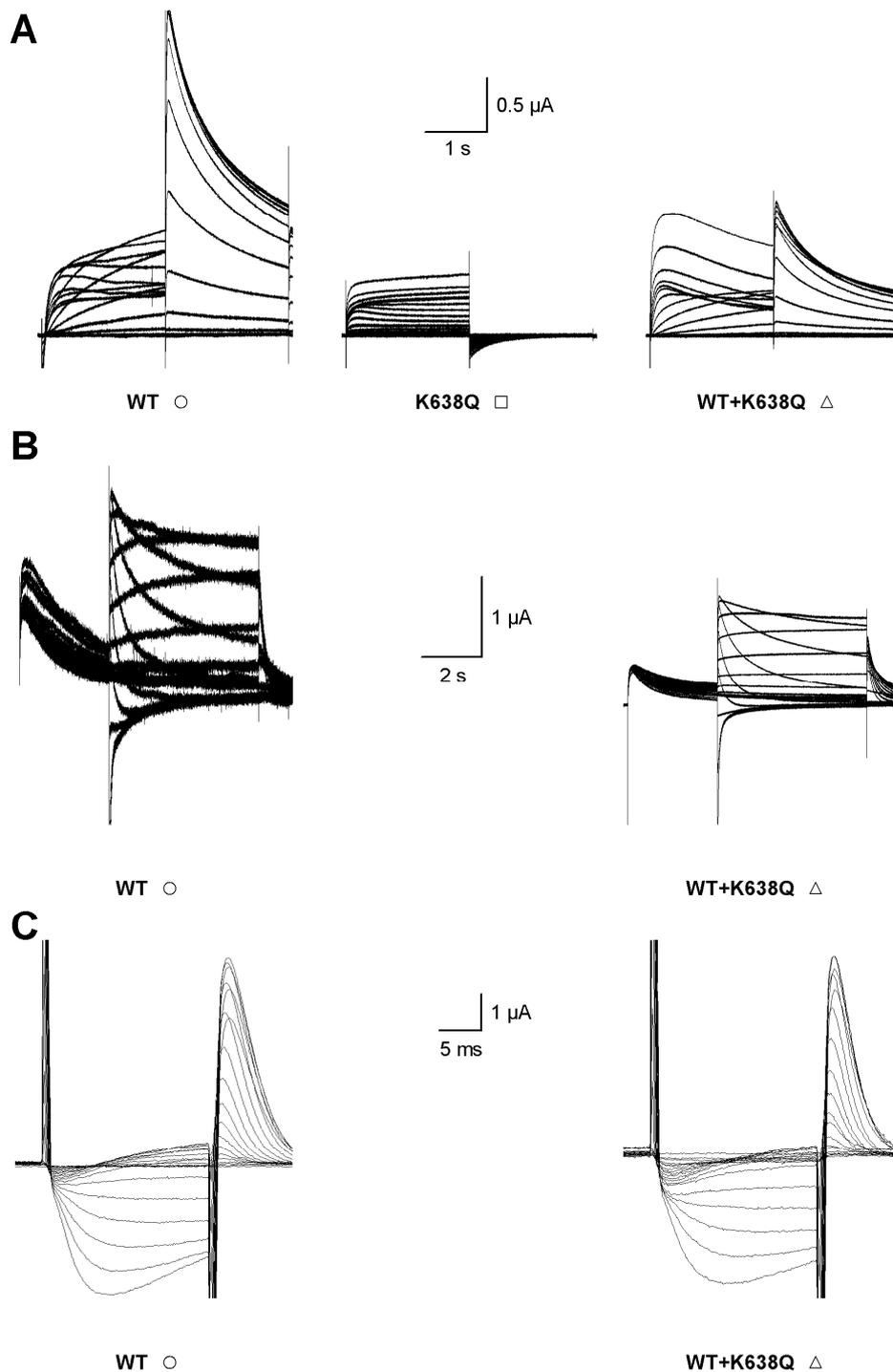
**A** Vergleich auf den WT normierter *tail*-Ströme von WT, K638Q, WT+K638Q und nicht injizierter Oozyten (Kontrolle). Dargestellt ist ein vergrößerter Ausschnitt. Der Kasten zeigt die komplette Registrierung unter Verwendung von Messprotokoll I (**Kap. 2.5.5**). **B** Analyse der Spitzenströme von WT, K638Q, WT+K638Q und Kontrolle. Die Werte wurden auf den WT normiert. WT =  $100 \pm 20,11\%$  ( $-1,47 \mu$ A); K638Q =  $25,01 \pm 7,32\%$  ( $-0,32 \mu$ A); WT+K638Q =  $67,02 \pm 15,18\%$  ( $-0,98 \mu$ A) und Kontrolle =  $18,2 \pm 2,35\%$  ( $-0,27 \mu$ A). Unterschiede sind nicht gegeben (n.s.), bzw. zwischen WT und Mutante mäßig signifikant ( $<0,01$ ) (**Kap. 2.5.6**). Die Zahlen in Klammern über den Balken geben die Anzahl (n) der gemessenen Oozyten an. **C** Analyse der Latenzzeit bis zum Spitzenstrom. WT =  $12,36 \pm 0,004$  ms; K638Q =  $4,92 \pm 0,13$  ms; WT+K638Q =  $10,66 \pm 0,23$  ms. Die Unterschiede in der Latenzzeit zeigen hohe Unterschiede zwischen WT und Mutante, WT und Coexpression und zwischen Mutante und Coexpression ( $<0,001$ ) (**Kap. 2.5.6**). Die Zahlen in Klammern über den Balken zeigen die Anzahl (n) der gemessenen Oozyten an.

### 3.3.2 Vergleich der Ganzzellströme während Aktivierung und Inaktivierung (Abb. 3.3.2)

**Abb. 3.3.2 A** zeigt die qualitative Analyse der spannungsabhängigen Gleichgewichtsaktivierung von Wildtyp, K638Q und Coexpression (**Messprotokoll II, Kap. 2.5.5**). Wildtyp und Coexpression zeigen für den Kanal charakteristische Ströme, wohingegen die Mutante atypische Ströme zeigt, möglicherweise durch das Auftreten endogener Ströme. Wildtyp und Coexpression sehen gleich aus, jedoch sind die Ströme der Coexpression um mehr als die Hälfte kleiner als die des Wildtyps. Die quantitative Auswertung erfolgt in **Abb. 3.3.3 A**.

Die Darstellung der instantanen Aktivierung des Wildtyps und der Coexpression (**Messprotokoll III, Kap. 2.5.5**) wird in **Abb. 3.3.2 B** gezeigt. Der Wildtyp zeigt wiederum die für dieses Messprotokoll typischen Registrierungen. Die Ströme der Coexpression sind ungefähr um die Hälfte kleiner als die des Wildtyps. Eine instantane Aktivierung der Mutante konnte aufgrund schlechter Abdichtungseigenschaften der Oozyten nicht gemessen werden.

**Abb. 3.3.2 C** vergleicht die spannungsabhängige Gleichgewichtsinaktivierung von Wildtyp und Coexpression (**Messprotokoll IV, Kap. 2.5.5**) miteinander. Wildtyp und Coexpression zeigen beide für den Kanal typische Ströme, wobei sich beide größtmäßig entsprechen. Da die Mutante keine Ströme generiert, kann auch keine schnelle Inaktivierung aufgezeichnet werden. Die Analyse der Spannungsabhängigkeit erfolgt in der **Abb. 3.3.3 C**.



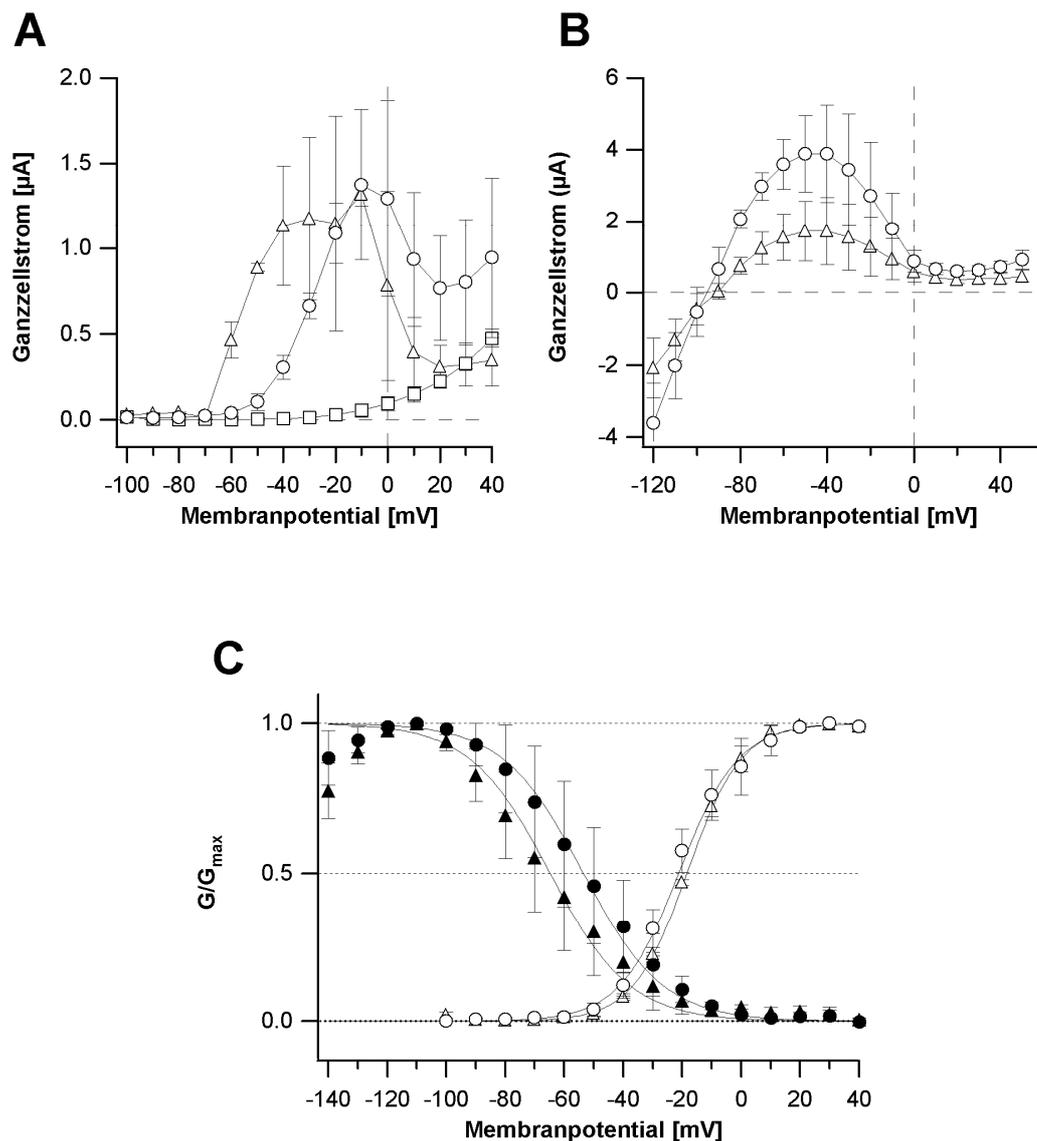
**Abb. 3.3.2:** Vergleich der Membranströme der Punktmutation K638Q während der Aktivierung und Inaktivierung.

**A** Fließgleichgewichts- Aktivierung von WT, K638Q und WT+K638Q unter Verwendung von Messprotokoll II. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.3.3 A. **B** Instantane Aktivierung von WT und WT+K638Q unter Verwendung von Messprotokoll III. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.3.3 B. **C** Schnelle Inaktivierung von WT und WT+K638Q unter Verwendung von Messprotokoll IV. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.3.3 C.

### 3.3.3 Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften (Abb. 3.3.3)

Aus der Analyse von Ganzzellströmen wie in **Abb. 3.3.2 A** dargestellt, wurden die im Gleichgewicht gemessenen und gemittelten Ströme von Wildtyp ( $\circ$ ,  $n = 3$ ), Mutante ( $\square$ ,  $n = 3$ ) und Coexpression ( $\triangle$ ,  $n = 3$ ) gegen das entsprechende Testpulspotential aufgetragen (**Kap. 2.5.5**). Ab -50 mV zeigt der Wildtyp eine spannungsabhängige Zunahme des Stroms gegenüber der Mutante, wobei die Coexpression nur eine vergleichbare Zunahme zeigt, die dem Wildtyp gegenüber leicht nach links versetzt ist (Zunahme ab -60 mV). Der größte Unterschied zwischen Wildtyp / Mutante ( $\Delta = 1,196 \mu\text{A}$ ) und Coexpression / Mutante ( $\Delta = 0,688 \mu\text{A}$ ) liegt bei 0 mV. Der Wildtyp zeigt hier  $1,292 \mu\text{A}$ , die Mutante  $0,096 \mu\text{A}$  und die Coexpression  $0,784 \mu\text{A}$ .

Aus der Analyse von **Abb. 3.3.2 B**, die die Membranströme über die Zeit zeigt, wurden nun für **Abb. 3.3.3 B** alle Datenpunkte von Wildtyp ( $\circ$ ) und Coexpression ( $\triangle$ ) gemittelt und daraus dieser Graph für die instantane Aktivierung erstellt. Bei -50 mV ist der Unterschied zwischen Wildtyp / Coexpression ( $\Delta = 2,138 \mu\text{A}$ ) am größten. Hier beträgt der Wert des Wildtyps  $3,888 \mu\text{A}$ , der der Coexpression  $1,715 \mu\text{A}$ . Zwischen -120 mV und -90 mV zeigen Wildtyp und Coexpression ihren einwärtsrektifizierenden Charakter mit negativen Ganzzellstromwerten. Der Graph, der eine Auswertung der Abbildungen **3.3.2 C** und **3.3.3 A** darstellt, wird nun in **Abb. 3.3.3 C** gezeigt. Er stellt die Spannungsabhängigkeit der isochronalen Aktivierung (aus **Abb. 3.3.3 A**) und Inaktivierung (aus **Abb. 3.3.2 C**) von Wildtyp ( $\circ$  bzw.  $\bullet$ ) und Coexpression ( $\triangle$  bzw.  $\blacktriangle$ ) dar. Zur Anpassung der Ausgleichskurven wurde wieder eine Boltzmann-Funktion (**Gleichung 3, Kap. 2.5.5**) verwendet. Die ermittelten Parameter der Aktivierung für den Wildtyp ( $\circ$ ) sind:  $v_{1/2} = -21,2 \pm 4,0 \text{ mV}$ ,  $k = 10,1 \pm 1,4 \text{ mV}$ ,  $n = 3$ ; für die Coexpression ( $\triangle$ ):  $v_{1/2} = -18,4 \pm 0,7 \text{ mV}$ ,  $k = 9,4 \pm 0,4 \text{ mV}$ ,  $n = 3$ . Die Parameter der Inaktivierung für den Wildtyp ( $\bullet$ ) sind:  $v_{1/2} = -53,5 \pm 12,2 \text{ mV}$ ,  $k = -13,6 \pm 1,4 \text{ mV}$ ,  $n = 2$ ; für die Coexpression ( $\blacktriangle$ ):  $v_{1/2} = -64,8 \pm 10,9 \text{ mV}$ ,  $k = -13,6 \pm 0,9 \text{ mV}$ ,  $n = 3$ .



**Abb. 3.3.3:** Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der Punktmutation K638Q.

**A** Vergleich der Strom-Spannungskennlinien im Fließgleichgewicht von WT (○, n = 3), K638Q (□, n = 3) und WT+K638Q (△, n = 3) (Messprotokoll II).

**B** Vergleich der instantanen Strom-Spannungskennlinien von WT (○, n = 3) und WT+K638Q (△, n = 3) (Messprotokoll III).

**C** Spannungsabhängigkeit der isochronalen Aktivierung (Messprotokoll II) und Inaktivierung (Protokoll IV) von WT und WT+K638Q. Ermittelte Parameter der Aktivierung für WT (○):  $v_{1/2} = -21,2 \pm 4,0$  mV,  $k = 10,1 \pm 1,4$  mV, n = 3; für WT+K638Q (△):  $v_{1/2} = -18,4 \pm 0,7$  mV,  $k = 9,4 \pm 0,4$  mV, n = 3. Parameter der Inaktivierung für WT (●):  $v_{1/2} = -53,5 \pm 12,2$  mV,  $k = -13,6 \pm 1,4$  mV, n = 2; für WT+K638Q (▲):  $v_{1/2} = -64,8 \pm 0,9$  mV,  $k = -13,6 \pm 0,9$  mV, n = 3. Zur Anpassung der Ausgleichskurven an die Werte wurde eine Boltzmann-Funktion verwendet (**Gleichung 3**).

Bei der Aktivierung gibt es keine Verschiebungen, bei der Inaktivierung zeigt die Mutante K638Q in der Coexpression im Vergleich zum Wildtyp eine Linksverschiebung um  $\Delta = 11,3$  mV.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Mutante K638Q keinen Strom leitet und dass die Coexpression mit 67,02% etwas mehr als 50% des Stroms leitet, den der Wildtyp zeigt. In der Latenzzeit fällt die mit 4,92 ms stark verkürzte Latenzzeit der Mutante auf. Der Vergleich der Gleichgewichts-Aktivierungs-Membranströme zeigt hERG-charakteristische Ströme von Wildtyp und Coexpression, wobei der Wildtyp Ströme größeren Ausmaßes zeigt. Die Ströme der Mutante sind atypisch, womöglich aufgrund des Auftretens endogener Ströme. Die Registrierungen der instantanen Aktivierung sind sowohl beim Wildtyp als auch bei der Coexpression hERG-typisch, die der Coexpression in etwa halb so groß wie die des Wildtyps. Die Registrierungen der Gleichgewichts-Inaktivierung sind sowohl beim Wildtyp als auch bei der Coexpression hERG-typisch; beide zeigen in etwa die gleiche Größe. Die größten Unterschiede zwischen Wildtyp, Mutante und Coexpression liegen bei der Gleichgewichts-Aktivierung bei 0 mV, bei der instantanen Aktivierung bei -50 mV. Zwischen -90 mV und -120 mV zeigen Wildtyp und Coexpression ihren einwärtsrektifizierenden Charakter. Bei der Aktivierung zeigen sich keine Verschiebungen; bei der Inaktivierung zeigt sich eine Linksverschiebung der Kurve der Coexpression in Bezug auf den Wildtyp. Es gibt es keine Veränderungen in der Ansprechbarkeit der Aktivierung sowie Inaktivierung.

### 3.4 Punktmutation R1055Q am C-Terminus

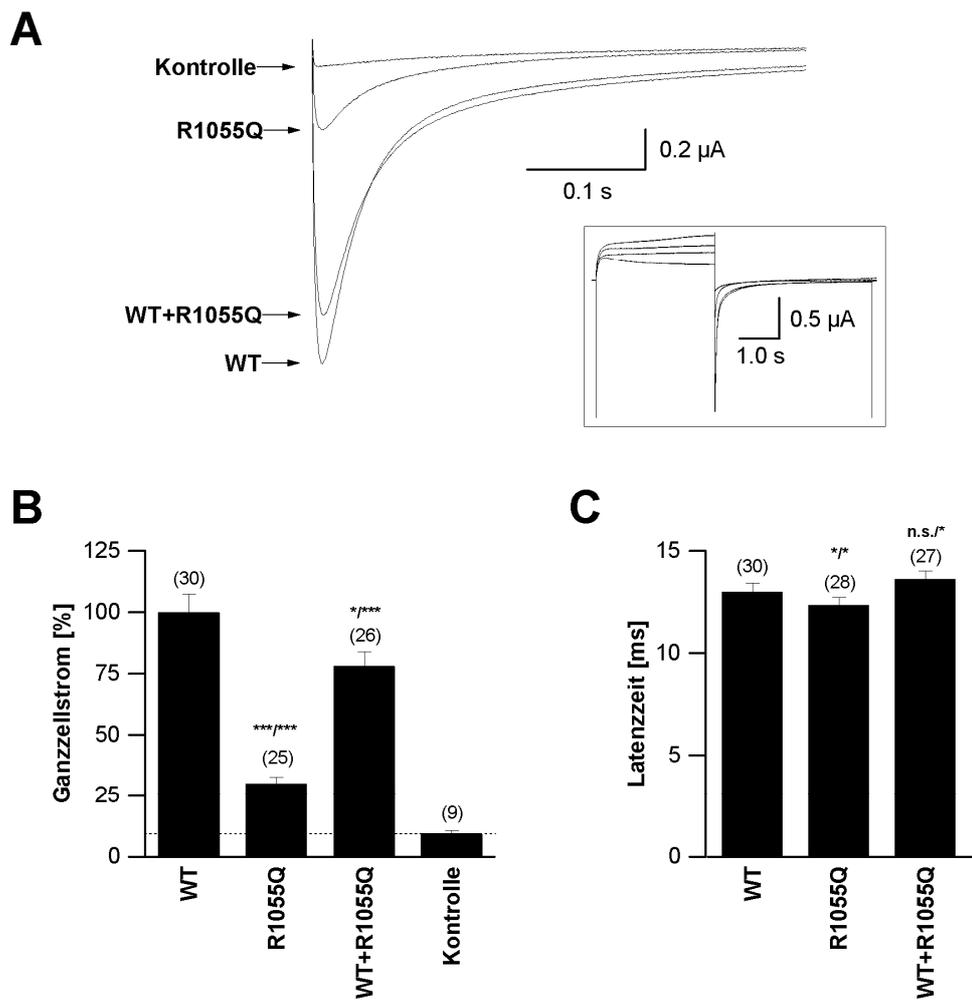
Die Mutation R1055Q, bei der Arginin durch Glutamin an der Position 1055 ausgetauscht ist, befindet sich am C-terminalen Ende des hERG-Kanals. Diese Punktmutation gilt klinisch als Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP im Exon 14) und wurde in der asiatischen Bevölkerung detektiert [47].

#### 3.4.1 Analyse der Ganzzellströme nach Hyperpolarisation (Abb. 3.4.1)

Es wurden wieder fünf Registrierungen des Spitzenstroms nach **Messprotokoll I, Kap. 2.5.5** nacheinander aufgezeichnet. Die gemittelten Registrierungen von Wildtyp, R1055Q, Coexpression und Kontrolle überein-

ander liegend zeigt Teil **A**. Es wird direkt deutlich, dass die Mutante einen deutlich geringeren Spitzenstrom zeigt, in etwa ein Viertel des Wildtyps, einiges mehr als die Kontrolle. Die Coexpression nähert sich dem Wildtyp an. Die quantitative Analyse ist in Teil **B** dargestellt. Die Werte im Einzelnen betragen für den Wildtyp  $100 \pm 7,44\%$  ( $I = -1,85 \mu\text{A}$ ,  $n = 30$ ), für die Mutante R1055Q  $29,97 \pm 2,66\%$  ( $I = -0,52 \mu\text{A}$ ,  $n = 25$ ), für die Coexpression  $78,22 \pm 15,85\%$  ( $I = -1,38 \mu\text{A}$ ,  $n = 26$ ) und für die Kontrolle  $9,4 \pm 1,18\%$  ( $I = -0,33 \mu\text{A}$ ,  $n = 9$ ). Der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante sowie zwischen Mutante und Coexpression zeigt laut ANOVA-Test eine hohe Signifikanz ( $<0,001$ , \*\*\*); zwischen Wildtyp und Coexpression besteht ein Unterschied von geringerer Signifikanz ( $<0,05$ , \*). Der Wert der Kontrolle ist mit 9,4% sehr niedrig, dagegen mutet der Wert der Mutante mit 29,97% sehr hoch an. Daher erklären sich wohl auch die hohen 78,22% der Coexpression.

Das Balkendiagramm in Teil **C** vergleicht die Latenzzeiten von Wildtyp, R1055Q und Coexpression. Die Werte im Einzelnen betragen für den Wildtyp  $13,39 \pm 0,44 \text{ ms}$  ( $n = 30$ ), für die Mutante R1055Q  $12,64 \pm 0,39 \text{ ms}$  ( $n = 28$ ) und für die Coexpression  $13,82 \pm 0,41 \text{ ms}$  ( $n = 27$ ). Es bestehen gering signifikante Unterschiede in der Latenzzeit sowohl zwischen Wildtyp und Mutante, als auch zwischen Mutante und Coexpression ( $<0,05$ , \*). Zwischen Wildtyp und Coexpression besteht kein signifikanter Unterschied (n.s.).



**Abb. 3.4.1:** Darstellung und Analyse der Ströme nach Hyperpolarisation der C-terminalen Punktmutation R1055Q.

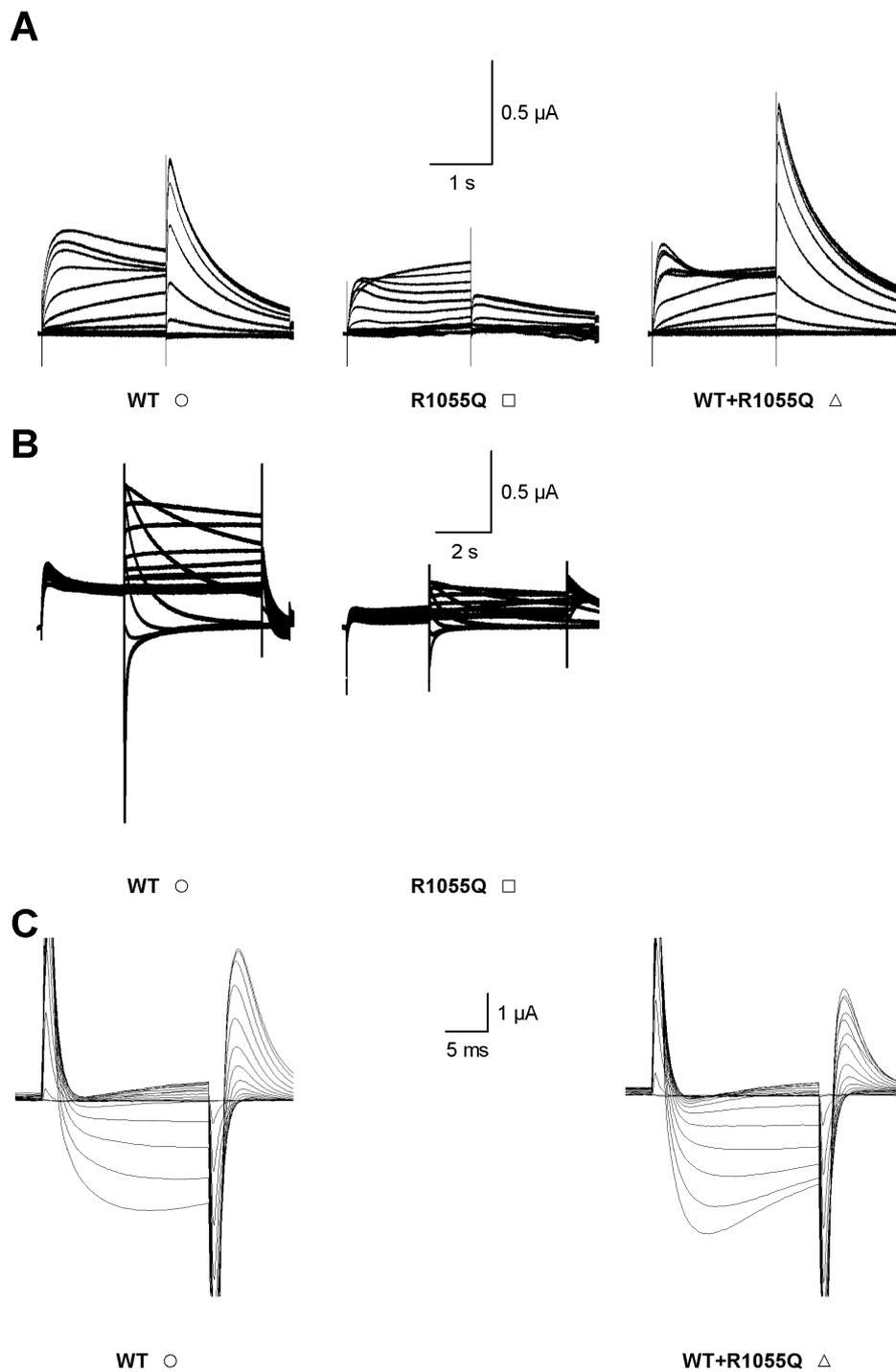
**A** Vergleich auf den WT normierter *tail*-Ströme von WT, R1055Q, WT+R1055Q und nicht injizierter Oozyten (Kontrolle). Dargestellt ist ein vergrößerter Ausschnitt. Der Kasten zeigt die komplette Registrierung unter Verwendung von Messprotokoll I (**Kap. 2.5.5**). **B** Analyse der Spitzenströme von WT, R1055Q, WT+R1055Q und Kontrolle. Die Werte wurden auf den WT normiert. WT =  $100 \pm 7,44\%$  ( $-1,85 \mu$ A); R1055Q =  $29,97 \pm 2,66\%$  ( $-0,52 \mu$ A); WT+R1055Q =  $78,22 \pm 5,85\%$  ( $-1,38 \mu$ A) und Kontrolle =  $9,4 \pm 1,18\%$  ( $-0,33 \mu$ A). Der Unterschied zwischen WT und Mutante sowie Mutante zur Coexpression zeigt eine hohe Signifikanz ( $<0,001$ ). Zwischen WT und Coexpression zeigt der Unterschied eine geringe Signifikanz ( $<0,05$ ) (**Kap. 2.5.6**). Die Zahlen in Klammern über den Balken geben die Anzahl (n) der gemessenen Oozyten an. **C** Analyse der Latenzzeit bis zum Spitzenstrom. WT =  $13,39 \pm 0,44$  ms; R1055Q =  $12,64 \pm 0,38$  ms; WT+R1055Q =  $13,82 \pm 0,41$  ms. Die Unterschiede in der Latenzzeit sind nicht gegeben (n.s.), bzw. nur gering signifikant ( $<0,05$ ) (**Kap. 2.5.6**). Die Zahlen in Klammern über den Balken zeigen die Anzahl (n) der gemessenen Oozyten an.

### 3.4.2 Vergleich der Ganzzellströme während Aktivierung und Inaktivierung (Abb. 3.4.2)

**Abb. 3.4.2 A** zeigt die qualitative Analyse der spannungsabhängigen Gleichgewichtsaktivierung von Wildtyp, R1055Q und Coexpression (**Messprotokoll II, Kap. 2.5.5**). Wildtyp, Mutante und Coexpression zeigen hERG-Kanal-charakteristische Ströme, wobei die Größe der Ströme in der Reihenfolge Coexpression, Wildtyp und Mutante abnimmt. Die quantitative Auswertung erfolgt in **Abb. 3.4.3 A**.

Die Darstellung der instantanen Aktivierung des Wildtyps und der Mutante (**Messprotokoll III, Kap. 2.5.5**) erfolgt in Teil **B**. Der Wildtyp zeigt wiederum die für dieses Messprotokoll typischen Registrierungen. Die Ströme der Mutante sind ungefähr um zwei Drittel kleiner als die des Wildtyps. Eine instantane Aktivierung der Coexpression konnte aufgrund schlechter Abdichtungseigenschaften der Oozyten nicht gemessen werden.

**Abb. 3.4.2 C** vergleicht die spannungsabhängige Gleichgewichtsinaktivierung von Wildtyp und Coexpression miteinander (**Messprotokoll IV, Kap. 2.5.5**). Wildtyp und Coexpression zeigen beide für den Kanal typische Ströme, wobei die Ströme der Coexpression in etwa zwei Drittel der Größe des Wildtyps entsprechen. Da die Mutante keine Ströme generiert, kann auch keine schnelle Inaktivierung aufgezeichnet werden. Die Analyse der Spannungsabhängigkeit erfolgt in **Abb. 3.4.3 C**.



**Abb. 3.4.2:** Vergleich der Ganzzellströme der Punktmutation R1055Q während der Aktivierung und Inaktivierung.

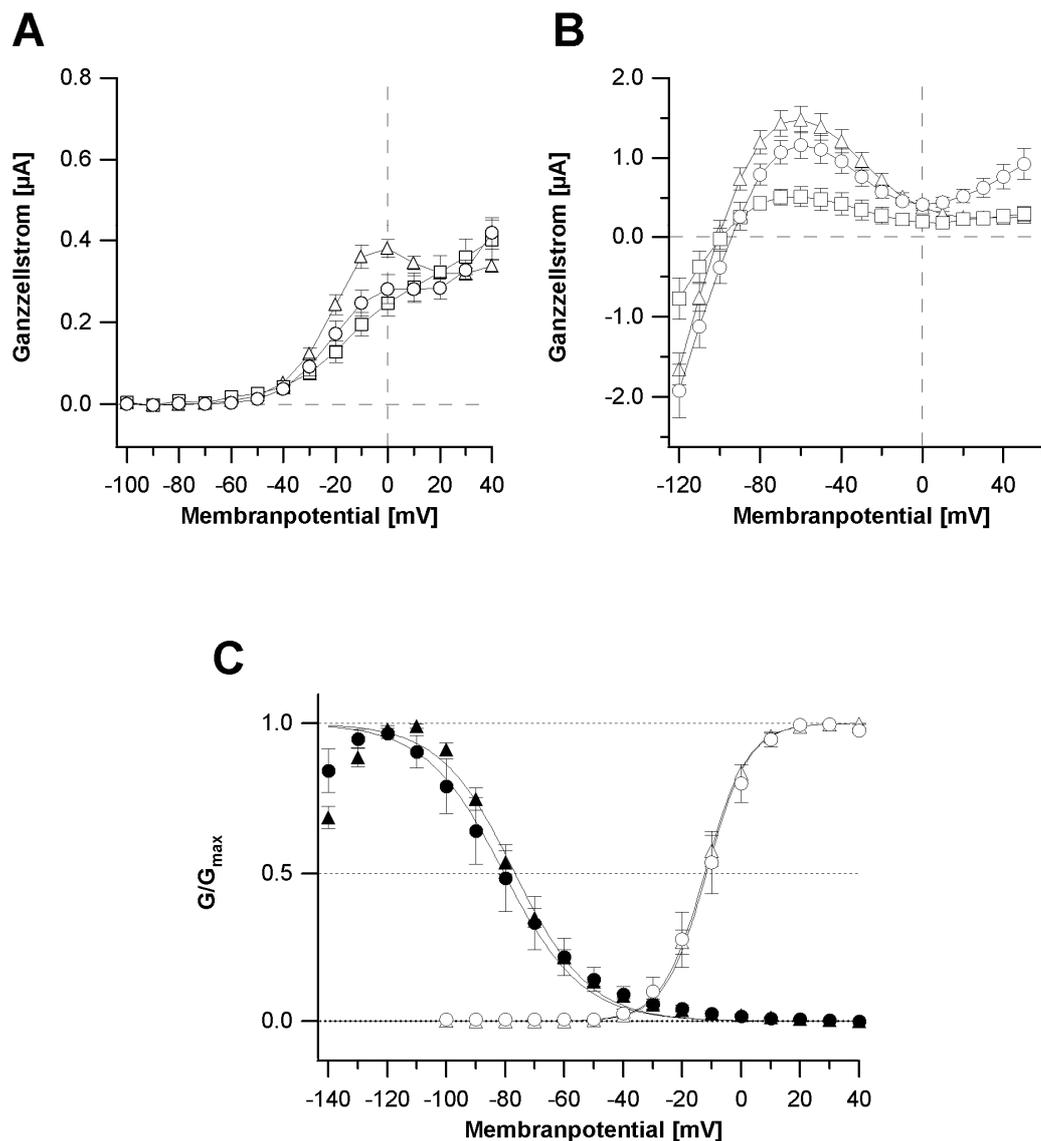
**A** Fließgleichgewichts-Aktivierung von WT, R1055Q und WT+R1055Q unter Verwendung von Messprotokoll II. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.4.3 A. **B** Instantane Aktivierung von WT und WT+R1055Q unter Verwendung von Messprotokoll III. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.4.3 B. **C** Schnelle Inaktivierung von WT und WT+R1055Q unter Verwendung von Messprotokoll IV. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.4.3 C.

### 3.4.3 Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften (Abb. 3.4.3)

Aus der Analyse von Ganzzellströmen wie in **Abb. 3.4.2 A** dargestellt, wurden die im Gleichgewicht gemessenen und gemittelten Ströme von Wildtyp ( $\circ$ ,  $n = 5$ ), Mutante ( $\square$ ,  $n = 5$ ) und Coexpression ( $\triangle$ ,  $n = 5$ ) gegen das entsprechende Testpulspotential aufgetragen (**Kap. 2.5.5**). Ab -50 mV zeigt der Wildtyp eine spannungsabhängige Zunahme des Stroms gegenüber der Mutante, wobei die Coexpression eine vergleichsweise größere Zunahme zeigt. Der größte Unterschied zwischen Wildtyp / Mutante ( $\Delta = 0,113 \mu\text{A}$ ) und Coexpression / Mutante ( $\Delta = 0,165 \mu\text{A}$ ) liegt bei -10 mV. Der Wildtyp zeigt hier  $0,247 \mu\text{A}$ , die Mutante  $0,36 \mu\text{A}$  und die Coexpression  $0,195 \mu\text{A}$ .

Aus der Analyse von **Abb. 3.4.2 B**, die die Membranströme über die Zeit zeigt, wurden nun für **Abb. 3.4.3 B** alle Datenpunkte von Wildtyp ( $\circ$ ,  $n = 5$ ), Mutante ( $\square$ ,  $n = 5$ ) und Coexpression ( $\triangle$ ,  $n = 5$ ) gemittelt und daraus dieser Graph für die instantane Aktivierung erstellt. Die glockenförmige Kurve der Coexpression liegt höher als die des Wildtyps. Die Mutante macht keine nennenswerten Aktivierungsströme. Bei -60 mV ist der Unterschied zwischen Wildtyp / Coexpression ( $\Delta = 0,352 \mu\text{A}$ ) und Mutante / Coexpression ( $\Delta = 0,97 \mu\text{A}$ ) am größten. Hier beträgt der Wert des Wildtyps  $0,158 \mu\text{A}$ , der der Mutante  $0,51 \mu\text{A}$  und der der Coexpression  $1,48 \mu\text{A}$ . Zwischen -120 mV und -90 mV zeigen Wildtyp und Coexpression ihren einwärtsrektifizierenden Charakter mit negativen Ganzzellstromwerten.

Der Graph, der eine Auswertung der Abbildungen **3.4.2 C** und **3.4.3 A** darstellt, wird nun in **Abb. 3.4.3 C** gezeigt. Er stellt die Spannungsabhängigkeit der isochronalen Aktivierung (aus **Abb. 3.4.3 A**) und Inaktivierung (aus **Abb. 3.4.2 C**) von Wildtyp ( $\circ$  bzw.  $\bullet$ ) und Coexpression ( $\triangle$  bzw.  $\blacktriangle$ ) dar. Zur Anpassung der Ausgleichskurven wurde wieder eine Boltzmann-Funktion (**Gleichung 3, Kap. 2.5.5**) verwendet.



**Abb. 3.4.3:** Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der C-terminalen Punktmutation R1055Q.

**A** Vergleich der Strom-Spannungskennlinien im Fließgleichgewicht von WT (○, n = 5), R1055Q (□, n = 5) und WT+R1055Q (△, n = 5) (Messprotokoll II). **B** Vergleich der instantanen Strom-Spannungskennlinien von WT (○, n = 5), R1055Q (□, n = 5) und WT+R1055Q (△, n = 5) (Messprotokoll III). **C** Spannungsabhängigkeit der isochronalen Aktivierung (Messprotokoll II) und Inaktivierung (Messprotokoll IV) von WT und WT+R1055Q. Ermittelte Parameter der Aktivierung für WT (○):  $v_{1/2} = -11,8 \pm 3,5$  mV,  $k = 7,1 \pm 0,2$  mV, n = 5; für WT+R1055Q (△):  $v_{1/2} = -12,4 \pm 1,5$  mV,  $k = 7,2 \pm 0,2$  mV, n = 5. Parameter der Inaktivierung für WT (●):  $v_{1/2} = -80,4 \pm 6,4$  mV,  $k = -13,3 \pm 0,5$  mV, n = 5; für WT+R1055Q (▲):  $v_{1/2} = -76,7 \pm 2,0$  mV,  $k = -12,7 \pm 0,7$  mV, n = 5. Zur Anpassung der Ausgleichskurven an die Werte wurde eine Boltzmann-Funktion verwendet (**Gleichung 3**).

Die ermittelten Parameter der Aktivierung für den Wildtyp (○) sind:  $v_{1/2} = -11,8 \pm 3,5$  mV,  $k = 7,1 \pm 0,2$  mV, n = 5; für die Coexpression (△):  $v_{1/2} = -12,4 \pm 1,5$  mV,  $k = 7,2 \pm 0,2$  mV, n = 5. Die Parameter der Inaktivierung für den

Wildtyp (●) sind:  $v_{1/2} = -80,4 \pm 6,4$  mV,  $k = -13,3 \pm 0,5$  mV,  $n = 5$ ; für die Coexpression (▲):  $v_{1/2} = -76,7 \pm 2,0$  mV,  $k = -12,7 \pm 0,7$  mV,  $n = 5$ . Bei der Aktivierung gibt es keine Verschiebungen, bei der Inaktivierung zeigt die Mutante R1055Q in der Coexpression im Vergleich zum Wildtyp eine kleine Rechtsverschiebung um  $\Delta = 3,7$  mV.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Mutante R1055Q einen verhältnismäßig hohen Grundstrom aufweist und dass die Coexpression mit 78,22% mehr als drei Viertel des Stroms leitet, den der Wildtyp zeigt. In der Latenzzeit gibt es keine Auffälligkeiten. Der Vergleich der Gleichgewichts-Aktivierungs-Membranströme zeigt hERG-charakteristische Ströme von Wildtyp, Mutante und Coexpression, wobei die Coexpression Ströme größeren Ausmaßes zeigt, dann der Wildtyp, zuletzt die Mutante. Die Registrierungen der instantanen Aktivierung sind sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante hERG-typisch, die der Mutante in etwa ein Drittel so groß wie die des Wildtyps. Die Registrierungen der Gleichgewichts-Inaktivierung sind sowohl beim Wildtyp als auch bei der Coexpression hERG-typisch; letztere zeigt in etwa zwei Drittel der Größe der Wildtypströme. Die größten Unterschiede zwischen Wildtyp, Mutante und Coexpression liegen bei der Gleichgewichts-Aktivierung bei -10 mV, wobei die Coexpression höhere Ströme zeigt als der Wildtyp. Bei der instantanen Aktivierung liegt der größte Unterschied bei -60 mV, auch hier zeigt die Coexpression größere Ströme als der Wildtyp, die Mutante macht prinzipiell keinen Strom. Zwischen -90 mV und -120 mV zeigen Wildtyp und Coexpression ihren einwärtsrektifizierenden Charakter. Bei der Aktivierung zeigen sich keine Verschiebungen; bei der Inaktivierung zeigt sich eine kleine Rechtsverschiebung der Kurve der Coexpression in Bezug auf den Wildtyp um  $\Delta = 3,7$  mV. Es gibt es keine Veränderungen in der Ansprechbarkeit der Aktivierung bzw. Inaktivierung.

### 3.5 Abbruchmutation Q688X in der Porenregion

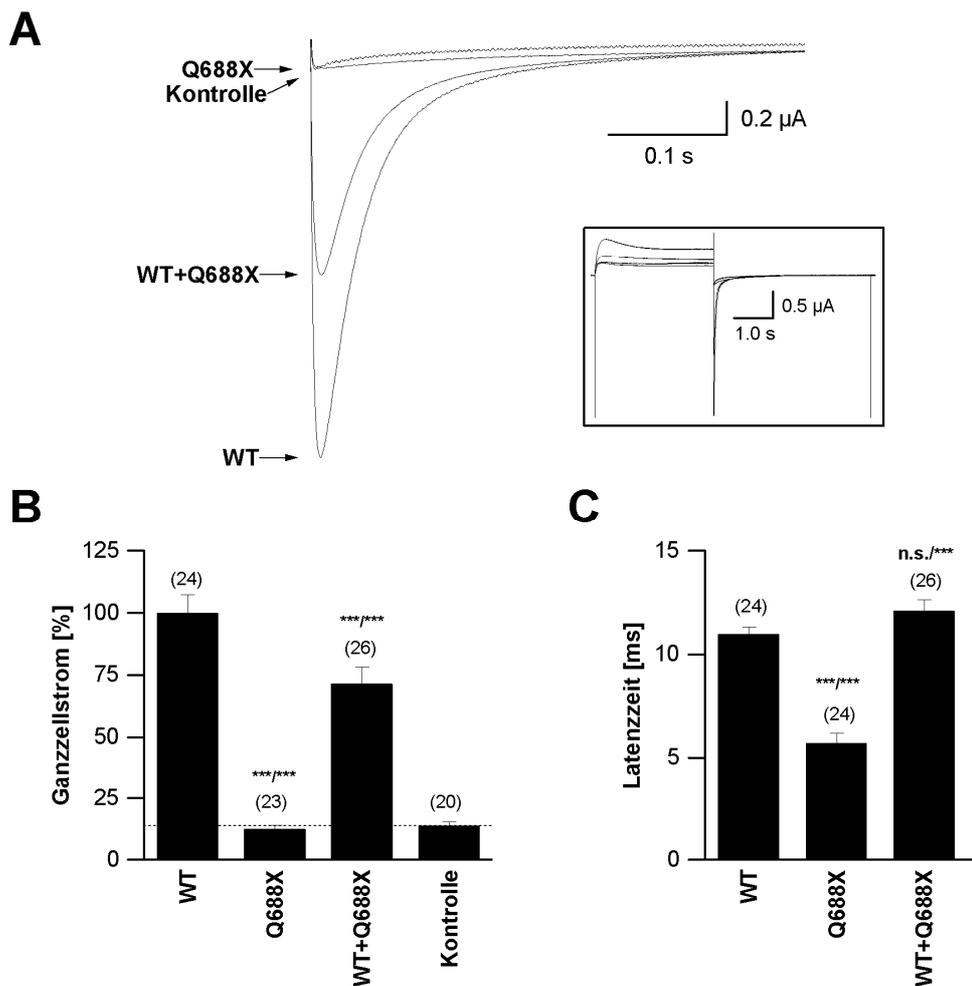
Die Mutation Q688X kommt es statt Bildung der Aminosäure Glutamin an der Position 688 zum Abbruch der Proteinbiosynthese. Die Mutation befindet sich mitten in der Porenregion des hERG-Kanals.

#### 3.5.1 Analyse der Ganzzellströme nach Hyperpolarisation (Abb. 3.5.1)

Es wurden wieder fünf Registrierungen der Spitzenströme (**Messprotokoll I, Kap. 2.5.5**) nacheinander aufgezeichnet. Die gemittelten Registrierungen von Wildtyp, Q638Q, Coexpression und Kontrolle übereinander liegend zeigt Teil **A**. Es wird ersichtlich, dass die Mutante einen extrem geringen Spitzenstrom zeigt, der im Bereich der Kontrolle liegt. Die Coexpression zeigt etwas mehr als die Hälfte des Stroms des Wildtyps.

Die quantitative Analyse ist in Teil **B** dargestellt. Die Werte im Einzelnen betragen für den Wildtyp  $100 \pm 7,3\%$  ( $I = -2,15 \mu\text{A}$ ,  $n = 24$ ), für die Mutante Q688X  $12,6 \pm 1,5\%$  ( $I = -0,23 \mu\text{A}$ ,  $n = 23$ ), für die Coexpression  $71,3 \pm 6,8\%$  ( $I = -1,45 \mu\text{A}$ ,  $n = 26$ ) und für die Kontrolle  $13,8 \pm 1,7\%$  ( $I = -0,22 \mu\text{A}$ ,  $n = 20$ ). Der Unterschied sowohl zwischen Wildtyp und Mutante, als auch zwischen Mutante und Coexpression und zwischen Wildtyp und Coexpression zeigt laut ANOVA-Test eine hohe Signifikanz ( $<0,001$ , \*\*\*). Der Wert der Mutante liegt mit 12,6% im selben niedrigen Bereich wie die Kontrolle mit 13,8%. Die Coexpression generiert mit 71,3% knapp zwei Drittel des Wertes des Wildtyps.

Das Balkendiagramm in Teil **C** der Abbildung vergleicht die Latenzzeiten von Wildtyp, Q688X und Coexpression. Die Werte im Einzelnen betragen für den Wildtyp  $10,99 \pm 0,34 \text{ ms}$  ( $n = 24$ ), für die Mutante Q688X  $5,71 \pm 0,48 \text{ ms}$  ( $n = 24$ ) und für die Coexpression  $12,12 \pm 0,53 \text{ ms}$  ( $n = 26$ ). Es bestehen hohe signifikante Unterschiede in der Latenzzeit sowohl zwischen Wildtyp und Mutante, als auch zwischen Mutante und Coexpression ( $<0,001$ , \*\*\*). Der Unterschied zwischen Wildtyp und Coexpression ist nicht signifikant (n.s.). Die Latenzzeit der Mutante ist hier mit 5,71 ms auffällig stark verkürzt.



**Abb. 3.5.1:** Darstellung und Analyse der Ströme nach Hyperpolarisation der C-terminalen Abbruchmutation Q688X.

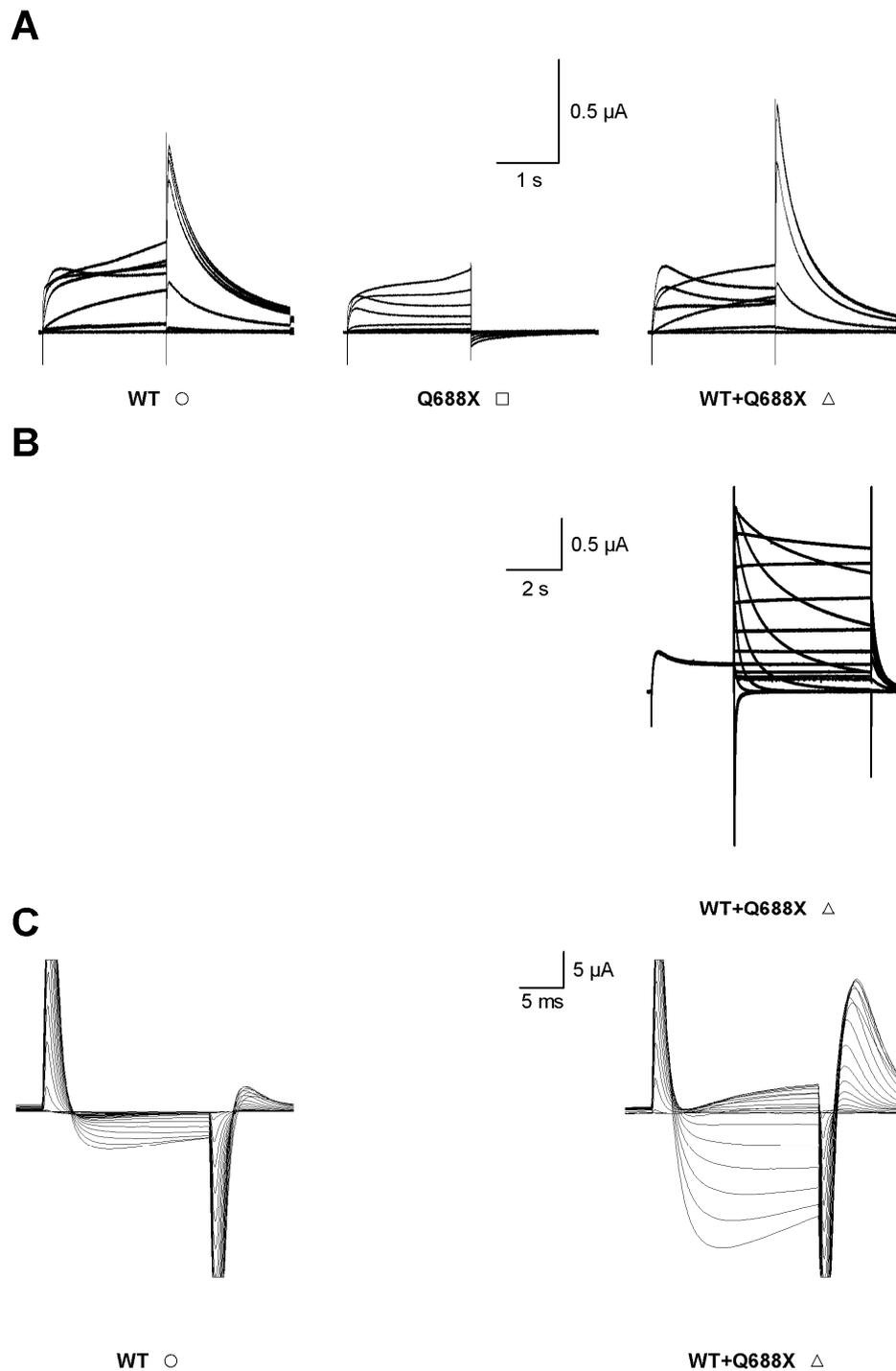
**A** Vergleich auf den WT normierter *tail*-Ströme von WT, Q688X, WT+Q688X und nicht injizierter Oozyten (Kontrolle). Dargestellt ist ein vergrößerter Ausschnitt. Der Kasten zeigt die komplette Registrierung unter Verwendung von Messprotokoll I (**Kap. 2.5.5**). **B** Analyse der Spitzenströme von WT, Q688X, WT+Q688X und Kontrolle. Die Werte wurden auf den WT normiert. WT =  $100 \pm 7,3\%$  ( $-2,15 \mu$ A); Q688X =  $12,6 \pm 1,5\%$  ( $-0,23 \mu$ A); WT+Q688X =  $71,3 \pm 6,8\%$  ( $-1,45 \mu$ A) und Kontrolle =  $13,8 \pm 1,7\%$  ( $-0,22 \mu$ A). Der Unterschied zwischen WT und Mutante, zwischen Mutante und Coexpression sowie zwischen WT und Coexpression zeigt eine hohe Signifikanz ( $<0,001$ ). (**Kap. 2.5.6**). Die Zahlen in Klammern über den Balken geben die Anzahl (n) der Messungen an. **C** Analyse der Latenzzeit bis zum Spitzenstrom. WT =  $10,99 \pm 0,34$  ms; Q688X =  $5,71 \pm 0,48$  ms; WT+Q688X =  $12,12 \pm 0,53$  ms. Die Unterschiede in der Latenzzeit zeigen hohe Signifikanzen zwischen WT und Mutation sowie zwischen Mutation und der Coexpression ( $<0,001$ ) (**Kap. 2.5.6**). Zwischen WT und Coexpression zeigen die Unterschiede keine Signifikanz (n.s.). Die Zahlen in Klammern über den Balken zeigen die Anzahl (n) der Messungen an.

### 3.5.2 Vergleich der Ganzzellströme während Aktivierung und Inaktivierung (Abb. 3.5.2)

**Abb. 3.5.2 A** zeigt die qualitative Analyse der spannungsabhängigen Gleichgewichtsaktivierung von Wildtyp, Q688X und Coexpression (**Messprotokoll II, Kap. 2.5.5**). Wildtyp und Coexpression zeigen hERG-charakteristische Ströme, wohingegen die Mutante atypische Ströme zeigt, möglicherweise durch das Auftreten endogener Ströme. Wildtyp und Coexpression sehen gleich aus, jedoch sind die Ströme der Coexpression um etwa ein Viertel größer als die des Wildtyps. Die quantitative Auswertung erfolgt in **Abb. 3.5.3 A**.

**Abb. 3.5.2 B** zeigt die instantane Aktivierung der Coexpression (**Messprotokoll III, Kap. 2.5.5**). Eine instantane Aktivierung des Wildtyps und der Mutante konnte aufgrund schlechter Abdichtungseigenschaften der Oozyten nicht gemessen werden. Die Registrierung der Coexpression zeigt den für hERG typischen Verlauf.

**Abb. 3.5.2 C** vergleicht die spannungsabhängige Gleichgewichtsinaktivierung (**Messprotokoll IV, Kap. 2.5.5**) von Wildtyp und Coexpression miteinander. Wildtyp und Coexpression zeigen beide für den Kanal typische Ströme, wobei die Registrierung der Coexpression in etwa fünfmal so groß ist wie die des Wildtyps. Da die Mutante keine Ströme generiert, kann auch keine schnelle Inaktivierung aufgezeichnet werden. Die Analyse der Spannungsabhängigkeit erfolgt in der **Abb. 3.5.3 C**.



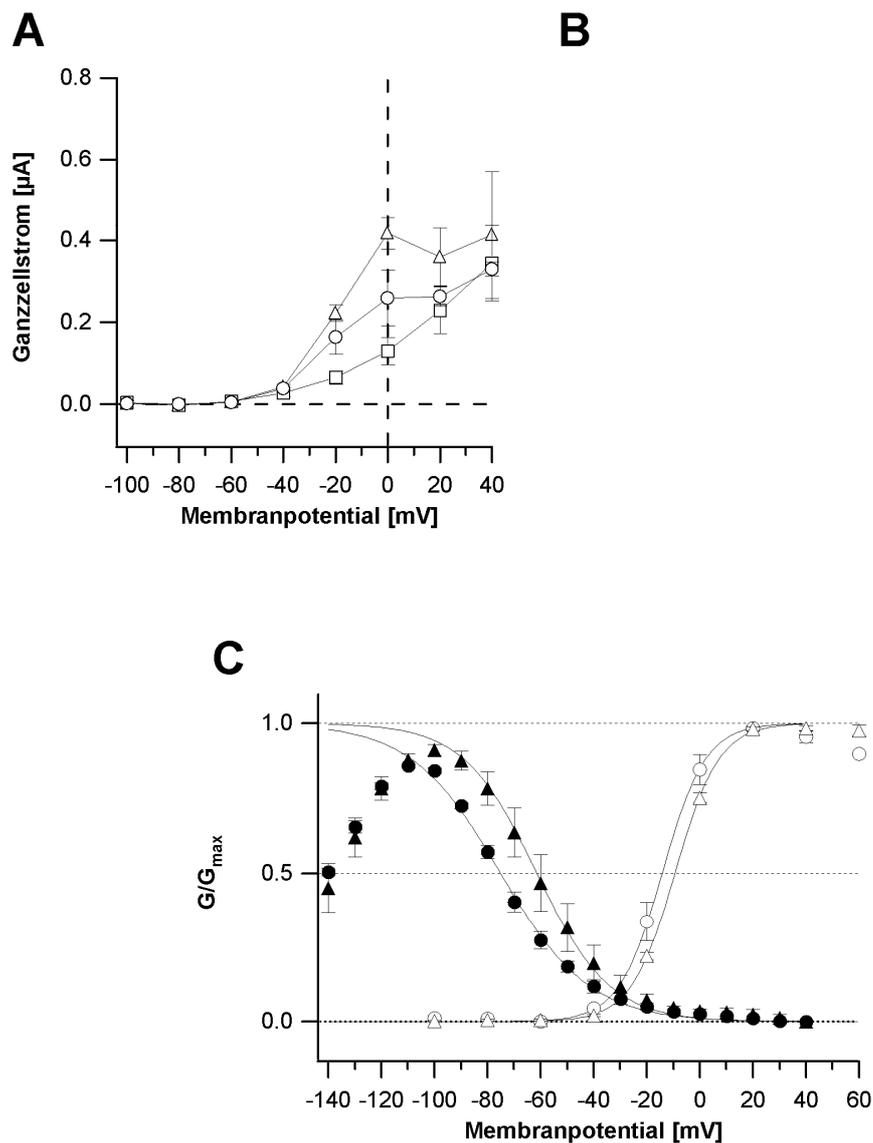
**Abb. 3.5.2:** Vergleich der Ganzzellströme der C-terminalen Abbruchmutation Q688X während der Aktivierung und Inaktivierung.

**A** Gleichgewichts-Aktivierung von WT, Q688X und WT+Q688X unter Verwendung von Messprotokoll II. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.5.3 A. **B** Instantane Aktivierung von WT+Q688X unter Verwendung von Messprotokoll III. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.5.3 B. **C** Schnelle Inaktivierung von WT und WT+Q688X unter Verwendung von Messprotokoll IV. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.5.3 C.

### 3.5.3 Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften (Abb. 3.5.3)

Aus der Analyse von Ganzzellströmen wie in **Abb. 3.5.2 A** dargestellt, wurden die im Gleichgewicht gemessenen und gemittelten Ströme von Wildtyp ( $\circ$ ,  $n = 3$ ), Mutante ( $\square$ ,  $n = 6$ ) und Coexpression ( $\triangle$ ,  $n = 5$ ) gegen das entsprechende Testpulsopotential aufgetragen (**Kap. 2.5.5**). Ab  $-50$  mV zeigt der Wildtyp eine spannungsabhängige Zunahme des Stroms gegenüber der Mutante. Der größte Unterschied zwischen Wildtyp / Mutante ( $\Delta = 0,129 \mu\text{A}$ ) und Coexpression / Mutante ( $\Delta = 0,288 \mu\text{A}$ ) liegt bei  $0$  mV. Der Wildtyp zeigt hier  $0,259 \mu\text{A}$ , die Mutante  $0,13 \mu\text{A}$  und die Coexpression  $0,418 \mu\text{A}$ . Aufgrund der schlechten Abdichtungseigenschaften der Oozyten, wie bei den Ganzzellströmen schon angesprochen, wurde auf Messungen der instantanen Aktivierung schließlich ganz verzichtet.

Der Graph, der eine Auswertung der Abbildungen **3.5.2 C** und **3.5.3 A** darstellt, wird nun in **Abb. 3.5.3 C** gezeigt. Er stellt die Spannungsabhängigkeit der isochronalen Aktivierung (aus **Abb. 3.5.3 A**) und Inaktivierung (aus **Abb. 3.5.2 C**) von Wildtyp ( $\circ$  bzw.  $\bullet$ ) und Coexpression ( $\triangle$  bzw.  $\blacktriangle$ ) dar. Zur Anpassung der Ausgleichskurven wurde wieder eine Boltzmann-Funktion (**Gleichung 3, Kap. 2.5.5**) verwendet. Die ermittelten Parameter der Aktivierung für den Wildtyp ( $\circ$ ) sind:  $v_{1/2} = -14,2 \pm 2,7$  mV,  $k = 8,2 \pm 0,4$  mV,  $n = 3$ ; für die Coexpression ( $\triangle$ ):  $v_{1/2} = -9,4 \pm 0,7$  mV,  $k = 8,3 \pm 0,2$  mV,  $n = 5$ . Die Parameter der Inaktivierung für den Wildtyp ( $\bullet$ ) sind:  $v_{1/2} = -75,1 \pm 1,7$  mV,  $k = -16,8 \pm 1,2$  mV,  $n = 3$ ; für die Coexpression ( $\blacktriangle$ ):  $v_{1/2} = -61,4 \pm 5,0$  mV,  $k = -13,8 \pm 1,0$  mV,  $n = 5$ . Bei der Aktivierung gibt es eine Rechtsverschiebung der Kurve der Coexpression um  $\Delta = 4,8$  mV, bei der Inaktivierung zeigt die Mutante Q688X in der Coexpression im Vergleich zum Wildtyp eine Rechtsverschiebung um  $\Delta = 13,7$  mV.



**Abb. 3.5.3:** Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der C-terminalen Abbruchmutation Q688X.

**A** Vergleich der Strom-Spannungskennlinien im Fließgleichgewicht von WT ( $\circ$ ,  $n = 3$ ), Q688X ( $\square$ ,  $n = 6$ ) und WT+Q688X ( $\triangle$ ,  $n = 5$ ) (Protokoll II). **B** Zum Vergleich der instantanen Strom-Spannungskennlinien gab es bei dieser Mutation keine geeigneten Daten, da am besagten Messtag nahezu alle Zellen leckig waren und auch an einem zweiten Messtag keine brauchbaren Ergebnisse zustande kamen. **C** Spannungsabhängigkeit der isochronalen Aktivierung (Protokoll II) und Inaktivierung (Protokoll IV) von WT und WT+Q688X. Ermittelte Parameter der Aktivierung für WT ( $\circ$ ):  $v_{1/2} = -14,2 \pm 2,7 \text{ mV}$ ,  $k = 8,2 \pm 0,4 \text{ mV}$ ,  $n = 3$ ; für WT+Q688X ( $\triangle$ ):  $v_{1/2} = -9,4 \pm 0,7 \text{ mV}$ ,  $k = 8,3 \pm 0,2 \text{ mV}$ ,  $n = 5$ . Parameter der Inaktivierung für WT ( $\bullet$ ):  $v_{1/2} = -75,1 \pm 1,7 \text{ mV}$ ,  $k = -16,8 \pm 1,2 \text{ mV}$ ,  $n = 3$ ; für WT+Q688X ( $\blacktriangle$ ):  $v_{1/2} = -61,4 \pm 5,0 \text{ mV}$ ,  $k = -13,8 \pm 1,0 \text{ mV}$ ,  $n = 5$ . Zur Anpassung der Ausgleichskurven an die Werte wurde eine Boltzmann-Funktion verwendet (Gleichung 3).

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Mutante Q688X keinen Strom leitet und dass die Coexpression mit 71,3% etwas mehr als zwei Drittel des Stroms

leitet, den der Wildtyp zeigt. In der Latenzzeit fällt die mit 5,71 ms stark verkürzte Latenzzeit der Mutante auf. Der Vergleich der Gleichgewichts-Aktivierungs-Membranströme zeigt hERG-charakteristische Ströme von Wildtyp und Coexpression, wobei letzterer Ströme größeren Ausmaßes zeigt. Die Ströme der Mutante sind atypisch, womöglich aufgrund des Auftretens endogener Ströme. Es wurden keine Registrierungen der instantanen Aktivierung aufgenommen. Die Registrierungen der Gleichgewichts-Inaktivierung sind sowohl beim Wildtyp als auch bei der Coexpression hERG-typisch; wobei die Coexpression Ströme zeigt, die in etwa fünfmal so groß sind wie die des Wildtyps. Die größten Unterschiede zwischen Wildtyp, Mutante und Coexpression liegen bei der Gleichgewichts-Aktivierung bei 0 mV. Bei der Aktivierung zeigt sich eine Rechtsverschiebung der Coexpression um  $\Delta = 4,8$  mV, bei der Inaktivierung zeigt die Mutante Q688X in der Coexpression im Vergleich zum Wildtyp eine Rechtsverschiebung um  $\Delta = 13,7$  mV. Es gibt es keine Veränderungen in der Ansprechbarkeit der Aktivierung sowie Inaktivierung.

### 3.6 Abbruchmutation Y611X in der Porenregion

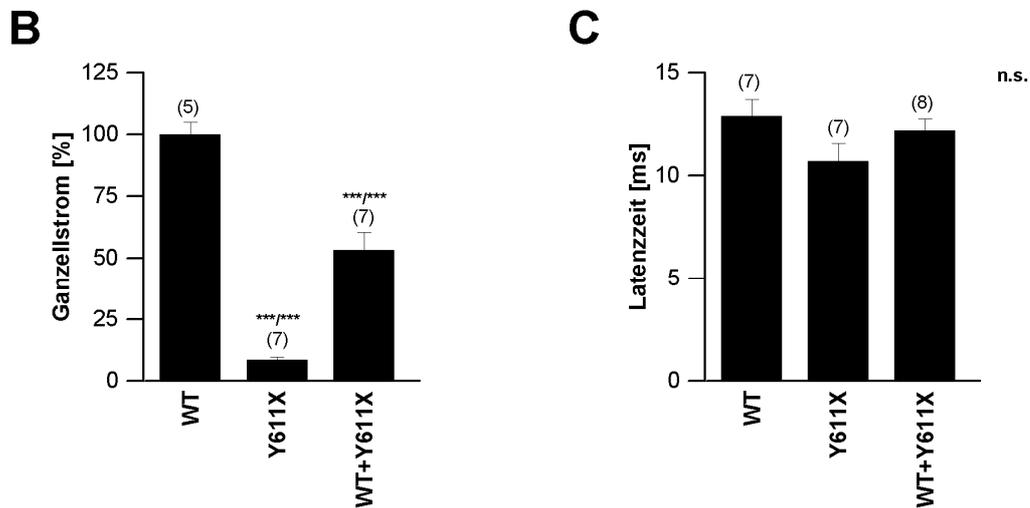
Die Mutation Y611X, bei der es anstelle der Bildung der Aminosäure Tyrosin an der Position 611 zum Abbruch kommt, befindet sich in S5 der Porenregion des hERG-Kanals.

#### 3.6.1 Analyse der Ganzzellströme nach Hyperpolarisation (Abb. 3.6.1)

Es wurden wieder fünf Registrierungen der Spitzenströme (**Messprotokoll I, Kap. 2.5.5**) nacheinander aufgezeichnet. Die Primärdaten (gemittelte Registrierung) sind leider verloren gegangen, deshalb fehlt hier Teil **A**.

Die quantitative Analyse ist in Teil **B** der Abbildung dargestellt. Die Werte im Einzelnen betragen für den Wildtyp  $100 \pm 4,9\%$  ( $I = -2,01 \mu\text{A}$ ,  $n = 5$ ), für die Mutante Y611X  $8,6 \pm 1,21\%$  ( $I = -0,17 \mu\text{A}$ ,  $n = 7$ ) und für die Coexpression  $53,32 \pm 7,3\%$  ( $I = -1,07 \mu\text{A}$ ,  $n = 7$ ). Es war kein Vergleich mit der Kontrolle möglich, da die Oozyten keinen stabilen, ausreichenden Membranwiderstand in der Spannungsklemme zeigten. Der Unterschied zwischen Wildtyp und

Mutante, sowie zwischen Wildtyp und Coexpression und zwischen Mutante und Coexpression zeigt laut ANOVA-Test eine hohe Signifikanz ( $<0,001$ , \*\*\*). Der Wert der Mutante ist verschwindend gering. Die Coexpression zeigt gut die Hälfte des Stroms des Wildtyps.



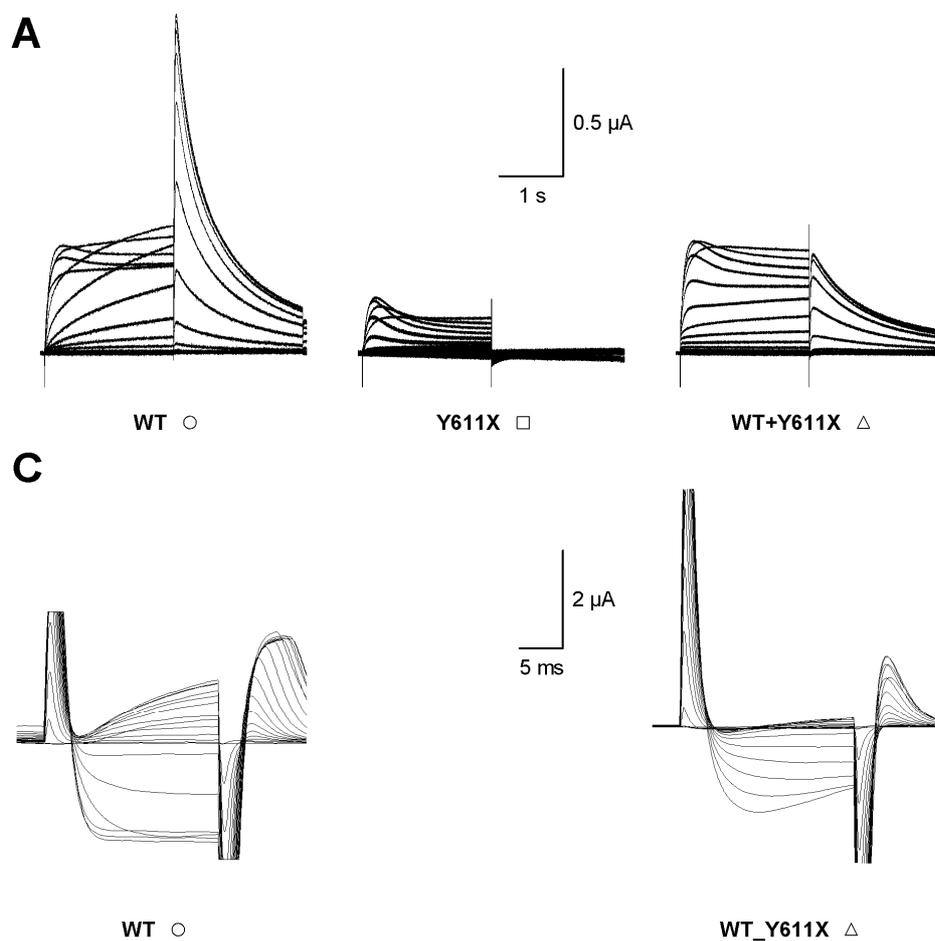
**Abb. 3.6.1:** Darstellung und Analyse der Ströme nach Hyperpolarisation der C-terminalen Abbruchmutation Y611X.

**A** Keine Originalmessung mehr vorhanden, da die Dateien der elektronischen Registrierung verloren gegangen sind. **B** Analyse der Spitzenströme von WT, Y611X und WT+Y611X. Es war kein Vergleich mit der Kontrolle möglich, da die Oozyten keinen stabilen, ausreichenden Membranwiderstand in der Spannungsklemme zeigten. Die Werte wurden auf den WT normiert. WT =  $100 \pm 4,9\%$  ( $-2,01 \mu\text{A}$ ); Y611X =  $8,6 \pm 1,21\%$  ( $-0,17 \mu\text{A}$ ); WT+Y611X =  $53,32 \pm 7,3\%$  ( $-1,07 \mu\text{A}$ ). Der Unterschied zwischen WT und Mutante sowie zwischen Mutante und Coexpression zeigt eine hohe Signifikanz ( $<0,001$ ). Zwischen WT und Coexpression besteht ebenfalls ein Unterschied mit großer Signifikanz (**Kap. 2.5.6**). Die Zahlen in Klammern über den Balken geben die Anzahl (n) der Messungen an. **C** Analyse der Latenzzeiten bis zum Spitzenstrom. WT =  $12,89 \pm 0,81 \text{ ms}$ ; Y611X =  $10,71 \pm 0,87 \text{ ms}$ ; WT+Y611X =  $12,19 \pm 0,55 \text{ ms}$ . Unterschiede in den Latenzzeiten sind nicht gegeben (n.s.) (**Kap. 2.5.6**). Die Zahlen in Klammern über den Balken zeigen die Anzahl (n) der Messungen an.

Das Balkendiagramm in Teil **C** der Abbildung vergleicht die Latenzzeiten von Wildtyp, Y611X und Coexpression. Die Werte im Einzelnen betragen für den Wildtyp  $12,89 \pm 0,81 \text{ ms}$  ( $n = 7$ ), für die Mutante Y611X  $10,71 \pm 0,87 \text{ ms}$  ( $n = 7$ ) und für die Coexpression  $12,19 \pm 0,55 \text{ ms}$  ( $n = 8$ ). Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Latenzzeit (n.s.).

### 3.6.2 Vergleich der Ganzzellströme während Aktivierung und Inaktivierung (Abb. 3.6.2)

**Abb. 3.6.2 A** zeigt die qualitative Analyse der spannungsabhängigen Gleichgewichtsaktivierung von Wildtyp, Y611X und Coexpression (**Messprotokoll II, Kap. 2.5.5**). Wildtyp und Coexpression zeigen hERG-charakteristische Ströme, wohingegen die Mutante atypische Ströme zeigt, möglicherweise durch das Auftreten endogener Ströme.



**Abb. 3.6.2:** Vergleich der Ganzzellströme der C-terminalen Abbruchmutation Y611X während Aktivierung und Inaktivierung.

**A** Fließgleichgewichts-Aktivierung von WT, Y611X und WT+Y611X unter Verwendung von Messprotokoll II. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.6.3 A. **C** Schnelle Inaktivierung von WT $\circ$  und WT+Y611X unter Verwendung von Messprotokoll IV. Die graphische Darstellung der Analyse erfolgt in Abb. 3.6.3 C.

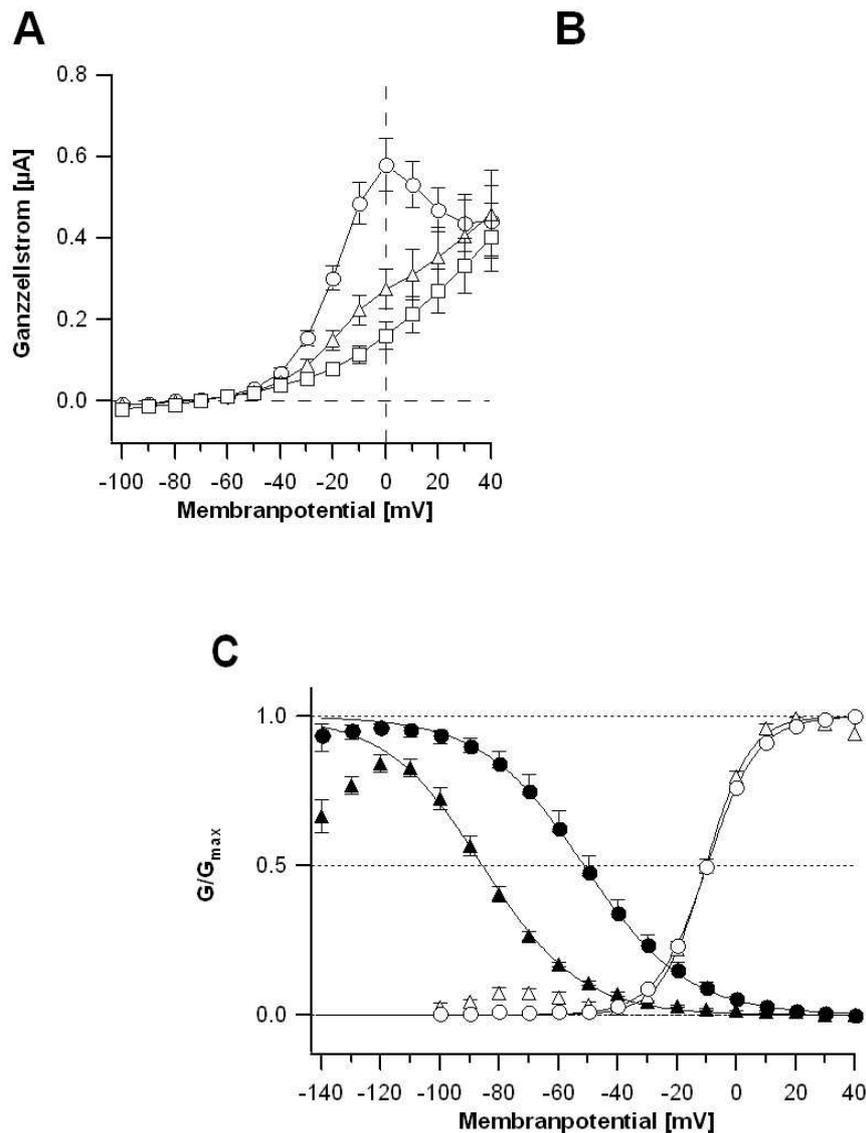
Wildtyp und Coexpression sehen gleich aus, jedoch sind die Ströme der Coexpression um mehr als die Hälfte kleiner als die des Wildtyps. Die quantitative Auswertung erfolgt in **Abb. 3.6.3 A**. Es gibt aufgrund der schlechten Abdichtungseigenschaften der Oozyten keine Darstellung der instantanen Aktivierung. Somit fehlt an dieser Stelle Teil **B** der Abbildung.

**Abb. 3.6.2 C** vergleicht die spannungsabhängige Gleichgewichtsinaktivierung von Wildtyp und Coexpression miteinander (**Messprotokoll IV, Kap. 2.5.5**). Wildtyp und Coexpression zeigen beide für den Kanal typische Ströme, wobei die Ströme der Coexpression ungefähr zwei Drittel der Stromgröße des Wildtyps aufweisen. Da die Mutante keine Ströme generiert, kann auch keine schnelle Inaktivierung aufgezeichnet werden. Die Analyse der Spannungsabhängigkeit erfolgt in **Abb. 3.6.3 C**.

### **3.6.3 Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften (Abb. 3.6.3)**

Aus der Analyse von Ganzzellströmen wie in **Abb. 3.6.2 A** dargestellt, wurden die im Gleichgewicht gemessenen und gemittelten Ströme von Wildtyp ( $\circ$ ,  $n = 4$ ), Mutante ( $\square$ ,  $n = 5$ ) und Coexpression ( $\triangle$ ,  $n = 7$ ) gegen das entsprechende Testpulspotential aufgetragen (**Kap. 2.5.5**). Ab  $-50$  mV zeigt der Wildtyp eine spannungsabhängige Zunahme des Stroms gegenüber der Mutante, wobei die Coexpression nur eine geringe Zunahme gegenüber der Mutante zeigt. Der größte Unterschied zwischen Wildtyp / Mutante ( $\Delta = 0,418 \mu\text{A}$ ) und Coexpression / Mutante ( $\Delta = 0,113 \mu\text{A}$ ) liegt bei  $0$  mV. Der Wildtyp zeigt hier  $0,578 \mu\text{A}$ , die Mutante  $0,16 \mu\text{A}$  und die Coexpression  $0,273 \mu\text{A}$ .

Teil **B** der Abbildung, die Darstellung der instantanen Aktivierung, fehlt aufgrund der schlechten Abdichtungswiderstände der Oozyten in der Spannungsklemme.



**Abb. 3.6.3:** Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der C-terminalen Abbruchmutation Y611X.

**A** Vergleich der Strom-Spannungskennlinien im Fließgleichgewicht von WT (○, n = 5), Y611X (□, n = 4) und WT+Y611X (△, n = 7) (Protokoll II). **B** Zum Vergleich der instantanen Strom-Spannungskennlinien gab es bei dieser Mutation keine geeigneten Daten, da am besagten Messtag nahezu alle Zellen leckig waren und auch an einem zweiten Messtag keine brauchbaren Ergebnisse zustande kamen. **C** Spannungsabhängigkeit der isochronalen Aktivierung (Protokoll II) und Inaktivierung (Protokoll IV) von WT und WT+Y611X. Ermittelte Parameter der Aktivierung für WT (○):  $v_{1/2} = -9,9 \pm 0,2$  mV,  $k = 8,5 \pm 0,2$  mV, n = 5. WT+T623I (△):  $v_{1/2} = -10,3 \pm 0,8$  mV,  $k = 7,4 \pm 0,6$  mV, n = 4. Parameter der Inaktivierung für WT (●):  $v_{1/2} = -51,4 \pm 3,5$  mV,  $k = -17,2 \pm 1,8$  mV, n = 4; für WT+Y611X (▲):  $v_{1/2} = -85,7 \pm 1,9$  mV,  $k = -16,3 \pm 0,9$  mV, n = 3. Zur Anpassung der Ausgleichskurven an die Werte wurde eine Boltzmann-Funktion verwendet (Gleichung 3).

Der Graph, der eine Auswertung der Abbildungen 3.6.2 C und 3.6.3 A darstellt, wird nun in **Abb. 3.6.3 C** gezeigt. Er stellt die Spannungsabhängigkeit der iso-

chronalen Aktivierung (aus **Abb. 3.6.3 A**) und Inaktivierung (aus **Abb. 3.6.2 C**) von Wildtyp ( $\circ$  bzw.  $\bullet$ ) und Coexpression ( $\triangle$  bzw.  $\blacktriangle$ ) dar. Zur Anpassung der Ausgleichskurven wurde wieder eine Boltzmann-Funktion (**Gleichung 3, Kap. 2.5.5**) verwendet. Die ermittelten Parameter der Aktivierung für den Wildtyp ( $\circ$ ) sind:  $v_{1/2} = -9,9 \pm 0,2$  mV,  $k = 8,5 \pm 0,2$  mV,  $n = 5$ ; für die Coexpression ( $\triangle$ ):  $v_{1/2} = -10,3 \pm 0,8$  mV,  $k = 7,4 \pm 0,6$  mV,  $n = 4$ . Die Parameter der Inaktivierung für den Wildtyp ( $\bullet$ ) sind:  $v_{1/2} = -51,4 \pm 3,5$  mV,  $k = -17,2 \pm 1,8$  mV,  $n = 4$ ; für die Coexpression ( $\blacktriangle$ ):  $v_{1/2} = -85,7 \pm 1,9$  mV,  $k = -16,3 \pm 0,9$  mV,  $n = 3$ . Bei der Aktivierung gibt es keine Verschiebungen, bei der Inaktivierung zeigt die Mutante Y611X in der Coexpression im Vergleich zum Wildtyp eine Linksverschiebung um  $\Delta = 34,3$  mV.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Mutante Y611X keinen Strom leitet und dass die Coexpression mit 53,32% etwas mehr als 50% des Stroms leitet, den der Wildtyp zeigt. In der Latenzzeit gibt es keine Auffälligkeiten. Der Vergleich der Gleichgewichts-Aktivierungs-Membranströme zeigt typische hERG-charakteristische Ströme von Wildtyp und Coexpression, wobei der Wildtyp Ströme größeren Ausmaßes zeigt. Die Ströme der Mutante sind atypisch, womöglich aufgrund des Auftretens endogener Ströme. Die Registrierungen der Gleichgewichts-Inaktivierung sind sowohl beim Wildtyp als auch bei der Coexpression hERG-typisch; wobei der Wildtyp Ströme größeren Ausmaßes zeigt. Die größten Unterschiede zwischen Wildtyp, Mutante und Coexpression liegen bei der Gleichgewichts-Aktivierung bei 0 mV. Bei der Aktivierung zeigen sich keine Verschiebungen; bei der Inaktivierung zeigt sich eine Linksverschiebung der Kurve der Coexpression um  $\Delta = 34,3$  mV. Es gibt es keine Veränderungen in der Ansprechbarkeit der Aktivierung und Inaktivierung.

### 3.7 Vergleichende Auswertung der Mutanten

In diesem Kapitel werden die ermittelten Werte und Parameter der sechs Mutationen vergleichend dargestellt. Dies geschieht in zwei Tabellen, wobei **Tabelle 3.1** die ermittelten mittleren Amplituden und Latenzzeiten der einzelnen

Mutanten aufzeigt, und **Tabelle 3.2** die Parameter für die Aktivierung und Inaktivierung vergleichend in einer Übersicht darstellt.

### Vergleich der Spitzenströme (Amplituden)

Die Expressionen des Wildtyps zeigten hERG-typische Membranströme. Die mittlere Amplitude lag bei  $-1,62 \mu\text{A}$ . Die Kontrolle zeigte je nach Messtag einen Membranstrom (nicht hERG-typisch, sondern als Leckstrom zu betrachten) zwischen 9,4% und 24,4% bezogen auf den Wildtyp.

**Tab. 3.1:** Zusammenfassung der Parameter von Amplitude und Latenz.

		A m p l i t u d e					L a t e n z		
		WT	MT	WT+MT	Kontrolle		WT	MT	WT+MT
<b>T623I</b>	$\mu\text{A}$	-1.31	-0.34	-0.56	-0.25	ms	11.45	16.39	11.20
	%	100.0	33.2	42.7	19.3	%	100.0	143.0	97.7
	SEM	6.36	4.98	4.66	3	SEM	0.46	1.13	0.28
	N	17	27	20	5	N	17	27	21
<b>G628S</b>	$\mu\text{A}$	-0.92	-0.20	-0.90	-0.22	ms	12.77	13.82	11.22
	%	100.0	22.1	97.8	24.2	%	100.0	108.2	87.9
	SEM	12.42	3.46	14.68	4.26	SEM	0.34	0.91	0.89
	N	10	7	8	7	N	10	7	10
<b>K638Q</b>	$\mu\text{A}$	-1.47	-0.36	-0.98	-0.27	ms	12.36	4.92	10.66
	%	100.0	25.0	67.0	18.0	%	100.0	39.8	86.3
	SEM	20.11	7.32	15.18	2.35	SEM	0.004	0.13	0.23
	N	11	10	12	6	N	7	7	7
<b>R1055Q</b>	$\mu\text{A}$	-1.85	-0.52	-1.38	-0.33	ms	13.37	12.64	13.83
	%	100.0	29.9	78.2	9.4	%	100.0	94.6	103.4
	SEM	7.44	2.66	5.85	1.18	SEM	0.44	0.38	0.41
	N	30	25	26	9	N	30	28	27
<b>Y611X</b>	$\mu\text{A}$	-2.01	-0.17	-1.07		ms	12.89	10.71	12.19
	%	100.0	8.6	53.3		%	100.0	83.1	94.5
	SEM	4.9	1.2	7.3		SEM	0.81	0.87	0.55
	N	5	7	7		N	7	7	8
<b>Q688X</b>	$\mu\text{A}$	-2.15	-0.23	-1.45	-0.22	ms	10.99	5.71	12.12
	%	100.0	12.6	71.3	13.8	%	100.0	94.6	103.4
	SEM	7.3	1.5	6.8	1.7	SEM	0.34	0.48	0.41
	N	24	23	26	20	N	24	24	26

In keiner der in dieser Studie untersuchten Expressionen der mutierten cDNA-Klone konnte ein hERG-charakteristischer Membranstrom nachgewiesen

werden. Im Bezug auf den Wildtyp legen die Amplituden der nicht-hERG-typischen Ströme zwischen 8,6% und 33%, was im Bereich der Kontrolle liegt.

Die Coexpressionen zeigten hERG-charakteristische Membranströme, die je nach Mutante zwischen 42,7% und 97,8% lagen. Es liegt keine Coexpression vor, bei der die Mutante den Gesamtstrom völlig hemmt.

Der Vergleich der jeweiligen Mutation mit dem parallel gemessenen Wildtyp zeigt in allen Fällen einen eindeutigen signifikanten Unterschied (siehe Ergebnisse der jeweiligen Mutante).

#### Vergleich der Latenzzeiten bis zum Erreichen des Spitzenstroms

Der Wildtyp zeigte Latenzzeiten zwischen 10,99 ms und 13,37 ms. Bei den Mutationen lagen die Werte zwischen 4,92 ms und 16,389 ms. Die Coexpressionen wiesen Werte zwischen 10,66 ms und 18,83 ms auf. Für die Kontrolle wurden keine Latenzzeiten bestimmt, da die nicht-injizierten Oozyten keine hERG-Ströme generierten. Da die Mutanten defekt sind (siehe Amplituden), kann nicht bestimmt werden ob die Veränderung der Latenz in der Veränderung der Eigenschaften des Wildtyps oder aber in der Aktivierung von endogen-induzierten Strömen liegt oder aber in einer Veränderung der Membraneigenschaften. Um die Bedeutung einer verkürzten oder verlängerten Latenzzeit zu verstehen, müssten weiterführende Versuche durchgeführt werden, die die kinetischen Eigenschaften der Mutanten beschreiben.

#### Vergleich der spannungsabhängigen Aktivierung

Der Wildtyp zeigte  $V_{1/2}$  im Bereich von -9,9 mV bis -21,2 mV und  $k$  im Bereich von 7,1 bis 10,1. Bei der Kontrolle und den Mutanten konnten aufgrund fehlender hERG-typischer Ströme keine Parameter für die Aktivierung ermittelt werden.

Die Coexpressionen zeigten  $V_{1/2}$  im Bereich von -9,4 mV und -18,4 mV und  $k$  im Bereich von 6,5 und 9,4. Die Unterschiede bei der jeweiligen Tageskontrolle (Wildtyp) waren gering.

Die Werte für die Aktivierung zeigen eine leichte Rechtsverschiebung bei der Coexpression der Mutante Q688X um  $\Delta = 4,8$  mV. Bei allen anderen Mutationen treten keine Links- oder Rechtsverschiebungen in der Aktivierung auf. Die Steilheiten der Funktionen zeigen keine Unterschiede.

#### Vergleich der spannungsabhängigen Inaktivierung

Der Wildtyp zeigte  $V_{1/2}$  im Bereich von -51,4 mV bis -85,2 mV und  $k$  im Bereich von -13,3 bis -17,2. Bei der Kontrolle und den Mutanten konnten aufgrund fehlender hERG-typischer Ströme keine Parameter für die Inaktivierung ermittelt werden.

Die Coexpressionen zeigten  $V_{1/2}$  im Bereich von -61,4 mV und -88,2 mV und  $k$  im Bereich von -12,7 und -16,3. Die Unterschiede bei der jeweiligen Tageskontrolle (Wildtyp) waren gering.

**Tab. 3.2:** Zusammenfassung der Parameter von Aktivierung und Inaktivierung.

	Aktivierung				Inaktivierung			
	V1/2 [mV]	SEM [mV]	slope	SEM	V1/2 [mV]	SEM [mV]	slope	SEM
<b>WT</b>					-73.5	4.4	-14.4	0.5
<b>WT+T623I</b>	-10.6	0.4	7.7	1.7	-86.2	2.2	-16.0	0.5
<b>WT</b>	-14.1	1.8	7.3	0.2	-85.2	1.1	-15.5	1.1
<b>WT+G628S</b>	-12.6	1.0	6.5	0.5	-88.2	1.5	-16.0	1.8
<b>WT</b>	-21.2	4.0	10.1	1.4	-53.5	12.2	-13.6	1.4
<b>WT+K638Q</b>	-18.4	0.7	9.4	0.4	-64.8	10.9	-13.6	0.9
<b>WT</b>	-11.8	3.5	7.1	0.2	-80.4	6.4	-13.3	0.5
<b>WT+R1055Q</b>	-12.4	1.5	7.2	0.2	-76.7	2.0	-12.7	0.7
<b>WT</b>	-9.9	0.2	8.5	0.2	-51.4	3.5	-17.2	1.8
<b>WT+Y611X</b>	-10.3	0.8	7.4	0.6	-85.7	1.9	-16.3	0.9
<b>WT</b>	-14.2	2.7	8.2	0.4	-75.1	1.7	-16.8	1.2
<b>WT+Q688X</b>	-9.4	0.7	8.3	0.2	-61.4	5.0	-13.8	1.0

Die Werte für die Inaktivierung zeigen Linksverschiebungen bei den Coexpressionen der Mutanten T623I um  $\Delta = 12,7$  mV, K638Q um  $\Delta = 11,3$  mV und eine besonders große Linksverschiebung bei Y611X um  $\Delta = 34,3$  mV.

Außerdem tritt eine Rechtsverschiebung bei Q688X um  $\Delta = 10,7$  mV auf. Die anderen Mutanten zeigen in der Coexpression keine Veränderungen.

Die Steilheit der Kurven zeigt nur bei der Coexpression der Mutante Q688X einen um drei erniedrigten Wert, ansonsten treten keine Änderungen in der Steilheit auf. Somit zeigen die Mutanten die gleiche Sensibilität wie der Wildtyp, sind in gleichem Maße ansprechbar auf Spannungsänderungen. Das aktive Fenster ist bei der Mutante K638Q am größten. Bei den Mutanten G628S und R1055Q ist es vergleichsweise „geschlossen“, bei den Mutanten T623I und Q688X ist das aktive Fenster in etwa gleich groß. Bei Y611X wird es durch die enorme Linksverschiebung stark verkleinert im Vergleich zu aktiven Fenster des Wildtyps.

## 4. Diskussion

Herzrhythmusstörungen, denen Ionenkanalerkrankungen zugrunde liegen, sind in den vergangenen Jahren zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. Gerade die LQT-Syndrome mit ihren gravierenden Auswirkungen nehmen einen hohen Stellenwert in der medizinischen Literatur ein. Diese Studie beschäftigt sich mit dem LQT2-Syndrom, das durch Mutation des *human ether-à-go-go-related gene* (hERG)-Kanals [101], dem molekularen Korrelat des verzögerten Gleichrichters  $I_{Kr}$  am Herzen, hervorgerufen wird.

cDNA von sechs verschiedenen Mutationen des hERG-Kanals wurde transkribiert und die so gewonnene cRNA wurde in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* injiziert, welche als heterologes Expressionssystem dienen. Mittels der *voltage-clamp*-Technik wurden dann Stromamplituden, Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten ermittelt und analysiert.

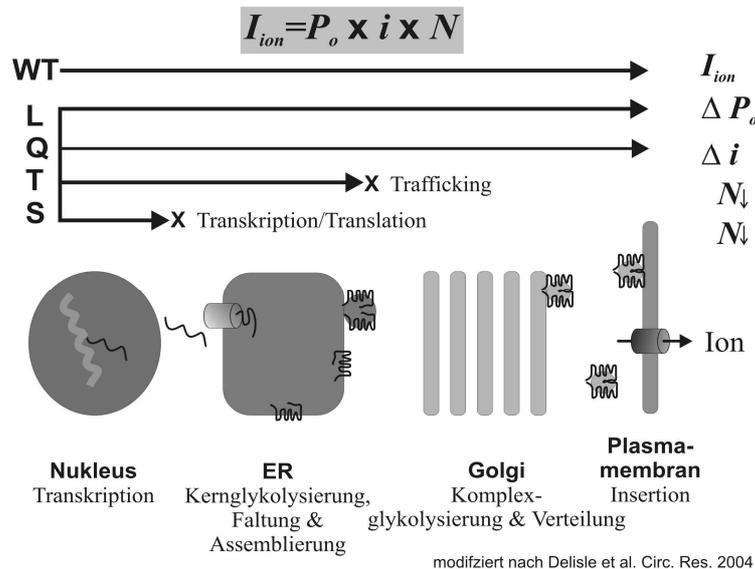
Der hERG-Kanal gehört zur Gruppe der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle ( $K_v$ ) und wie alle anderen  $K_v$ -Kanäle auch kommen funktionelle hERG-Kanäle durch Zusammenlagerung (Assemblierung) von vier  $\alpha$ -Untereinheiten zu einem tetrameren Proteinkomplex zustande, der dann in die Zellmembran eingebaut wird [70]. Die einzelne  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus sechs membran-durchspannenden Segmenten (S1 – S6) sowie einem N- und einem C-Terminus, die beide im Cytosol liegen. Jeweils Teile von S5 und S6 der vier Untereinheiten bilden zusammen mit der dazwischen liegenden P-Schleife die zentrale Pore aus [69]. Die Ergebnisse dieser Studie haben nun gezeigt, dass die sechs untersuchten Kanalmutanten alleine für sich keine hERG-charakteristischen Membranströme generierten. Das lässt den Schluss zu, dass keine funktionellen Kanäle in der Membran lokalisiert sind.

### Störungen in der Biogenese und Verteilung von Ionenkanalproteinen und deren Auswirkungen auf messbare Ströme

Mit der *Voltage Clamp*-Technik lässt sich nur der Gesamtstrom  $I_{ion}$  darstellen. In

**Abb. 4.1** wird gezeigt, dass der Gesamtstrom  $I_{ion}$  abhängig ist von der Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  der Kanäle, von der Einzelkanalleitfähigkeit  $i$  und von der Anzahl  $N$  der funktionellen Kanäle in der Membran ( $I_{ion} = P_o \times i \times N$ ). Einzelkanalleitfähigkeiten könnten mittels *Patch Clamp*-Methoden dargestellt werden [32] und zur Visualisierung von  $N$  könnten *Protein*-Assays wie z.B. Immunoblots durchgeführt werden.

Eine Verringerung von funktionellen Kanälen  $N \downarrow$  in der Membran kann sowohl durch eine Störung in der Proteinbiosynthese als auch in der Verteilung der Proteine auf die entsprechenden Zellkompartimente, in diesem Fall die Plasmamembran (*trafficking*) hervorgerufen werden (siehe **Abb. 4.1**).



**Abb. 4.1:** Zusammenhänge zwischen Gesamtstrom, Biosynthese und *trafficking*.

Der Gesamtstrom  $I_{ion}$  ist abhängig von der Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  der Kanäle, der Einzelkanalleitfähigkeit  $i$  sowie der Anzahl  $N$  der funktionellen Kanäle in der Membran. Das Protein wird im Zellkern transkribiert, zum Endoplasmatischen Retikulum transportiert und, nach dortiger Faltung, Assemblierung und Modifikationen, weiter zum Golgi-Apparat transportiert, wo es weiteren Modifikationen unterliegt und seine Adressierung erhält. Es gelangt durch Vesikeltransport zur Plasmamembran und wird dort inseriert. Der Gesamtstrom kann sich verringern bei veränderten Einzelkanalleitfähigkeiten  $i$ , bei veränderten Offenwahrscheinlichkeiten  $P_o$  oder bei einer geringeren Anzahl  $N$  von funktionellen Kanälen in der Membran, was auf Störungen in der Synthese oder im *trafficking* zurückzuführen ist.

Störungen im Bereich der Proteinbiosynthese können verschiedene Ursachen haben: Strukturmutationen und regulatorische Mutationen führen zu fehler-

haften Proteinen oder in falscher Menge synthetisierten Genprodukten. Störungen in der Translation haben eine Verminderung der Synthese zur Folge. Störungen in der posttranslationalen Modifikation führen zu fehlerhaft prozessierten und damit funktionsuntüchtigen oder –gestörten und unreifen Proteinen, die dann vom ER zurückgehalten werden und ihren Bestimmungsort nicht erreichen [22, 29, 104]. Das ER hat ein Qualitätskontrollsystem, welches unsauber gefaltete und assemblierte Proteine erkennt und zurückhält [9, 30, 33, 37]. Nur korrekt gefaltete und assemblierte Proteine werden mit Vesikeln zum Golgiapparat transportiert und dort weiter modifiziert. Sobald ein Ionenkanal fertig gestellt ist, wird er in Transportvesikel geladen, die mit der Plasmamembran fusionieren. Die Bewegung vom ER zum Golgiapparat scheint somit ein wesentlicher Kontrollpunkt für die Regulierung zu sein, wie viele funktionelle Kanäle die Zelloberfläche erreichen [30, 55].

Es ist nicht möglich eine Aussage zu treffen ob es bei den hier untersuchten Mutationen eine Störung in der Maturierung, in der Assemblierung oder im *trafficking* gab, weil die verwendeten Methoden nicht visualisieren konnten wo sich das Protein befand: in der Membran oder zurückgehalten im ER. Hierzu müssten andere Versuchsansätze herangezogen werden wie z.B. Protein-Assays, Farbmarkierungsexperimente (*staining*) oder Immunfluoreszenz-Tagging in Säugerzellen.

Eine auch für hERG-Kanäle gültige Unterteilung in vier prinzipiell mögliche Gruppen von kardialen Ionenkanal-Mutationen bietet die nachfolgende Tabelle 4.1.

**Tab. 4.1:** Klassifikation für kardiale Ionenkanal-Mutationen [15].

Klasse 1	Störung in der Proteinbiosynthese (veränderte Transkription o. Translation) $\Rightarrow N\downarrow$
Klasse 2	Störung im <i>trafficking</i> $\Rightarrow N\downarrow$
Klasse 3	Verändertes Schaltverhalten ( <i>gating</i> ) / Kinetik $\Rightarrow \Delta P_o$
Klasse 4	Veränderte oder gar keine Permeabilität $\Rightarrow \Delta i$

Klasse 1-Mutationen umfassen Störungen im Bereich der Transkription, der Translation und der co-translationalen Modifikationen. Es resultieren abgeschnittene, verkürzte Aminosäureketten und *Nonsense*-Proteine [14]. Ein

Beispiel für Klasse 1 ist die Deletionsmutation  $\Delta 1261$  am N-Terminus, die eine Rasterverschiebung an die Aminosäureposition 421 einleitet und dann an der Aminosäureposition 432 aufgrund eines neu entstandenen Stop-Codons abbricht [52]. Es entsteht ein nicht-funktionelles hERG-Kanalprotein.

Zur Klasse 2 gehören Mutationen mit Störungen in der post-translationalen Modifikation, in der Proteinfaltung und folglich im *trafficking*. Als Beispiele gelten T65P [67], N470D [28], G601S [24, 25] und A561V [22, 45]. Mutationen, bei denen per Immunoblot-Analyse dargestellt werden konnte, dass die unreife 135kDa-Form des Kanalproteins im Vergleich zur reifen 155kDa-Form überwog und per Immunofluoreszenz-Mikroskopie eine Retention im Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen wurde, sind Y611H und V822M [104] sowie N470D [28]. Besonders gut untersucht wurde der *trafficking*-Defekt mit ER-Retention und Degradation bei der Deletion  $\Delta F508$  des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR)-Kanals [48] bei der Cystischen Fibrose.

Bei einigen der *trafficking*-defekten Mutationen kann die Kanalfunktionalität teilweise wiederhergestellt werden: durch sogenanntes pharmakologisches *rescue*, mittels chemischer Chaperone oder durch niedrigere Inkubations-Temperaturen (siehe weiter unten).

Klasse 3-Mutationen führen zu Kanälen mit veränderten biophysikalischen Eigenschaften durch Änderungen im Schaltverhalten der Kanäle (*gating*) und / oder in der Kinetik. Ein Beispiel hierfür ist die Mutante T474I, die sich im intrazellulären S2-S3-Loop befindet [104]. Sie generiert hERG-charakteristische Membranströme, zeigt aber eine Aktivierung bei deutlich negativeren Spannungen sowie kleinere Ströme bei positiveren Spannungen.

Klasse 4-Mutationen zeigen veränderte oder gar fehlende Kanalselektivität für Ionen oder -permeabilität. Die Mutation N629D verursacht eine veränderte Kanal-Inaktivierung sowie eine Reduktion der Selektivität für  $K^+$ -Ionen gegenüber  $Na^+$ -Ionen [50].

Zusammenfassend verändern Mutationen der Klasse 1 und 2 die Anzahl  $N$  an funktionellen Proteinen in der Membran, Klasse 3-Mutationen beeinflussen die

Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  und Klasse 4-Mutationen verändern die Einzelkanalleitfähigkeit  $i$ .

Für die in dieser Studie untersuchten Mutationen könnten z.B. Immunoblot-Analysen, Immunofluoreszenz-Mikroskopie und Selektivitäts-Assays mit verschiedenen Kationenreihen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $^+$ ) hilfreich sein um sie gemäß **Tab. 4.1** einordnen und besser verstehen zu können.

### Darstellung der Assemblierungsfähigkeit von Ionenkanalmutanten durch Coexpressions-Experimente

Zur Beurteilung der Rolle der Assemblierung dienen die Coexpressionsversuche im molekularen 1:1-cRNA-Gemisch. Im humanen Organismus liegt jedes Gen in zwei Allelen vor. Entsprechend der Natur der Mutation und des Assemblierungsverhaltens sind theoretisch folgende Konstellationen bei einer gleichwertigen Expression der beiden Allele möglich:

#### 1. rezessives Verhalten (Haploinsuffizienz)

Das Genprodukt eines (Wildtyp-) Allels bildet homomere funktionelle Kanäle und das Genprodukt des mutierten Allels bildet keine homomeren funktionellen Kanäle und tritt nicht in Wechselwirkung mit dem Wildtyp-Allel. Entsprechend wird die zu erwartende Stromdichte um 50% reduziert sein. In der Literatur finden sich vor allem Beispiele für KCNQ1 [79, 80], aber auch für hERG [68].

#### 2. dominant-negatives Verhalten

Das Genprodukt des mutierten Allels bildet Heteromere mit Wildtyp-Untereinheiten, wobei es durch eine einzige defekte Untereinheit zu einem Funktionsverlust des gesamten Kanalkomplexes kommt. Bei einer freien stochastischen Verteilung der mutierten und nicht-mutierten Untereinheiten würde man 1/16 (6,3%) des Wildtyp-Stromes erwarten [42, 77].

In der Literatur gut beschrieben sind die Mutationen A561V [45] und N470D [28], die beide eine Coassemblierung von mutierten und nicht-mutierten Untereinheiten zeigen, welche mit ER-Retention und Protein-Degradation

einhergehen. Für beide Mutationen sind mittlerweile chemische Chaperone und Mechanismen gefunden worden, die die Funktionalität des hERG-Kanals zumindest teilweise wiederherstellen können (siehe weiter unten). Auch G628S gilt als dominant-negativ, wenngleich sie in dieser Studie komplette Funktionalität zeigte. Sanguinetti *et al.* führten 1996 [75] ebenfalls *voltage clamp*-Versuche an *xenopus laevis*-Oozyten durch. Bei den Coexpressionsversuchen zeigte sich eine Hemmung des Gesamtstroms auf 12% bezogen auf den Wildtyp. Durch biochemische Methoden konnte nachgewiesen werden, dass die Mutante G628S ein normales *trafficking* zeigt und in der Plasmamembran lokalisiert ist [104].

### 3. Untypisches Verhalten

Falls eine mutierte Untereinheit nicht zu einer kompletten Inaktivierung des Gesamtkanals führt oder erst größere Verhältnisse einen Ausfall des Kanalstroms bewirken, so würde dies nicht zu den beiden oben beschriebenen Verhalten führen. Es ist dann theoretisch eher so zu betrachten wie ein umgekehrt-dominant-negativer Effekt: Das Genprodukt des mutierten Allels bildet Heteromere mit den Wildtyp-Untereinheiten, wobei in diesem Fall aber die Wildtyp-Untereinheiten das gesamte Protein stabilisieren und einen „dominant-positiven“ Effekt auszuüben scheinen.

Für die in dieser Studie untersuchten Mutation R1055Q decken sich die Ergebnisse mit der klinischen Einteilung als Polymorphismus [47].

Bei den Ergebnissen der Coexpressionsversuche dieser Studie liegt ein heterogenes Bild vor: Es gibt Mutationen mit einem hERG-charakteristischen Membranstrom um die 50% (T623I, Y611X), die dem oben beschriebenen rezessiven Muster zuzuordnen sind, sowie Mutationen, deren Amplituden bei 70% bis nahezu 100% (untypisches Verhalten) des Wildtyp-Stroms liegen (G628S, K638Q, Q688X, R1055Q). Keine Coexpression zeigt einen kompletten Verlust der Stromamplituden des Wildtyps. Die Coexpressionen dieser Studie lassen vermuten, dass die Mutanten möglicherweise in der Lage sind, mit den Untereinheiten des Wildtyps heterotetramere funktionelle Kanäle auszubilden,

und dadurch die atypischen Ströme im Vergleich zu den theoretisch vermuteten Verhalten (rezessiv und dominant-negativ) zeigen.

### Teilweise Wiederherstellung der Kanalfunktionalität

Bei einigen dominant-negativen Mutationen konnte, zu einem gewissen Grad, die Funktionalität des hERG-Kanals durch diverse Mechanismen wiederhergestellt werden. Einige dieser Mutanten sind Temperatur-sensibel. So zeigen unter anderem die Mutationen N470D [28, 105], T65P [67] und R752W [23] einen deutlichen *trafficking*-Defekt, wenn sie in Säugerzellen oder HEK-293-Zellen bei 37°C inkubiert werden. Ein deutlicher Anstieg an funktionellen Kanälen in der Membran konnte erzielt werden durch Absenken der Inkubationstemperatur auf 27°C für 24 Stunden bzw. Verwendung des heterologen Expressionssystem *xenopus laevis* bei 18°C bis 22°C . Eine andere Möglichkeit bietet das gezielte Einsetzen chemischer Chaperone. So sprechen N470D, T65P und S601G sehr gut an auf den hERG-Kanal-Blocker E-4031. Die Kanalfunktionalität von A561V kann jedoch mit E-4031 nicht wiederhergestellt werden [45]. Bei N470D funktioniert das *rescue* auch mittels 10%iger Glycerol-Lösung. Kombiniert man die Temperaturenniedrigung mit der Beimengung von Glycerol, so erhält man keinen Effekt mehr. Weitere Medikamente, die zu einer Wiederherstellung der Funktionalität dienen können, sind Astemizole, Cisapride (z.B. N470D) und ALLN (z.B. A561V). Diskutiert wird auch die Interaktion von beta-Untereinheiten wie MiRP [1] und minK [60].

Bei den Mutationen dieser Studie zeigt sich generell ein Einfluss auf die Inaktivierung: Es ergaben sich Änderungen im makroskopischen Gleichgewichts-Inaktivierungsverhalten. Diese deuten an, dass es sich um eine C-Typ-Inaktivierung handelt (auch wenn hier eher Links- als Rechtsverschiebungen auftraten), wie schon 1996 von Schönherr und Heinemann [81] für Mutationen in der Porenregion postuliert. In der Aktivierung gibt es keine darstellbare Veränderung. Die S818L-Studie von Nakajima [64] schlägt vor, dass es am C-Terminus eine zyklische Nukleotid-Bindungsdomäne geben könnte, die den

Aktivierungs-/Deaktivierungsprozess steuert. Hierzu könnte man weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Kinetik vornehmen.

Aufgrund der Änderung in der Inaktivierung kann man theoretisch vermuten, dass es zwischen Wildtyp und Mutante zu irgendeiner Interaktion gekommen sein kann. Man kann daraufhin die Vermutung anstellen, dass heteromere Kanäle gebildet wurden, was aber durch andere Methoden nachgewiesen werden müsste.

Eine Möglichkeit wäre, dass sich Selektivitäten geändert haben (Permeabilität). Auch dies würde sich auf den makroskopischen Strom auswirken ( $I_{ion}$ ). Hierzu müssten Selektivitäts-Assays mit unterschiedlichen Kationen-Reihen ( $Na^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$ ) durchgeführt werden.

In der Literatur wird der Grad der Unterdrückung des hERG-Stroms in Mutationen am C-Terminus als weniger gravierend betrachtet als bei Mutationen in der Pore [63]. In dieser Studie ist kein Unterschied in der Schwere abzulesen zwischen Mutationen in der Pore und im C-Terminus.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse aus elektrophysiologischen Messungen im heterologen Expressionssystem spiegeln den klinischen Hintergrund der Patienten nur unzureichend wider. Jedoch haben die Patienten, die die in dieser Studie bearbeiteten Mutationen in sich tragen, ein nach den Kriterien [84] klinisch diagnostiziertes LQT2-Syndrom. In den wenigsten Fällen konnte bisher eine direkte Genotyp-Phänotyp-Korrelation gezeigt werden, was oftmals auf der Verwendung von nicht-humanen heterologen Expressionssystemen in isolierten Zellen beruht. Eine bessere Wahl wären Messungen aus gewonnenen Zellen aus Herzmuskel-Biopsien, bei denen auch inter-zelluläre Kommunikation stattfindet. Aus ethischen Gründen werden jedoch in der Regel keine Herzmuskel-Biopsien vorgenommen. Auch Umwelt-, Ernährungs- und andere physiologische Einflüsse, denen die Patienten ausgesetzt sind, finden keine Berücksichtigung in diesen rein experimentellen Versuchsansätzen. Diese Arbeit diene nicht als diagnostisches Mittel, sondern hier würden dann humangenetische Untersuchungen (*screenings*) und davon abgeleitete

epidemiologische Studien zu einem größeren Verständnis und einer besseren Vorsorge des LQT2-Syndroms führen.

Was aber dieses System leisten kann, ist das Testen von Substanzen im Zulassungsverfahren für Medikamente, was bereits für klinisch-pharmakologische Studien umgesetzt ist. Hier sollen Auslöser für das erworbene, medikamenten-induzierte LQT-Syndrom detektiert werden.

Die Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass die mutierten Untereinheiten mit den Wildtyp-Untereinheiten zumindest zum Teil heterotetramere funktionelle Proteinkomplexe bilden. Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation ist somit nicht direkt gegeben. Die derzeitige Entwicklung von Genchips und damit zusammenhängend von Genanalysen könnte zu einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation beitragen und damit zur Diagnostik und Risikobewertung des LQT2-Syndroms eingesetzt werden.

## 5. Zusammenfassung

Das *human ether-à-go-go related gene* (hERG) kodiert für die poren-bildende  $\alpha$ -Untereinheit eines Kaliumkanals, der den Ionenstrom  $I_{Kr}$  des verzögerten Gleichrichters in Herzmuskelzellen mediiert. Mutationen im hERG-Kanal können zum LQT2-Syndrom mit einem verlängerten QT-Intervall führen, das Arrhythmien bis hin zum Herzstillstand auslösen kann.

Für diese Studie wurden die sechs Mutationen T623I, G628S, K638Q, Y611X, Q688X und R1055Q elektrophysiologisch charakterisiert. Hierzu wurde cDNA der Mutationen transkribiert und die so gewonnene cRNA in Oozyten des süd-afrikanischen Krallenfrosches *xenopus laevis* injiziert, welche als heterologes Expressionssystem dienten. In vier experimentellen Ansätzen (Oozyten mit Wildtyp-, Mutanten-, 1:1-Gemisch-Wildtyp / Mutanten-cRNA und nicht-injizierte Oozyten) wurden Stromamplituden sowie Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (*two electrode voltage clamp-technique*) gemessen und analysiert.

Die Expressionen des Wildtyps und aller Coexpressionen zeigten hERG-typische Membranströme. Bei den mutierten cRNA-Klonen konnte kein hERG-typischer Membranstrom nachgewiesen werden. Keine Coexpression führte zu einer vollständigen Hemmung des Gesamtstroms, deshalb scheint ein dominant-negativer Mechanismus auf molekularer Ebene ausgeschlossen. Es zeigten sich Werte zwischen 42% und 98% bezogen auf den Wildtyp. Die Coexpressionen von T623I und Y611X zeigten mit 50% ein rezessives Verhalten auf molekularer Ebene. Die Coexpressionen von G628S, K638Q, Q688X und R1055Q zeigten mit Werten zwischen 70% und 100% eine gewisse Wiederherstellung der Kanalfunktionalität. Diese elektrophysiologischen Ergebnisse erlauben daher keine eindeutige Zuordnung zu einem molekularen Mechanismus. Die Coexpressionen dieser Studie zeigen, dass die Mutanten zum Teil in der Lage sind, mit den Untereinheiten des Wildtyps heterotetramere funktionelle Kanäle auszubilden.

Bei der Gleichgewichtsaktivierung des hERG-Kanals zeigte sich nur bei der Coexpression von Q688X mit dem Wildtyp eine Rechtsverschiebung um

$\Delta = 4,8$  mV, wobei die Ansprechbarkeit der Aktivierung bei allen sechs Mutationen konstant blieb. Bei der Inaktivierung zeigten sich Linksverschiebungen bei den Coexpressionen der Mutanten T623I ( $\Delta = 12,7$  mV), K638Q ( $\Delta = 11,3$  mV) und Y611X ( $\Delta = 34,3$  mV), was physiologisch zu einem verringerten Repolarisierungspotential führen würde. Die Coexpression der Mutante Q688X zeigte eine Rechtsverschiebung um  $\Delta = 10,7$  mV. Deutliche Unterschiede in der Ansprechbarkeit der Inaktivierung traten nicht auf. Für den Gesamtstrom und die Gleichgewichtsaktivierung lässt sich kein direkter Zusammenhang zwischen Position und Art der Mutation einerseits und elektrophysiologischer Charakterisierung andererseits ableiten. Wie von anderen Autoren für Mutationen in der S6-Helix und dem C-Terminus beschrieben, zeigten auch die Mutationen dieser Studie Verschiebungen in der Inaktivierung, womit eine mögliche Struktur-Funktions-Beziehung besteht. Lediglich die Mutation R1055Q zeigte keine Veränderung, womit sie als neutrale Mutation bzw. als Polymorphismus eingeordnet werden kann.

Für weitergehende Aussagen über Struktur-Funktions-Korrelationen müssten zusätzliche Experimente auf molekularer Ebene, wie z.B. Protein-Immunoassays und Immunofluoreszenz-Mikroskopie, durchgeführt und mit weiteren elektrophysiologischen Messungen abgeglichen werden.

## 6. Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

- [1] Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT und Goldstein SAN (1999) MiRP1 Forms  $I_{Kr}$  Potassium Channels with HERG and Is Associated with Cardiac Arrhythmia. *Cell* **97**:175-187.
- [2] Ackerman MJ (1998) The Long QT Syndrome: Ion Channel Diseases of the Heart. *Mayo Clin Proc* **73**:250-269.
- [3] Aidley DJ, Stanfield PR (1996) Molecules in Action. *Cambridge University Press*.
- [4] Bauer CK, Schwarz JR (2000) Physiology of EAG  $K^+$  Channels. *J Membr Biol* **182**:1-15.
- [5] Beeler GW, Reuter H (1977) Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibres. *J Physiol* **268**:177-210.
- [6] Bezanilla F (2000) The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels. *Physiol Rev* **80**:555-592.
- [7] Bezanilla F, Armstrong CM (1977) Inactivation of the Sodium Channel. *J Gen Physiol* **70**:549-566.
- [8] Borchard U, Hafner D (2000) Ionenkanäle und Herzrhythmusstörungen. *Z Kardiol* **89**:III/6-III/12.
- [9] Brewer JW, Corley RB (1996) Quality control in protein biogenesis: thiol-mediated retention monitors the redox state of proteins in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **109**:2383-2392.
- [10] Chevalier P, Rodriguez C, Bontemps L, Miquel M, Kirkorian G, Rousson R, Potet F, Schott JJ, Baró I, Toubol P (2001) Non-invasive testing of acquired long QT syndrome: Evidence of multiple arrhythmogenic substrates. *Cardiovasc Res* **50**:386-398.
- [11] Chugh SS, Kelly KL, Titus JL (2000) Sudden Cardiac Death With Apparently Normal Heart. *Circulation* **102**:649-654.
- [12] Coraboeuf E, Nargeot J (1993) Electrophysiology of human cardiac cells. *Cardiovasc Res* **27**:1713-1725.
- [13] Corrado D, Basso C, Thiene G (2001) Sudden cardiac death in young people with apparently normal heart. *Cardiovasc Res* **50**(2):399-408.
- [14] Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT (1995) A Molecular Basis For Cardiac Arrhythmia: HERG Mutations Cause QT Syndrome. *Cell* **80**:795-803.
- [15] Delisle BP, Anson BD, Rajamani S, January CT (2004) Biology of Cardiac Arrhythmias: Ion Channel Protein Trafficking. *Am Heart Association* **94**:1418-1428.
- [16] Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of  $K^+$  Conduction and Selectivity. *Science* **280**:69-77.
- [17] Dumont JN (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis*. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* **136**:153-79.
- [18] Duncan RS, McPate MJ, Ridley JM, Gao Z, James AF, Leishman DJ, Leaney JL, Witchel HJ, und Hancox JC (2007) Inhibition of the HERG potassium channel by the tricyclic antidepressant doxepin. *Biochem Pharmacol* **74**(3):425-437.
- [19] Durell SR, Guy HR (1992) Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels. *Biophys J* **62**:238-250.

- [20] Durell SR, Shrivastava IH, Guy HR (2004) Models of the Structure and Voltage-Gating Mechanism of the Shaker K<sup>+</sup> Channel. *Biophys J* **87**:2116-2130.
- [21] England SK, Uebele VN, Shear H, Kodali J, Bennett PB, Tamkun MM (1992) Characterization of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel beta subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:6309-6313.
- [22] Ficker E, Dennis AT, Obero-Paz CA, Castaldo P, Tagliatela M und Brown AM (2000) Retention in the Endoplasmatic Reticulum as a Mechanism of Dominant-negative Current Suppression in Human Long QT Syndrome. *J Mol Cell Cardiol* **32**:2327-2337.
- [23] Ficker E, Thomas D, Viswanathan PC, Dennis AT, Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Wible BA, Kaufman ES, Iyengar S, Schwartz PJ, Rudy Y, Brown AM (2000) Novel characteristics of a misprocessed mutant HERG channel linked to hereditary long QT syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**:H1748-H1756.
- [24] Ficker E, Obero-Paz CA, Zhao S, Brown AM (2002) The Binding Site for Channel Blockers That Rescue Misprocessed Human Long QT Syndrome Type 2 *ether-à-go-go*-related Gene (HERG) Mutations. *J Biol Chem* **277**:4989-4998.
- [25] Furutani M, Trudeau MC, Hagiwara N, Seki A, Gong Q, Zhou Z, Imamura S, Nagashima H, Kasanuki H, Takao A, Momma K, January CT, Robertson GA, Matsuoka R (1999) Novel Mechanism Associated With an Inherited Cardiac Arrhythmia: Defective Protein Trafficking by the Mutant HERG (G601S) Potassium Channel. *Circulation* **99**:2290-2294.
- [26] Goldin AL (1992) Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. *Methods Enzymol* **207**:266-279.
- [27] Gong Q, Anderson CL, January CT, und Zhou Z (2002) Role of glycosylation in cell surface expression and stability of HERG potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**:H77-H84.
- [28] Gong Q, Anderson CL, January CT, Zhou Z (2004) Pharmacological rescue of trafficking defective HERG channels formed by coassembly of wild-type and long QT mutant N470D subunits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**:H652-H658.
- [29] Gong Q, Jones MA, Zhou Z (2006) Mechanims of Pharmacological Rescue of Trafficking-defective hERG Mutant Channels in Human Long QT Syndrome. *J Biol Chem* **281**:4069-4074.
- [30] Griffith LC (2001) Potassium Channels: The importance of transport signals. *Curr Biol* **11**:R226-R228.
- [31] Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M (1988) Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* **395**:223-253.
- [32] Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakman B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**:85-100.
- [33] Hammond C, Helenius A (1995) Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* **7**:523-529.
- [34] Hanson J, Huxley HE (1953) The structural basis of the cross-striation in muscle. *Nature* **172**:530-532.
- [35] Haselgrove JC, Huxley HE (1973) X-ray evidence for radial cross-bridge movement and for the sliding filament model in actively contracting skeletal muscle. *J Mol Biol* **77**:549-568.
- [36] Haverkamp W, Eckardt L, Kirchhof P, Mönnig G, Schulze-Bahr E, Wedekind H, Borggreffe M, Madeja M, Breithardt G (2000) Neue Erkenntnisse in der Arrhythmiegenese – Die Rolle der Ionenkanäle und genetische Aspekte. *Z Kardiol* **89**:X/2-X/10.
- [37] Helenius A (2001) Quality control in the secretory assembly line. *Phil Trans R Soc Lond B* **356**:147-150.
- [38] Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich R (1990) Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **250**:533-538.

- [39] Huxley AF, Niedergerke R (1954) Structural changes in muscle during contraction. Interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* **173**:971-973.
- [40] Huxley HE (1969) The mechanism of muscle contraction. *Science* **164**:1356-1366.
- [41] Isbrandt D, Friederich P, Solth A, Haverkamp W, Ebneith A, Borggreffe M, Funke H, Sauter K, Breithardt G, Pongs O, Schulze-Bahr E (2002) Identification and functional characterization of a novel KCNE2 (MiRP1) mutation that alters HERG channel kinetics. *J Mol Med* **80**:524-532.
- [42] January CT, Gong Q, Zhou Z (2000) Long QT Syndrome: Cellular Basis and Arrhythmia Mechanism in LQT2. *J Cardiovasc Electrophysiol* **11**:1413-1418.
- [43] Jervell A, Lange-Nielsen F (1957) Congenital deaf-mutism, function heart disease with prolongation of the QT interval and sudden death. *Am Heart J* **54**:59-68.
- [44] Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R (2003) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* **423**:42-48.
- [45] Kagan A, Yu Z, Fishman GI, McDonald TV (2000) The Dominant Negative LQT2 Mutation A561V Reduces Wild-type HERG Expression. *J Biol Chem* **275**:11241-11248.
- [46] Kaupp UB, Seifert B (2001) Molecular Diversity of Pacemaker Ion Channels. *Annu. Rev. Physiol.* **63**:235-57.
- [47] Koo SH, Ho WF, Lee EJD (2005) Genetic polymorphisms in KCNQ1, HERG, KCNE1 and KCNE2 genes in Chinese, Malay and Indian populations of Singapore. *Br J Clin Pharmacol* **61**:301-308.
- [48] Kopito RR (1999) Biosynthesis and Degradation of CFTR. *Physiol Rev* **79**:167-173.
- [49] Kuschinsky W (1999) Herz-Kreislauf-Funktion. *Deetjen und Speckmann (Hrsg) Physiologie*. 3. Auflage:303-305.
- [50] Lees-Miller JP, Duan Y, Teng GQ, Thorstad , Duff HJ (2000) Novel Gain-of-Function Mechanisms in K<sup>+</sup> Channel-Related Long-QT Syndrome: Altered Gating and Selectivity in the HERG1 N629D Mutant. *Circ Res* **86**:507-513.
- [51] Li H, Fuentes-Garcia J, Towbin JA (2000) Current Concepts in Long QT Syndrome. *Pediatric Cardiology* **21**:542-550.
- [52] Li X, Xu J, Li M (1997) The Human  $\Delta$ 1261 Mutation of *HERG* Potassium Channel Results in a Truncated Protein That Contains a Subunit Interaction Domain and Decreases the Channel Expression. *J Biol Chem* **272**:705-708.
- [53] Lockless SW, Zhou M, MacKinnon R (2007) Structural and Thermodynamic Properties of Selective Ion Binding in a K<sup>+</sup> Channel. *PLoS Biol* **5**:1079-1088.
- [54] Long SB, Campbell EB, MacKinnon R (2005) Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling. *Science* **309**:903-908.
- [55] Ma D, Zerangue N, Lin YF, Collins A, Yu M, Jan YN, Jan YJ (2001) Role of ER Export Signals in Controlling Surface Potassium Channel Numbers. *Science* **291**:316-319.
- [56] MacKinnon R (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**:232-235.
- [57] MacKinnon R (1995) Pore loops: an emerging theme in ion channel structure. *Neuron* **14**:889-892.
- [58] MacKinnon R (2004) Nobel Lecture: Potassium Channels and the Atomic Basis of Selective Ion Conduction. *Bioscience Reports* **24**:75-100.
- [59] Madeja M und Mußhoff U (1992) Die Eizelle des Krallenfrosches als Modell in der Neurophysiologie. *EEG-Labor* **14**.

- [60] McDonald ThV, Yu Z, Ming Z, Palma E, Meyers MB, Wang KW, Goldstein SAN und Fishman GI (1997) A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current  $I_{Kr}$ . *Nature* **388**:289-292.
- [61] Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, und Sanguinetti MC (2000) A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *PNAS* **97**:12329-12333.
- [62] Myerburg RJ, Castellanos A, Kessler KM (2004) *Hurst's The Heart*, 8<sup>th</sup> ed., p.745.
- [63] Nakajima T, Furukawa T, Tanaka T, Katayama Y, Nagai R, Nakamura Y, Hiraoka M (1998) Novel Mechanism of HERG Current Suppression in LQT2 – Shift in Voltage Dependence of HERG Inactivation. *Circulation Res* **83**:415-422.
- [64] Nakajima T, Kurabayashi M, Ohyama Y, Kaneko Y, Furukawa T, Itoh T, Taniguchi Y, Tanaka T, Nakamura Y, Hiraoka M, Nagai R (2000) Characterization of S818L mutation in HERG C-terminus in LQT2. Modification of activation-deactivation gating properties. *FEBS Letters* **481**:197-203.
- [65] Noble D (2004) Modeling the Heart. *Physiology* **19**:191-197.
- [66] Ottschytsh N, Raes A, Van Hoorick D, Snyders DJ (2002) Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel  $\alpha$ -subunits identified in the human genome. *PNAS* **99**:7986-7991.
- [67] Paulussen A, Raes A, Matthijs G, Snyders DJ, Cohen N, Aerssens J (2002) A Novel Mutation (T65P) in the PAS Domain of the Human Potassium Channel HERG Results in the Long QT Syndrome by Trafficking Deficiency. *J Biol Chem* **277**: 48610-48616.
- [68] Paulussen A, Yang P, Pangalos M, Verhasselt P, Marrannes R, Verfaillie C, Vandenberg I, Crabbe R, Konings F, Luyten W, Armstrong M (2000) Analysis of the Human KCNH2 (HERG) Gene: Identification and Characterization of a Novel Mutation Y667X Associated with Long QT Syndrome and a Non-Pathological 9bp Insertion. *Mutation in Brief* **325**:1-5.
- [69] Pongs O (1992) Molecular Biology of Voltage-Dependent Potassium Channels. *Physiol Rev* **72**:S69-S88.
- [70] Pongs O (1997) Strukturmerkmale Kalium-selektiver Ionenkanäle. *Biospektrum* **3.97**
- [71] Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundqvist C, Bossaert L, Breithardt G, Brugada P, Camm JA, Cappato R, Cobbe SM, Di Mario C, Maron BJ, McKenna WJ, Pederson AK, Ravens U, Schwartz PJ, Trusz-Gluza M, Vardas P, Wellens HJJ, Zipes DP (2003) Update of the guidelines on sudden cardiac death of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal* **24**:13-15.
- [72] Roden DM, Lazzara R, Rosen M, Schwartz PJ, Towbin J, Vincent GM (1996) Multiple Mechanisms in the Long-QT Syndrome. *Circulation* **94**:1996-2012.
- [73] Romano C (1965) Congenital cardiac arrhythmia. *Lancet* **1**:658-659.
- [74] Ruppertsberg JP, Stocker M, Pongs O, Heinemann SH, Frank R, Koenen M (1991) *Nature* **352**:711-4.
- [75] Sanguinetti MC, Curran ME, Spector PS, Keating MT (1996) Spectrum of HERG  $K^+$ -channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:2208-2212.
- [76] Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995) A Mechanistic Link between an Inherited and an Acquired Cardiac Arrhythmia: HERG encodes the  $I_{Kr}$  Potassium Channel. *Cell* **81**:299-307.
- [77] Sanguinetti MC, Keating MT (1997) Role of delayed rectifier potassium channels in cardiac repolarization and arrhythmias. *News Physiol Sci* **12**:152-157.
- [78] Schäfer R (1999) Charakterisierung und funktionelle Bedeutung des erg-ähnlichen Kaliumstroms in laktotrophen Zellen der Ratte. Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.

- [79] Schmitt N, Calloe K, Nielsen NH, Buschmann M, Speckmann EJ, Schulze-Bahr E, Schwarz M (2007) The novel C-terminal KCNQ1 mutation M520R alters protein trafficking. *Biochem and Biophys Res Communications* **358**:304-310.
- [80] Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O (2000) A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *The EMBO Journal* **19**:332-340.
- [81] Schönherr R, Heinemann SH (1996) Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *J Physiol* **493**:635-642.
- [82] Schreibmayer W, Lester HA, Dascal N (1994) Voltage clamping of *Xenopus laevis* oocytes utilizing agarose-cushion electrodes. *Pflugers Arch.* **426** (5):453-8.
- [83] Schulze-Bahr E, Wedekind H, Haverkamp W, Borggrefe M, Assmann G, Breithardt G, Funke H (1999) The LQT syndromes – current status of molecular mechanisms. *Z Kardiol* **88**:245-254.
- [84] Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS (1993) Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation* **88**:782-284.
- [85] Schwartz PJ (1997) The long QT syndrome. *Curr Probl Cardiol* **22**:297-351.
- [86] Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent M, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AAM, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R (2001) Genotype-Phenotype Correlation in the Long QT Syndrome: Gene-Specific Triggers for Life-Threatening Arrhythmias. *Circulation* **103**:89-95.
- [87] Sewing S, Röper J, Pongs O (1996) Struktur und Funktion spannungsabhängiger K<sup>+</sup>-Kanäle. *Neuroforum* **2**:21-28.
- [88] Shibasaki T (1987) Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart. *J Physiol.* **387**:227-250.
- [89] Shih HT (1994) Anatomy of the Action Potential in the Heart. *Texas Heart Institute Journal* **21**:30-41.
- [90] Smith PL, Baukrowitz Th, Yellen G (1996) The inward rectification mechanisms of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* **379**:833-836.
- [91] Snyders DJ (1999) Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* **42**:377-390.
- [92] Spector PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC (1996) Class III Antiarrhythmic Drugs Block HERG, a Human Cardiac Delayed Rectifier K<sup>+</sup> Channel. Open-Channel Block by Methansulfonanilides. *Circulation Res* **78**:499-503.
- [93] Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT und Sanguinetti MC (1996) Fast Inactivation Causes Rectification of the I<sub>Kr</sub> Channel. *J. Gen. Physiol.* **107**:611-619.
- [94] Suessbrich H, Schönherr R, Heinemann SH, Attali B, Lang F, Busch AE (1997) The inhibitory effect of the antipsychotic drug haloperidol on HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol* **120**(5):968-74.
- [95] Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B und Robertson GA (1995) HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* **269**:92-95.
- [96] Tseng GN (2001) I<sub>Kr</sub>: The hERG Channel. *J Mol Cell Cardiol* **33**:835-849.
- [97] Valiyaveetil FI, Leonetti M, Muir TW, MacKinnon R (2006) Ion Selectivity in a Semisynthetic K<sup>+</sup> Channel Locked in the Conductive Conformation. *Science* **314**:1004-1007.
- [98] Vandenberg JI, Walker BD, Campbell TC (2001) HERK K<sup>+</sup> channels: friend and foe. *TRENDS in Pharmacological Sciences* **22** No.5.

- [99] Ward OC (1964) A new familial cardiac syndrome in children. *J Ir Med Assoc* **54**:103-106.
- [100] Warmke JF, Drysdale R und Garnetzky B (1991) A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila eag* locus. *Science* **252**:1560-1562.
- [101] Warmke JF, Ganetzky B (1994) A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**:3438-3442.
- [102] Wever EFD, Robles de Medina EO (2004) Sudden Death in Patients Without Structural Heart Disease. *J Am Coll Cardiol* **43**:1137-44.
- [103] Yarov-Yarovoy V, Baker D, Catterall WA (2006) Voltage sensor conformation in the open and closed state of structural models of K<sup>+</sup>channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(19):7292-7297.
- [104] Zhou Z, Gong Q, Epstein ML, January CT (1998) HERG Channel Dysfunction in Human Long QT Syndrome. Intracellular Transport and Functional Defects. *J Biol Chem* **273**:21061-21066.
- [105] Zhou Z, Gong Q, January CT (1999) Correction of Defective Protein Trafficking of a Mutant HERG Potassium Channel in Human Long QT Syndrome. Pharmacological and Temperature Effects. *J Biol Chem* **274**:31123-31126.
- [106] Zipes DP, Wellens HJJ (1998) Sudden Cardiac Death. *Circulation* **98**:2334-2351.

## 6.2 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen

<b>Abb. 1.1:</b>	Ionenströme im AP und AP des Kammermyokards [72].	3
<b>Abb. 1.2:</b>	EKG mit Rhythmusstörungen, Torsade de pointes [62].	4
<b>Abb. 1.3:</b>	Schematische Darstellung der Topologie einer <i>shaker</i> -Typ-Kaliumkanaluntereinheit [70].	8
<b>Abb. 1.4:</b>	Schematische Darstellung des Schaltverhaltens eines klassischen $K_v$ -Kanals mit N-Typ-Inaktivierung ( <b>A</b> ) und eines klassischen Einwärtsgleichrichters ( <b>B</b> ) [78].	10
<b>Abb. 1.5:</b>	Schaltverhalten des hERG-Kanals [78].	11
<b>Abb. 2.1:</b>	Durchgeführte Arbeiten des Forschungsprojektes im Rahmen des SFB 556 am Universitäts-Klinikum Münster.	14
<b>Abb. 2.2:</b>	Schema der Lokalisation der Klone, Klassifizierung der Mutationen.	15
<b>Abb. 2.3:</b>	Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches <i>Xenopus laevis</i> in den Reifestadien I bis VI (nach Dumont, 1972; Foto aus dem Institut für Physiologie I in Münster, Prof. Madeja).	21
<b>Abb. 2.4:</b>	Äquivalenter Schaltkreis für eine biologische Zelle ( $C = R$ ) [3].	24
<b>Abb. 2.5:</b>	Blockschaltbild zum elektrophysiologischen Versuchsaufbau der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik.	25
<b>Abb. 2.6:</b>	Darstellung des Spitzenstroms.	29
<b>Abb. 2.7:</b>	Darstellung der Strom-Spannungs-Kennlinie im Fließgleichgewicht.	30
<b>Abb. 2.8:</b>	Darstellung der instantanen Strom-Spannungskennlinie.	31
<b>Abb. 2.9:</b>	Darstellung der Gleichgewichts-Aktivierung und -Inaktivierung des Kanalstroms.	32
<b>Abb. 2.10:</b>	Darstellung der Gleichgewichts-Inaktivierung des hERG-Stroms.	34
<b>Abb. 3.1.1:</b>	Darstellung und Analyse von Ganzzellströmen nach Hyperpolarisation der Punktmutation T623I.	39
<b>Abb. 3.1.2:</b>	Vergleich der Ganzzellströme der Punktmutation T623I während der Aktivierung und Inaktivierung.	41
<b>Abb. 3.1.3:</b>	Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der Punktmutation T623I.	44
<b>Abb. 3.2.1:</b>	Darstellung und Analyse der Ströme nach Hyperpolarisation der Punktmutation G628S.	46
<b>Abb. 3.2.2:</b>	Vergleich der Ganzzellströme der Punktmutation G628S während der Aktivierung und Inaktivierung.	48
<b>Abb. 3.2.3:</b>	Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der Punktmutation G628S.	50
<b>Abb. 3.3.1:</b>	Darstellung und Analyse der Ströme nach Hyperpolarisation der Punktmutation K638Q.	53
<b>Abb. 3.3.2:</b>	Vergleich der Membranströme der Punktmutation K638Q während der Aktivierung und Inaktivierung.	55
<b>Abb. 3.3.3:</b>	Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der Punktmutation K638Q.	57
<b>Abb. 3.4.1:</b>	Darstellung und Analyse der Ströme nach Hyperpolarisation der C-terminalen Punktmutation R1055Q.	60
<b>Abb. 3.4.2:</b>	Vergleich der Ganzzellströme der Punktmutation R1055Q während der Aktivierung und Inaktivierung.	62
<b>Abb. 3.4.3:</b>	Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der C-terminalen Punktmutation R1055Q.	64

<b>Abb. 3.5.1:</b>	Darstellung und Analyse der Ströme nach Hyperpolarisation der C-terminalen Abbruchmutation Q688X. ....	67
<b>Abb. 3.5.2:</b>	Vergleich der Ganzzellströme der C-terminalen Abbruchmutation Q688X während der Aktivierung und Inaktivierung. ....	69
<b>Abb. 3.5.3:</b>	Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der C-terminalen Abbruchmutation Q688X. ....	71
<b>Abb. 3.6.1:</b>	Darstellung und Analyse der Ströme nach Hyperpolarisation der C-terminalen Abbruchmutation Y611X. ....	73
<b>Abb. 3.6.2:</b>	Vergleich der Ganzzellströme der C-terminalen Abbruchmutation Y611X während Aktivierung und Inaktivierung. ....	74
<b>Abb. 3.6.3:</b>	Vergleich und Analyse der Strom-Spannungs- sowie der Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der C-terminalen Abbruchmutation Y611X. ....	76
<b>Abb. 4.1:</b>	Zusammenhänge zwischen Gesamtstrom, Biosynthese und <i>trafficking</i> . ....	83

### Tabellen

<b>Tab. 1.1:</b>	Molekulare Grundlagen des Long QT-Syndroms [36]. ....	5
<b>Tab. 2.1:</b>	Zusammenfassung der Pulsparameter. ....	34
<b>Tab. 3.1:</b>	Zusammenfassung der Parameter von Amplitude und Latenz. ....	78
<b>Tab. 3.2:</b>	Zusammenfassung der Parameter von Aktivierung und Inaktivierung. ....	80
<b>Tab. 4.1:</b>	Klassifikation für kardiale Ionenkanal-Mutationen [15]. ....	84

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

AP	Aktionspotential
ATP	Adenosin-triphosphat
CHO	<i>chinese hamster ovary</i> , Eizellen des chinesischen Hamsters
EAD	<i>early afterdepolarizations</i>
EAG	ether-à-go-go gene
ERG	ether-à-go-go related gene
EKG	Elektrokardiogramm
ELK	ether-a-go-go-like gene
ER	Endoplasmatisches Retikulum
HEK 293	<i>human embryonic kidney</i> , humane embryonale Nieren-Zelllinie
hERG	humanes <i>ether-a-go-go-related gene</i>
JLNS	Jervell & Lange-Nielsen-Syndrom
LQT	Langes QT-Syndrom
MinK	<i>minimal potassium channel gene</i> , $\beta$ -Untereinheit
MiRP	<i>MinK-related protein</i> , $\beta$ -Untereinheit
RWS	Romano-Ward-Syndrom
SFB 556	Sonderforschungsbereich 556
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
TEVC	<i>two electrodes voltage clamp</i>
UKM	Universitätsklinikum Münster

# **Lebenslauf**

## **Zur Person**

Name: Katja Buhler, geb. Vogt  
Geburtsdatum: 19.01.1979  
Geburtsort: Lünen  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## **Schulischer Werdegang**

08/1985 – 06/1989: Paul-Gerhardt-Grundschule in Lünen  
08/1989 – 06/1998: Freiherr-vom-Stein-Gymnasium in Lünen  
15.06.1998: Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

## **Universitärer Werdegang**

10/1998: Beginn des Studiums der Zahnheilkunde an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
13.09.1999: Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
10/2001: Beginn der experimentellen Tätigkeit für die Promotion am Institut für Physiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität unter der Leitung von Prof. Dr. Erwin-Josef Speckmann und Dr. Martin Schwarz  
03.04.2002: Zahnärztliche Vorprüfung  
22.12.2004: Staatsexamen  
11.01.2005: Approbation als Zahnärztin

## **Beruflicher Werdegang**

03/2005 – 01/2006: Assistenz Zahnärztin in der Praxis von Dr. D. Plümer in Dinslaken  
02/2006 – 03/2007: Assistenz Zahnärztin in der Praxis von P. Locklair und Dr. H. Jaehrling in Selm  
seit 04/2007: Angestellte Zahnärztin in der Praxis von P. Locklair und Dr. H. Jaehrling in Selm

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Erwin-Josef Speckmann für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten im Institut für Physiologie I danken.

Mein ganz besonderer Dank gebührt Dr. Martin Schwarz, der mich in all den Jahren mit unermüdlichem Engagement unterstützt hat. Er war mir stets eine große Hilfe in technischen Anleitungen und Auswertungen der Ergebnisse. Ich danke ihm auch für seine unendliche Geduld sowie für die wertvollen Anregungen und Diskussionen, durch die diese Arbeit eine große Aufwertung erfahren hat.

Desweiteren möchte ich Frau Alexandra Markovic danken sowohl für ihre Hilfestellungen im Labor als auch für die Vorbereitung der Frosch-Eizellen.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie I möchte ich mich für die fortwährend freundliche, zuvorkommende und äußerst kollegiale Art bedanken, durch die ich mich als Doktorandin stets willkommen und integriert gefühlt habe.

Schließlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die mich während meiner gesamten akademischen Ausbildung liebevoll und tatkräftig unterstützt haben.



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Herrn  
Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann  
Institut für Physiologie  
des Universitätsklinikums Münster  
Robert-Koch-Straße 27 a

48149 Münster

Dienstgebäude:  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Telefax: 2115  
Raum: 431  
Auskunft erteilt:  
Frau Möllers  
E-Mail:  
irmgard.moellers@bezreg-muenster.nrw.de  
Aktenzeichen:  
50.0835.1.0 (G 32/97)

14. 08.2001

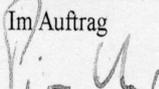
Betr.: Tierschutz;  
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren  
2. Verlängerung des Tierversuchs G 32/97:  
**„Experimentelle Epilepsieforschung“**  
Bezug: Antrag vom 25.07.2001  
Mein Genehmigungsbescheid vom 23. Oktober 1997  
- Az. 23.0835.1.0 (G 32/97) -

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Speckmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) verlängere ich auf den o. a. Antrag hin die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o. a. Versuchsvorhabens bis zum **31.10.2002**,

Für den im o. a. Genehmigungsbescheid unter Ziffer 3 aufgeführten stellvertretenden Leiter des Versuchsvorhabens habe ich an Stelle von Herrn Dr. Michael Madeja jetzt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mußhoff, Institut für Physiologie, Robert-Koch-Straße 27 a, 48149 Münster, eingesetzt.

Mit freundlichen Grüßen  
Im Auftrag

  
Dr. Piontkowski

### Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de • Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de • zentrale Telefaxnummer: (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820

ÖPNV ab Hbf: Linien 2 • 10 • 11 • 12 bis Haltestelle Windthorststraße (Haus K), Linien 14 • 20 bis Haltestelle Domplatz (Häuser A, B, C, H),

Linie 7 bis Haltestelle Wiener Str. (Haus W), Linie 15 bis Haltestelle Inselbogen (Haus F), Linie 1 • 9 bis Haltestelle Königsweg (Haus D).

Die Häuser S und T sind fußläufig 5 Min. vom Hbf in Richtung Innenstadt erreichbar.