Strukturdeterminanten für das Schaltverhalten des humanen spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv4.2

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt im Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

von

Jan Barghaan

Hamburg, 2008

Genehmigt vom Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Priv.-Doz Dr. R. BÄHRING Weiterer Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. K. WIESE Tag der Disputation: 10. Oktober 2008

Hamburg, den 25. September 2008

.



.

Professor Dr. Jörg Ganzhorn Leiter des Departments Biologie

Zusammenfassung

Kv4.2 Kaliumkanäle sind spannungsgesteuert und zeichnen sich durch eine schnelle Aktivierung und Inaktivierung aus. In Neuronen bilden ternäre Komplexe aus Kv4.2 α-Untereinheiten zusammen mit den akzessorischen β-Untereinheiten KChIP (Kv-Kanal interagierendes Protein) und DPP (Dipeptidyl-Aminopeptidase-ähnliches Protein) das molekulare Korrelat des unterschwellig aktivierten, somatodendritischen A-Typ Stroms (I_{SA}), der entscheidend an der Kontrolle dendritischer Erregbarkeit beteiligt ist. Die besondere Eigenschaft der Kv4 Kanäle schon bei Potenzialen negativ der Aktivierungsschwelle in einen refraktären, inaktivierten Zustand überzugehen, die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung, spielt dabei eine wichtige Rolle. Im Gegensatz zur gut untersuchten N-Typ Inaktivierung ist der Mechanismus der Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bisher weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer Mechanismus der Kv4.2 Geschlossen-Kanal-Inaktivierung vorgeschlagen, der strukturell auf einer Entkopplung von aktiviertem Spannungssensor und S6-Gate beruht.

Durch einen Alanin-Mutagenese-Scan im Bereich der Kopplungsstelle von Spannungssensor und S6-Gate mit nachfolgender thermodynamischer Analyse der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung einzelner Kv4.2-Mutanten konnte die Relevanz der Kopplungsstelle von Spannungssensor und S6-Gate für die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung herausgestellt werden. Für alle Kv4.2-Mutanten wurde die Affinität für den geschlossen-inaktivierten Zustand berechnet und so die Auswirkungen der Mutationen quantifiziert. Basierend auf diesen Parametern wurde eine *Double-Mutant-Cycle*-Analyse durchgeführt, die spezifische Aminosäuren im Bereich des S4-S5-Linkers und im S6-Segment als Interaktionspartner identifizierte. Insbesondere für die Aminosäuren E323 im S4-S5-Linker und V404 im S6-Segment ergab die *Double-Mutant-Cycle*-Analyse einen hohen Grad der Kopplung. Dieses Ergebnis konnte durch spezifische Redox-Modulation der korrespondierenden Cystein-Doppelmutante mit einem unabhängigen experimentellen Ansatz bestätigt werden.

Durch die Generierung von chimären Kanälen aus *Shaker* und Kv4.2 konnte gezeigt werden, dass die Kv4.2 Kopplungsstelle von Spannungssensor und Gate im *Shaker*-Kanal eine Inaktivierung vermittelt, während umgekehrt die *Shaker*-Kopplungsstelle die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung im Kv4.2-Kanal hemmt.

Abstract

Kv4.2 potassium channels are voltage-dependent and display rapid activation and inactivation. In neurons ternary complexes of Kv4.2 α -subunits and the accessory β -subunits KChIP (Kv-channel interacting protein) and DPP (dipeptidyl aminopeptidase-like protein) are the molecular correlate of the subthreshold activating, somatodendritic A-type current (I_{SA}), which is known to be involved in controlling dendritic excitability. A characteristic feature of Kv4 channel gating is the onset of inactivation at potentials negative to the activation threshold. This inactivation is termed closed-state inactivation, because at these potentials the channels enter a refractory, inactivated state directly from closed-states before reaching the open-state.

In contrast to the well studied mechanism of N-type inactivation the mechanism of Kv4.2 closed-state inactivation is poorly understood. In this study a novel model for the mechanism of Kv4.2 closed-state inactivation was tested, which is structurally based on uncoupling of the activated voltage sensor and the S6-Gate. The relevance of the coupling interface between voltage-sensor and S6-gate was demonstrated by means of Alanin scanning mutagenesis followed by detailed thermodynamic analysis of closed-state inactivation for the respective Kv4.2 mutants. For all functional Kv4.2 mutants affinities for the closed-inactivated state were calculated to quantify the mutation induced effects. Based on these parameters a double-mutant-cycle analysis was conducted, which identified specific interaction between amino acids in the S4-S5 linker region and the S6 region of the scan. Particularly for the glutamate at position 323 in the S4-S5 linker region and the valine at position 404 in S6 the double-mutant-cycle analysis revealed a high degree of interaction. Specific redox modulation of the corresponding double-cysteine mutant confirmed this result by an independent experimental approach.

Generation of chimeric channels consisting of *Shaker* and Kv4.2 showed that the Kv4.2 interface, which couples voltage-sensor and gate is able to mediate inactivation in a non-inactivating *Shaker* channel, while the *Shaker* interface inhibits closed-state inactivation in Kv4.2 channels.

Inhaltsverzeichnis

1	Einle	eitung		8
	1.1	Kaliur	nselektive Ionenkanäle	8
	1.2	Spani	nungesteuerte Kaliumkanäle	10
	1.3	Kv4-k	analkomplexe	13
	1.4	Shake	er- und Kv4-Inaktivierung	17
	1.5	Zielse	tzung	20
2	Mate	erial		21
	2.1	Chem	ikalien, Enzyme und Gebrauchsmaterialien	21
	2.2	Puffer	r und Lösungen	21
	2.3	Nährr	nedien	22
	2.4	Bakte	rienstämme	23
	2.5	Zelllin	ien	23
	2.6	Vekto	ren	23
	2.7	Verwe	endete Klone	23
3	Moth	noden		25
U	3 1	Molek	ularhiologische Methoden	25
	311	He He	rstellung kompetenter Bakterien	25
	3.1.2	2 Tra	ansformation von Bakterien	_0 25
	3.1.3	- Iso	lation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	26
	3.	1.3.1	Isolation von Plasmid-DNA aus 3 ml Bakterienkulturen	26
	3.	1.3.2	Isolation von Plasmid-DNA aus 50 ml Bakterienkulturen	26
	3.1.4	1 DN	A-Quantifizierung und Qualitätskontrolle	26
	3.	1.4.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der DNA	26
	3.	1.4.2	Agarose-Gelektrophorese	27
	3.	1.4.3	DNA Sequenzierung	27
	3.	1.4.4	DNA Sequenzanalyse	28
	3.1.5	5 Iso	lierung von DNA Fragmenten aus Agarose-Gelen	28
	3.1.6	6 In-v	vitro-Synthese von cRNA	28
	3.1.7	7 Qu	antifizierung und Qualitätskontrolle der synthetisierten cRNA	29
	3.1.8	B DN	A-Modifikationen	30
	3.	1.8.1	Restriktionshydrolyse	30
	3.	1.8.2	Ligation von DNA Fragmenten	30
	3.	1.8.3	Auffüllen von überhängenden 5'-Enden	30
	3.	1.8.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
	3.1.9	Ə Zie	Igerichtete in-vitro-Mutagenese	31
	3.	1.9.1	Kv4.2-Punktmutanten	33
	3.	1.9.2	Kanalchimären	33

	3.2	Ze	Ilbiologische Methoden	34
	3.2	.1	Präparation und Injektion von Xenopus-Oozyten	34
	3.2	.2	Routinehaltung von immortalisierten Zellen	34
	3.2	.3	Transfektion von immortalisierten Zellen	35
	3.3	Ele	ektrophysiologische Methoden	36
	3.3	.1	Patch-Clamp-Messungen	36
	3	3.3.1	1 Ausstattung des Patch-Clamp-Messstandes	38
	3	3.3.1	2 Versuchsdurchführung	39
	3	3.3.1	3 Datenerfassung	40
	3.3	.2	Die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Messungen	40
	3	3.3.2	1 Ausstattung des Oozyten-Messplatzes	41
	3	3.3.2	2 Versuchsdurchführung	41
	3	3.3.2	3 Datenerfassung	41
	3.3	.3	Stimulationsprotokolle und Datenauswertung	42
	3	3.3.3	1 Inaktivierungskinetik makroskopischer Ströme	42
	3	3.3.3	2 Deaktivierungskinetik makroskopischer Ströme	43
	3	3.3.3	3 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung	44
	3	3.3.3	4 Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung	45
	3	3.3.3	5 Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung	45
	3	3.3.3	6 Erholung von der Inaktivierung	48
		_	022	
4	Erg	gebn	555	50
4	Erg 4.1	gebn Ko	pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen	50 50
4	Erg 4.1 4.1	jebn Ko .1	pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung	50 50 51
4	Erg 4.1 4.1 4.1	gebn Ko .1 .2	pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung	50 50 51 53
4	Erg 4.1 4.1 4.1 4.1	,1 .3 .3	pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX Kanalkomplexe	50 50 51 53 56
4	Erg 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1	gebn Ko .1 .2 .3 .4	pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX Kanalkomplexe Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung	50 50 51 53 56 59
4	Erg 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1	gebn Kc .1 .2 .3 .4 .5	pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX Kanalkomplexe Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung Metallbrücken in Kv4.2-Cystein-Mutanten	50 50 51 53 56 59 63
4	Erg 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.2	(gebn Ko .1 .2 .3 .4 .5 Dy	pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX Kanalkomplexe Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung Metallbrücken in Kv4.2-Cystein-Mutanten namische Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate	50 50 51 53 56 59 63 66
4	Erg 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.2 4.2	gebn Ko .1 .2 .3 .4 .5 Dy .1	pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX Kanalkomplexe Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung Metallbrücken in Kv4.2-Cystein-Mutanten namische Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate Alanin-Mutagenese-Scan	50 50 51 53 56 59 63 66 68
4	Erg 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.2 4.2	yebn Ko .1 .2 .3 .4 .5 Dy .1 4.2.1	pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX Kanalkomplexe Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung Metallbrücken in Kv4.2-Cystein-Mutanten namische Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate Alanin-Mutagenese-Scan 1 Funktionalität der exprimierten Mutanten	50 50 51 53 56 59 63 66 68 69
4	Erg 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.2 4.2	gebn Ko .1 .2 .3 .4 .5 Dy .1 4.2.1	pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX Kanalkomplexe Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung Metallbrücken in Kv4.2-Cystein-Mutanten namische Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate Alanin-Mutagenese-Scan 1 Funktionalität der exprimierten Mutanten 2.1.1.1 Funktionelle Mutanten in der S4-S5-Linker-Region	50 51 53 56 59 63 66 68 69 71
4	Erg 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.2 4.2	gebn Kc .1 .2 .3 .4 .5 Dy .1 4.2.1 4.2	pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX Kanalkomplexe Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung Metallbrücken in Kv4.2-Cystein-Mutanten namische Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate Alanin-Mutagenese-Scan 1 Funktionalität der exprimierten Mutanten 2.1.1.1 Funktionelle Mutanten in der S4-S5-Linker-Region 2.1.1.2 Funktionelle Mutanten in der S6-Region	50 50 51 53 56 59 63 66 68 69 71 73
4	Erg 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.2 4.2 4.2	gebn Ko .1 .2 .3 .4 .5 Dy .1 4.2.1 4.2 4.2	 pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX Kanalkomplexe Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung Metallbrücken in Kv4.2-Cystein-Mutanten namische Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate Alanin-Mutagenese-Scan Funktionalität der exprimierten Mutanten 2.1.1.2 Funktionelle Mutanten in der S6-Region 2 Auswirkungen der Mutationen auf das Kv4.2-Schaltverhalten 	50 50 51 53 56 59 63 66 68 69 71 73 74
4	Erg 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.2 4.2 4.2	gebn Ko .1 .2 .3 .4 .5 Dy .1 4.2.1 4.2 4.2 4.2	pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX Kanalkomplexe Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung Metallbrücken in Kv4.2-Cystein-Mutanten namische Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate Alanin-Mutagenese-Scan 1 Funktionalität der exprimierten Mutanten 2.1.1.1 Funktionelle Mutanten in der S4-S5-Linker-Region 2.1.1.2 Funktionelle Mutanten in der S6-Region 2. Auswirkungen der Mutationen auf das Kv4.2-Schaltverhalten 2.1.2.1 Mutationen in der S4-S5-Linker-Region	50 50 51 53 56 59 63 66 68 69 71 73 74 79
4	Erg 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.2 4.2 2	gebn Ko .1 .2 .3 .4 .5 Dy .1 4.2.1 4.2 4.2 4.2	 pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX Kanalkomplexe Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung Metallbrücken in Kv4.2-Cystein-Mutanten namische Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate Alanin-Mutagenese-Scan 1 Funktionalität der exprimierten Mutanten 2.1.1.1 Funktionelle Mutanten in der S4-S5-Linker-Region 2 Auswirkungen der Mutationen auf das Kv4.2-Schaltverhalten 2.1.2.2 Mutationen in der S6-Region 	50 50 51 53 56 59 63 66 68 69 71 73 74 79 81
4	Erg 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.2 4.2 4.2	gebn Ko .1 .2 .3 .4 .5 Dy .1 4.2.1 4.2 4.2 4.2 4.2	 pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX Kanalkomplexe Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung Metallbrücken in Kv4.2-Cystein-Mutanten namische Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate Alanin-Mutagenese-Scan Funktionalität der exprimierten Mutanten 2.1.1.1 Funktionelle Mutanten in der S4-S5-Linker-Region 2.1.2.2 Mutationen in der S4-S5-Linker-Region 2.1.2.3 Übersicht der Mutationseffekte des Mutagenese-Scans 	50 51 53 56 59 63 66 68 69 71 73 74 79 81 84
4	Erg 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.2 4.2 4.2	gebn Ko .1 .2 .3 .4 .5 Dy .1 4.2.1 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2 .2	 pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX Kanalkomplexe Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung Metallbrücken in Kv4.2-Cystein-Mutanten namische Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate Alanin-Mutagenese-Scan 1 Funktionalität der exprimierten Mutanten 2.1.1.1 Funktionelle Mutanten in der S4-S5-Linker-Region 2 Auswirkungen der Mutationen auf das Kv4.2-Schaltverhalten 2.1.2.1 Mutationen in der S4-Region 2.1.2.2 Mutationen in der S6-Region 2.1.2.3 Übersicht der Mutationseffekte des Mutagenese-Scans Thermodynamische Analyse der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung 	50 51 53 56 59 63 66 68 69 71 73 74 79 81 84 90
4	Erg 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.2 4.2 4.2 4.2	gebn Ko .1 .2 .3 .4 .5 Dy .1 4.2.1 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2	 pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX Kanalkomplexe Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung Metallbrücken in Kv4.2-Cystein-Mutanten namische Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate Alanin-Mutagenese-Scan 1 Funktionalität der exprimierten Mutanten 2.1.1.1 Funktionelle Mutanten in der S4-S5-Linker-Region 2 Auswirkungen der Mutationen auf das Kv4.2-Schaltverhalten 2.1.2.1 Mutationen in der S4-S5-Linker-Region 2.1.2.2 Mutationen in der S6-Region 2.1.2.3 Übersicht der Mutationseffekte des Mutagenese-Scans Thermodynamische Analyse der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV 	50 51 53 56 59 63 66 68 69 71 73 74 79 81 84 90
4	Erg 4.1 4.1 4.1 4.1 4.1 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2	gebn Ko .1 .2 .3 .4 .5 Dy .1 4.2.1 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2 4.2.2 4.2.2	 pplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX Kanalkomplexe Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung Metallbrücken in Kv4.2-Cystein-Mutanten namische Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate Alanin-Mutagenese-Scan Funktionalität der exprimierten Mutanten 1.1.1 Funktionelle Mutanten in der S4-S5-Linker-Region 2 Auswirkungen der Mutationen auf das Kv4.2-Schaltverhalten 2.1.2.1 Mutationen in der S6-Region 2.1.2.3 Übersicht der Mutationseffekte des Mutagenese-Scans Thermodynamische Analyse der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung 1 Kinetische Analyse der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung 2 Double-Mutant-Cycle-Analyse 	50 51 53 56 59 63 66 69 71 73 74 79 81 84 90 95

		4.2.2.2	2 Elektrophysiologische Charakterisierung der Doppelmutanten	97
	4.2.2.2.3		3 Kinetische Analyse der Doppelmutanten	100
	4.2.2.2.4		4 Aminosäureinteraktionen zwischen S4-S5-Linker-Region und S6-Region	102
	4.2.3	3 Disu	fidbrücken zwischen S4-S5-Linker-Region und S6-Region	108
	4	.2.3.1	Cystein-Substitution	108
	4	.2.3.2	Spezifische Redox-Modulation der Cystein-Doppelmutante E323,V404C	109
	4.2.4	4 Kana	alchimären	117
	4	.2.4.1	Kv4.2/Shaker-Chimäre	118
	4	.2.4.2	Shaker/Kv4.2-Chimäre	119
5	Disk	kussion		123
	5.1	Kopplu	ng von Deaktivierung und Inaktivierung	123
	5.2	Dynam	sche Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate	124
	5.3	Physiol	ogische Relevanz	130
6	Lite	raturver	zeichnis	133
7	Anh	ang		144
	7.1	Plasmic	lkarten	144
	7.2	Abkürz	ungen	146
	7.3	Wissen	schaftlicher Werdegang	147
	7.4	Veröffe	ntlichungen und Kongressbeiträge	147
	7.5	Danksa	gung	149

1 Einleitung

1.1 Kaliumselektive lonenkanäle

Kaliumselektive Ionenkanäle stellen die größte und heterogenste Gruppe unter den Ionenkanälen dar. Sie kommen ubiquitär in allen Organismen von Archaea und Bakteria (Derst und Karschin, 1998; Jiang *et al.*, 2002; Schrempf *et al.*, 1995) über Pflanzen (Lebandy *et al.*, 2007) bis hin zum Tierreich (Tempel *et al.*, 1987; Pongs *et al.*, 1988) vor. Die Diversität dieser Gruppe entsteht durch eine große Anzahl verschiedener Kaliumkanalgene, die oftmals durch alternatives Spleißen der RNA-Transkripte unterschiedliche Kanäle codieren können. Kaliumselektive Ionenkanäle sind an einer Vielzahl von physiologischen Funktionen, wie Kaliumhomöostase, Signaltransduktion, sekretorischen Prozessen, Zellproliferation und der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials beteiligt. In Nervenzellen kontrollieren sie die Erregbarkeit und sind für die Repolarisation von Aktionspotenzialen verantwortlich (Hille, 2001; Coetzee *et al.*, 1999; Pardo, 2004).

In der Zellmembran bildet die einfachste Form des Kaliumkanals ein Tetramer oder ein Dimer aus α -Untereinheiten, die transmembranäre Domänen aufweisen. Die grobe Einteilung der Kaliumkanäle erfolgt nach der Anzahl dieser Transmembransegmente und der porenbildenden Domänen der einzelnen α -Untereinheiten. Die einfachste α -Untereinheit besteht aus nur zwei Transmembransegmenten, die über eine den Selektivitätsfilter tragende Porenschleife miteinander verbunden sind (2TM, 1P, Abbildung 1.1 A). Diese α-Untereinheiten kommen beispielsweise bei den einwärts rektifizierenden Kir-Kanälen und den prokaryotischen Kanälen KcsA (Doyle et al., 1998) und MthK (Jiang et al., 2002) vor. Die a-Untereinheiten der spannunggesteuerten Kv-Kanäle (z.B. Shaker, KCNQ, ERG, und Kv4) enthalten 6 Transmembransegmente (S1-S6) und eine porenbildende Domäne (6TM, 1P, Abbildung 1.1 C). Auch bei diesen Kanälen wird der funktionelle Kanal aus vier α-Untereinheiten gebildet. Obwohl der Calcium aktivierte BK-Kanal auch eine Spannungsabhängigkeit zeigt, wird er nicht zur Familie der Kv-Kanäle gezählt. Die α-Untereinheit dieses Kanals besteht aus insgesamt 7 Transmembransegmenten. Zusätzlich zu den Segmenten S1-S6 besitzt dieser Kanal vor dem S1- noch ein S0-Segment, so dass der N-Terminus auf der extrazellulären Seite liegt (Salkoff et al., 2006). Zu den Kaliumkanälen mit 4 Transmembransegmenten und zwei porenbildenden Domänen zählen die "Leckkanäle" (Goldstein et al., 1998; Abbildung 1.1 B) oder K_{2P}-Kanäle (z.B. TWIK, TREK, TASK, THIK). Diese Kanäle bilden Dimere und sind konstitutiv geöffnet, so dass sie das Ruhemembranpotenzial in die Nähe des K⁺-Gleichgewichtspotenzials bringen.



Abbildung 1.1: Topologiedarstellung der α -Untereinheiten verschiedener Kaliumkanalfamilien. A. Die α -Untereinheiten der K_{ir}-Kanäle und einiger bakterieller Kaliumkanäle bestehen aus nur zwei Transmembransegmenten (TM) und einer porenbildenden Domäne (P). B. Die "Leckkanäle" (z.B. TWIK, TREK, TASK) werden aus zwei Untereinheiten mit vier Transmembransegmenten und zwei porenbildenden Domänen gebildet. C. Die α -Untereinheiten der spannungsabhängigen Kv-Kanäle haben sechs Transmembransegmente und eine porenbildende Domäne. D. Einige Kaliumkänale bilden Dimere aus zwei α -Untereinheiten, die aus acht Transmembransegmenten und zwei porenbildenden Domänen bestehen (ScTOK1, NcTOK1).

Kanäle einer weiteren Gruppe bilden Dimere aus α -Untereinheiten mit 8 Transmembransegmenten und zwei porenbildenden Domänen und wurden bisher nur in Pilzen beschrieben (Ketchum *et al.*, 1995; Roberts, 2003; Abbildung 1.1 D).

Eine Gemeinsamkeit aller kaliumselektiven Ionenkanäle ist die Aminosäuresequenz TXGYGD, die sich in der Porenschleife der α -Untereinheiten befindet. Eine Ausnahme bilden Kanäle der K_{2P}-Familie, bei denen das Tyrosin teilweise durch ein Phenylalanin oder ein Leucin ersetzt wird (O'Connell *et al.*, 2002; Honoré *et al.*, 2007). Nach der Komplexbildung der α -Untereinheiten bilden je vier dieser Sequenzen den K⁺-Selektivitätsfilter der Kanäle. Die Carbonyl-Gruppen dieser Aminosäuren koordinieren die K⁺-Ionen und imitieren deren Hydrathülle. Das Abstreifen der Hydrathülle trägt zur hohen Selektivität für K⁺ bei. So ist die Anordnung der Carbonyle beispielsweise nicht geeignet die Hydrathülle des kleineren Na⁺-Ions nachzuahmen. (Doyle *et al.*, 1998).

1.2 Spannungesteuerte Kaliumkanäle

Kaliumkanäle ändern ihre Offenwahrscheinlichkeit als Antwort auf zahlreiche verschiedene Stimuli. Hierzu zählen die Änderung des pH-Wertes, das Binden von Liganden, wie Calcium (z.B. BK-Kanäle, Salkoff *et al.*, 2006), der β , γ -Untereinheiten von G-Proteinen (GIRK, bzw. Kir3, Yamada *et al.*, 1998) oder ATP (K_{ATP}, Aguilar-Bryan und Bryan, 1999) und nicht zuletzt die Änderung des Membranpotenzials (Gutman *et al.*, 2005).

Die Familie der spannungsgesteuerten K⁺-Kanäle oder Kv-Kanäle stellt die größte Gruppe innerhalb der kaliumselektiven Ionenkanäle dar. Die Kv-Kanäle lassen sich in sich in 12 Unterfamilien einteilen (Kv1 bis Kv12, Gutman *et al.*, 2005).

Die erste Charakterisierung von Kaliumleitfähigkeiten wurde von Hodgkin und Huxley im Riesenaxon von *Loligo pealei* durchgeführt (Hodgkin und Huxley, 1952). Da der beschriebene K⁺-Auswärtsstrom zu einer verzögerten Repolarisation nach einem Aktionspotenzial führte, wurde er als *Delayed-Rectifier*-Strom (verzögerte Gleichrichter) bezeichnet. Heute beschreibt der Begriff *Delayed-Rectifier* nicht oder nur sehr langsam inaktivierende Kv-Kanäle. Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, die nach Depolarisation eine schnelle Inaktivierung zeigen, werden im Gegensatz dazu als A-Typ Kaliumkanäle bezeichnet.

Die Grundlage für das Verständnis der molekularen Organisation und des Schaltverhaltens der Kv-Kanäle bildete die Klonierung des *Shaker*-Kanals aus der gleichnamigen *Drosophila melanogaster* Mutante (Tempel *et al.*, 1987; Kamb *et al.*, 1988; Pongs *et al.*, 1988). Der *Shaker*-Kanal dient bis heute als Prototyp für alle Kv-Kanäle und ist der bestuntersuchte aller Kaliumkanäle. Insbesondere die Kv-Kanäle der Unterfamilien Kv1, Kv2, Kv3 und Kv4 weisen eine enge Verwandtschaft mit dem *Shaker*-Kanal auf.

Auch wenn sich die Kv-Kanäle in ihrem Schaltverhalten stark voneinander unterscheiden, so ist ihr molekularer Aufbau dennoch sehr ähnlich. Alle Kv-Kanäle bilden Homo- oder Heterotetramere aus α -Untereinheiten, die aus 6 Transmembransegmenten (S1-S6; Abbildung 1.2 A) bestehen. Die Segmente S5 und S6 bilden die eigentliche Pore, die Segmente S1-S4 den Spannungssensor (Abbildung 1.2 A).

Die selektive Tetramerisierung der α -Untereinheiten wird bei vielen Kv-Kanälen (Kv1, Kv2, Kv3, Kv4) durch eine Tetramerisierungsdomäne (T1-Domäne; Abbildung 1.2 A), N-terminal von S1, vermittelt (Li *et al.*, 1992; Shen und Pfaffinger, 1995; Xu *et al.*,1995; Kreusch *et al.*, 1998). In dem funktionellen Kanal bilden die vier T1-Domänen eine Struktur auf der intrazellulären Seite der Membran, die als *hanging gondola* (hängende Gondel) beschrieben

wurde (Kobertz *et al.*, 2000; Sokolova *et al.*, 2001) und neben der Vermittlung der Tetramerisierung auch an der Bindung von zytoplasmatischen β -Untereinheiten beteiligt ist (Pioletti *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007b). Nicht alle Kanäle der Kv-Familie haben eine Tetramerisierungsdomäne im Bereich des N-Terminus. Bei Kanälen der Kv7-Unterfamilie (KCNQ) wird die selektive Assemblierung der α -Untereinheiten durch eine Tetramerisierungsdomäne im Bereich des C-Terminus vermittelt (Schmitt *et al.*, 2000; Maljevic *et al.*, 2002; Schwake *et al.*, 2003).



Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Aufbaus von Kv-Kanälen.

Die positiv geladenen Aminosäuren im S4-Segment ermöglichen es dem Kanal, Änderungen im Membranpotenzial "wahrzunehmen". Bei Depolarisation der Membran wirkt Energie des elektrischen Feldes auf das positiv geladene S4-Segment und verursacht eine Konformationsänderung des Kanals. Die genaue Bewegung des S4-Segments ist umstritten (Blaustein und Miller, 2004; Tombola *et al.*, 2005). Eine Theorie besagt, dass sich das S4-Segment in einer Schraubenbewegung entlang seiner Längsachse nach außen bewegt (*helicalscrew;* Abbildung1.3 A). Neuere, aus Kristallstrukturen von spannungsabhängigen K⁺-Kanälen gewonnene Erkenntnisse, lassen es wahrscheinlicher erscheinen, dass sich das S4-Segment in einer Kippbewegung durch die Membran bewegt (*voltage sensor paddle*; Abbildung 1.3 *B*; Jiang *et al.*, 2003a,b; Long *et al.*, 2005a,b). Diese Bewegung führt zu einer Konformationsänderung und schließlich zum Öffnen des Kanals (Durell *et al.*, 1998; Bezanilla, 2002).

A. Topologiedarstellung einer α -Untereinheit spannungsgesteuerter Kaliumkanäle bestehend aus 6 Transmembransegmente (S1-S6). Sie Segmente S5 und S6 bilden die Pore, S1-S4 den Spannungssensor des Kanals. N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Bei den Kanälen der Unterfamilien Kv1-Kv4 wird die Tetramerisierung der α -Untereinheiten durch eine Tetramerisierungsdomäne (T1) im Bereich des N-Terminus vermittelt. **B.** Schematische Darstellung eines funktionellen Kv-Kanals aus vier α -Untereinheiten.



Abbildung 1.3: Modell der Bewegung des S4-Segments bei Spannungsänderung (Jiang *et al.*, 2003a).
A. H*elical-screw*-Modell: Das S4-Segment bewegt sich in einer Schraubenbewegung entlang seiner Längsachse.
B. *Paddle*-Modell: Das S4-Segment bewegt sich mit einer Kippbewegung durch die Membran.

Nach Aktivierung aller vier Spannungssensoren überträgt sich deren Bewegung auf das S6-Segment, das als *Gate* (Tor) das Öffnen des Kanals kontrolliert (del Camino und Yellen, 2001), und es kommt zu einer kooperativen Öffnung der vier S6-Segmente (Ledwell *et al.*, 1999). Die Kanäle durchlaufen während der Aktivierung mehrere verschiedene Konformationen, die sich mit folgendem Gating-Schema beschreiben lassen:

$$C_R \mathop{\Longrightarrow} C_1 \mathop{\Longrightarrow} C_2 \mathop{\longmapsto} C_3 \mathop{\longmapsto} C_4 \mathop{\longmapsto} O$$

Hierbei steht C für die geschlossenen (*closed*) und O für den offenen (*open*) Zustand. Bei C_R ist keiner der Spannungssensoren aktiviert (*resting*). Während einer Depolarisation werden die einzelnen Spannungssensoren aktiviert (C₁ bis C₄). Diese Übergänge sind höchst spannungsabhängig. Sind alle Spannungssensoren aktiviert, kommt es in einem kooperativen, nahezu spannungsunabhängigen Schritt zum Öffnen des Kanals (C₄ \rightarrow O).

Um den Kanal zu öffnen, muss die Bewegung des Spannungssensors auf das S6-Gate übertragen werden. Dies geschieht im *Shaker*-Kanal über Aminosäureinteraktionen zwischen

dem S4-S5-Linker, dem proximalen Teil des S5- und dem distalen Teil des S6-Segments (Li-Smerin *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2002; Yifrach und MacKinnon, 2002).

1.3 Kv4-Kanalkomplexe

Kv4-Kanäle werden der Gruppe der A-Typ Kaliumkanäle zugerechnet. In dieser Gruppe werden alle Kv-Kanäle zusammengefasst, die im Gegensatz zu den *delayed-rectifier* Kanälen einen transienten, schnell aktivierenden und schnell inaktivierenden Auswärtsstrom vermitteln. Die Bezeichnung geht auf die Arbeiten von Connor und Stevens zurück, die einen solchen Strom in isolierten neuralen Somata der marinen Schnecke *Anisodoris* beschrieben (Connor und Stevens, 1971a,b). Der Gruppe der A-Typ Kanäle gehören spannungsgesteuerte Kaliumkanäle aus unterschiedlichen Unterfamilien an. Hierzu zählen Kv1.4 (Stühmer *et al.*, 1989) und viele Kanäle der Kv1 Unterfamilie, bei denen die schnelle Inaktivierung, die zu einem A-Typ Strom führt, durch akzessorische β-Untereinheiten vermittelt wird (Rettig *et al.*, 1994; Heinemann *et al.*, 1996). Außerdem werden Kv3.3 (Vega-Saenz de Miera *et al.*, 1992), Kv3.4 (Schröter *et al.*, 1991) und alle Mitglieder der Kv4-Unterfamilie der Gruppe der A-Typ Kaliumkanäle zugerechnet.

Bisher sind vier Mitglieder der Kv4-Unterfamilie beschrieben: Kv4.1, Kv4.2 und zwei unterschiedliche Spleißvarianten von Kv4.3 (Kv4.3S und Kv4.3L) (Pak *et al.*, 1991; Serodio *et al.*, 1996; Isbrandt *et al.*, 2000).

Die physiologische Rolle der Kv4-Kanäle wurde vor allem im Herzen und im Gehirn beschrieben. In Kardiomyozyten vermitteln Kv4-Kanäle die schnelle Komponente des transienten Auswärtsstroms I_{TO} (*transient outward*), der für die initiale Repolarisation des Herzaktionspotenzials verantwortlich ist (Dixon und McKinnon, 1994, Barry *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2005; Nerbonne und Krass, 2005).

In Neuronen vermitteln Kv4-Kanäle den unterschwellig aktivierten A-Typ Strom I_{SA} (*subthreshold activated*; Serôdio *et al.*, 1994; Serôdio und Rudy, 1998). Die Kv4-Kanäle zeigen hier eine somatodendritische Verteilung, wobei die Dichte des Kv4 vermittelten Stroms in Richtung des distalen Dendriten zunimmt (Hoffmann *et al.*, 1997). Durch die Kv4 vermittelten repolarisierenden K⁺-Ströme werden retrograd laufende Aktionspotenziale (*backpropagating action potentials*) im Dendriten abgeschwächt (Bernard und Johnston, 2003). Das Maß der Abschwächung wird durch die Verfügbarkeit der Kv4-Kanäle bestimmt. Exzitatorische postsynaptische Potenziale (EPSPs) können zur Inaktivierung der Kv4-Kanäle

führen, was zu einer stärkeren Ausbreitung von retrograd wandernden Aktionspotenzialen führt. Durch ihr komplexes Schaltverhalten wirken die Kv4-Kanäle als Koinzidenzdetektoren prä- und postsynaptischer Aktivität und sind deshalb an der Kontrolle synaptischer Plastizität beteiligt (Magee und Johnston, 1997; Faivre *et al.*, 1999; Schoppa und Westbrook, 1999; Watanabe *et al.*, 2002; Frick *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006).

Die verschiedenen physiologischen Funktionen, die die Kv4-Kanäle wahrnehmen, stellen unterschiedliche Anforderungen an das Schaltverhalten der Kanäle. Es kann zum einen durch die Bildung von Heteromultimeren aus verschiedenen Kv4 α -Untereinheiten, zum anderen durch die Anlagerung von akzessorischen β -Untereinheiten moduliert werden. Unterschiede im Schaltverhalten zwischen heterolog exprimierten Kv4-Kanälen und den entsprechenden nativen Strömen I_{SA} und I_{TO} (Baldwin *et al.*, 1994; Serodio *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1997) ließen erste Vermutungen über die Existenz modulatorisch wirkender akzessorischer β -Untereinheiten aufkommen. Weitere Hinweise brachte die Coinjektion einer Kv4 α -Untereinheit mit einer Fraktion niedermolekularer mRNA aus dem Gehirn der Ratte in *Xenopus*-Oozyten. Der resultierende A-Typ Strom zeigte nicht nur eine Vergrößerung der Amplitude, sondern auch Veränderungen in Aktivierung, Inaktivierung und Erholung von der Inaktivierung (Chabala *et al.*, 1993; Serodio *et al.*, 1994, 1996).

Heute sind zwei Hauptgruppen von akzessorischen
ß-Untereinheiten der Kv4-Kanäle bekannt. Die erste Gruppe stellen die Kv-Kanal interagierenden Proteine (Kv channel interacting proteins), die KChIPs dar (An et al., 2000). Die Gruppe der KChIPs umfasst 4 verschiedene Mitglieder (KChIP1 bis KChIP4), die jeweils in unterschiedlichen Spleißvarianten vorkommen. Bisher wurden 12 verschiedene KChIPs identifiziert (Jerng et al., 2004a). Es handelt sich bei den KChIPs um relativ kleine zytoplasmatische Proteine (etwa 250 Aminosäuren), die der Familie der Neuronalen-Calcium-Sensoren (Neuronal Calcium Sensors, NCS) zugerechnet werden. In einer konservierten C-terminalen Domäne der KChIPs befinden sich vier EF-Hand-Motive, von denen drei funktionell sind und Calcium binden können (Burgoyne und Weiss, 2001). Neben ihrer Rolle als Kv4 β-Untereinheit nehmen einige KChIPs auch noch andere Funktionen wahr. So ist KChIP3 identisch mit dem vorher beschriebenen Calsenilin (Buxbaum et al., 1998) und dem Transkriptionsfaktor DREAM (downstream regulatory element antagonist modulator; Carrión et al., 1999). Zwar zeigen auch andere Mitglieder der NCS-Familie eine Interaktion mit Kv-Kanälen, wie beispielsweise Frequenin (NCS-1), allerdings scheint diese Interaktion deutlich schwächer ausgeprägt zu sein als die Interaktion mit KChIPs (Nakamura et al., 2001; Guo et al., 2002b; Ren et al., 2003). Die Bindung von KChIPs an die Kv4-Kanäle ist sehr gut untersucht (Bähring *et al.*, 2001b; Ren *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004a,b; Scannevin *et al.*, 2004; Callsen *et al.*, 2005; Pioletti *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007b). Jeweils 4 α - und β -Untereinheiten lagern sich zu einem oktameren Kanalkomplex zusammen. KChIPs weisen in ihrer Struktur eine hydrophobe Tasche auf, mit der sie am zytoplasmatischen N-Terminus der Kv4 α -Untereinheit binden. Eine zweite Verbindung wird zwischen KChIP und der T1-Domäne einer benachbarten Untereinheit gebildet, so dass die KChIP β -Untereinheiten die α -Untereinheiten des Kanals miteinander verbinden und so den Komplex stabilisieren.

KChIP-Untereinheiten Bei Bindung von kommt verstärkten es zu einer Oberflächenexpression der Kv4-Kanäle. In heterologen Expressionssystemen konnte gezeigt werden, dass Kv4 α -Untereinheiten vermehrt im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten werden und erst bei Koexpression von in die Plasmamembran transportiert werden. Eine wahrscheinliche Ursache hierfür ist die Maskierung eines N-terminalen ER-Retentionssignals durch die KChIP-Bindung, da die Deletion des Kv4-N-Terminus ebenfalls zu einer erhöhten Oberflächenexpression führt (An et al., 2000; Bähring et al., 2001b; Shibata et al., 2003). Neben der Kontrolle der Oberflächenexpression und somit der Kv4 vermittelten Stromamplitude moduliert die KChIP-Bindung auch das Schaltverhalten der Kv4-Kanäle. So wird die initiale Phase der makroskopischen Inaktivierung von Kv4-Kanälen in der Regel durch KChIP verlangsamt und die Erholung von der Inaktivierung stark beschleunigt. Zusätzlich kommt es zu einer leichten Positiv-Verschiebung der Aktivierung bei einer starken Positiv-Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve, was zu einer Vergrößerung des Aktivierungsfensters führt (An et al., 2000; Bähring et al., 2001b; Gebauer et al., 2004; Beck et al., 2002; Jerng et al., 2005; Barghaan et al., 2008). Eine Ausnahme bildet KChIP4, das im Gegensatz zu den anderen KChIPs nur die Kv4 vermittelte makroskopische Inaktivierung verlangsamt, aber weder Effekte auf die Oberflächenexpression, noch auf die Erholung von der Inaktivierung oder die Steady-State-Inaktivierung der Kv4-Kanäle hat (Holmqvist et al., 2002).

Die zweite Gruppe der Kv4 β -Untereinheiten sind die Dipeptidyl-Aminopeptidase-ähnlichen Proteine (DPP oder DPLP). 2003 wurde erstmals ein Mitglied der DPP-Proteinfamilie als β -Untereinheit von Kv4-Kanälen beschrieben (Nadal *et al.*, 2003). Mittlerweile wurden zwei Mitglieder dieser Familie identifiziert (DPPX und DPPY), die mit Kv4-Kanälen interagieren und in verschiedenen Spleißvarianten vorkommen (Jerng *et al.*, 2004b; Radicke *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2005; Zagha *et al.*, 2005; Nadal *et al.*, 2006; Takimoto *et al.*, 2008; Jerng *et al.*, 2007). Die Einordnung in die Familie der Dipeptidyl-Aminopeptidase-ähnlichen Proteine erfolgte aufgrund der Sequenzhomologie zu der Serin Protease DPPIV, obwohl DPPX und DPPY keine Peptidase-Aktivität besitzen (Wada et al., 1992, Qi et al., 2003). DPPX und DPPY, die synonym auch als DPP6 und DPP10 bezeichnet werden, sind integrale Membranproteine mit einer Transmembrandomäne und einem sehr großen extrazellulären C-Terminus mit mehreren Glykosylierungsstellen. Diese extrazelluläre Domäne ist konserviert und die verschiedenen Spleißvarianten unterscheiden sich hauptsächlich im Bereich des zytoplasmatischen N-Terminus. Die Kristallstruktur der Extrazellulärdomäne von DPPX zeigte eine achtblättrige Propellerstruktur aus β -Faltblättern (Strop *et al.*, 2004). Die in der Kristallstruktur gefundene strukturelle Veränderung des katalytischen Zentrums gegenüber aktiven Dipeptidyl-Aminopeptidasen verhindert die Substratbindung und ist wahrscheinlich Peptidase-Aktivität von für die fehlende DPPX verantwortlich. Die genauen Interaktionsstellen von DPPs und Kv4 sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings konnte mittels Koimmunopräzipitation von DPPY und Kv4.3 gezeigt werden, dass Aminosäuren im Bereich des S1- und S2-Segments des Kanals kritisch für die Bindung sind (Ren et al., 2005).

Die Koexpression von DPPX und DPPY mit Kv4 α-Untereinheiten führt zu einer deutlichen Vergrößerung der Stromamplitude. Zusätzlich wird durch die Koexpression auch das Schaltverhalten der beeinflusst. Aktivierung, Kanäle Deaktivierung (Schließen), makroskopischen Inaktivierung und Erholung von der Inaktivierung werden durch die beschleunigt. Außerdem kommt zu einer Verschiebung Koexpression es der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Steady-State-Inaktivierung zu negativeren Potenzialen (Nadal et al., 2003; Jerng et al., 2004b; Barghaan et al., 2008)

Die Diskrepanz zwischen den Strömen heterolog exprimierter Kv4 α -Untereinheiten und den nativen Strömen I_{SA} und I_{TO} lässt sich also durch die modulatorischen Eigenschaften der β -Untereinheiten erklären. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass KChIP2 eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung der schnellen Komponente des I_{TO} spielt. Der Knock-out von KChIP2 führt in Mäusen zu einem fast vollständigen Verlust des I_{TO} und verursacht ventrikuläre Tachycardie (Kuo *et al.*, 2001). Auf molekularer Ebene konnte der Komplex aus Kv4 und KChIP2 in ventrikulären Kardiomyozyten der Maus durch Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden (Guo *et al.*, 2002a).

Für den unterschwellig aktivierten A-Typ Strom I_{SA} in Neuronen wird angenommen, dass er von ternären Kanalkomplexen aus Kv4-, KChIP- und DPP-Untereinheiten vermittelt wird. Neben dem biochemischen Nachweis dieser ternären Komplexe in Neuronen konnte gezeigt

werden, dass heterolog exprimierte Komplexe aus Kv4, KChIP und DPP Ströme vermitteln, die dem nativen *I*_{SA} sehr nahe kommen (Nadal *et al.*, 2003; Jerng *et al.*, 2005, Amarillo *et al.*, 2008).

1.4 Shaker- und Kv4-Inaktivierung

Viele Kv-Kanäle zeigen eine Inaktivierung (Rettig et al., 1994), d.h. bei anhaltender Depolarisierung kommt es zum Abfall des kanalvermittelten Stroms. Bei negativen Membranpotenzialen erholt sich der Kanal von der Inaktivierung und ist erst danach wieder aktivierbar. Besonders gut ist der Mechanismus der Inaktivierung im Shaker-Kanal untersucht. Es werden N-Typ- und C-Typ-Inaktivierung unterschieden. Der Mechanismus der N-Typ-Inaktivierung wurde strukturell mit dem Ball an einer Kette (ball and chain) verglichen (Hoshi et al., 1990). Der bewegliche, zytoplasmatische N-Terminus (Kette) trägt eine Aminosäuresequenz, die als Inkativierungspeptid fungiert (Ball), mit dem Poreninneren des Kanals interagiert (Zhou et al., 2001) und diesen so verschließt. Der Kanal wird also durch den N-Terminus in einem offen-inaktivierten Zustand gebracht, und die Erholung von der N-Typ-Inaktivierung erfolgt dementsprechend bei negativen Potenzialen über den offenen Zustand (Demo und Yellen; 1991, Ruppersberg et al., 1991). Nach Deletion des N-Terminus wird die schnelle Inaktivierung des Shaker-Kanals aufgehoben (Hoshi et al., 1990). Es verbleibt aber eine langsamere Inaktivierungskomponente, von der sich die Kanäle auch nur sehr langsam erholen. Da eine Beteilung des N-Terminus durch die Deletion ausgeschlossen werden konnte, wurde vermutet, dass bei diesem Inaktivierungsmechanismus eher C-terminal gelegene Sequenzen der a-Untereinheit eine Rolle spielen. Daher wurde dieser Inaktivierungsmechanismus C-Typ-Inaktivierung genannt (Hoshi et al., 1991). Tatsächlich ist nicht der zytoplasmatische C-Terminus für diese Form der Inaktivierung verantwortlich sondern vielmehr der extrazelluläre Teil der Pore, weswegen synonym auch der Ausdruck P-Typ Inaktivierung gebräuchlich ist. Im offenen Zustand kommt es während des Einsetzens der C-Typ-Inaktivierung zum Kolabieren des äußeren Teils der Pore. Der Vorgang der C-Typ-Inaktivierung ist sensitiv gegenüber Mutationen im äußeren Bereich der Pore (López-Barneo et al., 1993) und kann durch extrazellulär appliziertes TEA und durch die Erhöhung der äußeren K⁺-Konzentration verlangsamt werden (Choi et al., 1991; Baukrowitz und Yellen, 1995). Durch die Anlagerung von TEA und K⁺ im inneren Bereich der äußeren Pore wird das Kolabieren gehemmt, und es kommt zur Verlangsamung der C-Typ-Inaktivierung. TEA und K^+ wirken wie ein Fuß in der Tür, der das Schließen verhindert (López-Barneo *et al.*, 1993).

Bei beiden Mechanismen, N- und C-Typ-Inaktivierung, gehen die Kanäle erst nach dem Öffnen in einen offen-inaktivierten Zustand über (I_o) . Das vereinfachte Gating-Schema lässt sich wie folgt erweitern:



Die Kv4-Inaktivierung ist bei weitem nicht so gut aufgeklärt wie die Shaker-Inaktivierung. Obwohl die makroskopische Inaktivierung der Kv4-Kanäle der des Shaker-Kanals ähnelt, lässt sich die komplexe Kv4-Inaktivierung nicht allein durch die gut untersuchten Mechanismen der N- und C-Typ-Inaktivierung erklären. Makroskopische Kv4-vermittelte Ströme zeigen einen mehrphasischen Abfall, der nur durch das Anpassen einer Summe aus drei Exponentialfunktionen adäquat beschrieben werden kann (Jerng und Covarrubias, 1997; Bähring et al., 2001a), was auf eine Beteiligung mehrerer unterschiedlicher Inaktivierungsmechanismen schließen lässt. Gut untersucht ist die Rolle des N-Terminus bei der Kv4-Inaktivierung. Eine Deletion des Kv4-N-Terminus führt zu einer Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung, während die Applikation des N-terminalen Peptids in Inside-*Out-Patches* die Inaktivierung wieder beschleunigt. Darüber hinaus konnten Interaktionsstellen des N-Terminus mit dem Kv4-S6-Segment durch eine Double-Mutant-Cycle-Analyse bestimmt werden (Gebauer et al., 2004). Die dabei gefundenen Kopplungskoeffizienten waren allerdings im Vergleich zu den Kopplungskoeffizienten, die für die N-Typ-Inaktivierung des Shaker-verwandten Kv1.4 beschrieben wurden (Zhou et al., 2001), sehr klein. Die N-Typ-Inaktivierung stellt also eine Komponente der Kv4-Inaktivierung dar, scheint aber schwächer ausgeprägt zu sein als beim Shaker-Kanal. Die Tatsache, dass die schnelle makroskopische Kv4-Inaktivierung aber im Gegensatz zum Shaker-Kanal durch die Deletion des N-Terminus nicht komplett aufgehoben sondern nur verlangsamt wird, macht deutlich, dass die N-Typ-Inaktivierung nicht der einzige Inaktivierungsmechanismus der Kv4-Kanäle ist. Die verbleibende Inaktivierung ist auch nicht auf den Mechanismus der C-Typ-Inaktivierung zurückzuführen. Die beim Shaker-Kanal beobachtete Verlangsamung der Inaktivierung durch extrazelluläres TEA und erhöhte K⁺-Konzentration ist bei den Kv4-Kanälen nicht zu beobachten (Jerng und Covarrubias, 1997). Ein weiterer Unterschied zur *Shaker*-Inaktivierung stellt die besondere Eigenschaft der Kv4-Kanäle dar, schon bei Potenzialen negativ der Aktivierungsschwelle in den inaktivierten Zustand einzutreten (vgl. Abbildung 4.14 und 4.16). Da die Inaktivierung der Kv4-Kanäle also aus dem Geschlossenen-Zustand (C) erfolgen kann, wird diese Inaktivierung als Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bezeichnet. Das vereinfachte Gating-Schema sich also um geschlossen-inaktivierte Zustände (I_C) erweitern:



Die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung ist der wesentliche Inaktivierungsmechanismus der Kv4-Kanäle. So zeigen die Kv4-Kanäle auch nach Deletion der N-terminalen Inaktivierungsdomäne eine vollständige Inaktivierung (Bähring et al., 2001a). Weiterhin unterscheiden sich die Kinetiken der Erholung von der Offen-Inaktivierung und der Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung nicht, und es konnte gezeigt werden, dass die Erholung von der Offen-Inaktivierung nicht über den Offen-Zustand erfolgt. Dies führte zu der Annahme, dass Kv4-Kanäle auch bei starker Depolarisation in einem geschlosseninaktivierten Zustand akkumulieren (Bähring et al., 2001a). Dieses Phänomen wird als kumulative Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bezeichnet. Um während starker Depolarisation in den geschlossen-inaktivierten Zustand überzugehen, müssen die Kanäle also schon während der Depolarisation schließen (siehe Gating-Schema; $O \rightarrow C \rightarrow I_C$). Tatsächlich gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Deaktivierung (Schließen) und Inaktivierung. Zum einen sind zwei Kv4-Mutanten beschrieben, bei denen eine Verlangsamung der Deaktivierung von einer Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung begleitet ist (Jerng et al., 1999; Gebauer et al., 2004). Zum anderen kann die Kv4-Deaktivierung durch den Einsatz von Rb⁺ als Ladungsträger verlangsamt werden, da die Verweildauer von Rb⁺ in der Pore größer ist als die von K⁺. Auch hier ist die Verlangsamung der Deaktivierung von einer Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung begleitet (Bähring et al., 2001a; Shahidullah und Covarrubias, 2003).

Obwohl das Phänomen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung und ihre wichtige Rolle für das Kv4-Schaltverhalten schon lange bekannt sind, konnte der molekulare Mechanismus bisher nicht aufgeklärt werden.

1.5 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, die Strukturdeterminanten für die Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung zu bestimmen und ein neuartiges Model für den zugrunde liegenden molekularen Mechanismus zu untersuchen. Hierfür wurden verschiedene experimentelle Ansätze gewählt:

- Durch Korrelation von Inaktivierungs- und Deaktivierungszeitkonstanten verschiedener Kv4.2-Kanalkomplexe und die Ausbildung intramolekularer Metallbrücken sollte der Zusammenhang zwischen Inaktivierung und Deaktivierung untersucht werden.
- Durch einen Alanin-Mutagenese-Scan im Bereich der Kopplungsstelle von Spannungssensor und Gate in Verbindung mit einer thermodynamischen Analyse der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung sollte die Relevanz dieser Kopplungsstelle für die Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung untersucht werden.
- Mittels Double-Mutant-Cycle-Analyse auf der Basis von kinetischen Parametern der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung sollten Aminosäureinteraktionen im Bereich der Kopplungsstelle nachgewiesen werden.
- 4. Durch spezifische Redox-Modulation von Cystein-Doppelmutanten sollten die Ergebnisse der *Double-Mutant-Cycle*-Analyse in einem unabhängigen Ansatz überprüft werden.
- Die elektrophysiologische Untersuchung von chimären Kanälen aus Shaker und Kv4.2 sollte zeigen, ob das Inaktivierungsverhalten durch Austausch der jeweiligen Kopplungsstellen zwischen Spannungssensor und Gate moduliert werden kann.

2 Material

2.1 Chemikalien, Enzyme und Gebrauchsmaterialien

Soweit nicht anders angegeben wurden die Chemikalien von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) Roth (Karlsruhe), SERVA (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Th. Geyer (Hamburg) in *reinst* Qualität bezogen.

Die verwendeten Restriktionsenzyme stammten von den Firmen MBI Fermentas (St.Leon-Roth) und New England Biolabs (Frankfurt a. M.). Oligonukleotide wurden von Biomers (Ulm), MWG (Ebersberg) und Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert.

Für die Zellkultur wurden Medien von Gibco Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

Zentrifugationsschritte wurden mit den Zentrifugen *Biofuge pico*, *Biofuge stratos* (Heraeus, Hanau), *5417R* (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

Die Inkubation von Bakterienkulturen erfolgte im Wärmeschrank *Function Line* (Biometra, Göttingen) und im Wärmeschüttler *GFL 3031* (GFL, Burgwedel). Zur Inkubation der HEK293 Zellen diente der Inkubator *HERA cell* (Heraeus, Hanau).

2.2 Puffer und Lösungen

DEPC-Wasser	0,1 % (v/v) DEPC
DNA Auftragspuffer (10x)	0,5 mg/ml Bromphenolblau, 0,5 mg/ml Xylencyanol, 10
	mg/ml Ficoll (Type 400), 30 % (w/v) Glycerol
Extrazellulärlösungen	
ec6	135 mM NaCl, 10 mM Sucrose, 5 mM HEPES, 5 mM KCl, 2
	mM CaCl ₂ , 2 mM MgCl ₂ , pH 7,4 mit NaOH
ec8	135 mM RbCl, 20 mM Sucrose, 5 mM HEPES, 2 mM CaCl ₂ ,
	2 mM MgCl ₂ , pH 7,4 mit RbOH

ec8a	135 mM KCl, 20 mM Sucrose, 5 mM HEPES, 2 mM CaCl ₂ , 2
	mM MgCl ₂ , pH 7,4 mit KOH
ec19	100 mM KCl, 60 mM NaCl, 10 mM HEPES, 3 mM CaCl ₂ , 1
	mM MgCl ₂ , pH 7,4 mit KOH
Gentamicin-Lösung	75 mM NaCl, 5 mM HEPES, 2 mM KCl, 2mM CaCl ₂ , 1 mM
	MgCl ₂ , 50 µg/ml Gentamicin, pH 7.5 mit NaOH
Intrazellulärlösungen	
ic6	125 mM KCl, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, 10 mM
	Sucrose, 2 mM Glutathion, 2 mM K2-ATP, 1 mM MgCl2, 1
	mM CaCl ₂ , pH 7,2 mit KOH
ic8	125 mM RbCl, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl ₂ ,
	1 mM MgCl ₂ , pH 7,2 mit RbOH
ic8a	125 mM KCl, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl ₂ , 1
	mM MgCl ₂ , pH 7,2 mit KOH
ic21	160 mM KCl, 10 mM HEPES, 0,5 mM MgCl ₂ , pH 7,4 mit
	КОН
KCM (5x)	0,5 M KCl, 0,25 M MgCl ₂ , 0,15 M CaCl ₂
ND96-Lösung	91 mM NaCl, 5 mM HEPES, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl ₂ , 1
	mM MgCl ₂ , pH 7,4 mit NaOH
OR2-Lösung	82,5 mM NaCl, 55 mM HEPES, 2 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ ,
	pH 7.5 mit NaOH
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, 100 mM Essigsäure
TSS-Puffer	73 % LB-Medium, 10 % PEG3350, 5 % DMSO, 20 mM
	MgSO ₄ , pH 6,5 sterilfiltriert.

2.3 Nährmedien

Die Medien für Bakterienkulturen wurden autoklaviert und bei Bedarf mit 100 mg/l Ampicillin versetzt.

LB-Medium	10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, pH 7,4
LB-Platten	15 g/l Agar in LB-Medium

2.4 Bakterienstämme

Escherichia coli XL1-Blue recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1 lac[F'proAB lacl^q ZΔM15Tn10(Tet'] (Bullock *et al.*, 1987)

2.5 Zelllinien

HEK293 ZellenHumane embryonale Nierenzellen (Human Embryonic Kidney
Cells; DSMZ Nr. ACC 305)

2.6 Vektoren

pcDNA3	Expressionsvektor für heterologe Expression in kultivierten
	Säugerzellen (Invitrogen, Karlsruhe)
pGEM HEJuel	RNA-Transkriptionsvektor; trägt die untranslatierten
	Regionen des β -Globin-Gens aus Xenopus laevis und eine
	Polyadenylierungssequenz.
pBSTA	RNA-Transkriptionsvektor. Derivat des Vektors pBluscript
	SK(+) (Stratagene); trägt die untranslatierten Regionen des β -
	Globin-Gens aus Xenopus laevis und eine
	Polyadenylierungssequenz.

2.7 Verwendete Klone

EGFP (BD Biosciences, Heidelberg). EGFP diente als Transfektionskontrolle in HEK293 Zellen.

Kv4.2 (AH009258, Zhu et al, 1999). Klon der humanen Kv4.2 α -Untereinheit.

Kv4.2\Delta2-10, Kv4.2\Delta2-20, Kv4.2\Delta2-40 (Bähring *et al.* **2001b). N-terminal deletierte Varianten der humanen Kv4.2 \alpha Untereinheit. Es sind 9, 19 bzw. 39 Aminosäuren des proximalen N-Terminus deletiert.**

KChIP2.1 (NM-014591, An *et al.*, 2000)

KChIP2.2 (NM_173191, Bähring et al., 2001b)

DPPXs (NM_001936, Wada et al., 1992): Kurze Spleißvariante von DPPX.

Sh H4 IR (Hoshi *et al.*, 1990). Spleißvariante H4 (Kamb *et al.*, 1988) bzw. B (Schwartz *et al.*, 1988) des *Shaker*-Kanals. Durch Deletion der Aminosäuren 6 bis 46 (Δ 6-46) ist die N-Typ-Inaktivierung des Kanals aufgehoben. Zur cRNA Synthese wurde das in pBSTA klonierte Gen verwendet.

Soweit nicht anders angegeben wurden zur Expression in HEK293 Zellen die in pcDNA3 klonierten Gene verwendet, für die cRNA Synthese wurden die in pGEM HEJuel (Abschnitt 2.6) klonierten Gene eingesetzt.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Mit einer Einzelkolonie des *Escherichia coli* Stammes XL1-Blue wurden 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht auf dem Schüttler (37 °C, 270 Upm) inkubiert. Mit 1 ml dieser Kultur wurden 500 ml LB-Medium inokuliert. Die Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,5 bis 0,6 auf dem Schüttler belassen (37 °C, 130 Upm), dann im Eiswasserbad für 5 Minuten unter Schwenken gekühlt, auf 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio One, Frickenhausen) verteilt und für 10 Minuten bei 4 °C und 5000 x g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Bakterien-Pellets in je 5 ml eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert. Aliquots von 0,5 ml der Zellsuspension wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.1.2 Transformation von Bakterien

Zur Transformation der kompetenten XL1-Blue Zellen wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Ein Transformationsansatz aus 20 μ l 5x KCM und der gewünschten DNA (0,05-5 μ g) wurde mit sterilem demineralisiertem Wasser bis zu einem Volumen von 100 μ l aufgefüllt und auf Eis gekühlt. 100 μ l der kompetenten Zellen wurden zu dem Ansatz gegeben und vorsichtig durch auf und ab pipettieren vermischt. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock für 5 Minuten bei 37 °C ausgesetzt. Anschließend wurde 1 ml 37 °C warmes LB-Medium zu den Zellen gegeben. Nach 45 Minuten bei 37 °C wurden 100 μ l der Zellen auf LB-Agarplatten mit 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.1.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

3.1.3.1 Isolation von Plasmid-DNA aus 3 ml Bakterienkulturen

Für die Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurden Reagenzgläser mit 4 ml LB-Medium, das mit 100 μg/ml Ampicillin versetzt war, mit Einzelkolonien angeimpft und über Nacht auf dem Schüttler belassen (270 Upm, 37 °C). Am folgenden Tag wurden 3 ml der Kulturen in zwei Schritten abzentrifugiert (14000 Upm, 1 min). Die weitere Isolation erfolgte mit den Minipräp-Kits *Illustra plasmidPrep Mini Spin* (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) oder *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Zur Elution der DNA im letzten Schritt der Isolation wurden 50 μl demineralisiertes Wasser eingesetzt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

3.1.3.2 Isolation von Plasmid-DNA aus 50 ml Bakterienkulturen

Um größere Mengen (100 – 200 µg) Plasmid-DNA zu erhalten, wurden 50 ml Über-Nacht-Kulturen der entsprechenden Stämme in LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) hergestellt. Die Kulturen wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 5000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit den Midipräp-Kits *Illustra plasmidPrep Midi Flow Kit* (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) oder *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurde die DNA mit demineralisiertem Wasser auf eine Konzentration von 1 µg/ml gebracht und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.1.4 DNA-Quantifizierung und Qualitätskontrolle

3.1.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der DNA

Die Qualität und die Konzentration der DNA wurden mit dem Photometer bestimmt (*Ultrospec 3000*, Pharmacia Biotech, Freiburg). In einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm wurde die Extinktion von verschiedenen Verdünnungen der DNA bei 260 nm, 280

nm und 320 nm gegen Wasser gemessen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm liegt das Extinktionsmaximum der DNA, bei 280 nm das von Proteinen. Bei 320 nm können Partikelverunreinigungen der Lösungen gemessen werden. Für doppelsträngige DNA gilt:

$$\mathbf{c} = (\mathbf{E}_{260} - \mathbf{E}_{320}) \cdot 0,05 \; \mu \text{g/}\mu\text{l}$$

wobei c: DNA-Konzentration, E: Extinktion. Der Quotient E_{260}/E_{280} ist ein Maß für die Verunreinigung der DNA durch Proteine und sollte über 1,8 liegen.

3.1.4.2 Agarose-Gelektrophorese

Zur Detektion und Analyse von DNA-Fragmenten wurden diese in horizontalen Agarose-Gelen (1-1,5 % w/v) in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die zu analysierenden Proben wurden zuvor mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt. Zum Nachweis der DNA enthielten die Gele 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid, das in Nukleinsäuren interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Der Nachweis erfolgte bei einer Wellenlänge von 312 nm mit dem UV-Transluminator *TI1* (Biometra, Göttingen). zur Abschätzung der Fragmentlängen wurde der DNA-Größenstandard *1 kb Plus Ladder* (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

3.1.4.3 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde nach der Kettenabbruch Methode, die den Strangabbruch während der DNA Polymerisation nach dem Einbau von ddNTPs ausnutzt, durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Hierfür wurde das *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, USA) benutzt. Für die Sequenzierungs-PCR wurden Proben mit 500 ng Template-DNA, 15 pmol Sequenzierungs-Primer, 2 µl BigDye-Reaktionsmix, 6 µl BigDye-Reaktionspuffer und einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Prädenaturierung	94 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	10 s	
Hybridisierung	50 °C	5 s	≥ 25
Elongation	60 °C	4 min	J
Elongation	60 °C	7 min	1

Nach der PCR wurde die DNA durch Zugabe von 300 µl Ethanol (99,8 %) und 80 µl 0,3 mM Natriumacetat-Lösung gefällt (5 min, RT) und zentrifugiert (4 °C, 14000 Upm). Der Überstand wurde entfernt, das Präzipitat mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 4 °C). Nach Entfernen des Überstandes wurde die DNA in einer Vakuumzentrifuge getrocknet (*Concentrator 5301*, Eppendorf, Hamburg).

Die Sequenzierung der so vorbereiteten Proben wurde mit dem *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim) von der Sequenzierungsgruppe im Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf vorgenommen.

3.1.4.4 DNA Sequenzanalyse

DNA-Sequenzen wurden mit den Programmen *Seqman* (EditSeq, USA), *Bioedit* (Hall, 1999) und *VectorNTI* (Invitrogen, Karlsruhe) analysiert.

3.1.5 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die DNA Fragmente wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, das gewünschte Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in 500 μ l QG-Puffer aufgenommen und in Lösung gebracht (60 °C, 10 min). Nach der weiteren Aufreinigung mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) wurde die DNA in 30 μ l Wasser gelöst.

3.1.6 In-vitro-Synthese von cRNA

Zur *in-vitro*-Synthese von cRNA wurden die Kanalkonstrukte in den Vektor pGem HEJuel kloniert. Zur Herstellung der Template-DNA wurden 5 µg Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *Not*I (0,2 U/µg DNA) über Nacht bei 37 °C linearisiert. Die vollständige

Linearisierung wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Zur Aufreinigung der Template-DNA wurde zu 100 µl des Restriktionsansatzes das gleiche Volumen Phenol gegeben. Die Probe wurde durchmischt und anschließend zentrifugiert (5 min, 14000 Upm). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl Chloroform vermischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die wässrige Phase erneut abgenommen und in ein neues Gefäß gegeben. Zur Fällung der DNA wurden 250 µl Ethanol (99,8 %) und 10 µl 3 M Natriumacetat zum Ansatz gegeben. Nach Ablauf der einstündigen Inkubationszeit bei -70 °C wurde die Probe zentrifugiert (14000 Upm, 30 min, 4 °C), mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und anschließend für weitere 10 Minuten zentrifugiert (14000 Upm). Nach Entfernen des Überstandes wurde das DNA-Präzipitat unter dem Abzug getrocknet und anschließend in 10 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

Die *in-vitro*-Transkription wurde mit 6 μ l der aufgearbeiteten Template-DNA und dem *mMESSAGE mMACHINE T7 Kit* (Ambion, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Ende der *in-vitro*-Transkription wurden 80 μ l DEPC-Wasser zu dem Ansatz gegeben und die synthetisierte cRNA durch Phenol/Chloroform Behandlung mit anschließender Ethanolfällung aufgereinigt (siehe oben). Nach dem Trocknen wurde das Präzipitat in 22 μ l DEPC-Wasser gelöst.

3.1.7 Quantifizierung und Qualitätskontrolle der synthetisierten cRNA

Die Quantifizierung der synthetisierten cRNA erfolgte mit dem 2100 Bioanalyzer System und dem RNA 6000 Nano LabChip Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Die Methode beruht auf einer elektrophoretischen Auftrennung der Proben in einer Kapillare und einer Laser-Detektion der Banden. Auf einem Chip können 12 Proben geladen werden, die nacheinander aufgetrennt werden. Durch einen Vergleich mit einem RNA-Standard (RNA 6000 Ladder, Ambion, USA) kann von der Software (2100 Expert Software B.02.02, Agilent) die Größe des RNA-Fragments und dessen Konzentration errechnet werden. Durch ein computergeneriertes virtuelles Gel lässt sich die Qualität der cRNA abschätzen. Eventuelle Degeneration der cRNA wird auf dem virtuellen Gel als "Schmier" erkennbar. Für die weiterführenden Experimente wurde nur cRNA verwendet, die sich als definierte Bande auf dem virtuellen Gel darstellte.

Für die Quantifizierung wurden immer je zwei verschiedene Verdünnungen der gleichen cRNA mit DEPC-Wasser angefertigt (1:10 und 1:20), so dass die RNA-Konzentration im

Messbereich des Gerätes lag. Die Proben wurden denaturiert (2 min, 70 °C). Die Präparation des Chips und der Messvorgang wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.8 DNA-Modifikationen

3.1.8.1 Restriktionshydrolyse

Für die Restriktionshydrolyse von Plasmid-DNA wurde die gewünschte DNA-Menge (1-5 μg) mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (0,2-10 U) und dem zugehörigen 10x-Puffer nach Herstellerangaben für 2-3 h inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung (10 min, 65 °C) gestoppt. Bei gleichzeitigem Verdau mit mehreren Restriktionsenzymen wurden Enzymmengen und Pufferbedingungen entsprechend angepasst. War ein paralleler Verdau aufgrund unterschiedlicher Pufferanforderungen der Enzyme nicht möglich, wurde sequentiell verdaut. Zwischen den Restriktionsschritten wurde die DNA mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

3.1.8.2 Ligation von DNA Fragmenten

Für die Ligation von DNA Fragmenten wurden 50-100 ng des geschnittenen Vektors mit dem jeweiligen Insert, 1 U T4-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot), dem dazugehörigen Reaktionspuffer und 5 % PEG 4000 (w/v) in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 16 °C über Nacht inkubiert. Das Insert wurde dabei im Überschuss eingesetzt. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert lag zwischen 1:5 und 1:10. Nach der Inkubation wurde die Ligase für 10 Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert und direkt im Anschluss zur Transformation eingesetzt (siehe Abschnitt 3.1.2).

3.1.8.3 Auffüllen von überhängenden 5'-Enden

Um durch Restriktionshydrolyse entstandene 5'-Überhänge von wenigen Basen aufzufüllen, wurde das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* verwendet (Fermentas, St.

Leon-Rot). Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 40 μ l mit einer DNA-Menge von 3 μ g nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.8.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Technik der Polymerasekettenreaktion wurde zum Einfügen von Punktmutationen benutzt (siehe Abschnitt 3.1.9). Um dem Auftreten unerwünschter Mutationen in Folge eines fehlerhaften Baseneinbaus durch die DNA-Polymerase vorzubeugen, wurde für die PCR ausschließlich *Pfu-Turbo*-DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Diese besitzt eine Korrekturlese-Funktion (3'-5' Exonuklease-Aktivität), was die Fehlerrate drastisch vermindert. Mit folgendem Standard PCR-Ansatz in einem Gesamtvolumen von 50 µl wurde die Reaktion durchgeführt:

•	Template-DNA	50-100 ng
•	3' Primer	60 nM

• 5' Primer 60 nM	•	5' Primer	60 nM
-----------------------------	---	-----------	-------

- dNTP-Mix 200 μM
- MgCl₂ 2 mM
- 10 x Reaktionspuffer (Stratagene) 5 µl
- *Pfu-Turbo*-DNA-Polymerase 2,5 U
- H_2O ad 50 μl

3.1.9 Zielgerichtete in-vitro-Mutagenese

Die Mutation einzelner Aminosäuren erfolgte durch *Overlap*-PCR (Higuchi *et al.*, 1988). Hierfür wurden überlappende Primer konstruiert, die Mismatches im Bereich der zu mutierenden Aminosäure aufweisen, aber komplementär zur Umgebung der Mutationsstelle sind (siehe Abbildung 3.1 A). In der ersten PCR wurden mit Hilfe von nicht degenerierten flankierenden Primern in zwei getrennten Reaktionen zwei DNA-Fragmente erzeugt, welche die mutierte Sequenz trugen. Diese Fragmente weisen aufgrund der Überlappung der Mutagenese-Primer eine Komplementarität im Bereich der eingefügten Mutation auf. Die Fragmente können also von der Polymerase verlängert werden, so dass die flankierenden Primer hybridisieren können und das gewünschte Fragment amplifiziert werden kann (siehe Abbildung 3.1 B). Die beiden flankierenden Primer wurden dabei so gewählt, dass das entstandene Fragment zwei singuläre Restriktionsschnittstellen aufweist. Auf diese Weise kann ein Wildtyp-Fragment aus dem Vektor herausgeschnitten werden und das durch die *Overlap*-PCR erzeugte mutierte Fragment mittels Ligation an dessen Stelle eingefügt werden.



Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Overlap-PCR zur Generierung von Mutationen.

A. In zwei getrennten Ansätzen werden mit Hilfe von degenerierten Primern Fragmente erzeugt, die eine Mutation (rot) am Rand aufweisen. **B.** In einer zweiten PCR werden diese Fragmente verlängert. Die überlappenden Bereiche dienen als Primer für die DNA-Polymerase. Nach Zugabe der äußeren Primer wird das lange, mutationstragende Fragment amplifiziert R1 und R2 geben die Lage der singulären Restriktionsschnittstellen an.

Für die Reaktionen wurden die Thermocycler *GeneAmp 2400* bzw. 9700 (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) verwendet. Für beide PCR-Schritte wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Prädenaturierung	94 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	30 s	
Hybridisierung	54 °C	45 s	≥ 25
Elongation	72 °C	1,5 min	J
Elongation	72 °C	7 min	1

Nach der ersten PCR wurden die entstandenen Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert, mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und in 30 µl Wasser aufgenommen. Davon wurden 0,5 µl als Template-DNA für die zweite PCR eingesetzt. Bei dieser PCR erfolgte die Zugabe der äußeren flankierenden Primer erst nach 5 Zyklen.

3.1.9.1 Kv4.2-Punktmutanten

In der S4-S5-Linker- und der S6-Region des Alanin-Mutagenese-Scans (Abschnitt 4.2.1) wurden die Aminosäuren G309, L310, R311, I312, L313, G314, Y315, T316, L317, K318, S319, C320, S322, E323, L324, G325, F326, L327, L328, F329, V397, I398, L400, P401, V402, P403, V404, I405, V406, S407, N408, F409, S410, R411, I412 und Y413 nach Alanin und die Aminosäuren A321 und A399 nach Valin mutiert.

Alle Mutationen wurden mit degenerierten Primern, die die jeweilige Mutation trugen, über *Overlap*-PCR erzeugt. Nach der Amplifikation über die beiden äußeren Primer (fwd. Primer, rev. Primer, siehe Anhang, Abbildung 7.1), wurden Vektor und PCR-Produkt mit *Bam*HI/*Nru*I geschnitten und das mutierte Fragment durch Ligation eingefügt.

Das Einfügen der Cystein-Mutationen an den Positionen E323 und V404 in Kv4.2 Δ 2-10 bzw. Δ 2-40 in pGEM HEJuel für die Experimente in Abschnitt 4.2.3 erfolgte auf gleiche Weise. Es wurden dieselben äußeren Primer und Restriktionsschnittstellen verwendet.

Für die in Abschnitt 4.1.5 beschriebenen Experimente wurden die Aminosäuren V404 und H414 nach Cystein und die Position R411 nach Alanin mutiert. Dies erfolgte über *Overlap*-PCR im N-terminal deletierten Kv4.2-Konstrukt Kv4.2Δ2-40 im pcDNA3 Vektor (Anhang, Abbildung 7.2) Die Positionen der äußeren Primer sind in der Abbildung 7.2 dargestellt. Nach Amplifkation wurde das mutationstragende Fragment über *Bam*HI/*Hind*III in den Vektor kloniert.

3.1.9.2 Kanalchimären

Für die Generierung der Kanalchimäre Kv4.2/Sh:S4-S5;S6 wurden in mehren *Overlap*-PCR Schritten folgende Punktmutationen in Kv4.2Δ2-40 in pGEM eingeführt (vgl. Abbildung 4.34): R311Q, Y315R, S319A, C320S, A321M, S322R, F326L, L328I, V397T, S410N, R411Y und I412F. Für die PCR wurden die in Abbildung 7.1 dargestellten äußeren Primer verwendet. Die Klonierung erfolgte über einen *Bam*HI/*Nru*I Verdau. Zur Generierung der Kanalchimäre Sh/Kv4.2:S4-S5;S6 wurden folgende Punktmutationen in Sh H4 IR in pBSTA (Abbildung 7.3) eingeführt: Q383R, R387Y, A391S, S392C, M393A, R394S, L398F, I400L, T469V, N482S, Y483R und F384I (vgl. Abbildung 4.34).

Diese Mutationen wurden über mehrere *Overlap*-PCR Schritte eingeführt. Die Bindestellen der äußeren Primer sind in Abbildung 7.3 dargestellt. Die Klonierung erfolgte über die singulären Restriktionsschnittstellen *Spe*I und *Mf*eI.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Präparation und Injektion von *Xenopus*-Oozyten

Die weiblichen *Xenopus leavis* Frösche wurden in Tricain-Lösung (1,2 mg/l in Leitungswasser) für 20 min bei Raumtemperatur anästhesiert und danach Teile des Ovars operativ entfernt. Zur Entfernung der Follikelzellschicht wurden die Oozyten in Ca²⁺-freier Oozyten-Ringer-Lösung (OR2-Lösung) mit 1,3 mg/ml Kollagenase A (Sigma, Taufkirchen) auf einem Horizontalschüttler inkubiert (3-4 h, 100 Upm, RT). Nach mehrmaligem Waschen mit OR2-Lösung, wurden Stadium V-VI-Oozyten selektiert, in Gentamicin-Lösung überführt und über Nacht bei 18 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Oozyten in OR2-Lösung mit je 50 nl cRNA-Lösung injiziert (Stühmer, 1992). Für die Injektion wurde der *Nanoject II* Injektor (Drummond, USA) verwendet. Um nach ein bis drei Tagen ein adäquates Expressionsniveau zu erzielen, wurden pro Oozyte 3-8 ng cRNA injiziert.

3.2.2 Routinehaltung von immortalisierten Zellen

Humane embryonale Nierenzellen (HEK293) wurden in 7 ml Kulturmedium in 25 cm² Zellkulturflaschen (Nunc, Roskilde Dänemark) kultiviert. Als Kulturmedium diente *Dulbeccos MEM/NUT-Mix F12* (Gibco Invitrogen, Karlsruhe), das mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (Biochrom, Berlin) und 1 % (v/v) PSG-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) angereichert wurde. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 5 % CO₂ und einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Nach zwei bis drei Tagen erreichten die Zellen eine 80 bis 100 prozentige Konfluenz. Zum Ablösen der Zellen wurden diese nach Abnahme des Mediums in 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend, um die enzymatische Reaktion abzustoppen, mit 5 ml frischem Kulturmedium versetzt. Nach Überführung der Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen wurde diese zentrifugiert (5 min, 1200 Upm), der Überstand entfernt und das Pellet in 2 ml frischem Medium resuspendiert. Die Dichte der Zellsuspension wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die Aufrechterhaltung der Kultur wurden 7 ml einer Zellsuspension mit 4×10^4 Zellen pro ml Kulturmedium in frische Kulturflaschen gegeben.

3.2.3 Transfektion von immortalisierten Zellen

Unter einer Transfektion versteht man eine Methode des Einbringens zellfremder DNA in eine Wirtszelle. Für die Transfektion von HEK293 Zellen wurde die Methode der Lipofektion verwendet. Diese Methode beruht auf einer Komplexbildung der negativ geladenen DNA mit der Oberfläche kationischer Lipidvesikel. Diese Komplexe können aufgrund ihrer Hydrophobizität leicht mit der Zellmembran verschmelzen, so dass die DNA in die Zelle gelangt. Für die Transfektion der HEK293 Zellen wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe verwendet. Vor der Transfektion wurden 2 ml Zellsuspension in der gewünschten Dichte in 35 mm Zellkulturschalen (Nunc, Roskilde, Dänemark) ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Menge des pro Kulturschale benötigten Transfektionsreagenzes hängt von der Zelldichte und der eingesetzten DNA-Menge ab. In dieser Arbeit wurden für die Transfektion zwischen 0,1 und 4 µg DNA und zwischen 1 und 3 µl Lipofectamine 2000 pro Kulturschale mit jeweils 100 µl OPTI-MEM I (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) vermischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die beiden Lösungen zusammengeführt und für weitere 30 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Kulturmedium abgenommen und 800 µl OPTI-MEM I auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 200 µl des Transfektionsansatzes hinzugefügt. Nach dem 2,5 bis 5 stündigen Transfektionsvorgang im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch 2 ml Kulturmedium ersetzt. Am folgenden Tag konnten die transfizierten Zellen für die elektrophysiologischen Messungen eingesetzt werden.

3.3 Elektrophysiologische Methoden

Es wurden Messungen mit der Patch-Clamp- und der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode durchgeführt. Die elektrophysiologischen Experimente wurden bei Raumtemperatur (20 bis 25 °C) durchgeführt.

3.3.1 Patch-Clamp-Messungen

Die Patch-Clamp Technik wurde in den siebziger Jahren auf der Basis der Spannungsklemme von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt (Neher und Sakmann, 1976) und später verfeinert (Hamil et al., 1981). Ursprünglich wurde die Patch-Clamp Technik zur elektrophysiologischen Untersuchung von einzelnen Ionenkanälen in biologischen Membranen entwickelt. Durch diese Technik war es erstmals möglich, Ströme im Picoampere-Bereich zu messen. Die Messung von Strömen dieser Größenordnung macht es notwendig, das Hintergrundrauschen des Messapparates sehr klein zu halten. Dies wird zum einen durch die elektrische Abschirmung des gesamten Messplatzes mit einem Faraday-Käfig erreicht, zum anderen durch die Etablierung eines sehr engen Kontaktes zwischen elektrolytgefüllter Glaspipette und Zellmembran (Seal). Dieser Kontakt bildet einen hochohmigen Widerstand, der im Idealfall mehrere G Ω betragen sollte (*Giga-Seal*; Numberger und Draguhn, 1996). Nach der Annährung der Pipette an die Zellmembran und der Bildung des Giga-Seals, liegt die cell-attached-Konfiguration vor (Abbildung 3.2 links). In dieser Konfiguration können Ableitungen einzelner Ionenkanäle innerhalb der Pipettenöffnung vorgenommen werden. Durch das Anlegen eines Unterdrucks ist es möglich, das Membranstück in der Pipettenöffnung zu zerstören, ohne dass das Giga-Seal beeinträchtigt wird. Es besteht nun eine Verbindung zwischen Zellinnerem und der Messpipette (Abbildung 3.2 rechts), so dass innerhalb kürzester Zeit das Zytoplasma der Zelle durch die Pipettenlösung ersetzt wird und Messungen unter genau definierten Ionenbedingungen möglich sind. Diese Konfiguration wird als whole-cell-Konfiguration bezeichnet. Im Gegensatz zur cell-attached-Konfiguration, in der Messungen an einigen wenigen Ionenkanälen innerhalb der Pipettenöffnung möglich sind, repräsentieren die in der whole-cell-Konfiguration abgeleiteten Ströme, sämtliche Ionenkanäle einer Zelle (vgl. Abbildung 3.2).


Abbildung 3.2: Patch-Clamp-Konfigurationen.

Dargestellt sind die *cell-attached-* (links) und die *whole-cell-*Konfiguration (rechts) der Patch-Clamp-Technik. Nach Etablierung eines *Giga-Seals* kann die Zelle durch Anlegen von Unterdruck an die Pipette geöffnet werden. ic: Intrazellulärlösung; ec: Extrazellulärlösung.

Bei der Patch-Clamp-Technik ist es möglich, das Membranpotenzial konstant auf ein vorgegebenes Kommando-Potenzial (V_{soll} ; Abbildung 3.3) zu "klemmen". Um das Potenzial konstant zu halten, ist die Injektion eines Kompensationsstroms notwendig. Dieser Strom spiegelt direkt den Ionenstrom wider, der zur Differenz zwischen dem Membranpotenzial der Zelle (V_m) und dem Kommando-Potenzial führt. Dieser Kompensationsstrom wird über einen Strom-Spannungswandler erzeugt. Er besteht aus einem Operationsverstärker (OPA), der die Spannungen V_m und V_{soll} an seinen beiden Eingängen misst und am Ausgang eine Spannung erzeugt, die proportional zu der Differenz von V_m und V_{soll} , aber extrem verstärkt ist. Der Spannungsabfall über den Rückkopplungswiderstand R_f führt dann zur Injektion des Stroms in die Zelle.

Die Spannungsdifferenz zwischen V_{soll} und der Ausgangsspannung am OPA, die proportional zum injizierten Strom ist, wird gemessen und kann mit einem entsprechenden Kalibrierungsfaktor (abhängig von R_f) in den Strom umgerechnet werden (Abbildung 3.3). Ein wichtiges Maß für den Zugang zum Zellinneren bildet der Zugangswiderstand (Serienwiderstand, R_s; Abbildung 3.3). Dieser Widerstand verursacht einen Spannungsabfall, so dass im Zellinneren eine zu geringe Spannung aufgebaut wird. Außerdem beeinflusst er durch seine Filtereigenschaften die Geschwindigkeit der Strominjektion. Um ein möglichst schnelles "Klemmen" der Spannung bei einem geringen Fehler zu erreichen, muss der Serienwiderstand möglichst klein sein.



Abbildung 3.3 Vereinfachtes Schaltbild einer Patch-Clamp-Messung. R_{\cdot} Rückkonnlungswiderstand R_{\cdot} Serienwiderstand R_{\cdot} Seal-Widerstand C_{\cdot}

 R_{f} : Rückkopplungswiderstand, R_{s} : Serienwiderstand, R_{g} : Seal-Widerstand, C_{p} : Pipettenkapazität, R_{m} : Membranwiderstand, C_{m} : Membrankapazität, V_{m} : Membranpotenzial, V_{soll} : Kommando-Potenzial, V_{aus} : Ausgangsspannung, OPA: Operationsverstärker.

3.3.1.1 Ausstattung des Patch-Clamp-Messstandes

Eine wichtige Vorraussetzung für die Etablierung eines *Giga-Seals* und die anschließende Durchführung der empfindlichen Patch-Clamp-Messungen ist ein erschütterungsfreier Arbeitsplatz. Daher war die gesamte Messapparatur auf einem schwingungsgedämpften Tisch gelagert. Um das Hintergrundrauschen bei den Messungen zu minimieren, wird der Messstand durch einen Faraday-Käfig gegenüber äußeren elektromagnetischen Feldern abgeschirmt.

Um die Patchpipette zur Etablierung eines *Giga-Seals* präzise auf die Zellmembran aufsetzen zu können, wurde ein elektrischer Mikromanipulator (*Patchman*, Eppendorf, Hamburg) verwendet. Zur optischen Kontrolle diente ein inverses Mikroskop (*Axiovert 135*, Zeiss, Jena) mit bis zu 400-facher Vergrößerung und Phasenkontrastoptik. Mit einer Hg-UV-Lichtquelle (*HBO 50*, Zeiss, Jena) und geeigneten Filtern konnte das als Transfektionsmarker verwendete EGFP detektiert werden. Die Experimente wurden in 35 mm Zellkultur-Schälchen durchgeführt, die direkt in eine Halterung auf dem Objekttisch eingesetzt wurden. Die Superfusion der HEK-Zellen mit Messlösung erfolgte schwerkraftgetrieben. Zur Absaugung wurde eine Vakuumpumpe eingesetzt.

3.3.1.2 Versuchsdurchführung

Mit einem horizontalen Pipettenziehgerät (*DMZ-Puller*, Zeitz, Augsburg) wurden Kapillaren aus Borosilikatglas (*GB150T-8P*, Science Products, Hofheim) ausgezogen, so dass eine Öffnung von ungefähr 1 μ m entstand. Der Widerstand zwischen Pipette und Messlösung lag zwischen 2 und 3 M Ω . Nach Befüllen mit filtrierter Intrazellulärlösung (0,2 μ m Sterilfilter, ic, siehe Abschnitt 2.2) wurde die Pipette in einen am Vorverstärker befestigten Pipettenhalter eingesetzt. Über eine Öffnung im Pipettenhalter konnte Über- bzw. Unterdruck an die Pipette angelegt werden. Zur Minimierung von Offset-Potenzialen durch Polarisierung wurden Ag/AgCl-Elektroden verwendet. Die elektrische Verbindung zwischen Pipettenlösung und Verstärker stellte ein chlorierter Silberdraht in der Pipette her. Für die Chlorierung der Elektrode wurde geschmolzenes AgCl auf den Draht aufgetragen. Als Badelektrode diente ein Ag/AgCl-Pellet (World Precision Instruments, USA).

Für die in Abschnitt 4.1 beschriebenen Messungen der makroskopischen Auswärtsströme und der Erholung von der Inaktivierung wurde soweit nicht anders angegeben die Intrazellulärlösung ic6 und die Extrazellulärlösung ec6 verwendet (siehe Abschnitt 2.2). Nach der Nernst-Gleichung ergibt sich bei 20 °C ein K⁺-Umkehrpotenzial von $E_K = -83,3$ mV. Die im selben Abschnitt beschriebenen Messungen zur Deaktivierungskinetik wurden hauptsächlich in symmetrischem Rb⁺ durchgeführt. Hierfür wurden die Lösungen ic8 und ec8 benutzt (siehe Abschnitt 2.3). Das Rb⁺-Umkehrpotenzial bei 20 °C liegt nach Nernst bei +1,9 mV. Einige Messungen in diesem Abschnitt wurden in symmetrischen K⁺ vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde das Rubidium durch Kalium ausgetauscht (ic8a/ec8a; Abschnitt 2.3). Es ergibt also dasselbe Umkehrpotenzial (+1,9 mV).

Die Messungen in Abschnitt 4.1.5 wurden mit der Intrazellulärlösung ic21 und der Extrazellulärlösung ec19 durchgeführt (Abschnitt 2.2). Bei 20 °C liegt das Umkehrpotenzial für K⁺ nach der Nernst-Gleichung bei -11 mV.

Für die Subtraktion des unspezifischen Leckstroms wurde dieser mit der p/n-Methode bestimmt. Bei dieser Methode wird die lineare Abhängigkeit des Leckstroms vom Membranpotenzial ausgenutzt. Die p/n-Protokolle enthalten die gleichen Spannungssprünge wie die eigentlichen Pulsprotokolle (siehe Abschnitt 3.3.3), jedoch mit viel kleineren Amplituden, so dass während des Leckprotokolls nur der unspezifische Strom ermittelt wird.

Um sicherzustellen, dass sich dies im Bereich passiver Membranreaktion abspielt, wurde ein p/5 (1/5 der Amplitude des eigentlichen Pulsprotokolls) ausgehend von einem Potenzial von -100 mV gewählt. Die Stromantworten mehrerer Durchläufe des p/5 Protokolls werden von der Software gemittelt, auf die Spannungen des Pulsprotokolls hochgerechnet und von den eigentlichen Stromantworten abgezogen.

3.3.1.3 Datenerfassung

Die vom Vorverstärker gemessenen Signale wurden an den Hauptverstärker (*EPC9*, HEKA Elektronik, Lambrecht) weitergeleitet. Die Digitalisierung des analogen Signals des Hauptverstärkers und die Einspeisung der Messdaten in den Computer erfolgte über einen *ITC16* AD/DA-Wandler (HEKA Elektronik, Lambrecht). Dabei wurde das Signal mit einer Aufnahmefrequenz von 1 bis 20 kHz digitalisiert. Zur Datenerfassung und Steuerung des Verstärkers wurde die Software *PULSE* (HEKA Elektronik, Lambrecht) eingesetzt.

Die Kompensation der kapazitiven Ströme erfolgte softwaregesteuert. Serienwiderstände waren kleiner als 6 M Ω und wurden durch den Messverstärker maximal kompensiert (85 – 95 %).

3.3.2 Die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Messungen

Zur elektrophysiologischen Analyse der in *Xenopus*-Oozyten exprimierten Kanäle wurde die Technik des Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp verwendet. Diese Technik geht auf die Arbeiten von Cole zurück (Cole, 1979) und wurde in der vorliegenden Arbeit modifiziert nach Stühmer angewendet (Stühmer, 1992). Das Membranpotenzial der Oozyte wird hierbei durch zwei intrazelluläre Elektroden kontrolliert. Eine Elektrode misst das aktuelle Membranpotenzial (Spannungselektrode), während die andere (Stromelektrode) den Strom injiziert, um das gewünschte Membranpotenzial aufrecht zu erhalten. Im Gegensatz zur Patch-Clamp-Technik ermöglicht die Spannungselektrode die direkte Erfassung des eigentlichen Membranpotenzials.

3.3.2.1 Ausstattung des Oozyten-Messplatzes

Die Messapparatur für das Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp war auf einer Metallplatte auf einem Tisch aufgebaut. Die Elektrodenhalter waren an mechanischen Mikromanipulatoren (Märzhäuser, Wetzlar) angebracht, die magnetisch am Untergrund befestigt wurden. Zur optischen Kontrolle diente ein Binokular (Zeiss, Jena) über der Messkammer. Die Superfusion der Oozyten mit Messlösung erfolgte schwerkraftgetrieben. Zur Absaugung wurde eine Vakuumpumpe eingesetzt.

3.3.2.2 Versuchsdurchführung

Die Pipetten wurden aus Borsilikatglas bestehenden Kapillaren (Wandstärke: 0,15 mm, World Precision Instruments, USA) mit einem horizontalen Pipettenziehgerät *P97* (Sutter Intruments, USA) gezogen. Anschließend wurden die Spitzen unter dem Binokular gebrochen, so dass eine etwa 15 μ m große Öffnung entstand. Als Pipettenlösung wurde 3 M KCl verwendet. Um den Austritt der Pipettenlösung zu verhindern, wurden die Spitzen der Pipetten mit in 3 M KCl gelöstem Agar (1 % w/v) befüllt. Der Widerstand der so präparierten Pipetten lag in ND96-Lösung zwischen 0,1 und 0,3 M Ω . Die elektrische Verbindung zur Pipettenlösung wurde durch chlorierte Silberdrähte (siehe Abschnitt 3.3.1.2) hergestellt. Als Badelektroden dienten Ag/AgCl-Pellets (World Precision Instruments).

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen an *Xenopus*-Oozyten wurde immer ND96 (Abschnitt 2.2) als Messlösung verwendet. Das K⁺-Umkehrpotenzial wurde durch die Umkehr von Tail-Strömen gemessen und lag bei -90 mV.

3.3.2.3 Datenerfassung

Die Signale des Vorverstärkers wurden an den Hauptverstärker (*TURBO TEC 10 CX*, npi electronic, Tamm) weitergeleitet. Als Schnittstelle zum Computer diente ein *LIH-1600* AD/DA-Wandler (HEKA Elektronik, Lamprecht). Die Digitalisierung der Daten erfolgte mit einer Aufnahmefrequenz von 1 bis 3 kHz. Die Software *PULSE* (HEKA) diente der

Datenerfassung und zur Kontrolle des Messverstärkers. Zur Ermittlung des unspezifischen Leckstroms wurde ein p/10 Protokoll ausgehend von einem Potenzial von -80 mV verwendet.

3.3.3 Stimulationsprotokolle und Datenauswertung

Für die Datenerfassung und die Programmierung der Pulsprotokolle wurde die Software *PULSE* (HEKA Elektronik, Lambrecht) verwendet. Zur Auswertung wurden die Programme *PULSEFIT* (HEKA Elektronik, Lambrecht), *Excel 2000* (Microsoft, USA) *Kaleidagraph* (Synergy Software, USA) *und Graphpad Prism* (GraphPad Software, USA) eingesetzt. Das Modellieren der Kristallstruktur von Kv1.2 (Long *et al.*, 2005a) erfolgte mit Hilfe des Programms *PyMOL* (Delano Scientific LLC, San Fransisco, USA).

Mittelwerte sind immer mit SEM (Standard Error of the Mean) angegeben.

Bei der Berechnung des Standardfehlers (S_C) einer Größe C, die von den fehlerbehafteten Größen A \pm S_A und B \pm S_B abhängt, wurde eine unabhängige lineare Fortpflanzung des Fehlers angenommen. Für Quotienten und Produkte gilt dann (Fenner, 1931):

Quotienten:
$$C = \frac{A}{B} \pm \frac{1}{B^2} \sqrt{A^2 \cdot s_B^2 + B^2 \cdot s_B^2}$$

Produkte:

$$C = A \cdot B \pm \sqrt{A^2 \cdot s_B^2 + B^2 \cdot s_B^2}$$

3.3.3.1 Inaktivierungskinetik makroskopischer Ströme

Zur Ermittlung der Inaktivierungskinetik wurden makroskopischer Ströme durch Spannungssprünge von -110 mV auf verschiedene depolarisierende Potenziale ausgelöst (Abbildung 3.4).



Abbildung 3.4: Pulsprotokoll: Kinetik der makroskopischen Inaktivierung und Spannungsabhängigkeit der Aktivierung.

Ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV wird die Zelle für 1500 ms bei -110 mV hyperpolarisiert. Es folgen Spannungssprünge auf Potenziale von -90 bis +90 mV in 10 mV Schritten für 1500 ms.

Für eine genaue kinetische Analyse der makroskopischen Inaktivierung wurde die Summe von bis zu drei Exponentialfunktionen an den Stromabfall angepasst:

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

wobei: I: Strom, A: relative Amplitude, t: Zeit, τ : Zeitkonstante.

3.3.3.2 Deaktivierungskinetik makroskopischer Ströme

Für die Bestimmung der Deaktivierungskinetik wurden Tail-Ströme ausgelöst. Hierfür wurde ein Pulsprotokoll verwendet, das nach einem kurzen depolarisierenden Puls Spannungssprünge auf verschiedene negative Potenziale beinhaltet (Abbildung 3.5). Die Länge des depolarisierenden Pulses wurde hierbei so gewählt, dass es zur Aktivierung der Kanäle kommt, jedoch keine sichtbare makroskopische Inaktivierung auftritt.

Die Versuche zur Deaktivierung wurden in der *whole-cell*-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik mit symmetrischen Ionenbedingungen durchgeführt. Der Spannungssprung auf ein negatives Potenzial nach kurzer Aktivierung der Kanäle führt daher zu einem Einwärtsstrom. Der Abfall dieses Tail-Stroms spiegelt die Deaktivierungskinetik wider. Für die genaue kinetische Analyse der Deaktivierungskinetik wurde eine oder die Summe von zwei Exponentialfunktionen an den Tail-Strom angelegt (siehe Abschnitt 3.3.3.1). Die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung wurde wie in Abschnitt 3.3.3.6 für die Erholung von der Inaktivierung beschrieben ausgewertet.



Abbildung 3.5: Pulsprotokoll: Kinetik und Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung. Nach einer Hyperpolarisation auf -100 mV für 200 ms folgt ein kurzer depolarisierender Spannungssprung zu +40 mV für 4 ms. Während der anschließenden Pulse zu negativeren Potenzialen (-100 bis -50 mV in 10 mV Schritten) kommt es zur Deaktivierung der Kanäle.

3.3.3.3 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurde aus den Peak-Amplituden von Strömen berechnet, die durch Spannungssprünge auf unterschiedliche Potenziale aktiviert wurden (Abbildung 3.4).

Mit Hilfe des ermittelten Umkehrpotenzials (siehe Abschnitt 3.3.2.2) und der Peak-Amplitude (I_{max}) des Stroms bei dem jeweiligen Membranpotenzial (V_m) konnte die Leitfähigkeit G wie folgt berechnet werden:

$$G = \frac{I_{max}}{V_m - E_k}$$

Die berechneten Werte für die Leitfähigkeit wurden auf die maximale Leitfähigkeit normalisiert. Eine Boltzmann-Funktion vierter Ordnung wurde an die Datenpunkte angepasst:

$$\frac{G}{G_{max}} = \left(\frac{1}{1+e^{\left(\frac{V_m-V'}{s}\right)}}\right)^4$$

wobei: V_m: Membranpotenzial, V': Spannung halbmaximaler Aktivierung einer Untereinheit, s: Steigungsfaktor.

Die Spannung halbmaximaler Aktivierung ($V_{1/2}$) wurde manuell mit Hilfe der Software *Kaleidagraph* (Synergy Software, USA) bestimmt und repräsentiert die Spannung bei der die oben aufgeführte Boltzmann-Funktion einen Wert von 0,5 hat.

3.3.3.4 Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung

Die Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung wurde aus den Peak-Amplituden von Strömen bei +40 mV nach einem konditionierenden Vorpuls von 30 Sekunden und unterschiedlicher Spannung ermittelt (Abbildung 3.6).



Abbildung 3.6: Pulsprotokoll: Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung. Nach einem konditionierenden Vorpuls von 30 s bei Potenzialen von -120 bis 0 mV in 5 mV Schritten folgt ein Testpuls von + 40 mV für 200 ms.

Die Amplituden der bei +40 mV (I) induzierten Ströme wurden auf den größten erzielten Peakstrom (I_{max}) normiert (I/I_{max}) und gegen die Spannung des konditionierenden Vorpulses aufgetragen. An die Datenpunkte wurde eine einfache Boltzmann-Funktion angepasst:

$$\frac{I}{I_{max}} = \frac{1}{1 - e^{\left(\frac{Vm - V_{1/2}}{s}\right)}}$$

wobei: V_m : Membranpotenzial, $V_{1/2}$: Spannung halbmaximaler Inaktivierung, s: Steigungsfaktor.

3.3.3.5 Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung

Das Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung wurde mit einem Testpuls auf +40 mV bestimmt, dem ein unterschwelliger Vorpuls variabler Länge vorausging (Abbildung 3.7).



Abbildung 3.7: Pulsprotokoll: Kinetik der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung.

Nach einer Hyperpolarisation auf -110 mV für 1,5 s folgt ein Spannungssprung auf +40 mV für 40 ms (Kontrollpuls). Während der anschließenden Hyperpolarisation (-110 mV, 1,5 s) erholen sich die Kanäle von der Inaktivierung. Während des unterschwelligen Vorpulses variabler Länge (-65 mV, 20 ms bis 51,2 s) setzt die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung ein. Die Verfügbarkeit der Kanäle wird durch einen weiteren Spannungssprung auf +40 mV (Testpuls) geprüft.

Für den Vorpuls wurde in den meisten Fällen ein Potenzial von -65 mV gewählt, was dem Potenzial der halbmaximalen Steady-State-Inaktivierung des Kv4.2-Wildtyp-Kanals entspricht. Die Peak-Amplituden der durch den Testpuls ausgelösten Ströme (I_{test}) wurden auf die Stromantwort eines vorangegangenen Kontrollpulses ($I_{control}$) normalisiert. Die normalisierten Stromamplituden ($I_{test}/I_{control}$) wurden gegen die Dauer des Vorpulses aufgetragen. Zur weiteren Analyse wurde eine einfache Exponentialfunktion an die Datenpunkte angepasst:

$$\frac{I}{I_{max}} = (1 - A_0) \cdot e^{-\frac{t}{\overline{z_{max}}}} + A_0$$

wobei: A₀: Steady-State-Amplitude, t: Zeit, τ : Zeitkonstante.

Aus der Steady-State-Amplitude A₀ und der Zeitkonstante τ_{inact} der Inaktivierungsreaktion wurden die kinetischen Parameter k_{on} (Hinrate der Inaktivierungsreaktion), k_{off} (Rückrate der Inaktivierungsreaktion) und K_d (Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion) berechnet:

$$k_{off} = rac{A_0}{ au_{inact}}$$
 $k_{on} = rac{1}{ au} - k_{off}$ $K_d = rac{k_{off}}{k_{on}}$

Die Berechnung von Kopplungskoeffizienten mittels *Double-Mutant-Cycle*-Analyse stellt eine Methode zur Quantifizierung von Aminosäureinteraktionen dar. Als Berechnungsgrundlage dienen die oben beschriebenen Gleichgewichtskonstanten (K_d) der Reaktion der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV. Für die Analyse werden die K_d-Werte des Wildtyp-Kanals (K_{d(wt,wt)}), zweier Einzelmutanten (K_{d(wt,mut)} und K_{d(mut,wt)}) und der korrespondierenden Doppelmutante (K_{d(mut,mut)}) benötigt. Die Berechnung der Kopplungskoeffizienten ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

Im ersten Schritt werden die K_d-Werte der Einzelmutanten jeweils mit den Wert des Wildtyps in Verhältnis gesetzt (X₁ und Y₂) und der Wert der Doppelmutante jeweils mit dem Wert der beiden Einzelmutanten (X₂ und Y₁). Y₂ beschreibt also die Änderung des K_d-Wertes durch die Mutation 2 (mut2) gegenüber dem Wildtyp , während Y₁ die Änderung des K_d-Wertes durch Mutation 2 gegenüber der Mutation 1 (mut1) beschreibt. Analog beschreiben X₁ und X₂ die Effekte Mutation 1 gegenüber dem Wildtyp bzw. der Mutation 2. Bei einer Unabhängigkeit der einzelnen Mutationseffekte, also einer reinen Additivität, sollte X₁ = X₂ und Y₁ = Y₂ gelten.



Abbildung 3.8: Double-Mutant-Cycle-Analyse und Berechnung der Kopplungskoeffizienten. Schematische Darstellung des Prinzips der Double-Mutant-Cycle-Analyse und der Berechnung des Kopplungskoeffizienten Ω . Durch den Vergleich der K_d-Werte des Wildtyp-Kanals (oben links), zweier Einzelmutanten (unten links und oben rechts) und der korrespondierenden Doppelmutante kann gezeigt werden ob eine Interaktion zwischen zwei Aminosäuren vorliegt.

Der Kopplungskoeffizient Ω nimmt also bei einer Unabhängigkeit der Mutationseffekte einen Wert von 1 an. Bei von 1 abweichenden Ω -Werten sind die Effekte gekoppelt, also nicht unabhängig voneinander, was auf eine räumliche Nähe und funktionelle Interaktion der betreffenden Aminosäuren schließen lässt. Im Folgenden wird als Maß der Aminosäureinteraktion der Betrag des natürlichen Logarithmus des Kopplungskoeffizienten (ln Ω) verwendet. Bei Unabhängigkeit der Mutationen geht dieser Wert also gegen null.

3.3.3.6 Erholung von der Inaktivierung

Um die Erholung von der Inaktivierung zu beschreiben wurden zwei verschiedene Pulsprotokolle verwendet. Zum einen ein klassisches Doppelpuls-Protokoll (Abbildung 3.9), bei dem die Inaktivierung auch über den Offen-Zustand möglich ist.



Abbildung 3.9: Pulsprotokoll: Erholung von der Offen-Inaktivierung.

Nach einer Hyperpolarisation für 1,5 s folgt ein Spannungssprung auf +40 mV für 1,5 s (Kontrollpuls), während dem die Inaktivierung einsetzt. Nach einem hyperpolarisierenden Puls variabler Länge kommt es zur Erholung von der Inaktivierung. Durch einen weiteren Spannungssprung zu +40 mV (Testpuls) wird die Verfügbarkeit der Kanäle geprüft. Es wurden Erholungspotenziale von -80 bis -120 mV eingesetzt (vgl. Abbildung 4.6)

Zum anderen wurde ein Protokoll verwendet, bei dem die Inaktivierung durch einen Vorpuls unterhalb der Aktivierungsschwelle induziert wird, so dass eine Inaktivierung nur aus Geschlossen-Zuständen heraus erfolgen kann (Abbildung 3.10).



Abbildung 3.10: Pulsprotokoll: Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung.

Nach einer Hyperpolarisation auf -100 mV für 1,5 s folgt ein kurzer Spannungssprung auf +40 mV für 40 ms (Kontrollpuls). Während des anschließenden unterschwelligen Pulses (-55 mV, 20 s) setzt die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung ein. Nach einem hyperpolarisierenden Puls variabler Länge bei -100 mV kommt es zur Erholung von der Inaktivierung. Durch einen weiteren Spannungssprung zu +40 mV (Testpuls) wird die Verfügbarkeit der Kanäle geprüft. In beiden Fällen wurden die Stromamplituden des Testpulses (I_{test}) auf die Amplitude des Kontrollpulses ($I_{control}$) normiert, gegen die Dauer des hyperpolarisierenden Pulses aufgetragen und eine einfache Exponentialfunktion an die Datenpunkte angepasst:

$$\frac{I_{test}}{I_{control}} = 1 - (1 - A_0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{rec}}}$$

wobei: A₀: Steady-State-Amplitude, t: Zeit, τ_{rec} : Zeitkonstante der Erholungsreaktion.

In Abschnitt 4.2.1 ist die Erholung von der Inaktivierung in Prozent dargestellt. Hierfür wurde die Steady-State-Amplitude subtrahiert, die Datenpunkte auf das Maximum normalisiert, mit 100 multipliziert und folgende Exponentialfunktion angepasst:

$$Y = 100 \cdot \left(1 - e^{\frac{t}{\tau_{rec}}}\right)$$

Um die Spannungsabhängigkeit der Erholung von der Inaktivierung zu beschreiben wurde die Erholung von der Inaktivierung bei verschiedenen Potenzialen gemessen und die Zeitkonstanten gegen das Potenzial aufgetragen. Die Spannungsabhängigkeit der Erholungskinetik wurde durch folgende Exponentialfunktion beschrieben:

$$au_{rec}(V) = au_{rec}(0) \cdot e^{rac{q_{app} \cdot F}{R \cdot T}}$$

Hierbei ist $\tau_{rec}(V)$ die Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung bei dem Erholungspotenzial V, $\tau_{rec}(0)$ die theoretische Zeitkonstante bei 0 mV, R die Gaskonstante, T die Temperatur in Kelvin und F die Faraday-Konstante. q_{app} ist die apparente Ladung und beschreibt den Grad der Spannungsabhängigkeit.

4 Ergebnisse

4.1 Kopplung von Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4.2-Kanälen

Auch wenn der Mechanismus der Kv4-Inaktivierung bisher nicht verstanden ist, gibt es Hinweise, dass Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4-Kanälen gekoppelt sind. So konnte gezeigt werden, dass eine verlangsamte Deaktivierungskinetik ausgelöst durch bestimmte Mutationen (Jerng et al., 1999; Gebauer et al., 2004) oder durch Verwendung von Ionen mit längerer Verweildauer in der Pore (Bähring et al., 2001a; Shahidullah und Covarrubias, 2003) von einer Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung begleitet ist. Um zu analysieren, ob die Kopplung von Deaktivierung und Inaktivierung eine generelle Eigenschaft von Kv4-Kanälen ist, wurden in dieser Arbeit andere Modifikationen des Schaltverhaltens auf eine Kopplung der beiden Mechanismen hin untersucht. Hierfür wurden die Auswirkungen von N-terminaler Deletion und Koexpression von akzessorischen β-Untereinheiten auf die Kinetik von Inaktivierung und Deaktivierung analysiert. Die α-Untereinheiten des Kv4.2-Wildtyp-Kanals und der N-terminal deletierten Kv4.2-Konstrukte (Kv4.2Δ2-10, Kv4.2Δ2-20 und Kv4.2 Δ 2-40; siehe Abschnitt 2.7) wurden allein und zusammen mit den β -Untereinheiten KChIP2 und DPPX in HEK293 Zellen heterolog exprimiert und mittels der whole-cell-Patch-Clamp-Technik elektrophysiologisch untersucht. Aus der Kombination unterschiedlicher Nterminaler Deletionen und der Koexpression unterschiedlicher β-Untereinheiten ergeben sich 11 verschiedene Kanalkomplexe (Tabelle 4.1 und 4.2), die unterschiedliche Effekte auf Inaktivierungs- und Deaktivierungskinetik zeigen. Diese Effekte wurden durch das Anpassen von multi-exponentiellen Funktionen quantifiziert. Durch die Korrelation der Zeitkonstanten von Inaktivierung und Deaktivierung der verschiedenen Kanalkomplexe konnte eine Kopplung der beiden Mechanismen gezeigt werden.

4.1.1 Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung

Der Kv4.2-Wildtyp-Kanal weist bei Depolarisation eine schnelle makroskopische Inaktivierung auf (Abbildung 4.1 A). Um die Kinetik dieser makroskopischen Inaktivierung zu beschreiben, wurde die Summe von drei Exponentialfunktionen an den Abfall des makroskopischen Stroms angepasst (Abbildung 4.1 B). Die Kinetik der makroskopischen Inaktivierung wurde also durch drei Zeitkonstanten charakterisiert: $\tau_{1 \text{ inact}}$ beschreibt die schnelle Komponente, $\tau_{2 \text{ inact}}$ die mittlere und $\tau_{3 \text{ inact}}$ die langsame Komponente der Inaktivierung. Die Amplituden der Exponentialfunktionen stellen den Anteil der jeweiligen Gesamtreaktion Spannungsabhängigkeit Komponente an der dar. Um die der Inaktivierungsreaktion zu untersuchen, wurde diese Analyse bei verschiedenen depolarisierenden Potenzialen durchgeführt (+40 mV bis +80 mV). Die Ergebnisse der Analyse der Inaktivierungskinetik des Wildtyp-Kanals bei diesen Potenzialen sind in Abbildung 4.1 C dargestellt. Keine der drei Inaktivierungskomponenten zeigte eine Spannungsabhängigkeit in diesem Potenzialbereich. Die Zeitkonstanten der Inaktivierung der verschiedenen Kanalkomplexe wurden daher bei einem fixen Testpotenzial von +40 mV miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 4.1 für alle 11 getesteten Kanalkomplexe aufgeführt. Zusätzlich wurde bei allen Konstrukten die Erholung von der Inaktivierung bei -80 mV bestimmt (Tabelle 4.1).



Abbildung 4.1: Kinetische Analyse der Kv4.2 vermittelten makroskopischen Inaktivierung.

A. Die Kv4.2 vermittelten makroskopischen Ströme wurden durch depolarisierende Pulse von -100 mV nach -80 bis +80 mV ausgelöst. **B.** Ableitung von derselben Zelle bei +40 mV auf einer anderen Zeitscala. Die magenta gefärbte Kurve zeigt die Summe dreier Exponentialfunktionen, die an den Abfall des makroskopischen Stroms angepasst wurden. Die Pulsprotokolle sind unter den Stromspuren dargestellt. **C.** Zusammenfassung der kinetischen Analyse der makroskopischen Inaktivierung. Gezeigt sind die Mittelwerte der Zeitkonstanten (schwarze Symbole) und deren Anteil an der Gesamtreaktion (weiße Symbole), die sich aus einer schnellen (Kreise), einer mittleren (Dreiecke) und einer langsamen Komponente (Quadrate) zusammensetzt. Die Zeitkonstanten wurden auf einer logarithmischen Scala (linke Y-Achse) gegen das Membranpotenzial aufgetragen.

	$\tau_{1 \text{ inact}}(\text{ms})$	% τ _{1 inact}	$\tau_{2\text{inact}}(\text{ms})$	$\% \tau_{2 \text{ inact}}$	τ _{3 inact} (ms)	$\% \ \tau_{3 \ inact}$	n	$\tau_{rec}(ms)$	n
wt	14 ± 1	68 ± 3	54 ± 4	25 ± 3	682 ± 97	7±3	8	290 ± 43	3
in Rb⁺/Rb⁺								264 ± 21	4
wt + KChIP2	22 ± 3	31 ± 7	53 ± 7	67 ± 7	452 ± 67	2 ± 1	4	39 ± 3	4
in Rb ⁺ /Rb ⁺								36 ± 1	3
wt + DPPX	7 ± 1	75 ± 4	28 ± 2	21 ± 4	933 ± 35	4 ± 1	4	91 ± 8	4
in Rb ⁺ /Rb ⁺								96 ± 8	5
wt + KChIP2 + DPPX	21 ± 3	63 ±10	54 ± 7	34 ±10	369 ± 70	3 ± 1	10	19 ± 10	10
in Rb ⁺ /Rb ⁺								26 ± 6	8
∆ 2-10	26 ± 2	64 ± 4	107 ± 13	26 ± 4	824 ±102	10 ± 1	5	216 ± 35	3
∆2-10 + KChIP2	22 ± 2	55 ± 8	74 ± 7	36 ± 7	431 ± 27	9 ± 1	8	56 ± 14	3
∆2-10 + DPPX	14 ± 1	56 ± 4	54 ± 4	25 ± 2	474 ± 31	19 ± 2	9	82 ± 6	8
$\Delta 2-10 + KChIP2 + DPPX$	18 ± 3	47 ±10	41 ± 7	52 ±10	398 ± 83	1 ± 1	8	27 ± 2	6
in Rb ⁺ /Rb ⁺								30 ± 6	8
∆2-20	42 ± 3	40 ± 3	126 ± 8	52 ± 2	670 ± 81	8 ± 1	10	253 ± 16	3
∆2-40	39 ± 4	33 ± 6	108 ± 5	60 ± 5	385 ± 24	7 ± 1	3	238 ± 47	3
∆2-40 + DPPX	12 ± 2	23 ± 3	87 ± 6	66 ± 4	237 ± 55	11 ± 2	9	72 ± 9	9
in Rb⁺/Rb⁺								88 ± 4	11

Tabelle 4.1: Analyse der makroskopischen Inaktivierung.

In der Tabelle sind die Zeitkonstanten und die relativen Amplituden aufgeführt, die aus der Anpassung der Summe dreier Exponentialfunktionen an den Abfall des makroskopischen Stroms ermittelt wurden. Die Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung bei -80 mV ergaben sich durch Anlegen einer einfachen Exponentialfunktion an die Datenpunkte. In einigen Experimenten wurde die Erholung von der Inaktivierung in symmetrischem Rb⁺ gemessen.

4.1.2 Kinetik der Kv4.2-Deaktivierung

Um die Schließkinetik zu untersuchen, wurde ein spezielles Pulsprotokoll verwendet (Abbildung 3.5 und 4.2 A). Ausgehend von einem Haltepotenzial von -100 mV wurde die Zelle für 4 ms bei +40 mV depolarisiert, was zur Aktivierung des Kanals führte. Der Puls war jedoch so kurz gewählt, dass keine sichtbare Inaktivierungsreaktion ausgelöst wurde (Abbildung 4.2 A). Nach diesem Puls folgten Spannungssprünge auf verschiedene negativere Potenziale (-100 mV bis -50 mV). Bei diesen Potenzialen schließen die Kanäle. Die Schließkinetik wird durch den Abfall des Einwärtsstroms (Tail-Stroms) repräsentiert und lässt sich durch das Anpassen der Summe zweier Exponentialfunktionen adäquat beschreiben (Abbildung 4.2 B). Die Messung der Schließkinetik erfolgte unter nahezu symmetrischen Ionenbedingungen. Unter diesen Bedingungen liegt das Umkehrpotenzial nahe 0 mV und damit außerhalb des für das Schließen relevanten Potenzialbereiches. Außerdem wurde Rubidium (Rb⁺) als leitendes Ion verwendet. Rubidium verlangsamt durch den längeren Aufenthalt in der Pore das Schließen des Kanals (Sala et al., 1991; Abbildung 4.2 C). Bei des Kanals mit den akzessorischen β-Untereinheiten stieg Koexpression die Oberflächenexpression der Kanalkomplexe, was zu großen Stromamplituden führte.

Zusätzlich wurde die Deaktivierung stark beschleunigt, so dass schon bei Verwendung von Rb⁺ die Grenzbereiche des Messverstärkers erreicht wurden, die bei der Verwendung von K⁺ überschritten worden wären. Die Verlangsamung der Deaktivierung durch die Verwendung von Rb⁺ als leitendes Ion erleichterte die elektrophysiologische Analyse dieser Kinetik. Die Ergebnisse der Analyse der Deaktivierungskinetik für den Kv4.2-Wildtyp-Kanal sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Die beiden Zeitkonstanten (τ_1 deact und τ_2 deact) der angepassten Exponentialfunktion charakterisieren die Deaktivierungskinetik. Durch die Amplitude der einzelnen Funktionen kann ihr Anteil an der Gesamtreaktion dargestellt werden. Das Auftragen der Zeitkonstanten gegen das Potenzial zeigte deutlich die exponentielle Spannungsabhängigkeit der Deaktivierungsreaktion (Abbildung 4.2 C). Die aus der angepassten Exponentialfunktion berechnete apparente Ladung q_{app} ist ein Maß für die Spannungsabhängigkeit der Reaktion. Die Ergebnisse der Analyse der Deaktivierungskinetik bei einem Potenzial von -80 mV für alle 11 getesteten Kv4.2-Kanalkomplexe sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.



Abbildung 4.2: Kinetische Analyse der Kv4.2 vermittelten Deaktivierung.

A. Die Tail-Ströme wurden durch Spannungssprünge von +40 mV nach -100 bis -50 mV in symmetrischem Rb⁺ ausgelöst. **B.** Ableitung eines Tail-Stroms derselben Zelle bei -80 mV auf einer anderen Zeitscala. Die magenta gefärbte Kurve zeigt die Summe zweier Exponentialfunktionen, die auf den Tail-Strom angepasst wurde. Die zwei Komponenten dieser Funktion sind als gepunktete Kurven dargestellt und beschreiben die schnelle und die langsame Komponente der Kv4.2-Deaktivierungskinetik. Die Pulsprotokolle sind unter den Stromspuren gezeigt. **C.** Zusammenfassung der kinetischen Analyse der Kv4.2-Deaktivierung. Gezeigt sind die Mittelwerte der schnellen ($\tau_{1 \text{ deact}}$; Kreise), der langsamen Zeitkonstante ($\tau_{2 \text{ deact}}$; umgedrehte Dreiecke) und der Anteil von $\tau_{1 \text{ deact}}$ an der Gesamtreaktion (Dreiecke). Die Zeitkonstanten wurden auf einer logarithmischen Scala (linke Y-Achse) gegen das Membranpotenzial aufgetragen. Die geraden Linien repräsentieren an die Datenpunkte angepasste Exponentialfunktionen, die die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung beschreiben. Die apparente Ladung q_{app} ist für $\tau_{1 \text{ deact}}$ angegeben. Die unterbrochenen Linien ohne Datenpunkte beschreiben die Kv4.2-Deaktivierungskinetik in symmetrischen K⁺.

Kv4.2	$\tau_{1 \text{ deact}} (ms)$	q_{app}	$\% \tau_{1 \text{ deact}}$	$\tau_{2 \text{ deact}} \left(\text{ms} \right)$	n
wt	3,9 ± 0,2	0,50	87 ± 1	22,5 ± 1,3	7
wt in K ⁺ /K ⁺	1,5 ± 0,3	0,57	83 ± 8	15,4 ± 7,8	4
wt + KChIP2	1,7 ± 0,2	0,93	89 ± 1	8,7 ± 3,3	5
wt + DPPX	3,0 ± 0,2	0,82	96 ± 1	55,1 ± 13,7	5
wt + KChIP2 + DPPX	1,1 ± 0,1	1,09	97 ± 1	5,4 ± 0,7	6
Δ2-10	6,8 ± 0,4	0,62	69 ± 3	31,4 ± 1,8	8
∆2-10 + KChIP2	2,3 ± 0,1	1,02	96 ± 1	11,3 ± 2,5	7
Δ2-10 + DPPX	3,9 ± 0,4	0,79	93 ± 2	15,1 ± 1,5	8
$\Delta 2-10 + \text{KChIP2} + \text{DPPX}$	1,3 ± 0,1	1,17	94 ± 2	4,5 ± 1,1	8
Δ2-20	7,5 ± 0,4	0,51	74 ± 3	20,2 ± 1,3	5
Δ2-40	9,6 ± 1,4	0,46	78 ± 3	35,6 ± 5,4	9
Δ2-40 + DPPX	3,7 ± 0,2	0,78	96 ± 1	40,1 ± 4,6	11

Tabelle 4.2: Analyse der Deaktivierungskinetik.

Deaktivierungszeitkonstanten aus der Anpassung der Summe zweier Exponentialfunktionen an den Abfall des Einwärtsstroms bei -80 mV in symmetrischem Rb⁺. Die relative Amplitude der schnellen Zeitkonstante ist angegeben. Für den Kv4.2-Wildtyp-Kanal in Abwesenheit akzessorischer β -Untereinheiten sind zusätzlich die Deaktivierungsparameter in symmetrischem K⁺ gezeigt.

4.1.3 Stromkinetik ternärer Kv4.2/KChIP2/DPPX-Kanalkomplexe

Die aufgrund von N-terminaler Deletion, Koexpression von akzessorischen β -Untereinheiten oder einer Kombination dieser beiden Kanalmodifikationen auftretenden Effekte auf die Inaktivierung und die Deaktivierung sollen in diesem Kapitel am Beispiel der Kv4.2-Deletionsmutante $\Delta 2$ -10 dargestellt werden. Die Deletion von 9 N-terminalen Aminosäuren bewirkte eine Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung gegenüber dem Kv4.2-Wildtyp-Kanal. Dies drückt sich in der Vergrößerung aller drei Zeitkonstanten aus. (Tabelle 4.1) und ist auf die fehlende N-Typ-Inaktivierung zurückzuführen (Gebauer *et al.*, 2004). Konstrukte mit ausgedehnteren N-terminalen Deletionen (Kv4.2 Δ 2-20 und Kv4.2 Δ 2-40) zeigten ebenfalls eine Verlangsamung der Inaktivierung, auch wenn diese nur in einer Vergrößerung von τ_1 inact und τ_2 inact zum Ausdruck kam.

Alle drei Deletionsmutanten (Kv4.2 Δ 2-10, Kv4.2 Δ 2-20 und Kv4.2 Δ 2-40) zeigten eine deutliche Verlangsamung in der schnellen Komponente der Deaktivierung ($\tau_{1 \text{ deact}}$; Tabelle 4.2). Dies lässt darauf schließen, dass der Kv4.2-N-Terminus zwei Funktionen erfüllt. Zum einen ist er an der Inaktivierung beteiligt (N-Typ-Inaktivierung), zum anderen beschleunigt er die Schließreaktion. Im Gegensatz zu den Kv4.2-Konstrukten mit größerer N-terminaler Deletion ist Kv4.2 Δ 2-10 in der Lage mit KChIP-Untereinheiten zu interagieren (Bähring *et al.*, 2001b).



Abbildung 4.3: Effekte der Koexpression von KChIP2 und DPPX auf die makroskopische Inaktivierung der N-terminal deletierten Kv4.2-Mutante Kv4.2Δ2-10.

A. Repräsentative normalisierte Kv4.2Δ2-10 vermittelte A-Typ Ströme bei +40 mV in Abwesenheit von akzessorischen β-Untereinheiten, in Anwesenheit von KChIP2 und in Anwesenheit von sowohl KChIP2 als auch DPPX. **B.** Mittelwerte der drei Zeitkonstanten der makroskopischen Inaktivierung für die Kanalkomplexe Kv4.2Δ2-10, Kv4.2Δ2-10/KChIP2, Kv4.2Δ2-10/DPPX und Kv4.2Δ2-10/KChIP2/DPPX. **C.** Daten für die Erholung von der Inaktivierung der vier verschiedenen Kanalkomplexe. Gezeigt sind die Datenpunkte für den ternären Komplex Kv4.2Δ2-10/KChIP2/DPPX (Quadrate) mit der angepassten einfachen Exponentialfunktion. Für die übrigen Kanalkomplexe sind nur die an die Datenpunkte angelegten Funktionen dargestellt (Kv4.2Δ2-10: durchgezogene Linie, Kv4.2Δ2-10/KChIP2: unterbrochene Linie, Kv4.2Δ2-10/DPPX: gepunktete Linie).

Die Koexpression von KChIP2 mit Kv4.2-Wildtyp führte zu einer Verlangsamung der schnellen initialen Komponente der Inaktivierung bei gleichzeitiger Beschleunigung der langsamen Komponente (Abbildung 4.3 A und B). Bei Koexpression von KChIP2 mit Kv4.2Δ2-10 ergaben sich Inaktivierungszeitkonstanten, die denen von KChIP2 und Wildtyp-Kanal glichen. Offensichtlich hat KChIP2 einen dominanten Effekt auf die Kv4.2-Inaktivierung gegenüber der N-terminalen Deletion. Zusätzlich wurde die Erholung von der Inaktivierung durch KChIP2 stark beschleunigt (Abbildung 4.3 C).

Auch auf die Kinetik der Deaktivierung hatte die KChIP2-Koexpression Auswirkungen, die sich in einer Beschleunigung sowohl der schnellen als auch der langsamen Komponente der Deaktivierung bei einer verstärkten Spannungsabhängigkeit ausdrückten (Abbildung 4.4).

Als zweite akzessorische β -Untereinheit wurde DPPX untersucht. Eine Koexpression von Kv4.2 Δ 2–10 mit DPPX führte zu einer Beschleunigung aller drei Komponenten der makroskopischen Inaktivierung und (ebenso wie KChIP2-Koexpression) zur Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung (Abbildung 4.3). Auch die Deaktivierungskinetik wurde durch DPPX beschleunigt, allerdings weniger stark als durch KChIP2-Koexpression (Tabelle 4.2, Abbildung 4.4 B).

Die Expression von ternären Kanalkomplexen aus Kv4.2 Δ 2-10 α -Untereinheiten, KChIP2 und DPPX zeigte die Additivität der Einzeleffekte von KChIP und DPPX auf Inaktivierungsund Deaktivierungskinetik. Die zusätzliche Koexpression von DPPX mit dem Komplex aus Kv4.2 Δ 2-10 und KChIP2 führte zu einer weiteren Beschleunigung der Inaktivierung (Tabelle 4.1, Abbildung 4.3 A und B). Auch die Erholung von der Inaktivierung erfuhr eine zusätzliche Beschleunigung (Abbildung 4.3 C und 4.6 C). Das Gleiche gilt für die Deaktivierungskinetik der ternären Kanalkomplexe. Bei Koexpression von DPPX mit dem Kanalkomplex Kv4.2 Δ 2-10/KChIP2 kam es zu einer zusätzlichen Beschleunigung beider Komponenten der Deaktivierung (Abbildung 4.4 A, Tabelle 4.2). Die Additivität der modulatorischen Effekte von KChIP2 und DPPX auf die Kinetiken von Inaktivierung und Deaktivierung lassen auf unterschiedliche, unabhängige Mechanismen der Modulation schließen.



Abbildung 4.4: Effekte der Koexpression von KChIP2 und DPPX auf die Deaktivierungskinetik der Nterminal deletierten Kv4.2-Mutante Kv4.2∆2-10.

A. Repräsentative normalisierte Kv4.2Δ2-10 vermittelte Tail-Ströme bei -80 mV in Abwesenheit von akzessorischen β-Untereinheiten, in Anwesenheit von KChIP2 und in Anwesenheit von sowohl KChIP2 als auch DPPX. Die an den Abfall des Einwärtsstroms angepassten doppelt exponentiellen Funktionen sind magenta dargestellt. **B.** Die schnellen Zeitkonstanten der Deaktivierung ($\tau_{1 \text{ deact}}$) wurden gegen das Potenzial aufgetragen. Für den ternären Komplex Kv4.2Δ2-10/KChIP2/DPPX sind die Datenpunkte und die daran angelegte einfache Exponentialfunktion dargestellt. Die apparente Ladung (q_{app}) für den ternären Kanalkomplex ist angegeben. Für die übrigen Kanalkomplexe sind nur die angepassten Funktionen gezeigt (Kv4.2Δ2-10: durchgezogene Linie, Kv4.2Δ2-10/KChIP2: unterbrochene Linie und Kv4.2Δ2-10/DPPX gepunktete Linie. **C.** Der Anteil der schnellen Komponente der Deaktivierung ($\tau_{1 \text{ deact}}$) an der Gesamtreaktion in Abhängigkeit vom Potenzial. Die Dreiecke zeigen die Datenpunkte des ternären Komplexes. Linien ohne Datenpunkte repräsentieren die übrigen Kanalkomplexe (Legende wie in B).

4.1.4 Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung

Die Modulation von Deaktivierungs- und Inaktivierungskinetik erfolgte durch N-terminale Deletionen unterschiedlicher Größe ($\Delta 2$ -10, $\Delta 2$ -20 und $\Delta 2$ -40), Koexpression von verschiedenen akzessorischen
ß-Untereinheiten (KChIP2 und DPPX) und durch Kombination Kanalmodifikationen. Die dieser beiden Analyse der Inaktivierungsund Deaktivierungskinetik der resultierenden 11 Kanalkomplexe durch Anpassen von multiexponentiellen Funktionen beschreibt die unterschiedlichen Auswirkungen dieser Modifikationen auf die beiden Mechanismen des Schaltverhaltens (Tabelle 4.1 und 4.2). Um den Zusammenhang zwischen Inaktivierung und Deaktivierung zu zeigen, wurde eine genaue Korrelationsanalyse der Inaktivierungszeitkonstanten, Deaktivierungszeitkonstanten und den Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung aller Kanalkomplexe durchgeführt. Dazu wurden diese Zeitkonstanten für die jeweiligen Kanalkomplexe paarweise gegeneinander aufgetragen (Abbildung 4.5 und 4.6) und mittels Pearson-Korrelationsanalyse auf einen Zusammenhang hin untersucht. Signifikante Korrelationen ergaben sich zwischen der schnellen Zeitkonstante der Deaktivierung $(\tau_1$ und verschiedenen deact) Inaktivierungsparametern, während die langsame Zeitkonstante der Deaktivierung ($\tau_{2 \text{ deact}}$) mit keinem der getesteten Inaktivierungsparameter korrelierte.



Abbildung 4.5: Korrelationsanalyse von Parametern der makroskopischen Inaktivierung und Deaktivierung.

Die Mittelwerte der Inaktivierungszeitkonstanten aus Tabelle 4.1 sind gegen die jeweiligen Mittelwerte der schnellen ($\tau_{1 \text{ deact}}$: Kreise) und der langsamen Zeitkonstante der Deaktivierung ($\tau_{2 \text{ deact}}$: Dreiecke) aus Tabelle 4.2 auf einer logarithmischen Scala aufgetragen: $\tau_{1 \text{ inact}}$ (A und B), $\tau_{2 \text{ inact}}$ (C und D), $\tau_{3 \text{ inact}}$ (E und F). Die verschiedenen Farben repräsentieren die verschiedenen Kv4.2 α -Untereinheiten (Kv4.2wt: schwarz, Kv4.2 Δ 2-10: grün, Kv4.2 Δ 2-20: blau und Kv4.2 Δ 2-40: rot). Datenpunkte für die einzelnen Kanalkomplexe sind mit Nummern markiert: 1: Kv4.2wt; 2: Kv4.2wt/KChIP2; 3: Kv4.2wt/DPPX; 4: Kv4.2wt/KChIP2/DPPX; 5: Kv4.2 Δ 2-10; 6: Kv4.2 Δ 2-10/KChIP2; 7: Kv4.2 Δ 2-10/DPPX; 8: Kv4.2 Δ 2-10/KChIP2/DPPX; 9: Kv4.2 Δ 2-20; 10: Kv4.2 Δ 2-40; 11: Kv4.2 Δ 2-40/DPPX. Die Korrelationskoeffizienten r₁ und r₂ für $\tau_{1 \text{ deact}}$ und $\tau_{2 \text{ deact}}$ sind zusammen mit den jeweiligen p-Werten der Signifikanz angegeben.

Die Korrelation der initialen Phase der Deaktivierung (τ_1 deact) mit der initialen Phase der makroskopischen Inaktivierung ($\tau_{1 \text{ inact}}$) ergab einen Korrelationskoeffizienten von r = 0,704 (p = 0,0156). Eine noch stärke Korrelation besteht zwischen τ_1 deact und der mittleren Zeitkonstante der makroskopischen Inaktivierung ($\tau_{2 \text{ inact}}$) mit r = 0,815 (p = 0,0022). Weiterhin zeigte sich eine starke Korrelation zwischen $\tau_{1 \text{ deact}}$ und der Zeitkonstante der Erholung von der Inaktivierung τ_{rec} mit einem Korrelationskoeffizienten von r = 0,803 (p = 0,0029). Interessanterweise scheint diese Korrelation durch den Datenpunkt des Wildtyp-Kanals verzerrt zu sein, da der N-Terminus hier die Deaktivierung kontrolliert, ohne signifikante Auswirkungen auf die Erholungskinetik zu haben (vgl. Tabelle 4.1 und 4.2). Der Ausschluss dieses Datenpunktes von der Analyse verstärkt die Korrelation zwischen den beiden Parametern (r = 0.965; p < 0.0001). Die Erholung von der Inaktivierung in Abwesenheit von akzessorischen β -Untereinheiten weist ebenso wie die Deaktivierung eine starke Spannungsabhängigkeit auf (Bähring et al., 2001a). Um die Spannungsabhängigkeit der beiden Parameter direkt miteinander vergleichen zu können, wurde die Erholung von der Inaktivierung für einige Kanalkomplexe bei verschiedenen Potenzialen gemessen. Die aus dem Anpassen von einfachen Exponentialfunktionen gewonnenen Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung wurden gegen das Erholungspotenzial aufgetragen (Abbildung 4.6 C). Das Anpassen einer einfachen Exponentialfunktion an diese Datenpunkte lieferte Werte für die apparente Ladung q_{app}, die zur Quantifizierung der Spannungsabhängigkeit der Erholung von der Inaktivierung dienen. Die q_{app}-Werte für die Erholung von der Inaktivierung liegen zwar im selben Bereich wie die Werte für die schnelle Komponente der Deaktivierung, allerdings lässt sich keine direkte Korrelation der Wertepaare der jeweiligen Kanalkomplexe erkennen (Abbildung 4.6 C, Tabelle 4.1).



Abbildung 4.6: Korrelationsanalyse von Deaktivierung und Erholung von der Inaktivierung.

Die Mittelwerte der Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung aus Tabelle 4.1 sind gegen die jeweiligen Mittelwerte der schnellen (τ_1 deact: Kreise; A) und der langsamen Zeitkonstante der Deaktivierung (τ_2 deact: Dreiecke; B) aus Tabelle 4.2 auf einer logarithmischen Scala aufgetragen. Die verschiedenen Farben repräsentieren die verschiedenen Kv4.2 α-Untereinheiten (Kv4.2wt: schwarz, Kv4.2Δ2-10: grün, Kv4.2Δ2-20: blau und Kv4.2Δ2-40: rot). Datenpunkte für die einzelnen Kanalkomplexe sind mit Nummern markiert. 1: Kv4.2wt; 2: Kv4.2wt/KChIP2; 3: Kv4.2wt/DPPX; 4: Kv4.2wt/KChIP2/DPPX; 5: Kv4.2\Delta2-10; 6: Kv4.2A2-10/KChIP2; 7: Kv4.2Δ2-10/DPPX; 8: Kv4.2Δ2-10/KChIP2/DPPX; 9: Kv4.2Δ2-20; 10: Kv4.2Δ2-40; 11: Kv4.2 Δ 2-40/DPPX. Die Korrelationskoeffizienten r₁ und r₂, für τ_1 deact und τ_2 deact, sind zusammen mit den jeweiligen p-Werten der Signifikanz angegeben. Bei Ausschluss des Datenpunktes für den Wildtyp-Kanal in A ergeben sich die grau dargestellten idealisierten Korrelationsparameter r₁' und p'. C. Spannungsabhängigkeit der Erholung von der Inaktivierung und der Deaktivierung. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte der Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung bei verschiedenen Potenzialen für verschiedene Kv4.2-Kanalkomplexe (siehe Legende neben dem Graphen). Die geraden Linien repräsentieren die an die Datenpunkte angepassten Exponentialfunktionen. Als Maß für die Spannungsabhängigkeit ist die apparente Ladung q_{app} angegeben. Für die Spannungsabhängigkeit der schnellen Deaktivierungszeitkonstanten τ_1 deact sind für die entsprechenden Kanalkomplexe nur die angepassten Funktionen gezeigt (Kv4.2wt: schwarze durchgezogene Linie, Kv4.2Δ2-10: grüne durchgezogene Linie, Kv4.2Δ2-10/KChIP2: grüne unterbrochene Linie, Kv4.2Δ2-10/DPPX: grüne gepunktete Linie und Kv4.2Δ2-10/KChIP2/DPPX: dicke grüne Linie).

4.1.5 Metallbrücken in Kv4.2-Cystein-Mutanten

Die Korrelationsanalyse der modulatorischen Effekte auf Inaktivierung und Deaktivierung zeigte, dass diese beiden Mechanismen in irgendeiner Weise miteinander gekoppelt sein müssen. Es ist sogar vorstellbar, dass Inaktivierung und Deaktivierung ein ähnlicher Mechanismus zu Grunde liegt.

Für den spHCN-Kanal aus einem Seeigel konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung bei diesem Kanal einem Schließen des S6-Gate beruht (Shin *et al.*, 2004). Dieser Zustand ist refraktär, weshalb die Autoren von einer Desensitisierung gegenüber der Spannung sprechen (*Desensitization to voltage*). Durch Einfügen von Cystein-Mutationen in das S6-Segment war es möglich, den spHCN-Kanal durch Applikation von Cd²⁺ im offenen Zustand "gefangen" zu halten. Die Autoren bezeichnen diesen Zustand als *locked-open*. Die Cd²⁺ Ionen werden durch die eingeführten Cysteine koordiniert und bilden eine Metallbrücke zwischen zwei benachbarten S6-Segmenten aus (Abbildung 4.7). Bei spHCN verhindert das Cd²⁺ nicht nur das Deaktivieren, sondern auch das Inaktivieren der Kanäle.

Um zu untersuchen, ob ein ähnlicher Inaktivierungsmechanismus auf den Kv4.2-Kanal anwendbar ist, wurde ein ähnliches Experiment, wie für den spHCN-Kanal beschrieben, durchgeführt. Die Auswahl der Aminosäurepositionen im S6-Segment für das Einführen von Cysteinen wurde auf Homologiekriterien basierend vorgenommen. Der spHCN-Kanal weist eine eher geringe Sequenzhomologie mit Kv4.2 auf. Wesentlich besser eignet sich für Homologiebetrachtungen der näher verwandte *Shaker*-Kanal mit dem analoge Experimente durchgeführt wurden (Holmgren *et al.*, 1998; Webster *et al.*, 2004). In Abbildung 4.7 B ist ein unvollständiges Alignment der Aminosäuresequenzen der drei Kanäle gezeigt. Für das Einführen der Cystein-Mutationen wurden die Positionen V404 und H414 in Kv4.2 ausgewählt, da sie homolog zu den in *Shaker* mutierten Positionen sind (Webster *et al.*, 2004). Trotz der geringen Sequenzübereinstimmung mit dem spHCN-Kanal ist die Position V404 in Kv4.2 auch homolog zu einer Cystein-Mutationsstelle in spHCN.



Abbildung 4.7: Metallbrücken zwischen benachbarten S6-Segmenten.

A. Schematische Darstellung der Bildung von Metallbrücken zwischen den S6-Segmenten benachbarter Untereinheiten (modifiziert nach Holmgren *et al.*, 1998). Die S6-Segmente der vier α -Untereinheiten sind als Zylinder dargestellt. Sie werden durch die Koordinierung von Cd²⁺ Ionen durch Cysteine im offenen Zustand gehalten. B. Unvollständiges Sequenzalignment von Kv4.2, *Shaker*, und spHCN. Die rot eingefärbten Aminosäuren stellen die für die Ausbildung von Metallbrücken relevanten Positionen in *Shaker* und spHCN bzw. die homologen Positionen in Kv4.2 dar. Das positiv geladene Arginin an Position 411 in Kv4.2 ist blau eingefärbt. Im *Shaker*-Kanal fehlt an homologer Position eine positive Ladung.

Als Hintergrund für die beiden Cystein-Mutationen (V404,H414C) wurde der N-terminal deletierte Kanal Kv4.2 Δ 2-40 gewählt, da dieser keine N-Typ-Inaktivierung zeigt (Gebauer et al., 2004). Ein locked-open-Zustand durch die Bildung von Metallbrücken zwischen den S6-Segmenten sollte sich in diesem Konstrukt also direkt auf die makroskopische Inaktivierung auswirken, wenn die Inaktivierung wie bei spHCN auf einem Schließen des S6-Gates von beruht. Die Doppelmutante Kv4.2 V404,H414C Δ2-40 wurde in HEK293 Zellen exprimiert und die Ströme in der whole-cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik abgeleitet. Für die Messungen in Anwesenheit von Cd²⁺ wurden 100 µM CdCl₂ zur Pipettenlösung gegeben. Die Ergebnisse für diese Kv4.2-Cystein-Doppelmutante sind in Abbildung 4.8 A und C. dargestellt. Weder die Schließkinetik noch die Inaktivierungskinetik für Kv4.2 V404,H414C Δ 2-40 wurden durch die Anwesenheit von Cd²⁺ verlangsamt. Bei einem Tail-Potenzial von -80 mV ergab sich unter Kontrollbedingungen eine Zeitkonstante τ_{deact} von 9,4 ± 1,8 ms (n = 3). In Anwesenheit von Cd²⁺ beschleunigte sich die Schließkinetik sogar tendenziell ($\tau_{deact} =$ 6.1 ± 2.2 ms; n = 4). Es ist also nicht möglich, den Kv4.2-Kanal durch Cd²⁺ in einen *locked*open-Zustand zu bringen. Folglich zeigte Cd²⁺ auch keinen Effekt auf die Inaktivierungskinetik bei +40 mV (Abbildung 4.8 C). Unter Kontrollbedingungen lagen die Inaktivierungszeitkonstanten τ_{fast} bei 79 ± 14 ms; τ_{slow} = 752 ± 58 ms (n = 3) und unterschieden sich damit kaum von denen in Anwesenheit von Cd^{2+} ($\tau_{fast} = 85 \pm 18 \text{ ms}; \tau_{slow} =$ 633 ± 53 ms; n = 3).

Kv4.2 V404,H414C,R411A ∆2-40



В

A Kv4.2 V404,H414C ∆2-40

Abbildung 4.8: Kv4.2-Cytein-Mutanten können nicht durch intrazelluläres Cd²⁺ im offenen Zustand gehalten werden.

Analyse der Deaktivierungs- und Inaktivierungskinetik der Kv4.2-Konstrukte Kv4.2 V404,H414C Δ 2-40 und Kv4.2 V404,H414C,R411A Δ 2-40 unter Kontrollbedingungen (schwarze Symbole) und in Anwesenheit von 100 μ M Cd²⁺ (weiße Symbole). Analyse der Deaktivierungskinetik von Kv4.2 V404,H414C Δ 2-40 (**A**) und Kv4.2 V404,H414C,R411 Δ 2-40 (**B**). Gezeigt sind die Mittelwerte der Zeitkonstante für die Deaktivierung bei Potenzialen von -100 mV bis -50 mV. Es wurde eine einfache Exponentialfunktion an die Datenpunkte abgepasst. Repräsentative Tail-Ströme bei -80 mV in Abwesenheit (links) und in Anwesenheit von 100 μ M Cd²⁺ (rechts) sind über den Graphen dargestellt. Analyse der Inaktivierungskinetik von Kv4.2 V404,H414C Δ 2-40 (**C**) und Kv4.2 V404,H414C,R411A Δ 2-40 (**D**). Gezeigt sind die Mittelwerte der zwei Zeitkonstanten der makroskopischen Inaktivierung bei +40 mV für beide Kanalkonstrukte in Anwesenheit (weiße Balken) und Abwesenheit (schwarze Balken) von Cd²⁺.

Um auszuschließen, dass das positiv geladene Arginin an Position 411 (Abbildung 4.7 B) die Ausbildung von Metallbrücken in Kv4.2 V404,H414C $\Delta 2$ –40 verhindert, wurde diese Ladung durch Mutation nach Alanin entfernt. Mit der resultierenden Triplemutante (Kv4.2 V404,H414C,R411A $\Delta 2$ –40) wurden analoge Experimente durchgeführt (Abbildung 4.8 C und D). Auch für dieses Konstrukt ergaben sich keine Auswirkungen von Cd²⁺ auf Deaktivierungs- und Inaktivierungskinetik. Die Zeitkonstante τ_{deact} für die Deaktivierung bei -80 mV lag unter Kontrollbedingungen bei 5,1 ± 1,6 ms (n = 4) und unterschied sich damit nicht von der in Anwesenheit von Cd²⁺ ($\tau_{deact} = 5,4 \pm 1,5$ ms; n = 8). Auch bei Entfernen der Ladung an Position 411 konnte der Kanal also nicht im offenen Zustand gehalten werden. Somit zeigte die Anwesenheit von Cd²⁺ auch keinen Effekt auf die Inaktivierung bei +40 mV (Kontrolle: $\tau_{fast} = 124 \pm 13$ ms; $\tau_{slow} = 788 \pm 96$ ms; n = 4; 100 µM Cd²⁺: $\tau_{fast} = 134 \pm 25$ ms; $\tau_{slow} = 895 \pm 32$ ms; n = 8; Abbildung 4.8 D).

4.2 Dynamische Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der modulierenden Effekte durch Koexpression von β-Untereinheiten und N-terminaler Deletion auf Inaktivierung und Deaktivierung (Abschnitt 4.1.4) geben starke Hinweise auf eine Kopplung der beiden Mechanismen. Die Korrelationsanalyse deutet darauf hin, dass den Hauptkomponenten von Inaktivierung und Deaktivierung derselbe Mechanismus zu Grunde liegt. Es ist vorstellbar, dass auch die Kv4.2-Inaktivierung auf einem Schließen des Kanals durch die Rückstellung des S6-Gates beruht. In Abbildung 4.9 ist ein hypothetischer Inaktivierungsmechanismus schematisch dargestellt. Bei der Deaktivierung (Abbildung 4.9; $O \rightarrow C_R$) kommt es durch Hyperpolarisation zu einer Rückstellung des Spannungssensors und des S6-Gates, was zum Schließen des Kanals führt. Die Inaktivierung des Kanals (Abbildung 4.9; $O \rightarrow I_C$) führt ebenfalls zum Schließen des S6-Gates, allerdings kommt es zu einer Entkopplung von Spannungssensor und S6-Gate. Die Rückstellung des S6-Gate in die Geschlossen-Position ist also nicht von der Rückstellung des Spannungssensors begleitet. Durch die Entkopplung von Spannungssensor und Gate ist dieser geschlossen-inaktivierte Zustand refraktär. Eine Erholung von der Inaktivierung (Abbildung 4.9; $I_C \rightarrow C_R$) setzt eine Wiederherstellung der Verbindung zwischen Spannungssensor und Gate voraus. Auch die Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung, also die Inaktivierung bei unterschwelligen Potenzialen, kann durch diesen Mechanismus erklärt werden, da es vorstellbar ist, dass das Entkoppeln eines Spannungssensors bereits vor der Aktivierung des Kanals eintreten kann (Abbildung 4.9; $C_R \rightarrow I_C$).



Abbildung 4.9: Hypothetischer Inaktivierungsmechanismus des Kv4.2-Kanals.

Ein Entkoppeln der Verbindung zwischen Spannungssensor und Gate führt zur Inaktivierung. Dies kann aus dem Geschlossen-Zustand (C_R) und aus dem Offen-Zustand (O) erfolgen. In beiden Fällen geht der Kanal in einen geschlossen-inaktivierten Zustand über (I_C). Der Kanal ist erst nach Wiederherstellung der Verbindung zwischen Spannungssensor und Gate wieder aktivierbar.

Es war allerdings nicht möglich, diesen Mechanismus der Inaktivierung des Kv4.2-Kanals durch die Ausbildung von Metallbrücken zu untersuchen, da die untersuchten Kv4.2-Cystein-Mutanten nicht durch Cd²⁺ in den *locked-open*-Zustand gebracht werden konnten. In den N-terminal deletierten Cystein-Doppelmutanten ließen sich weder Inaktivierung noch Deaktivierung durch die Anwesenheit von Cd²⁺ beeinflussen (Abschnitt 4.1.5; siehe Diskussion). Deswegen wurde ein anderer Ansatz gewählt, um den Mechanismus der Kv4.2-Inaktivierung zu untersuchen. Um näheren Aufschluss über die Kopplung von Inaktivierung und Deaktivierung zu erhalten, wurde im Bereich der Kopplungsstelle zwischen Spannungssensor und Gate ein Alanin-Mutagenese-Scan durchgeführt.

4.2.1 Alanin-Mutagenese-Scan

Wenn der Inaktivierungsmechanismus des Kv4.2-Kanals auf einem Entkoppeln der Verbindung zwischen Spannungssensor und Gate beruht, sollten Mutationen im Bereich dieser Verbindungsstelle Auswirkungen auf das Inaktivierungsverhalten haben. Es wurde ein Mutagenese-Scan in zwei Regionen vorgenommen (Abbildung 4.10). Die erste Region umfasst 21 Aminosäuren. Sie beinhaltet 15 Aminosäuren des zytoplasmatischen S4-S5-Linkers und 6 Aminosäuren des N-terminalen Teils des Transmembransegmentes S5. Diese Region wird im Folgenden als S4-S5-Linker-Region bezeichnet. Die zweite Region umfasst 17 Aminosäuren, von denen 10 im C-terminalen Teil des Transmembransegmentes S6 liegen. Die verbleibenden 7 Aminosäuren bilden den proximalen Teil des zytoplasmatischen C-Terminus. Von dieser Region wird im Folgenden als S6-Region des Mutagenese-Scans gesprochen. Die genaue Region der Interaktionstellen zwischen Spannungssensor und Gate ist für den Kv4.2-Kanal nicht bekannt. Die Auswahl der Region des Alanin-Mutagenese-Scans erfolgte daher basierend auf Shaker/KcsA-Chimären und der Kv1.2-Kristrallstruktur. Der spannungsunabhängige bakterielle KcsA-Kanal kann durch eine Fusion mit dem Shaker-Spannungssensor in einem spannungsabhängigen Kanal umgewandelt werden. Dies ist allerdings nur möglich, wenn auch der distale Teil des S6 durch Shaker-Sequenzen ersetzt wird (Lu et al., 2001, 2002). Durch ein Alignment der Kv4.2-Aminosäuresequenz mit der des Shaker-Kanals wurden die homologen Aminosäurepositionen in Kv4.2 bestimmt und diese als Bereiche für den Mutagenese-Scan festgelegt (Abbildung 4.10 C).

Die 2005 publizierte Kristallstruktur des Kv1.2-Kanals (Long *et al.*, 2005a, b) aus der Ratte bietet weitere Hinweise darauf, dass es sich bei den ausgewählten Bereichen um die für die Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate relevanten Regionen handelt. Diese Struktur stellt die erste und bisher einzige komplette Kristallstruktur eines spannungsabhängigen Kaliumkanals eines Säugetiers dar. Aufgrund der relativ hohen Sequenzhomologie von Kv4.2 und Kv1.2 auf Aminosäureebene bildet die Kv1.2-Struktur die bisher beste Modellstruktur für den Kv4.2-Kanal. In Abbildung 4.10 B wurden die zu den Bereichen des Kv4.2-Mutagenese-Scans homologen Aminosäuren in der Kv1.2-Kristallstruktur gelb eingefärbt. Es wird ersichtlich, dass sich die beiden Regionen des Mutagenese-Scans räumlich sehr nahe kommen, was eine Interaktion zwischen Aminosäuren der verschiedenen Regionen sehr wahrscheinlich erscheinen lässt.



Abbildung 4.10: Regionen des Alanin-Mutagenese-Scans

A. Topologiedarstellung einer α -Untereinheit. B. Kristallstruktur von Kv1.2 (Long *et al.*, 2005a,b). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur zwei der vier α -Untereinheiten dargestellt. C. Sequenzdarstellung der Regionen des Mutagenese-Scans. Die putativen Transmembransegmente (Zhu *et al.*, 1999) sind als Rechtecke über der Sequenz gekennzeichnet. In allen drei Darstellungen sind die Regionen des Mutagenese-Scans gelb dargestellt, das GYG-Motiv des Selektivitätsfilters ist rot eingefärbt.

4.2.1.1 Funktionalität der exprimierten Mutanten

Eine wichtige Voraussetzung für die Analyse der Ergebnisse eines Mutagenese-Scans ist die Funktionalität der Kanalmutanten (vgl. Abschnitt 3.1.9.1) Es ist zwar wünschenswert, dass die eingeführten Mutationen zu Veränderungen im Schaltverhalten des Kanals führen, allerdings sollten sich diese Veränderungen in einem Rahmen bewegen, der eine elektrophysiologische Charakterisierung und eine anschließende thermodynamische Analyse (Abschnitt 4.2.2) zulässt. In Abbildung 4.11 ist die Lage der Mutationen dargestellt, die eine funktionelle Expression in *Xenopus*-Oozyten zulassen.



Abbildung 4.11: Funktionelle Kv4.2-Mutanten des Alanin-Mutagenese-Scans.

A. Modellierung der funktionellen (gelb) und nicht funktionellen Mutanten (rot) auf die homologen Positionen der Kristallstruktur von Kv1.2. Die Darstellung zeigt das S6-Segment, S5 und den S4-S5-Linker zweier α -Untereinheiten (vgl. Abbildung 4.10). **B.** Ausschnitt aus der Kv4.2-Aminosäuresequenz. Die mutierten Aminosäuren sind analog zu A eingefärbt.

Die homologen Positionen dieser Mutationsstellen wurden in der Kristallstruktur des Kv1.2-Kanals (Long *et al.*, 2005a,b) gelb eingefärbt. Diejenigen Mutationen, die einen Funktionsverlust des Kanals zur Folge hatten, sind rot dargestellt. Dabei handelt es sich offensichtlich um besonders kritische Positionen, da bereits die Substitution einer einzelnen Aminosäure an dieser Stelle durch Alanin ausreicht, um einen Funktionalitätsverlust herbeizuführen. Auffällig an der Verteilung dieser kritischen Positionen ist eine Häufung dieser Positionen im proximalen Teil des S5 Segments und im zentralen S6-Segment.

In einem ersten Schritt zur elektrophysiologischen Überprüfung der Funktionalität eines Kanalkonstruktes wurden Spannungssprünge ausgehend von einem Potenzial von -110 mV zu verschiedenen Testpotenzialen (Abbildung 3.4) vorgenommen. Die aus diesen Spannungssprüngen resultierenden Stromfamilien zeigen die Funktionalität und das Expressionsniveau der Kanalkonstrukte an.

4.2.1.1.1 Funktionelle Mutanten in der S4-S5-Linker-Region

In der S4-S5-Linker-Region zeigten 14 der 21 Mutanten eine funktionelle Expression in *Xenopus*-Oozyten. Alle funktionellen Konstrukte konnten spannungsabhängig aktiviert werden. Die für den Kv4.2-Wildtyp-Kanal charakteristische schnelle Aktivierung und schnelle Inaktivierung, waren auch in diesen Kanalkonstrukten erkennbar (Abbildung 4.12). Ihre Funktion wurde also nicht soweit durch die jeweiligen Mutationen beeinträchtigt, dass die grundlegende Stromcharakteristik nicht mehr erkennbar ist. Allerdings wurden bei einem Vergleich der Stromkinetiken von Mutanten und Kv4.2-Wildtyp leichte Effekte ersichtlich (Abbildung 4.12). So wiesen die Ströme der Konstrukte I312A, L317A und A321V eine augenscheinlich langsamere makroskopische Inaktivierung auf. Auffällig war ebenfalls ein im Vergleich zum Wildtyp-Kanal deutlich größerer verbleibender Strom am Ende des 1,5 Sekunden langen depolarisierenden Pulses bei den Konstrukten G309A, I312A und A321V. Dies wurde besonders bei stärkerer Depolarisation deutlich.

Ergebnisse



Abbildung 4.12: Stromfamilien der funktionellen Mutanten in der S4-S5-Linker-Region.

Repräsentative Stromkurven resultierend aus Spannungssprüngen von -110 mV nach -80 mV bis +80 mV für den Kv4.2-Wildtyp-Kanal und die funktionellen Mutanten in der S4-S5-Linker-Region. Wegen der besseren Vergleichbarkeit wurden die Stromkurven auf die maximal erzielte Amplitude normalisiert. Die Kanalkonstrukte wurden heterolog in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. Die Ableitungen erfolgten mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik in ND96 Messlösung.
4.2.1.1.2 Funktionelle Mutanten in der S6-Region

In der S6-Region des Alanin-Mutagenese-Scans zeigten 9 von 17 Kanalkonstrukten eine funktionelle Expression (Abbildung 4.13). Wie bei den Konstrukten der S4-S5-Linker-Region blieben die Hauptcharakteristika des Kv4.2-Wildtyp-Stroms (Schnelle Aktivierung, schnelle Inaktivierung) auch bei den makroskopischen Strömen der funktionellen Kanalkonstrukte der S6-Region erhalten.



Abbildung 4.13: Stromfamilien der funktionellen Mutanten in der S6-Region.

Repräsentative Stromkurven resultierend aus Spannungssprüngen von -110 mV nach -80 mV bis +80 mV des Kv4.2-Wildtyp-Kanals und der funktionellen Mutanten der S6-Region. Die Stromkurven auf die maximal erzielte Amplitude normalisiert.

4.2.1.2 Auswirkungen der Mutationen auf das Kv4.2-Schaltverhalten

Um die Effekte der Mutationen auf die Stromkinetik der einzelnen Konstrukte, insbesondere auf das Inaktivierungsverhalten, hinreichend beschreiben zu können, reicht eine oberflächliche Betrachtung der makroskopischen Stromkinetik nicht aus. Hierfür bedarf es einer genaueren elektrophysiologischen Untersuchung mit Hilfe spezieller Pulsprotokolle, die Aktivierung, Inaktivierung und Erholung von der Inaktivierung quantifizierbar beschreiben. Der Fokus dieser Analyse lag hierbei auf der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung.

Um die Effekte der eingeführten Mutationen auf die verschiedenen Parameter des Schaltverhaltens zu charakterisieren, wurden zunächst entsprechende Kontrollexperimente mit dem Kv4.2-Wildtyp-Kanal durchgeführt. Hierzu wurden die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung (Steady-State-Inaktivierung), das Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung und die Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung im *Xenopus*-Oozyten Expressionssystem mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik elektrophysiologisch untersucht.

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des Kv4.2-Wildtyp-Kanals ist in Abbildung 4.14 A und B dargestellt. Die Aktivierungsschwelle des Wildtyp-Kanals lag bei etwa -40 mV. Aus der an die Datenpunkte angepassten Boltzmann-Funktion (vgl. Abschnitt 3.3.3.3) ergaben sich für den Wildtyp-Kanal ein Potenzial halbmaximaler Aktivierung (V_{1/2act}) von 7,5 ± 0,7 mV (n = 7) und ein Steigungsfaktor s_{act} von 20,4 ± 0,7 mV.

In Abbildung 4.14 C und D ist die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung des Wildtyp-Kanals gezeigt (vgl. Abschnitt 3.3.3.4). Die Inaktivierung des Kanals zeigte eine Abhängigkeit von dem gewählten Vorpulspotenzial. Die Spannung halbmaximaler Inaktivierung (V_{1/2inact}) lag für den Kv4.2-Wildtyp-Kanal bei -66,9 ± 0,8 mV mit einem Steigungsfaktor (s_{inact}) von 5,9 ± 0,3 mV (n = 7).



Abbildung 4.14: Aktivierung und Steady-State-Inaktivierung des Kv4.2-Wildtyp-Kanals.

A. und **B.**. Aktivierung des Kv4.2-Wildtyp-Kanals. **A.** Stromfamilie der Kv4.2-Aktivierung. mit schematischer Darstellung des Pulsprotokolls. **B.** Die nach Auswertung der Rohdaten resultierende Aktivierungskurve beschreibt die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. Eine Boltzmann-Funktion vierter Ordnung wurde an die Datenpunkte angepasst (vgl. Abschnitt 3.3.3.).

C. und **D.** Steady-State-Inaktivierung des Kv4.2-Wildtyp-Kanals. **C.** Stromfamilie der Kv4.2-Steady-State-Inaktivierung mit schematischer Darstellung des Pulsprotokolls. Nach langen Vorpulsen zu unterschiedlichen Potenzialen folgt ein kurzer depolarisierender Puls zu +40 mV. **D.** Die nach Auswertung der Rohdaten resultierende Steady-State-Inaktivierungskurve beschreibt die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung. Eine einfache Boltzmann-Funktion wurde an die Datenpunkte angepasst (vgl. Abschnitt 3.3.3.4).

Aus der Betrachtung der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Inaktivierung wird ein charakteristisches Merkmal des Kv4.2-Schaltverhaltens ersichtlich, nämlich die Eigenschaft des Kanals, bereits bei Membranpotenzialen negativ der Aktivierungsschwelle in den inaktivierten Zustand überzugehen. Dies wird besonders bei der gemeinsamen Darstellung von Aktivierungs- und Inaktivierungskurve deutlich (Abbildung 4.16 A.). Bei einem Potenzial von -50 mV lag nur eine sehr geringe Aktivierung vor, während ein Vorpuls zu demselben Potenzial bereits eine vollständige Inaktivierung zur Folge hatte. Die Inaktivierung bei Potenzialen negativ der Aktivierungsschwelle wird daher als Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bezeichnet.

Das Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung des Kv4.2-Wildtyp-Kanals bei einem Potenzial von -65 mV ist in Abbildung 4.15 A und B gezeigt. Aus der an die Datenpunkte angepassten Exponentialfunktion (vgl. Abschnitt 3.3.3.5) ergab sich eine Zeitkonstante des Einsetzens der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung (τ_{inact}) von 1,28 ± 0,11 s (n = 8). Nach einer Vorpulsdauer von etwa 10 Sekunden stellte sich bei dem Kv4.2-Wildtyp-Kanal ein Gleichgewicht zwischen der Fraktion der inaktivierten und der Fraktion der verfügbaren Kanäle ein. Dieses Gleichgewicht wird durch die Steady-State-Amplitude (A₀) der angelegten Exponentialfunktion beschrieben (vgl. Abschnitt 3.3.3.5). Die Steady-State-Amplitude der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung des Wildtyps bei -65 mV lag bei $0,46 \pm 0,032$ (n = 8). Bei einem Potenzial von -65 mV bleiben also 46 % der Kanäle aktivierbar, während die restlichen 54 % inaktiviert sind. Die Steady-State-Amplitude der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung wies eine starke Spannungsabhängigkeit auf. Diese Spannungsabhängigkeit spiegelt direkt die Steady-State-Inaktivierungskurve wider. Das Variieren des Vorpulspotenzials beim Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung verdeutlicht dies (Abbildung 4.16 A und B). Bei Vorpulspotenzialen negativ von -65 mV stellte sich eine höhere, bei positiveren Potenzialen eine niedrigere Steady-State-Amplitude ein. Bei einem Potenzial von -75 mV betrug die Steady-State-Amplitude 0.81 ± 0.023 (n = 3), während bei -50 mV, mit einer Steady-State-Amplitude von $0,016 \pm 0,012$ (n =8), nahezu alle Kanäle inaktiviert waren.



Abbildung 4.15: Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung und Erholung von der Inaktivierung des Kv4.2-Wildtyp-Kanals.

A. und **B.** Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung. **A.** Stromfamilie des Einsetzens der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung des Kv4.2-Wildtyp-Kanals mit schematischer Darstellung des Pulsprotokolls. **B.** Nach Auswertung der Rohdaten wurde eine einfache Exponentialfunktion an die Datenpunkte angepasst, die die Zeitabhängigkeit der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung des Wildtyp-Kanals bei einem Vorpulspotenzial von -65 mV beschreibt (vgl. Abschnitt 3.3.3.5).

C. und **D.** Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung des Kv4.2-Wildtyp-Kanals. **C.** Stromfamilie der Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung. mit schematischer Darstellung des Pulsprotokolls. **D.** Nach Auswertung der Rohdaten wurde eine einfache Exponentialfunktion an die Datenpunkte angepasst, die die Zeitabhängigkeit der Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung des Wildtyp-Kanals bei einem Zwischenpulspotenzial von -100 mV beschreibt (vgl. Abschnitt 3.3.3.6).

Einen weiteren wichtigen Parameter des Kv4.2-Schaltverhaltens bildet die Kinetik der Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung (Abbildung 4.15 C und D). Hierfür wurden die Kanäle durch einen unterschwelligen Puls inaktiviert, ohne den Offen-Zustand zu durchlaufen (vgl. Abbildung 3.10). Die vollständige Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei einem Erholungspotenzial von -100 mV war bei dem Kv4.2-Wildtyp-Kanal nach ungefähr 1 Sekunde abgeschlossen. Die Zeitkonstante der Erholungsreaktion (τ_{rec}) bei -100 mV betrug 237 ± 18 ms (n = 7).



Abbildung 4.16: Spannungsabhängigkeit der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung des Wildtyp Kv4.2-Kanals.

A. Gemeinsame Darstellung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Steady-State-Inaktivierung (vgl. Abbildung 4.14). **B.** Kinetik des Einsetzens der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei unterschiedlichen Vorpulspotenzialen. Die Steady-State-Amplitude der angepassten Exponentialfunktionen spiegelt die Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung wider (vgl. A).

Die Beschreibung der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Inaktivierung, der Kinetik der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung, der Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung und die Quantifizierung dieser Aspekte des Schaltverhaltens des Kv4.2-Wildtyp-Kanals durch die vorgestellten Parameter, bilden eine wichtige Grundlage, um die Auswirkungen der eingeführten Mutationen charakterisieren zu können.

4.2.1.2.1 Mutationen in der S4-S5-Linker-Region

Die Auswirkungen der Mutationen auf das Schaltverhalten der Kanalkonstrukte sind vielfältig und unterscheiden sich qualitativ und quantitativ. An dieser Stelle sollen die auftretenden Effekte beispielhaft anhand von ausgesuchten Alanin-Mutanten in der S4-S5-Linker-Region dargestellt werden.

Während einige Mutationen starke Veränderungen bei allen getesteten Parametern bewirkten, hatten andere nur sehr geringe Effekte zur Folge. Der Austausch von Glycin gegen Alanin an Position 325 (G325A) hatte praktisch keine Auswirkungen auf alle getesteten Merkmale des Schaltverhaltens (Abbildung 4.17 oben). Mit $V_{1/2act} = 8,4 \pm 1,7$ mV (n = 5); $V_{1/2inact} = -65,0 \pm$ 0,9 mV (n = 6); $\tau_{inact} = 1,25 \pm 0,08$ s (n = 5) und $\tau_{rec} = 231 \pm 14$ ms (n = 5) ist das Schaltverhalten von Kv4.2 G325A fast identisch mit dem des Wildtyp-Kanals. Einen anderen Effekt zeigte der Austausch des Glutamats an Position 323 gegen Alanin (E323A). Obwohl diese Position nur zwei Aminosäuren weiter N-terminal liegt, bewirkte ein Austausch an dieser Position eine deutliche Veränderung des Schaltverhalten (Abbildung 4.17 mitte). Bei dieser Kv4.2-Mutante waren die Spannungsabhängigkeiten von Aktivierung und Inaktivierung gegenüber dem Kv4.2-Wildtyp-Kanal zu negativeren Potenzialen verschoben $(V_{1/2act} = -2,6 \pm 0,4 \text{ mV}; n = 8; V_{1/2inact} = -79,0 \pm 0,5 \text{ mV}; n = 8)$. Außerdem war das Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV und die Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -100 mV gegenüber dem Wildtyp-Kanal deutlich beschleunigt (τ_{inact} = 0,16 ± 0,004 s; n = 6 und τ_{rec} = 106 ± 2 ms; n = 6). Die negative Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve und die extreme Beschleunigung des Einsetzens der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV deuten bei diesem Konstrukt auf eine Begünstigung der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung hin. Einen gegenteiligen Effekt bewirkte der Austausch des Serins an der benachbarten Position 322 gegen Alanin (S322A, Abbildung 4.17 unten). Die Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Inaktivierung wies bei Kv4.2 S322A gegenüber dem Wildtyp eine Verschiebung zu positiveren Potenzialen auf ($V_{1/2act} = +20.7 \pm 1.9 \text{ mV}$; n = 5; $V_{1/2inact} = -52.6 \pm 2.1$ mV; n = 5). Das Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV war mit τ_{inact} = 1,317 ± 0,067 s (n = 5) etwas verlangsamt, während die Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung mit $\tau_{rec} = 177 \pm 10$ ms (n = 5) im Vergleich zum Kv4.2-Wildtyp-Kanal leicht beschleunigt war. Diese Daten weisen darauf hin, dass bei Kv4.2 S322A die Verfügbarkeit der Kanäle gegenüber dem Wildtyp-Kanal begünstigt, bzw. die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung gehemmt ist.



Abbildung 4.17: Analyse der Spannungsabhängigkeit und Inaktivierungskinetik von Kv4.2-S4-S5-Linker-Mutanten.

Experimentelle Daten für Kv4.2-Wildtyp und die S4-S5-Linker-Mutanten S322A, E323A und G325A. Es wurden die Pulsprotokolle aus den Abbildungen 4.14 und 4.15 verwendet: Aktivierung und Steady-State-Inaktivierung (linke Spalte), Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV (mittlere Spalte) und die Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung (rechte Spalte). Es wurden die in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Funktionen an die Datenpunkte angepasst. Zur Abschätzung der Lage der Alanin-Mutationen ist die homologe Position in der Kv1.2-Struktur rot eingefärbt. Für die Mutanten sind die Datenpunkte und die jeweiligen angepassten Funktionen (durchgezogene Linien) abgebildet. Für Kv4.2-Wildtyp sind nur die angepassten Funktionen dargestellt (gepunktete Linien).

Der Aminosäureaustausch an drei räumlich sehr nah beieinander liegenden Positionen hatte also drei unterschiedliche Auswirkungen auf die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung. Einen ersten Hinweis auf die Erklärung dieses Phänomens bietet ein Blick auf die homologen Positionen in der Kv1.2-Kristallstruktur. Während die homologen Positionen für E323 und S322 eher in Richtung des S6-Transmembransegments weisen, liegt die homologe Position für G325 in der Kv1.2-Kristallstruktur auf der gegenüberliegenden, der dem S6 abgewandten Seite der α -Helix (Abbildung 4.17). Diese räumliche Anordnung unterstützt die Hypothese, dass Interaktionen zwischen Aminosäuren der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region an der Reaktion der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung beteiligt sind.

4.2.1.2.2 Mutationen in der S6-Region

In der S6-Region erzeugten die Alanin-Substitutionen ebenfalls Änderungen des Kv4.2-Schaltverhaltens. Der Austausch des Valins an Position 404 gegen Alanin (V404A in Abbildung 4.18) zeigte von allen funktionellen Mutanten die größte Negativ-Verschiebung der Steady-State-Inaktivierung ($V_{1/2inact} = -95,2 \pm 3,0$ mV; n = 6), wohingegen sich die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung nur leicht in Richtung positiverer Potentiale verschob ($V_{1/2act} = 13,6 \pm 7,5$ mV; n = 4). Das Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung war stark beschleunigt ($\tau_{inact} = 0,141 \pm 0,006$ s; n = 6) und die Erholung bei -100 mV verlangsamt ($\tau_{rec} = 598 \pm 45$ ms; n = 7). Die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung wird in diesem Kanalkonstrukt also stark gefördert. Gleiches gilt, wenn auch in wesentlich geringerem Ausmaß, für den Austausch von Isoleucin zu Alanin an Position 412 (I412A in Abbildung 4.18). Auch hier kam es zu einer Negativ-Verschiebung der Steady-State-Inaktivierung $(V_{1/2inact} = -80,2 \pm 0,9 \text{ mV}; n = 9)$, während die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung kaum von der des Kv4.2-Wldtyp-Kanals abwich ($V_{1/2act} = 8,5 \pm 1,8$ mV; n = 6). Das Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung war beschleunigt ($\tau_{inact} = 0,604 \pm 0,05$ s; n = 8) und die Erholungsreaktion etwas verlangsamt ($\tau_{rec} = 284 \pm 27$ ms; n = 7). Ebenso wie in der S4-S5-Linker-Region, gibt es auch in der S6-Region des Mutagenese-Scans Positionen an denen eine Alanin-Substitution das Kv4.2-Schaltverhalten derart veränderte, dass es zur Hemmung der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung kam. Die Kanalkonstrukte Kv4.2 S407A und Kv4.2 N408A zeigten eine solche Veränderung des Schaltverhaltens (Abbildung 4.18). Besonders ausgeprägt war dies bei letzterem Kanalkonstrukt. Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Inaktivierung waren im Vergleich zum Wildtyp-Kanal positiv verschoben ($V_{1/2act} = 28,9 \pm$ 5,5 mV; n = 5; V_{1/2inact} = -56,2 \pm 2,5 mV; n = 5). Zwar war das Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung beschleunigt (τ_{inact} = 0,714 \pm 0,09 s; n = 7), allerdings zeigte diese Mutante eine extrem schnelle Erholungsreaktion (τ_{rec} = 68 \pm 6 ms; n = 6), was entscheidend für die Verschiebung der Steady-State-Inaktivierung sein dürfte. Auch unter den funktionellen Mutanten der S6-Region fanden sich Kanalkonstrukte, deren Schaltverhalten sich von dem des Kv4.2-Wildtyp-Kanal nahezu nicht unterschied. Das Konstrukt Kv4.2 S410A zeigte in seinem Schaltverhalten die größte Ähnlichkeit zum Wildtyp-Kanal (vgl. Tabelle 4.3). Auch hier unterstützt die räumliche Anordnung der homologen Positionen in der Kv1.2-Struktur die Hypothese, dass Interaktionen zwischen Aminosäuren der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region bei der Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung eine wichtige Rolle spielen.



Abbildung 4.18: Analyse der Spannungsabhängigkeit und Inaktivierungskinetik von Kv4.2-S6-Mutanten. Experimentelle Daten für den Kv4.2-Wildtyp-Kanal und die S6-Mutanten V404A, S407A, N408A und I412A. Es wurden die Pulsprotokolle aus den Abbildungen 4.14 und 4.15 verwendet: Aktivierung und Steady-State-Inaktivierung (linke Spalte), Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV (mittlere Spalte) und die Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung (rechte Spalte). Es wurden die in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Funktionen an die Datenpunkte angepasst. Zur Abschätzung der Lage der Alanin-Mutationen wurde die homologe Position in der Kv1.2-Struktur rot eingefärbt. Für die Mutanten sind die Datenpunkte und die jeweiligen angepassten Funktionen (durchgezogene Linien) abgebildet. Für Kv4.2-Wildtyp sind nur die angepassten Funktionen dargestellt (gepunktete Linien).

4.2.1.2.3 Übersicht der Mutationseffekte des Mutagenese-Scans

In diesem Kapitel sollen die Effekte der Mutationen auf die in den vorangegangen Abschnitten vorgestellten Parameter des Kv4.2-Schaltverhaltens quantifiziert werden. Aus der Übersicht der Mutationseffekte (Abbildung 4.19 und 4.20) wird deutlich, dass wichtige Vorraussetzungen für eine weitergehende Analyse erfüllt sind. Die Mehrzahl (60 %) der mutierten Kv4.2-Kanalkonstrukte zeigte eine funktionelle Expression in Xenopus-Oozyten Expressionssystem. Weiterhin haben die unterschiedlichen Mutationen auch unterschiedliche Auswirkungen auf die verschiedenen Parameter des Schaltverhaltens. Die Effekte unterscheiden sich in Quantität und Qualität. So hatte das Einfügen eines Alanins an den Positionen 318, 320, 321, 325 und 410 mit einer Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve von weniger als 3 mV praktisch keine Auswirkungen auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung, während Mutationen an den Positionen 311, 313, 322, 323, 326, 400, 404, 408 und 412 mit einer Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve von über 10 mV sehr starke Effekte hervorriefen (Abbildung 4.19 B). Die unterschiedliche Qualität der Effekte wird ebenfalls bei Betrachtung der Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurven deutlich. Bei den Konstrukten R311A, S322A, F326A und N408A trat eine Verschiebung zu positiveren Potenzialen auf. Bei den Kv4.2-Mutanten, E323A, L400A, V404A und I412A dagegen wies die Verschiebung ein negatives Vorzeichen auf. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (Abbildung 4.19 A). Auch hier traten Effekte unterschiedlicher Stärke in beide Richtungen auf.



Abbildung 4.19: Verschiebung der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Inaktivierung durch die eingeführten Mutationen.

A. Verschiebung der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung. B. Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung. Es sind Werte für alle funktionellen Mutanten der S4-S5-Linker-Region (links) und der S6-Region (rechts) im Vergleich zum Kv4.2-Wildtyp-Kanal dargestellt. Die Anzahl der Versuche ist neben den Balken angegeben. Zur Orientierung befindet sich über den Diagrammen jeweils eine topologische Darstellung einer Kv4.2 α -Untereinheit, in der die relevante Region gelb eingefärbt ist.

Allerdings glichen deutlich mehr Mutanten in Bezug auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung dem Wildtyp-Kanal, als es für die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung der Fall war. Die Konstrukte Y315, G325A, F326, S407A, R411A, I412A, und Y413A wiesen eine Verschiebung der Aktivierungskurve von weniger als 3 mV gegenüber dem Wildtyp-Kanal auf. Eine Verschiebung der Aktivierungskurve von über 10 mV trat dagegen nur bei den Mutanten R311A, C320A, A321V, S322A, E323A und N408A auf. Interessanterweise geht eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung nicht immer mit einer gleichgerichteten Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung einher. Bei der Betrachtung der Kv4.2-Konstrukte mit einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung oder Inaktivierung von mehr als 10 mV ($|\Delta V_{1/2}| > 10$ mV) ergibt sich folgendes Bild: Bei den Kv4.2-Mutanten G309A, R311A, S322A, E323A, L400A, N408A war diese Verschiebung gleichsinnig. Bei den Konstrukten L313A, F326A, V404A, und I412A lag eine Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve von über 10 mV vor, während die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von der Mutation nahezu unbeeinflusst blieb. Der umgekehrte Fall, eine starke Verschiebung der Aktivierungskurve bei gleich bleibender Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung, zeigte nur das Konstrukt A321V.

Die Effekte auf die Kinetik der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung wurden durch die Zeitkonstanten des Einsetzens der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung (Abbildung 4.20 A) bei einem Potenzial von -65 mV und durch die Zeitkonstanten der Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -100 mV (Abbildung 4.20 B) charakterisiert. Auffällig bei der Betrachtung der Auswirkungen der Mutationen auf diese Parameter sind zwei Aspekte: Zum einen scheinen diese Parameter höchst empfindlich auf das Einfügen von Mutationen zu reagieren. Nur fünf der funktionellen Mutanten zeigten eine Änderung der Zeitkonstante des Einsetzens der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV von weniger als 25 % gegenüber der Kv4.2-Wildtyp Kontrolle (Y315A, C320A, S322A, G325A und Y413A). Gleiches gilt für die Zeitkonstanten der Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung. Hier wiesen ebenfalls nur fünf Kanalkonstrukte (G309A, A321V, G325A, I412A und Y413A) eine Änderung der Zeitkonstante von weniger als 25 % auf. Zum anderen ist auffällig, dass das Einfügen der Mutationen in den meisten Fällen eine Erniedrigung beider Zeitkonstanten, also eine Beschleunigung sowohl des Einsetzens der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung als auch der Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bewirkte.



Abbildung 4.20: Auswirkungen der eingeführten Mutationen auf die Kinetik der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung.

A. Zeitkonstanten des Einsetzens der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung. B. Zeitkonstanten der Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung. Es sind die Zeitkonstanten für den Kv4.2-Wildtyp-Kanal und die funktionellen Kv4.2-Mutanten der S4-S5-Linker-Region (links) sowie der S6-Region des Mutagenese-Scans dargestellt. Die Anzahl der Versuche ist neben den Balken angegeben. Zur Orientierung befinden sich über den Diagrammen topologische Darstellungen der Kv4.2 α -Untereinheit, in der die relevanten Regionen gelb eingefärbt sind.

Von den Kv4.2-Mutanten, die eine Änderung der Zeitkonstante des Einsetzens der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung von über 25 % aufwiesen, zeigten nur drei (I312A, A321V und S407A) eine Erhöhung der Zeitkonstante, also eine Verlangsamung der Reaktion. Den mit Abstand stärksten Effekt auf das Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung hatte das Einfügen eines Alanins an der Position 312 (I312A). Diese Mutation führte zu einer Erhöhung der Inaktivierungszeitkonstante auf 48,1 Sekunden. Das entspricht einer 37,5-fachen Erhöhung gegenüber dem Kv4.2-Wildtyp-Kanal. Die größte Beschleunigung der Inaktivierungsreaktion bei -65 mV zeigte das Konstrukt V404A mit einer Zeitkonstante von 141 ms (vgl. Tabelle 4.3 und Abbildung 4.20). Bei der Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung zeigten ebenfalls nur 3 der Konstrukte mit einer Änderung der Zeitkonstante von über 25 % eine Erhöhung der Zeitkonstante, also eine Verlangsamung der Erholungsreaktion. Hierbei handelt es sich um die Kv4.2-Mutanten I312A, L400A und V404A. Mit einer Zeitkonstante von 1,9 s, dem 8 fachen der Wildtyp Zeitkonstante, weist Kv4.2 L400A die stärkste Verlangsamung der Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung auf. Das andere Extrem stellt die Mutante N408A mit einer Zeitkonstante von 69 ms dar, was einer etwa 3,4 fachen Beschleunigung der Erholungsreaktion gegenüber dem Kv4.2-Wildtyp-Kanal entspricht. Die Werte aller untersuchten Parameter des Schaltverhaltens der funktionellen Mutanten und des Kv4.2-Wildty-Kanals sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

	V _{1/2act} (mV)	s _{act} (mV)	n	V _{1/2inact} (mV)	S _{inact} (mV)	n	τ_{inact} - ((m:	τ _{inact} -65mV (ms)			τ_{rec} -100 mV (ms)			n
wt	$7,5 \pm 0,7$	$20,4 \pm 0,7$	7	-66,9 ± 0,8	$5,9 \pm 0,3$	9	1281	±	106	8	237	±	18	7
G309A	-1,7 ± 1,1	$22,3 \pm 0,1$	5	$-74,7 \pm 0,9$	$5,2 \pm 0,2$	5	600	±	46	5	209	±	9	5
L310A														
R311A	26,1 ± 2,3	$22,9 \pm 0,8$	5	-48,2 ± 2,1	$5,8 \pm 0,1$	5	663	±	263	5	90	±	9	5
I312A	13,8 ± 2,0	$20,7 \pm 0,3$	5	-72,3 ± 1,1	$7,7 \pm 0,4$	5	48148	±	8473	5	713	±	24	5
L313A	$12,0 \pm 0,3$	25,0 ± 0,2	5	-77,5 ± 0,4	7,0 ± 0,1	5	172	±	34	5	83	Ŧ	4	5
G314A														
Y315A	8,7 ± 1,8	$22,8 \pm 0,4$	5	-62,8 ± 1,1	$5,5 \pm 0,1$	5	1096	±	20	5	113	±	6	5
T316A	11,7 ± 2,3	22,9 ± 0.8	5	-72,2 ± 0,6	$6,8 \pm 0,3$	5	408	±	13	5	147	Ŧ	5	5
L317A	21,6 ± 1,2	$23,9 \pm 0,2$	5	-72,6 ± 0,9	$7,6 \pm 0,4$	5	356	±	13	5	85	±	9	5
K318A	$15,2 \pm 0,5$	24,1 ± 0,2	5	-67,7 ± 0,3	$5,4 \pm 0,2$	5	912	±	46	5	157	±	4	5
S319A														
C320A	21,1 ± 0,9	$24,5 \pm 0,5$	5	-65,9 ± 1,2	$5,0 \pm 0,2$	5	1097	±	72	5	120	±	12	5
A321V	-9,2 ± 1,1	21,1 ± 0,7	5	-68,4 ± 0,7	$5,0 \pm 0,3$	5	3499	±	140	5	188	±	17	5
S322A	20,7 ± 1,9	$20,2 \pm 0,2$	5	-52,6 ± 2,1	$5,8 \pm 0,2$	5	1317	±	67	5	177	±	11	5
E323A	$-2,6 \pm 0,4$	$19,2 \pm 0,3$	8	-79,0 ± 0,5	$6,8 \pm 0,1$	8	161	±	5	6	106	±	3	6
L324A														
G325A	8,4 ± 1,7	$20,4 \pm 0,4$	5	-64,9 ± 0,9	$6,3 \pm 0,2$	6	1256	±	86	5	232	±	14	5
F326A	$10,4 \pm 4,9$	$21,0 \pm 0,3$	5	-45,9 ± 3,0	$6,9 \pm 0,1$	5	682	±	130	5	145	±	29	5
L327A														
L328A														
F329A														
V397A														
1398A														
A399V														
L400A	$2,9 \pm 4,4$	$30,2 \pm 2,1$	4	-92,1 ± 1,8	$10,9 \pm 0,4$	5	386	±	40	6	1924	±	129	5
P401A														
V402A	0,9 ± 1,6	$23,4\pm0,6$	5	$-59,2 \pm 0,9$	$9,8 \pm 0,1$	5	555	±	22	5	153	Ŧ	5	5
P403A														
V404A	13,6 ± 7,5	$25,0 \pm 2,2$	4	-95,2 ± 2,4	$10,2 \pm 2,5$	6	141	±	6	6	598	Ŧ	45	7
1405A														
V406A														
S407A	$7,6 \pm 2,5$	21,1 ± 0,5	9	-61,0 ± 0,8	$5,9 \pm 0,4$	6	1743	±	247	7	142	Ŧ	12	7
N408A	$28,9 \pm 5,5$	22,9 ± 1,4	5	-56,2 ± 2,5	$5,7 \pm 0,3$	5	715	±	94	7	69	Ŧ	7	6
F409A														
S410A	12,7 ± 1,8	$22,1 \pm 0,5$	5	-65,3 ± 1,2	$6,3\pm0,2$	5	720	±	95	5	161	Ŧ	17	5
R411A	8,5 ± 1,4	21,7 ± 2,2	5	-63,2 ± 1,2	$6,5 \pm 0,7$	8	726	±	54	3	169	±	13	6
I412A	8,5 ± 1,8	$23,5\pm0,4$	6	$-80,2 \pm 0,9$	$5,9 \pm 0,2$	9	604	±	50	8	284	Ŧ	27	7
Y413A	$9,5\pm0,8$	$22,0\pm0,6$	6	-62,5 ± 1,2	$7,0\pm0,4$	8	1219	±	200	8	192	Ŧ	14	7

Tabelle 4.3: Parameter des Schaltverhaltens für den Kv4.2-Wildtyp-Kanal und alle funktionellen Konstrukte des Mutagenese-Scans.

In der Tabelle sind die Werte für die Spannung der halbmaximalen Aktivierung (V_{1/2act}) und der halbmaximalen Inaktivierung (V_{1/2inact}), sowie die zugehörigen Steigungsfaktoren (s_{act} und s_{inact}) aufgeführt. Außerdem gezeigt sind die Zeitkonstanten für das Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei einem Potenzial von -65 mV (τ_{inact} -65 mV) und für die Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -100 mV (τ_{rec} -100 mV). Die Fehler sind als SEM angegeben. Mutanten, für die keine Werte angegeben sind, zeigten keine funktionelle Expression in *Xenopus*-Oozyten (vgl. Abbildung 4.11).

4.2.2 Thermodynamische Analyse der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung

Die im vorangegangenen Kapitel dargestellten Parameter des Kv4.2-Schaltverhaltens für die Konstrukte des Mutagenese-Scans dienten der ersten Charakterisierung der Mutanten. Die Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve bietet erste Hinweise darauf, ob die eingeführten Mutationen die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung fördern oder hemmen. Die bisherige Beschreibung und Quantifizierung der Mutationseffekte lässt jedoch keinen Schluss über die Interaktion bestimmter Aminosäuren der S4-S5-Linker-Region mit Aminosäuren der S6-Region zu. Dafür ist eine thermodynamische Analyse notwendig. Diese beinhaltet eine kinetische Analyse durch die Berechnung von Affinitäten für den geschlossen-inaktivierten Zustand und die Ermittlung von Kopplungskoeffizienten für Aminosäuren der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region des Mutagenese-Scans. Die Berechnung von Kopplungskoeffizienten erlaubt die Quantifizierung von Aminosäureinteraktionen und lässt Rückschlüsse auf Funktionsmechanismen in einem Protein-Komplex zu.

4.2.2.1 Kinetische Analyse der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV

Für die kinetische Analyse der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung wurden die Raten für das Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung (kon) und die Rückreaktion (koff) bei einem Potenzial von -65 mV für den Wildtyp-Kanal und alle funktionellen Konstrukte des Mutagenese-Scans bestimmt. Aus diesen Raten wurden dann die Gleichgewichtskonstanten (K_d) für diese beiden Teilreaktionen bei -65 mV berechnet (siehe Abschnitt 3.3.3.5). Diese Analyse war notwendig, da die Zeitkonstanten des Einsetzens der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung allein die Reaktion nicht vollständig beschreiben. Bei einem Potenzial von -65 mV ist die Inaktivierung für viele Kv4.2-Mutanten nicht vollständig. Es stellt sich ein Steady-State, ein Gleichgewicht zwischen Inaktivierung und Erholung von der Inaktivierung, ein. Diese Gleichgewichte bei -65 mV beschreiben die K_d Werte (Tabelle 4.4). Bei einem K_d Wert bei -65 mV von 1 wären die Raten koff und kon gleich, und es befänden sich im Steady-State 50 % der Kanäle im inaktivierten Zustand, während die restlichen 50 % aktivierbar wären. Bei der Reaktion des Einsetzens der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV würde sich in diesem Fall eine Steady-State-Amplitude (A0) von 0,5 einstellen. Die Spannung halbmaximaler Inaktivierung der Steady-State-Inaktivierungskurve läge bei -65 mV. Dieses trifft annähernd auf den Kv4.2-Wildtyp-Kanal zu. Die Steady-State-Amplitude der

Inaktivierung (A₀) des Kv4.2.Wildtyp-Kanals bei -65 mV liegt bei 0,46. \pm 0,032 (n = 8). Es wäre also ein K_d-Wert von knapp unter 1 zu erwarten, da die Hinrate der Inaktivierungsreaktion (k_{on}) nur unwesentlich größer als die Rückrate (k_{off}) sein sollte. Tatsächlich liegt der K_d-Wert für den Wildtyp-Kanal bei 0,898 \pm 0,13; n =8 (vgl. Tabelle 4.4). Bei Kv4.2-Mutanten, deren Steady-State-Inaktivierungskurven eine starke Verschiebung zu negativen Potentialen zeigten, wie es zum Beispiel für die Konstrukte E323A und V404A der Fall ist, ist das Gleichgewicht zwischen Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung und Erholung von der Inaktivierung bei -65 mV stark auf die Seite der Inaktivierungsreaktion verschoben, was sich in sehr kleinen K_d-Werten ausdrückt (E323A: 0,142 \pm 001; n = 6 und V404A: 0,054 \pm 0.011; n = 6). Gegenteilig stellt sich die Situation für die Konstrukte dar, deren Steady-State-Inaktivierungskurven eine Verschiebung in positive Richtung aufwiesen. Bei den Konstrukten R311A und F326A beispielsweise liegt das Gleichgewicht der Inaktivierungsreaktion bei -65 mV auf der Seite der Erholungsreaktion, was sich in hohen K_d-Werten manifestiert (R311A: 11,985 \pm 0,821; n = 5; F326A: 15,94 \pm 2,097; n = 5).

Wenn k_{on} die Rate für das Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung und k_{off} die Rate für die Erholungsreaktion bei einem Potenzial von -65 mV ist, sollte sich eine Korrelation zwischen k_{off} bei -65 mV (Abbildung 4.21 A) und der Rate der Erholung bei -100 mV (Abbildung 4.21 B) ergeben. Bei einem Potenzial von -100 mV liegt das Gleichgewicht zwischen Inaktivierungsreaktion und Erholungsreaktion deutlich auf der Seite der Erholungsreaktion. Bei diesem Potenzial kommt es also kaum noch zur Inaktivierung der Kanäle, so dass die Rate der Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -100 mV ($1/\tau_{rec}$) annähernd einem k_{off} der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -100 mV entspricht.



Abbildung 4.21: Auswirkungen der eingeführten Mutationen auf die Rückrate der Reaktion der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung.

A. Rückraten für die Reaktion der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV (k_{off}) für alle funktionellen Kv4.2-Mutanten und den Wildtyp-Kanal. **B.** Raten für die Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -100 mV. Zur Orientierung befinden sich über den Diagrammen topologische Darstellungen einer Kv4.2 α -Untereinheit, in denen die relevanten Regionen gelb eingefärbt sind. **C.** Die paarweise Auftragung dieser Parameter gegeneinander ergibt eine höchstsignifikante Korrelation.

	k₀ff -65mV	k on -65mV	K d -65mV	In(K _d /K _{d,wt}) -65mV			
wt	0,368 ± 0,030	0,448 ± 0,051	0,898 ± 0,130				
G309A	0,208 ± 0,012	1,497 ± 0,129	0,143 ± 0,016	-1,860 ± 0,115			
L310A							
R311A	2,260 ± 0,884	0,193 ± 0,077	11,985 ± 0,821	2,584 ± 0,071			
I312A	0,011 ± 0,003	0,015 ± 0,005	$0,763 \pm 0,085$	-0,185 ± 0,102			
L313A	1,085 ± 0,164	5,365 ± 0,671	0,201 ± 0,013	$-1,506 \pm 0,063$			
G314A							
Y315A	0,566 ± 0,028	0,348 ± 0,031	1,713 ± 0,248	0,606 ± 0,139			
T316A	0,668 ± 0,015	1,791 ± 0,073	0,375 ± 0,013	$-0,876 \pm 0,035$			
L317A	0,852 ± 0,048	1,971 ± 0,132	0,446 ± 0,055	$-0,729 \pm 0,117$			
K318A	$0,450 \pm 0,034$	0,657 ± 0,033	0,687 ± 0,047	-0,277 ± 0,068			
S319A							
C320A	0,481 ± 0,075	0,452 ± 0,049	1,150 ± 0,277	0,153 ± 0,205			
A321V	0,113 ± 0,015	0,174 ± 0,001	0,661 ± 0,110	$-0,361 \pm 0,160$			
S322A	0,579 ± 0,063	0,187 ± 0,021	3,401 ± 0,874	1,284 ± 0,230			
E323A	0,778 ± 0,053	5,478 ± 0,162	0,142 ± 0,010	-1,853 ± 0,068			
L324A			· • · • • • • • • • • • • • • • • • • •				
G325A	0,407 ± 0,028	$0,404 \pm 0,042$	1,047 ± 0,117	0,128 ± 0,111			
F326A	1,622 ± 0,440	$0,100 \pm 0,018$	15,940 ± 2,097	2,846 ± 0,149			
L32/A							
L328A							
-323A			*****				
13984							
A399V							
L400A	0.377 + 0.049	2.341 + 0.244	0.167 + 0.021	-1.731 + 0.142			
P401A	3,377 - 0,010	_,011 _ 0,214	0,101 ± 0,021	1,101 - 0,142			
V402A	1,148 ± 0,088	0,664 ± 0,037	1,768 ± 0,219	0,649 ± 0,117			
P403A							
V404A	$0,358 \pm 0,055$	$6,783 \pm 0,358$	0,054 ± 0,011	$-2,867 \pm 0,206$			
1405A							
V406A							
S407A	0,451 ± 0,044	$0,165 \pm 0,025$	$3,079 \pm 0,469$	1,171 ± 0,160			
N408A	1,381 ± 0,303	$0,215 \pm 0,042$	7,759 ± 1,900	1,984 ± 0,278			
F409A							
S410A	$0,768 \pm 0,124$	0,735 ± 0,112	1,092 ± 0,158	0,157 ± 0,135			
R411A	$0,766 \pm 0,036$	$0,629 \pm 0,077$	$1,240 \pm 0,092$	0,317 ± 0,076			
I412A	0,154 ± 0,016	$1,579 \pm 0,123$	$0,097 \pm 0,007$	$-2,243 \pm 0,079$			
Y413A	0,529 ± 0,114	0,405 ± 0,097	1,343 ± 0,132	0,354 ± 0,103			

Tabelle 4.4: Kinetische Parameter der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung.

In der Tabelle sind die Werte für die Hinrate (k_{on}), die Rückrate (k_{off}) und die Gleichgewichtskonstante (K_d) für die Reaktion der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung des Kv4.2-Wildtyp-Kanals und alle funktionellen Konstrukte des Mutagenese-Scans bei einem Inaktivierungspotenzial von -65 mV angegeben. Außerdem sind die Werte für ln($K_d/K_{d,wt}$) als Maß der Affinitätsänderung für den geschlossen-inaktivierten Zustand der Mutanten bei -65 mV im Vergleich zum Wildtyp-Kanal dargestellt. Mutanten, für die keine Werte angegeben sind, zeigten keine funktionelle Expression in *Xenopus*-Oozyten (vgl. Abbildung 4.11). Die Werte für k_{off} bei -65 mV (Abbildung 4.21 A) und die Rate der Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -100 mV (Abbildung 4.21 B) für den Wildtyp und die einzelnen Kv4.2-Mutanten wurden in Abbildung 4.21 C gegeneinander aufgetragen. Eine Pearson-Analyse zeigte eine höchstsignifikante Korrelation der beiden Parameter (r = 0,678; p = 0,0003). Die Korrelation dieser Parameter bietet eine Kontrolle der berechneten k_{off} -Werte, da diese im Einklang mit den unabhängig gemessenen Raten der Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung stehen.

Mit den aus den Raten der Hin- und Rückreaktion ermittelten Gleichgewichtskonstanten für die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV war es möglich, die Effekte der einzelnen Mutationen auf die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung zu quantifizieren. In Abbildung 4.22 sind die Werte für ln(K_d/K_{d.wt}) für alle funktionellen Kv4.2-Mutanten dargestellt. Dieser Parameter zeigt die Änderung der Affinität für den geschlossen-inaktivierten Zustand der Mutanten gegenüber dem Kv4.2-Wildtyp-Kanal bei einem Potenzial von -65 mV an. Hierbei bedeutet ein negativer ln(K_d/K_{d,wt})-Wert eine Begünstigung der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung, ein positiver Wert gibt eine Hemmung dieses Zustandes bei -65 mV im Vergleich zum Kv4.2-Wildtyp-Kanal an. Die größten Unterschiede zum Wildtyp-Kanal in der S4-S5-Linker-Region zeigten die Mutanten G309A und F326A. Hier wies das Kanalkonstrukt G309A mit $\ln(K_d/K_{d,wt}) = -1,860 \pm 0,115$ (n = 5) eine Begünstigung der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV gegenüber dem Wildtyp-Kv4.2 auf, während die Mutante F326A mit $\ln(K_d/K_{d,wt}) = -2,846 \pm 0,149$ (n = 5) eine Hemmung der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei diesem Potenzial zeigte. In der S6-Region wird der größte Unterschied zum Wildtyp-Kanal bei den Kv4.2-Mutanten V404A ($\ln(K_d/K_{d,wt}) = -2,867 \pm 0,206$; n = 6) und N408A $(\ln(K_d/K_{d,wt}) = 1.984 \pm 0.278; n = 7)$ sichtbar. Den geringsten Unterschied zeigten die Mutanten G325A ($\ln(K_d/K_{d,wt}) = -0.128 \pm 0.111 \text{ n} = 5$) und S410A ($\ln(K_d/K_{d,wt}) = 0.157 \pm 0.157 \pm 0.111 \text{ n} = 5$) 0.135, n = 5).

Eine Änderung der Affinität für den geschlossen-inaktivierten Zustand bei einem bestimmten Potenzial gegenüber dem Wildtyp-Kanal ($\ln(K_d/K_{d,wt})$) sollte sich direkt in einer Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve ($\Delta V_{1/2inact}$) widerspiegeln. In der Tat zeigt eine Auftragung dieser Parameter für alle funktionellen Kv4.2-Mutanten des Mutagenese-Scans eine lineare Abhängigkeit (Abbildung 4.22 C). Eine Pearson-Analyse dieser Abhängigkeit liefert eine höchstsignifikante Korrelation (r = 0,9483; p < 0,0001). Diese Korrelation bietet eine wichtige Kontrolle, da sie zeigt, dass die berechneten Affinitäten (K_d -65 mV) mit einer direkt gemessenen Größe (V_{1/2inact}) im Einklang stehen.



Abbildung 4.22: Änderung der Affinität für den geschlossen-inaktivierten Zustand der funktionellen Kv4.2-Mutanten gegenüber dem Kv4.2-Wildtyp-Kanal.

A. Die Änderung der Affinität für den geschlossen-inaktivierten Zustand ist als $\ln(K_d/K_{d,wt})$ für alle funktionellen Mutanten in der S4-S5-Linker-Region (links) und der S6-Region (rechts) dargestellt. **B.** Auftragung dieser Affinitätsänderung gegen die Änderung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung ($\Delta V_{1/2inact}$) zeigt eine höchstsignifikante Korrelation.

4.2.2.2 Double-Mutant-Cycle-Analyse

Bisher wurde gezeigt, wie einzelne Mutationen die Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung beeinflussen. Mit der Berechnung der Affinitäten für den geschlossen-inaktivierten Zustand konnten diese Effekte quantifiziert werden. Durch die Korrelation der k_{off} -Werte mit den $1/\tau_{rec}$ -Werten und der $\ln(K_d/K_{d,wt})$ -Werte mit den $\Delta V_{1/2inact}$ -Werten konnte die Korrektheit der

kinetischen Parameter überprüft und bestätigt werden. In diesem Kapitel soll nun untersucht werden, ob Aminosäuren der S4-S5-Linker-Region mit denen der S6-Region bei der Reaktion der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung interagieren. Eine Interaktion einzelner Aminosäuren miteinander kann mit der *Double-Mutant-Cycle*-Analyse quantifiziert werden (Carter *et al.*, 1984; Hidalgo und MacKinnon, 1995; Ranganathan *et al.*, 1996; Imredy und MacKinnon, 2000; Zhou *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte der beiden einzelnen Mutationen auf die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung mit dem Effekt der korrespondierenden Doppelmutante verglichen. Liegt keine Interaktion zwischen den Aminosäuren vor, ist der Effekt der Doppelmutante die Addition der Effekt der Doppelmutanten. Bei einer Interaktion der beiden Einzelmutanten. Die Abweichung von der Additivität, also die Interaktion von Aminosäuren, kann durch die Berechnung von Kopplungskoeffizienten quantifiziert werden. Dies erfolgte auf der Grundlage von Gleichgewichtskonstanten für die Reaktion der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV (K_d -65 mV) des Wildtyp-Kanals, zweier Einzelmutanten und der korrespondierenden Doppelmutante (siehe Abschnitt 3.3.3.5).

4.2.2.2.1 Auswahl der Mutanten zur Analyse

Für die *Double-Mutant-Cycle*-Analyse wurden 8 Doppelmutanten generiert. Hierfür wurden zwei Kv4.2-Konstrukte mit einer Mutation in der S4-S5-Linker-Region (S322A und E323A) jeweils mit vier verschiedenen Mutationen in der S6-Region (V404A, S407A, N408A und I412A) kombiniert. Bei der Auswahl der Mutanten bzw. Aminosäurereste zur Analyse wurden verschiedene Aspekte berücksichtigt. Als erstes Kriterium diente die Auswirkung der jeweiligen Einzel-Mutation auf die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung. Wichtig hierbei ist natürlich, dass sich die Mutante vom Wildtyp-Kanal unterscheidet. Daher wurden für die Analyse nur Mutanten ausgewählt bei denen der Betrag des $\ln(K_d/K_{d,wt})$ -Wertes größer als 1 ist. Außerdem wurde die unterschiedliche Qualität der Mutationseffekte auf die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung berücksichtigt. So ist bei den Kv4.2-Konstrukten E323A, V404A und I412A die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung gegenüber dem Wildtyp-Kanal begünstigt, was sich durch negative $\ln(K_d/K_{d,wt})$ -Werte ausdrückt, während die $\ln(K_d/K_{d,wt})$ -Werte der Mutanten S322A, S407A und N408A positiv sind, was eine Hemmung der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung im Vergleich zum Kv4.2-Wildtyp entspricht. Ein weiteres Kriterium war die räumliche Nähe der homologen Aminosäuren in der Kv1.2-Kristallstruktur, die erste

Hinweise auf die Möglichkeit einer Interaktion der Aminosäuren bietet. Ein Blick auf diese Struktur (Abbildung 4.25 A und B) zeigt, dass die homologen Positionen der ausgewählten Mutationsstellen tatsächlich relativ nahe beieinander liegen. Das letzte Kriterium stellten die für den *Shaker*-Kanal vorhandenen Daten dar. Die Kv4.2-Positionen E323 und V404 sind homolog zu E395 und V476 in *Shaker*. Diese Aminosäuren zeigten in *Shaker* bei einer *Double-Mutant-Cycle*-Analyse mit Aktivierungsparamtern den höchsten Grad an Interaktion (Yifrach und MacKinnon, 2002).

4.2.2.2.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der Doppelmutanten

Um das Schaltverhalten der Kv4.2-Doppelmutanten zu charakterisieren, wurden dieselben Pulsprotokolle wie für die Charakterisierung der Einzelmutanten gewählt. Die Ergebnisse dieser elektrophysiologischen Analyse sind in den Abbildungen 4.23 und 4.24 dargestellt. In der Tabelle 4.5 sind die Parameter des Schaltverhaltens für alle Doppelmutanten aufgeführt. Da für die nachfolgende Berechnung der Kopplungskoeffizienten, die Daten für den Wildtyp-Kanal, der beiden Einzelmutanten und der Doppelmutanten benötigt werden, sind diese Daten jeweils in einem Diagramm dargestellt. Die Abbildungen 4.23 und 4.24 zeigen die Daten für Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Inaktivierung, Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung und Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung der Doppelmutanten. Die Mutation S322A führte zu einem positiven ln(K_d/K_{d.wt})-Wert und einer Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve zu positiveren Potenzialen. Sie wurde mit zwei Mutationen kombiniert, die gleichsinnige Effekte auf diese Parameter haben (S407A und N408A) und mit zwei Mutationen, die entgegen gesetzte Effekte bewirken (V404A und I412A; Abbildung 4.23). Die Mutation E323A bewirkte eine Negativ-Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve und einen negativen ln(K_d/K_{d,wt})-Wert. Diese Mutation wurde mit den gleichen S6-Mutationen kombiniert (V404A, S407A, N408A und I412A; Abbildung 4.24).

Die dargestellten Daten für die Doppelmutanten geben zwar noch keinen direkten Aufschluss über die Additivität der Effekte auf die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung, allerdings werden hier schon einige interessante Aspekte deutlich. Besonders herauszuheben sind die beiden Doppelmutanten, die die S6-Mutation V404A enthalten (S322,V404A und E323,V404A). Bei diesen beiden Doppelmutanten scheint der Einfluss der Mutation V404A dominant auf die Veränderungen des Schaltverhaltens zu wirken. Beide Doppelmutanten wirken in allen



Abbildung 4.23: Analyse der Spannungsabhängigkeit und Inaktivierungskinetik von Kv4.2-Doppelmutanten.

Experimentelle Daten für die Kv4.2-Doppelmutanten S322,V404A; S322,S407A; S322,N408A und S322,I412A. Aktivierung und Steady-State-Inaktivierung (linke Spalte), Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV (mittlere Spalte) und die Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -100 mV (rechte Spalte). Es wurden die in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Funktionen an die Datenpunkte angepasst. Zur Abschätzung der Lage der Alanin-Mutationen sind die homologen Positionen in der Kv1.2-Struktur rot eingefärbt. Für die Doppelmutanten sind die Datenpunkte und die jeweils angepassten Funktionen (schwarze durchgezogene Linie) abgebildet. Für Kv4.2-Wildtyp (schwarze gepunktete Linien) und die Einzelmutanten sind nur die angepassten Funktionen dargestellt (S4-S5-Linker-Region: rote unterbrochene Linien; S6-Region: blaue unterbrochene Linien).



Abbildung 4.24: Analyse der Spannungsabhängigkeit und Inaktivierungskinetik von Kv4.2-Doppelmutanten.

Experimentelle Daten für die Kv4.2-Doppelmutanten E323,V404A; E323,S407A; E323,N408A und E323,I412A. Aktivierung und Steady-State-Inaktivierung (linke Spalte), Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV (mittlere Spalte) und die Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -100mV (rechte Spalte). Es wurden die in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Funktionen an die Datenpunkte angepasst. Zur Abschätzung der Lage der Alanin-Mutationen sind die homologen Positionen in der Kv1.2-Struktur rot eingefärbt. Für die Doppelmutanten sind die Datenpunkte und die jeweiligen angepassten Funktionen (schwarze durchgezogene Linien) abgebildet. Für Kv4.2-Wildtyp (schwarze gepunktete Linien) und die Einzelmutanten sind nur die angepassten Funktionen dargestellt (S4-S5-Linker-Region: rote unterbrochene Linien).

getesteten Aspekten des Schaltverhaltens deutlich mehr der Einzelmutante V404A als der entsprechenden S4-S5-Linker-Einzelmutanten (vgl. Abbildung 4.23, 4.24 und Tabelle 4.5). Die Auswirkungen der Einzelmutationen scheinen nicht additiv zu sein. Anders stellt sich die Situation bei den Doppelmutanten dar, die die S6-Mutation S407A enthalten. So zeigen die Einzelmutanten S322A und S407A eine positive Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve (S322A: V_{1/2inact} = -52,6 ± 2,1 mV; n = 5; S407A: V_{1/2inact} = -61,0 ± 0,8 mV; n = 6). Die korrespondierende Doppelmutante zeigt eine zusätzliche Positiv-Verschiebung (V_{1/2inact} = -51,1 ± 0,4 mV; n = 5). Bei der Betrachtung der Doppelmutante E323,S407A ist die Situation ähnlich. Bei dem Kv4.2-Konstrukt E323A ist die Steady-State-Inaktivierungskurve in negative Richtung verschoben (V_{1/2inact} = -79,0 ± 0,5 mV; n = 8), während die Einzelmutante S407A eine Verschiebung in positive Richtung aufweist (V_{1/2inact} = -61,0 ± 0,8 mV; n = 5). Die Doppelmutante liegt mit einem Wert für V_{1/2inact} von -69,4 ± 0,9 mV (n = 6 zwischen den Effekten der Einzelmutanten. Diese Daten weisen daher eher auf eine Additivität, also eine Unabhängigkeit der Einzeleffekte hin.

	V₁/₂act (mV)	s _{act} (mV)	n	V _{1/2inact} (mV)	s_{inact} (mV)	n	τ_{inact} -65mV (ms)	n	τ _{rec} -100 mV (ms)	n
S322,V404A	14,3 ± 1,3	25,5 ± 0,3	5	-89.6 ± 0,5	5,2 ± 0,1	5	211 ± 12	5	842 ± 42	5
S322,S407A	17,3 ± 0,3	21,4 ± 0,2	5	-51.1 ± 0,4	$5,4 \pm 0,1$	5	3440 ± 205	5	159 ± 3	5
S322,N408A	33,7 ± 2,3	$22,3 \pm 0.8$	3	-52.8 ± 1,1	$5,9 \pm 0,3$	5	1541 ± 233	5	107 ± 6	5
S322,I412A	13,4 ± 1,6	20,7 ± 0,5	4	-69.6 ± 1,4	$6,6 \pm 0,5$	5	1571 ± 278	5	297 ± 15	5
E323,V404A	11,4 ± 3,2	25,3 ± 0,9	5	-94.8 ± 4,5	7,1 ± 0,3	5	170 ± 10	5	486 ± 17	5
E323,S407A	16,3 ± 2,5	$24,1 \pm 0,4$	5	-69.4 ± 0,9	$6,3 \pm 0,1$	6	460 ± 30	5	126 ± 9	5
E323,N408A	26,1 ± 2,1	$26,4 \pm 0,4$	5	-71.9 ± 0,7	$6,3 \pm 0,1$	6	369 ± 25	5	158 ± 13	5
E323I,412A	8,5 ± 2,2	$25,0 \pm 0,2$	5	-85.0 ± 0,8	$6,9 \pm 0,2$	5	238 ± 10	5	279 ± 7	5

Tabelle 4.5: Parameter des Schaltverhaltens der Kv4.2-Doppelmutanten

Werte für die Spannung der halbmaximalen Aktivierung (V_{1/2act}) und der halbmaximalen Inaktivierung (V_{1/2inact}), sowie die zugehörigen Steigungsfaktoren (s_{act} und s_{inact}). Die Zeitkonstanten für das Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei einem Potenzial von -65 mV (τ_{inact} -65 mV) und der Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -100 mV (τ_{rec} -100 mV) sind angegeben.

4.2.2.2.3 Kinetische Analyse der Doppelmutanten

Für die kinetische Analyse der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung der Doppelmutanten wurden, wie für die Einzelmutanten, die Raten für das Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung (k_{on}) und die Rückreaktion (k_{off}) ermittelt und daraus die Gleichgewichtskonstanten K_d berechnet (Abschnitt 3.3.3.5). Die Tabelle 4.6 fasst diese kinetischen Parameter für alle Doppelmutanten zusammen.

	k₀ ff -65mV		k₀n -65mV			K d -6	/	In(K ₄/ K ₄,wt) -65mV			
S322,V404A	0,105 ± 0	0,013	4,700	±	0,308	0,022	±	0,002	-3,720	±	0,101
S322,S407A	0,271 ± 0	0,016	0,024	±	0,003	11,447	±	0,896	2,532	±	0,083
S322,N408A	0,623 ± 0	0,070	0,077	±	0,022	10,611	±	2,279	2,363	±	0,237
S322,I412A	0,295 ± 0	0,028	0,421	±	0,093	0,791	±	0,104	-0,164	±	0,139
E323,V404A	0,402 ± 0	0,117	5,552	±	0,350	0,075	±	0,024	-2,637	±	0,263
E323,S407A	0,784 ± 0	0,064	1,433	±	0,170	0,583	±	0,090	-0,484	±	0,164
E323,N408A	0,590 ± 0	0,049	2,178	±	0,261	0,293	±	0,049	-1,187	±	0,193
E323,I412A	0,225 ± 0	0,018	4,102	±	0,163	0,060	±	0,006	-2,741	±	0,101

Tabelle 4.6: Kinetische Parameter der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung der Kv4.2-Doppelmutanten. Werte für die Hinrate (k_{on}), die Rückrate (k_{off}) und die Gleichgewichtskonstante (K_d) für die Reaktion der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung der Kv4.2-Doppelmutanten bei einem Inaktivierungspotenzial von -65 mV. Als Maß der Affinitätsänderung für den geschlossen-inaktivierten Zustand im Vergleich zum Wildtyp-Kanal sind die Werte für $\ln(K_d/K_{d,wt})$ der Doppelmutanten bei -65 mV angegeben.

In Abbildung 4.25 sind die $\ln(K_d/K_{d,wt})$ -Werte bei -65 mV für die Kv4.2-Doppelmutanten im Vergleich mit den Werten für die korrespondierenden Einzelmutanten der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region graphisch dargestellt.

Die Kv4.2-Mutanten S322A und S407A zeigen $\ln(K_d/K_{d,wt})$ -Werte von 1,284 ± 0,230 (n = 5) und 1,171 \pm 0,160 (n = 7), während der ln(K_d/K_{d,wt})-Wert für die korrespondierende Doppelmutante bei 2,532 \pm 0,083 (n = 5) liegt. Hier liegt offensichtlich eine Additivität der Effekte der Einzelmutationen vor. Ähnliches gilt für das Mutantenpaar E323A/S407A auch hier liefert die Betrachtung der $\ln(K_d/K_{d,wt})$ -Werte (E323A: -1,853 ± 0,068; n= 6; S407A: $1,171 \pm 0,160$; n = 7; E323,S407A: -0,484 $\pm 0,164$; n = 5) Hinweise auf eine Additivität der Effekte. Gegenteilig stellt sich die Situation für die Kv4.2-Mutantenpaare S322A/V404A und E323A/V404A dar. Der ln(K_d/K_{d.wt})-Wert des Kanalkonstrukts S322A ist positiv (s.o.), der Wert für die Mutante V404A negativ (-2,867 \pm 0,206; n = 6). Der Wert für die Doppelmutante mit $-3,720 \pm 0,101$ (n = 5) sogar noch negativer, was einer Additivität der Effekte der Einzelmutanten offensichtlich widerspricht. Bei dem Kv4.2-Mutantenpaar E323A/V404A lässt die Betrachtung der ln(K_d/K_{d.wt})-Werte eine Unabhängigkeit der Einzeleffekte ebenfalls unwahrscheinlich erscheinen. Die Werte für beide Einzelmutanten sind negativ (E323A: -1,853 \pm 0,068; n = 6; V404A: -2,867 \pm 0,206; n = 6). Der Wert für die Doppelmutante E323,V404A ist mit $-2,637 \pm 0,263$ (n = 5) allerdings etwas weniger negativ als der Wert der Einzelmutante V404A, was einer Additivität widerspricht.



Abbildung 4.25: Affinitätsänderung für den geschlossen-inaktivierten Zustand der Einzel- und Doppelmutanten.

Änderung der Affinitäten für den geschlossen-inaktivierten Zustand der Einzelmutanten und der dazugehörigen Doppelmutanten. A. Die $\ln(K_d/K_{d,wt})$ Werte für die Doppelmutanten ausgehend von der S4-S5-Linker-Mutation S322A sind im Vergleich zu denen der korrespondierenden Einzelmutanten dargestellt (rechts). Lage der homologen Positionen in der Kv1.2-Kristallstruktur (links). Die dargestellten Seitenketten entsprechen denen des Kv4.2-Wildtyp-Kanals. Der Bereich des Mutagenese-Scans ist gelb, die relevanten Aminosäuren sind rot eingefärbt. **B.** Analoge Darstellung für die Doppelmutanten ausgehend von der S4-S5-Linker-Mutation E323A und für die dazugehörigen Einzelmutanten.

4.2.2.2.4 Aminosäureinteraktionen zwischen S4-S5-Linker-Region und S6-Region

Zur genauen Quantifizierung der Interaktion zwischen Aminosäuren der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region wurden mittels *Double-Mutant-Cycle*-Analyse Kopplungskoeffizienten berechnet (siehe Abschnitt 3.3.3.5). Als Berechnungsgrundlage dienten die K_d-Werte des Geschlossen-Kanal-Inaktivierung des Kv4.2-Wildtyp-Kanals, der S4-S5-Linker-Mutante, der S6-Mutante und der korrespondierenden Doppelmutante (Tabelle 4.6). Das Prinzip dieser Analyse ist in Abbildung 4.26 nochmals bildhaft dargestellt.



Abbildung 4.26: Prinzip der Double-Mutant-Cycle-Analyse.

Schematische Darstellung des Prinzips der *Double-Mutant-Cycle*-Analyse. Es werden die K_d -Werte des Wildtyp-Kanals (oben links), der S4-S5-Linker-Mutante (oben rechts), der S6-Mutante (unten links) und der korrespondierende Doppelmutante miteinander verglichen. Auf diese Weise kann gezeigt werden ob eine Interaktion zwischen den jeweiligen Aminosäuren vorliegt. Mutationen sind durch einen roten Punkt gekennzeichnet.

Die in Abschnitt 3.3.3.5 beschriebene Berechnung der Kopplungskoeffizienten wurde für die acht verschieden Aminosäurepaare durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.27 dargestellt. Das größte Maß an Kopplung zeigte sich zwischen dem Valin an Position 404 und dem Serin an Position 322 (Abbildung 4.27 A, $\ln\Omega = 2,23 \pm 0,82$) bzw. dem V404 und dem Glutamat an Position 323 (Abbildung 4.27 B, $\ln\Omega = 2,16 \pm 0,89$). Die geringste Kopplung ergab sich zwischen dem Serin an Position 407 (Abbildung 4.46 A, $\ln\Omega = 0.018 \pm 0.006$) und das Serin an Position 322 bzw. zwischen S407 und dem Glutamat an Position 323 (Abbildung 4.27 B, $\ln\Omega = 0.177 \pm 0.048$). Für diese Paare zeigte die Analyse eine völlige Unabhängigkeit. Es liegt also keine Interaktion zwischen den betroffenen Aminosäuren vor. Die Kopplungskoeffizienten für die übrigen Aminosäurepaare (S322,N408; S322,I412; E323,N408 und E323,I412) liegen zwischen diesen Extremen. Damit bestätigen diese Ergebnisse die durch die Betrachtung der ln(K_d/K_{d,wt})-Werte von Einzel- und Doppelmutanten getroffene Abschätzung über die Additivität der Einzeleffekte. Auch die räumliche Anordnung der homologen Aminosäuren in der Kv1.2-Kristallstruktur ist konsistent mit den für die Aminosäurepaare ermittelten Kopplungskoeffizienten. Die Aminosäuren V404, N408 und I412 in der S6-Region sind den beiden Aminosäuren S322 und E323 in der S4-S5-Linker-Region zugewandt (Abbildung 4.27). Für alle 6 möglichen Paarungen dieser Aminosäuren zeigen die Kopplungskoeffizienten eine Interaktion an. Die homologe Position für das Serin 407 in der S6-Region liegt in der Kv1.2-Kristallstruktur dagegen auf der dem S4-S5-Linker abgewandten Seite der α -Helix. Diese Lage macht eine Interaktion dieser Aminosäure mit dem Serin 322 oder dem Glutamat 323 äußerst unwahrscheinlich. Für die Paarungen mit S407 zeigten die Kopplungskoeffizienten dementsprechend auch keine Interaktion an.



Abbildung 4.27: Interaktion von Aminosäuren in der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region. A. Kopplungskoeffizienten für die getesteten Aminosäurepaare ausgehend von der S4-S5-Linker-Position S322 (rechts). und Lage der homologen Positionen in der Kv1.2-Kristallstruktur (links). Die gezeigten Seitenketten entsprechen denen des Kv4.2-Wildtyp-Kanals. Der Bereich des Mutagenese-Scans ist orange, die relevanten Aminosäuren sind rot eingefärbt. **B.** Analoge Darstellung für die Aminosäurepaare ausgehend von der S4-S5-Linker-Mutation E323A.

Auffällig bei der Betrachtung der Kv1.2-Kristallstruktur ist die relative Lage der homologen Positionen der Aminosäuren I412 und S322 bzw. E323 zueinander. Das Isoleucin an Position 412 ist zwar dem S4-S5-Linker zugewandt, allerdings relativ weit von den Positionen S322 und E323 entfernt. Trotzdem zeigt die *Double-Mutant-Cycle*-Analyse eine Interaktion zwischen S322 und I412 ($\ln\Omega = 0.76 \pm 0.25$) und zwischen E323 und I412 an ($\ln\Omega = 1.34 \pm 0.27$) an (siehe Diskussion).

Eine Interaktion zwischen zwei Aminosäuren und somit auch die Kopplungskoeffizienten sollten bei verschiedenen Potenzialen gleich sein. Die bisher gezeigten Kopplungskoeffizienten beruhen alle auf der kinetischen Analyse der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV, was dem Potenzial der halbmaximalen Inaktivierung des Wildtyp-Kv4.2 nahe kommt. Dieses Potenzial scheint jedoch nicht für alle Mutantenpaare sinnvoll zu sein. Durch die starke Negativ-Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve bei den Kv4.2-Mutanten E323A, V404A und I412 liegt die Steady-State-Amplitude der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung (A₀) bei -65 mV sehr nahe bei null. Gleiches gilt für die korrespondierenden Doppelmutanten E323, V404A und E323, I412A. Die Steady-State-Amplituden des Einsetzens der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung (A₀; Abschnitt 3.3.3.5) von Einzel- und Doppelmutanten liegen bei diesem Potenzial also sehr nah zusammen (vgl. Abbildung 4.24), was möglicherweise einen Fehler bei der Beurteilung der Additivität der Effekte durch die Double-Mutant-Cycle-Analyse verursachen könnte. Für diese Paarungen wurde mit -75 mV daher ein negativeres Inaktivierungspotenzial gewählt. Bei den Kv4.2-Mutanten S322A, S407A und N408A und auch bei den korrespondierenden Doppelmutanten S322,S407A und S322,N408A kommt es dagegen zu einer Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve zu positiveren Potenzialen (vgl. Abbildung 4.23). Für diese Paarungen wurde daher ein positiveres Inaktivierungspotenzial gewählt und mit den entsprechenden Wildtyp Daten verglichen (S322,S407A: -50 mV; S322,N408A: -55 mV). Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 4.28 dargestellt. Bei allen Mutantenpaarungen kommt es zu einer breiteren Auffächerung der Steady-State-Amplituden der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung von Kv4.2-Wildtyp-Kanal, den Einzelmutanten und den entsprechenden Doppelmutanten (Abbildung 4.28 A-D). Die aus diesen Kurven ermittelten Gleichgewichtskonstanten für die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bilden die Berechnungsgrundlage für die in Abbildung 4.28 E dargestellten Kopplungskoeffizienten bei alternativen Potenzialen. Bei einem Vergleich dieser Kopplungskoeffizienten mit den Kopplungskoeffizienten bei -65 mV ergab sich die gleiche Tendenz für den Grad der Kopplung der Aminosäurepaare. Auch bei den alternativen getesteten Inaktivierungspotenzialen zeigen die Aminosäuren E323 und V404 mit $\ln\Omega = 2,86 \pm 1$ eine starke Kopplung, während zwischen den Aminosäuren S322 und S407 mit $\ln\Omega = 0.123 \pm$ 0,049 keine Kopplung vorliegt. Die Kopplungskoeffizienten der Aminosäurepaare S322,N408 und E323,I412 mit $\ln\Omega$ -Werten von 1,57 ± 0,59 und 1,10 ± 0,22 liegen zwischen diesen Extremen.

Durch die Berechnung von Kopplungskoeffizienten auf der Grundlage einer kinetischen Analyse der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung konnten Interaktionen zwischen Aminosäuren der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region gezeigt werden. Diese Kopplung spielt also eine Rolle bei Konformationsänderungen während der Reaktion der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung.



Abbildung 4.28: Kopplungskoeffizienten bei unterschiedlichen Inaktivierungspotenzialen.

A-D. Kinetik des Einsetzens der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei alternativen Inaktivierungspotenzialen für den Kv4.2-Wildtyp-Kanal und die Mutantenpaare S322,S407A; S322,N408A; E323,V404A und E323,I412A Gezeigt sind die Datenpunkte und die angepassten Exponentialfunktionen für die Doppelmutanten (schwarz). Für den Wildtyp-Kanal (unterbrochene schwarze Linie) und die Einzelmutanten (S4-S5-Linker-Region: rote unterbrochene Linie; S6-Region: blaue unterbrochene Linie) sind nur die an die Datenpunkte angelegten Exponentialfunktionen dargestellt. **E.** Kopplungskoeffizienten für alle getesteten Aminosäurepositionen bei -65 mV (schwarze Balken) und bei alternativen Potenzialen für die in A-D gezeigten Positionen (weiße Balken). Das alternative Inaktivierungspotenzial ist jeweils über den weißen Balken angegeben.

4.2.3 Disulfidbrücken zwischen S4-S5-Linker-Region und S6-Region

Um direkt zu testen, ob das Entkoppeln der Verbindung zwischen Spannungssensor und Gate die mechanistische Grundlage der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bildet und damit die Ergebnisse der *Double-Mutant-Cycle*-Analyse zu untermauern, wurde ein weiterer experimenteller Ansatz verfolgt. Sowohl in die S4-S5-Linker- als auch in die S6-Region des Kv4.2-Kanals wurde jeweils eine Cystein-Mutation eingeführt. Bei enger räumlicher Nähe der Cysteine kann es unter oxidierenden Bedingungen im Zellinneren zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den beiden Thiol-Gruppen, einer Disulfidbrücke, kommen. Wird eine solche Bindung zwischen Spannungssensor und Gate ausgebildet, wird damit die Kopplung zwischen diesen beiden Domänen extrem verstärkt. Eine Verstärkung dieser Verbindung sollte sich auf die Inaktivierung auswirken, da dadurch ein Entkoppeln von Spannungssensor und Gate verhindert wird. Da diese Verbindung auch für die Übertragung der Bewegung des Spannungssensors auf das S6-Gate verantwortlich ist, sind auch Effekte auf die Aktivierung des Kanals zu erwarten.

4.2.3.1 Cystein-Substitution

Für die Cystein-Mutationen in der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region wurden die Positionen E323 und V404 ausgewählt. Für diese Positionen konnte mit der *Double-Mutant-Cycle*-Analyse ein hoher Grad an Kopplung gezeigt werden. Außerdem weisen die homologen Positionen in der Kv1.2-Kristallstruktur eine enge räumliche Nähe auf, was für die Ausbildung einer Disulfidbrücke essentiell ist (Abbildung 4.29). Als Hintergrund für die Cystein-Mutationen wurden N-terminal deletierte Kv4.2-Konstrukte verwendet (Kv4.2 Δ 2-10 und Δ 2-40), um die N-Typ-Inaktivierung zu eliminieren. Die Auswirkungen auf den Abfall des makroskopischen Stroms durch die Ausbildung der Disulfidbrücke sollten somit direkt die Auswirkungen auf die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung widerspiegeln. Durch Applikation von membrangängigen Oxidations- und Reduktionsmitteln (tBHO₂ und DTT) konnte das Redoxpotenzial im Zellinneren verändert werden. Die Applikation von tBHO₂ führte zu oxidierenden Bedingungen im Zellinnern und zur Ausbildung von Disulfidbrücken, während diese Bindung durch DTT reduziert, also aufgelöst wurde.


Abbildung 4.29: Disulfidbrücken zwischen Cysteinen der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region. Gezeigt ist ein vergrößerter Ausschnitt aus der Kv1.2-Kristallstruktur im Bereich der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region. Die homologen Positionen zu Cystein-Mutationen in Kv4.2 E323C und V404C sind grau eingefärbt. Bei räumlicher Nähe der Thiol-Gruppen (orange) kann es zur Ausbildung einer Disulfidbrücke kommen (orange unterbrochene Linie).

4.2.3.2 Spezifische Redox-Modulation der Cystein-Doppelmutante E323,V404C

Um die Auswirkungen der Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen S4-S5-Linker und S6 zu analysieren, wurde das Kv4.2-Konstrukt E323,V404C Δ2-40 mit Hilfe des Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp elektrophysiologisch untersucht. Hierzu wurde die Oozyte im Verlauf einer Serie von depolarisierenden Pulsen auf +40 mV nacheinander mit ND96 (Kontrollbedingungen), 10 mM DTT in ND96 (reduzierende Bedingungen), und 2 mM tBHO₂ in ND96 (oxidierende Bedingungen) superfundiert (Abbildung 4.30 A). Unter Kontrollbedingungen fiel zunächst die kleine Amplitude des resultierenden Stroms auf. Nach Applikation von 10 mM DTT kam es zu einem raschen Anstieg der Stromamplitude bis ein Plateau erreicht wurde. Bei Applikation von 2 mM tBHO₂ während dieser Plateauphase war ein schneller Abfall der Amplitude zu beobachten. Bei erneuter Gabe von DTT ließ sich die Reduktion der Stromamplitude umkehren. Dabei wurde die maximale Amplitude aber nicht mehr erreicht. Nach dem Erreichen eines Spitzenwertes sank die Amplitude sogar auch in Anwesenheit von DTT langsam weiter ab. Dies geschah allerdings deutlich langsamer als in Anwesenheit von tBHO₂. Es handelt sich hierbei offensichtlich um einen Langzeiteffekt, der leicht von dem schnellen Effekt des Amplitudenanstiegs zu unterscheiden ist. Um die Effekte von Reduktion und Oxidation sicher auf das Auflösen und die Ausbildung von spezifischen Disulfidbrücken zurückführen zu können, wurde das oben beschriebene Experiment analog mit dem nicht mutierten Kv4.2Δ2-40-Kanal und den beiden Einzelmutanten Kv4.2E323C Δ2-40 und Kv4.2V404C Δ2-40 durchgeführt (Abbildung 4.31 A, C und E). Bei diesen Kv4.2-Konstrukten fiel zunächst die deutlich größere Ausgangsamplitude unter Kontrollbedingungen auf. Die Anwesenheit von DTT vergrößerte die Stromamplitude dieser Konstrukte nicht. Auch der rasche Abfall der Amplitude, wie er bei der Doppelmutante auftrat, kam bei keinem der Kontrollkonstrukte vor. Es war lediglich der Langzeiteffekt einer langsamen Amplitudenabnahme in Anwesenheit von DTT zu erkennen, wie er auch bei der Kv4.2-Doppelmutante E323,V404C Δ 2-40 zu beobachten war. Bei dieser langsamen Abnahme handelt es sich also offensichtlich um einen unspezifischen Effekt, der bei allen Konstrukten auftritt. Die schnellen Effekte auf die Amplitude (Erhöhung unter reduzierenden Bedingungen und Erniedrigung unter oxidierenden Bedingungen) traten dagegen nur bei der Doppelmutante auf. Die Spezifität und die Reversibilität dieser Effekte auf die Stromamplitude durch Oxidation und Reduktion zeigt, dass sie auf das Auflösen oder die Bildung von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen in der S4-S5-Linker-Region und der zurückzuführen sind. Es ist vorstellbar, dass S6-Region diese Brücken unter Kontrollbedingungen bereits ausgebildet sind, was eine starke, unflexible Bindung zwischen Spannungssensor und S6-Gate zur Folge hat. Die Starrheit dieser Bindung erschwert die Aktivierung des Kanals, so dass bei einer Depolarisation nur sehr kleine Amplituden auftreten. In Anwesenheit von DTT wird die Disulfidbrücke aufgelöst, was die Bindung zwischen Spannungssensor und Gate wieder flexibler werden lässt, so dass die Aktivierung erleichtert wird und es zum Anstieg der Amplitude kommt. Bei Applikation von tBHO₂ kommt es durch Oxidation der Thiol-Gruppen zur erneuten Ausbildung der starren kovalenten Bindung und infolgedessen zur Amplitudenabnahme.

Durch den Langzeiteffekt der Amplitudenabnahme war es nicht möglich die Auswirkungen von Oxidation und Reduktion auf die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung mit Hilfe von Pulsprotokollen zu untersuchen, wie für die Charakterisierung der Mutanten des Mutagenese-Scans verwendet wurden (Abschnitt 3.3.3.5). Daher wurde in Hinblick auf den Mechanismus der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung die Kinetik des Abfalls des makroskopischen Stroms bei +40 mV unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von DTT oder tBHO₂ untersucht.



Abbildung 4.30: Redoxpotenzial abhängige Ausbildung von Disulfidbrücken in Kv4.2 E323,V404C Δ 2-40. A. Repräsentatives Experiment zur Auswirkung von Reduktion und Oxidation auf die Stromamplitude bei einem Potenzial von +40 mV. B. Auswärtsströme bei +40 mV unter Kontrollbedingungen (grau), in Anwesenheit von 10 mM DTT (rot) und 2mM tBHO₂ (blau). Aus fünf unabhängigen Experimenten wurden unter den drei verschiedenen Bedingungen Stromspuren ausgewählt (vgl. Pfeile in A), normalisiert und der Mittelwert gebildet. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM und sind hell dargestellt. C. Zeitkonstanten der Inaktivierung unter den verschiedenen Bedingungen als Einzelwerte für die fünf Experimente. D. Mittelwerte mit SEM der Zeitkonstanten aus C.

Da durch die Deletion des N-Terminus N-Typ-Inaktivierung ausgeschlossen werden kann, ist der Abfall des makroskopischen Stroms ausschließlich auf den Mechanismus einer kumulativen Geschlossen-Kanal-Inaktivierung zurückzuführen. Wenn diese Inaktivierung auf einem Entkoppeln der Verbindung von Spannungssensor und Gate und dem anschließenden Zurückfallen des S6-Gates in die Geschlossen-Position beruht (I_C in Abbildung 4.9), sollte eine kovalente Bindung zwischen Spannungssensor und Gate den Abfall des makroskopischen Stroms bei +40 mV verlangsamen. Eine Analyse der Inaktivierungskinetik des makroskopischen Stroms ist in Abbildung 4.30 B-D dargestellt.



Abbildung 4.31: Auswirkungen von Reduktion und Oxidation auf die Kv4.2-Konstrukte Δ 2-40, E323C und V404C.

Auswirkung von DTT und tBHO₂ auf Stromamplitude (linke Spalte) und Inaktivierungskinetik (rechte Spalte) für Kv4.2 Δ 2–40 (**A** und **B**), Kv4.2 E323C Δ 2-40 (**C** und **D**) und Kv4.2 V404C Δ 2-40 (**E** und **F**). Für die Auswirkungen auf die Stromamplitude sind repräsentative Experimente gezeigt, für die Zeitkonstanten Mittelwerte aus drei Messungen mit SEM. Die Zeitkonstanten wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten ermittelt: Unter Kontrollbedingungen (grau), nach fünf Minuten Superfusion mit DTT (rot) und nach fünf Minuten Superfusion mit tBHO₂ (blau). **G.** Vergleich der Effekte auf die Inaktivierungszeitkonstanten der Kontrollkonstrukte (Kv4.2 Δ 2-40, Kv4.2 E323C Δ 2-40 und Kv4.2 V404C Δ 2-40) und der Cystein-Doppelmutante (Kv4.2 E323,V404C Δ 2-40). Die Zeitkonstanten wurden jeweils auf die Zeitkonstante unter Kontrollbedingungen normalisiert. Um den Effekt von Reduktion und Oxidation auf die Inaktivierung zu quantifizieren, wurden die Zeitkonstanten der makroskopischen Inaktivierung der Doppelmutante zu drei verschiedenen Zeitpunkten ermittelt: unter Kontrollbedingungen, unter reduzierenden Bedingungen (bei der maximalen Amplitude in Anwesenheit von DTT) und unter reduzierenden Bedingungen (in Anwesenheit von tBHO₂ bei gleicher Amplitude wie unter Kontrollbedingungen; Pfeile in Abbildung 4.30) Bei den Messungen mit den Kontrollkonstrukten, wurden die Amplituden unter Kontrollbedingungen und nach fünf Minuten Applikation von DTT bzw. tBHO₂ miteinander verglichen (Pfeile in Abbildung 4.31). Für die Doppelmutante Kv4.2 E323,V404C Δ 2-40 lag die Zeitkonstante der Inaktivierung unter Kontrollbedingungen bei 470 \pm 93 ms (n = 5). In Anwesenheit von DTT kam es mit $\tau_{inact} = 152 \pm 27$ ms (n = 5) zu einer Verringerung der Zeitkonstante um 62 %, also zu einer Beschleunigung der Inaktivierungsreaktion. Dieser Effekt wurde unter oxidierenden Bedingungen (in Anwesenheit von tBHO₂) mit einer Erhöhung der Zeitkonstante auf 282 ± 41 ms (n = 5) teilweise wieder aufgehoben, erreichte allerdings nicht das gleiche Niveau wie unter Kontrollbedingungen. Ein Blick auf die Versuche mit den Kv4.2-Kontrollkonstrukten Δ 2-40, E323C Δ 2-40 und V404C Δ 2-40 ergibt ein anderes Bild: Bei der Einzelmutante V404C A240 blieben die Zeitkonstanten unter allen Bedingungen etwa konstant (ND96: 250 ± 16 ms; DTT: 248 ± 28 ms; tBHO₂: 256 ± 30 ms; n = 3; Abbildung 4.31 F). Das Konstrukt ohne Cystein-Mutation ($Kv4.2\Delta 2.40$) zeigte zwar eine Erniedrigung der Zeitkonstante (ND96: 157 \pm 6 ms; DTT: 132 \pm 3 ms; n = 3), allerdings war die Verringerung der Zeitkonstante mit nur 26 % im Vergleich zu der unter Kontrollbedingungen deutlich geringer als bei der Doppelmutante (Abbildung 4.31 G). Zudem ist der Effekt nicht durch Applikation von tBHO₂ umkehrbar (tBHO₂: 131 ± 7 ms; n = 3). Ähnlich stellt sich die Situation für die Einzelmutante E323C dar. Bei diesem Kv4.2-Konstrukt kam es in Anwesenheit von DTT zu einer Erniedrigung der Zeitkonstante um 30 %, aber auch dieser Effekt war durch die Applikation von tBHO₂ nicht umkehrbar, sondern verstärkte sich sogar noch etwas (ND96: 157 ± 16 ms; DTT: 110 ± 27 ms; tBHO₂: 96 ± 13 ms; n = 3; Abbildung 4.31 D). Die Kontrollversuche zeigen, dass die starke Verringerung der Zeitkonstante durch DTT und die teilweise Umkehrung dieses Effektes durch tBHO₂ Applikation spezifisch für die Doppelmutante Kv4.2 E323C,V404C Δ2-40 sind und daher auf dem Auflösen bzw. der Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den eingeführten Cystein-Mutationen beruhen.

Die oben beschriebenen Cystein-Mutationen wurden auch in Kv4.2 Δ 2-10 eingeführt und die entsprechenden Mutanten zusammen mit KChIP2 in Xenopus-Oozyten koexprimiert. Dieses Konstrukte weisen keine N-Typ-Inaktivierung auf, erlauben aber eine funktionelle KChIP-Bindung (siehe Abschnitt 4.1.3). Durch die Eigenschaft von KChIP. die Oberflächenexpression zu erhöhen, sollte die Stromamplitude der Cystein-Doppelmutante Kv4.2 E323,V404C Δ2-10 unter Kontrollbedingungen vergrößert sein. Eine größere Stromamplitude verringert den Fehler bei der Anpassung der Exponentialfunktion an den Abfall des makroskopischen Stroms. Außerdem sollte der Langzeiteffekt der Amplitudenreduktion des makroskopischen Stroms verringert werden, der möglicherweise durch eine Redox-Modifikation von nativen Cysteinen, die an der Tetramerisierung der α-Untereinheiten beteiligt sind, verursacht wird (Wang et al., 2007a). Durch die Bindung einer KChIP β-Untereinheiten an zwei benachbarten α-Untereinheiten wird das Kv4.2-Tetramer gefestigt (Kunjilwar et al., 2004; Pioletti et al., 2006; Wang et al., 2007b).

Mit den Kv4.2 Δ 2-10 Konstrukten (Kv4.2 Δ 2-10; Kv4.2 E323C Δ 2-10; Kv4.2 V404 Δ 2-10 und Kv4.2 E323,V404C Δ 2-10) als Komplex mit KChIP2 wurden identische Experimente zur Redox-Modulation wie mit den Kv4.2 Δ 2-40-Konsrukten durchgeführt. Die KChIP-Koexpression führte bei allen Konstrukten zu einer Vergrößerung der maximal erzielten Amplitude und auch der Langzeiteffekt der Amplitudenabnahme war abgeschwächt.

Die schnellen Effekte der Redox-Modulation auf Amplitude und Inaktivierung in Anwesenheit von KChIP (Abbildung 4.32 und 4.33) sind qualitativ mit den Effekten in Abwesenheit von KChIP (Abbildung 4.30 und 4.31) zu vergleichen und traten spezifisch bei der Doppelmutante auf (vgl. Abbildung 4.32 und 4.33).

Die Möglichkeit zwischen den Cysteinen an den Positionen 323 und 404 Disulfidbrücken zu erzeugen, zeigt die räumliche Nähe dieser Positionen. Die Auswirkungen auf die Amplitude und die makroskopische Inaktivierung machen deutlich, dass diese beiden Positionen an der Kopplung zwischen Spannungssensor und S6-Gate beteiligt sind und sowohl bei der Aktivierung als auch bei der Inaktivierung des Kanals eine wichtige Rolle spielen. Die kovalente Bindung zwischen Spannungssensor und S6-Gate hemmt zum einen durch ihre Starrheit die Aktivierung, zum anderen verlangsamt sie die Inaktivierung, da die Entkopplung von Spannungssensor und Gate erschwert wird.



Abbildung 4.32: Redoxpotenzial abhängige Ausbildung von Disulfidbrücken in Kv4.2 E323,V404C ∆2-10 bei KChIP2-Koexpression.

A. Repräsentatives Experiment zur Auswirkung von Reduktion und Oxidation auf die Stromamplitude bei einem Potenzial von +40 mV. **B.** Auswärtsströme bei +40 mV unter Kontrollbedingungen (grau), in Anwesenheit von 10 mM DTT (rot) und 2mM tBHO₂ (blau). Aus fünf unabhängigen Experimenten wurden unter den drei verschiedenen Bedingungen Stromspuren ausgewählt (vgl. Pfeile in A) normalisiert und der Mittelwert gebildet. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM und sind hell dargestellt. **C.** Zeitkonstanten der Inaktivierung unter den verschiedenen Bedingungen als Einzelwerte für die fünf Experimente. **D.** Mittelwerte mit SEM der Zeitkonstanten aus C.



Abbildung 4.33: Auswirkungen von Reduktion und Oxidation auf die Kv4.2-Konstrukte Δ 2-10, E323C und V404C bei KChIP2-Koexpression.

Auswirkung von DTT und tBHO₂ auf Stromamplitude (linke Spalte) und Inaktivierungskinetik (rechte Spalte) für Kv4.2 Δ 2-10 (**A** und **B**), Kv4.2 E323C Δ 2-10 (**C** und **D**) und Kv4.2 V404C Δ 2-10 (**E** und **F**). Alle Konstrukte wurden mit KChIP2 koexprimiert. Für die Auswirkungen auf die Stromamplitude sind repräsentative Experimente gezeigt, für die Zeitkonstanten Mittelwerte aus drei Messungen mit SEM. Die Zeitkonstanten wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten ermittelt: Unter Kontrollbedingungen (grau), nach fünf Minuten Superfusion mit DTT (rot) und nach fünf Minuten Superfusion mit tBHO₂ (blau). **G.** Vergleich der Effekte auf die Inaktivierungszeitkonstanten der Kontrollkonstrukte (Kv4.2 Δ 2-10, Kv4.2 E323C Δ 2-10 und Kv4.2 V404C Δ 2-10) und der Cystein-Doppelmutante (Kv4.2 E323, V404C Δ 2-10). Die Zeitkonstanten wurden jeweils auf die Zeitkonstante unter Kontrollbedingungen normalisiert.

4.2.4 Kanalchimären

E konnte gezeigt werden, dass eine Kopplung zwischen Aminosäuren der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region besteht. Auf mechanistischer Ebene sind die Befunde konsistent mit einem Entkoppeln dieser Verbindung als strukturelle Grundlage der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung. Durch die Berechnung von Kopplungskoeffizienten auf der Grundlage der kinetischen Parameter der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung wurde diese auf die Interaktion zwischen einzelnen Aminosäuren spezifiziert. Die Interaktion von E323 und V404 konnte in den Versuchen zur spezifischen Redox-Modulation bestätigt werden. Die Fragestellung in diesem Kapitel lautet: Können die Kv4.2-Sequenzen der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region Inaktivierung in einem nicht inaktivierenden Kanal vermitteln, und können umgekehrt die homologen Sequenzen eines nicht inaktivierenden Kanals die Kv4.2-Inaktivierung aufheben? Um dies zu untersuchen wurden Kanalchimären aus dem N-terminal deletierten Kv4.2-Kanal (Kv4.2Δ2-40) und einem N-terminal deletierten *Shaker*-Kanal (Sh H4 IR) erzeugt.



Abbildung 4.34: Kanalchimären aus Shaker- und Kv4.2-Sequenzen.

Topologische Darstellung je einer α -Untereinheit der Kanalchimären Kv4.2/Sh:S4-S5;S6 (**A**) und Sh/Kv4.2:S4-S5;S6 (**B**). Kv4.2-Anteile der Kanalchimären sind grau, *Shaker*-Anteile rotbraun dargestellt. Beide Konstrukte weisen eine Deletion des N-Terminus auf, was die N-Typ-Inaktivierung eliminiert. **C.** Ausschnitt eines Sequenzalignments der Aminosäuresequenzen von Kv4.2 (grau) und *Shaker* H4 (rotbraun). Die ausgetauschten Sequenzabschnitte sind eingerahmt.

Hierfür wurden die Kv4.2-Aminosäuresequenzen, in denen auch der Mutagenese-Scan durchgeführt worden war, an die homologen Positionen des *Shaker*-Kanals eingeführt und umgekehrt (Abbildung 4.34). Das Kanalkonstrukt Kv4.2/Sh:S4-S5;S6 besteht aus dem Kv4.2 Δ 2-40-Kanal, in dem die Sequenzen der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region durch die homologen *Shaker*-Sequenzen ersetzt wurden (Abbildung 4.34 A). Umgekehrt wurden bei dem Konstrukt Sh/Kv4.2:S4-S5;S6 die Kv4.2-Sequenzen dieser Regionen in den *Shaker* H4 IR (Δ 6-46) Hintergrund eingeführt (Abbildung 4.34 B).

4.2.4.1 Kv4.2/Shaker-Chimäre

Die elektrophysiologische Charakterisierung der Kv4.2/Sh:S4-S5;S6-Chimäre zeigte, dass das Einführen der entsprechenden Shaker-Sequenzen in die S4-S5-Linker-Region und die S6-Region nicht ausreicht um die Kv4.2-Inaktivierung komplett aufzuheben. Dennoch ergab der Vergleich der Kanalchimäre mit Kv4.2A2-40 eine Hemmung der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung (Abbildung 4.35). So war die makroskopische Inaktivierung bei +40 mV gegenüber der Kontrolle stark verlangsamt. Zur Quantifizierung dieses Effekts wurde die Summe von zwei Exponentialfunktion an den Stromabfall bei +40 mV angepasst. Während die schnelle Zeitkonstante relativ konstant blieb (Kv4.2 Δ 2-40: τ_{fast} = 133 ± 4 ms; n = 5 Kv4.2/Sh:S4-S5;S6: $\tau_{fast} = 134 \pm 10$ ms; n = 5), war die langsame Zeitkonstante der Chimäre gegenüber der Kontrolle deutlich größer (Kv4.2 Δ 2-40: τ_{slow} = 367 ± 23 ms n = 5; Kv4.2/Sh:S4-S5;S6: $\tau_{slow} = 793 \pm 32$ ms n = 5; vgl. Abbildung 4.35 A). Die Steady-State-Inaktivierung war bei der Kanalchimäre leicht zu positiveren Potentialen verschoben $(Kv4.2\Delta 40: V_{1/2inact} = -75,5 \pm 2,3 \text{ mV}; n = 5; Kv4.2/Sh:S4-S5;S6: V_{1/2inact} = 69,1 \pm 0,4 \text{ mV}; n$ = 5; Abbildung 4.35 B). Außerdem trat eine deutliche Verlangsamung des Einsetzens der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung bei -65 mV auf (Kv4.2 Δ 40: τ_{inact} = 1012 ± 66 ms; n = 6; Kv4.2/Sh:S4-S5;S6: τ_{inact} = 3056 ± 345 ms; n = 5; Abbildung 4.35 C), während die Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung stark beschleunigt war (Kv4.2 Δ 2-40: τ_{rec} = 362 ± 20 ms; n = 6; Kv4.2/Sh:S4-S5;S6: τ_{rec} = 148 ± 13 ms; n = 6; Abbildung 4.35 D).



Abbildung 4.35: Shaker-Kopplungsstelle hemmt die Inaktivierung in Kv4.2Δ2-40.

A. Stromantwort auf einen Testpuls nach +40 mV für das Kontrollkonstrukt Kv4.2 Δ 2-40 (gepunktete Linie) und den chimären Kanal Kv4.2/Sh:S4-S5;S6 (schwarze Linie). B. Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Inaktivierung. C. Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung. D. Erholung von der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung. Für die Kanalchimäre Kv4.2/Sh:S4-S5;S6 sind die Datenpunkte mit SEM und die angepassten Funktionen (durchgezogene Linier; siehe Abschnitt 3.3.3) gezeigt. Für das Kontrollkonstrukt Kv4.2 Δ 2-40 sind nur die an die Datenpunkte angelegten Funktionen dargestellt (gepunktete Linien).

4.2.4.2 Shaker/Kv4.2-Chimäre

Bei der Sh/Kv4.2:S4-S5;S6-Chimäre wurden die für die Kopplung von Spannungssensor und Gate verantwortlichen Aminosäuren aus Kv4.2 in den *Shaker* H4 IR Hintergrund eingeführt (Abbildung 4.34 B). Der *Shaker* H4 IR-Kanal diente daher als Kontrollkonstrukt. Durch die N-terminale Deletion (Δ 6-46) zeigt dieser *Shaker*-Kanal nur eine schwache Inaktivierung (Abbildung 4.36 A und D). Am Ende eines depolarisierenden Pulses von 1,5 Sekunden Dauer lag das Ausmaß der Inaktivierung bei allen getesteten Potenzialen bei etwa 15-20 %. Die Aktivierungsschwelle lag bei etwa -40 mV, das Potenzial der halbmaximalen Aktivierung bei V_{1/2 act} = 0,9 ± 1,0 mV (n = 7) bei einem Steigungsfaktor von s_{act} = 21,8 ± 0,7 mV (Abbildung

4.36 C). Das Einfügen der Kv4.2-Kopplungsstelle in diesen Kanal hatte starke Auswirkungen auf Aktivierung und Inaktivierung. So wurde bei der Aktivierung des chimären Kanals Sh/Kv4.2:S4-S5;S6 auch bei starker Depolarisation keine Sättigung der Aktivierungskurve erreicht. Die in Abbildung 4.36 C gezeigten Datenpunkte wurden daher auf das Maximum der angepassten Boltzmann-Funktion normalisiert. Die Aktivierungsschwelle der Kanalchimäre lag mit etwa -40 mV zwar im Bereich der Kontrolle, allerdings war die Aktivierungskurve sehr flach (s = 41,27 ± 1,10 mV; n = 6), was zu einer extremen Positiv-Verschiebung des Potenzials der halbmaximalen Aktivierung führte (V_{1/2act} = 105,9 ± 9,0 mV; n = 6).



Abbildung 4.36: Kv4.2-Kopplungsstelle induziert eine Inaktivierung im nicht inaktivierenden Kanal *Shaker* H4 IR.

A und B. Stromantworten auf Spannungssprünge nach -40 mV bis +150 mV für das Kontrollkonstrukt *Shaker* H4 IR (A) und den chimären Kanal Sh/Kv4.2:S4-S5;S6 (B). C. Aktivierungskurven für *Shaker* H4 IR (orange Quadrate) und Sh/Kv4.2:S4-S5;S6 (orange-graue Quadrate). Es wurden Boltzmann-Funktionen vierter Ordnung an die Datenpunkte angepasst. D. Prozentualer Anteil der Inaktivierenden Stromkomponente in Abhängigkeit vom Potenzial für *Shaker* H4 IR (orange Quadrate) und Sh/Kv4.2:S4-S5;S6 (orange-graue Quadrate). Für die Analyse wurde die maximale Stromamplitude mit der nach 1,5 Sekunden verbleibenden Amplitude verglichen.

Ein ebenso deutlicher Unterschied zwischen Kontrolle und der Kanalchimäre Sh/Kv4.2:S4-S5;S6 wird bei der Betrachtung des Inaktivierungsverhaltens sichtbar. Während das Kontrollkonstrukt *Sh*aker IR bei allen Potenzialen nur eine gleich bleibende, sehr geringe Inaktivierung zeigte, trat bei der Kanalchimäre bei starker Depolarisation eine schnell inaktivierende Komponente auf (bei +150 mV: $\tau = 41 \pm 10$ ms; n = 6) Abbildung 4.36 B und D). Je stärker die Depolarisation, desto größer war der Anteil des inaktivierenden Stroms (Abbildung 4.36 D). Bei einem Potenzial von +50 mV waren nach 1,5 Sekunden 19,5 ± 2,6 % (n = 6) des Spitzenstroms inaktiviert. Bei diesem Potenzial lag die Kanalchimäre also etwa auf dem Niveau der Kontrolle (15,2 ± 2,4 %; n = 7).



Abbildung 4.37: Erholung von der Inaktivierung und Steady-State-Inaktivierung der Kanalchimäre Sh/Kv4.2:S4-S5;S6.

A. Erholung von der Inaktivierung bei zwei verschiedenen Potenzialen. Der Graph zeigt den Zeitverlauf der Erholung bei Erholungspotenzialen von -55 mV und -100 mV. Das Pulsprotokoll ist unter dem Graphen schematisch dargestellt. Es wurden einfache Exponentialfunktionen an die Datenpunkte angepasst. **B.** Abhängigkeit der Stromamplitude vom Vorpulspotenzial. Gezeigt sind die auf das Maximum normalisierte Stromamplituden bei einem Potenzial von +100 mV nach Vorpulsen zu verschiedenen Potenzialen. Eine schematische Darstellung des Pulsprotokolls befindet sich unter dem Graphen.

Bei einem Potenzial von +150 mV dagegen kam es nach 1,5 Sekunden zu einer Inaktivierung von $69.1 \pm 1.3 \%$ (n = 6), während die Inaktivierung des *Shaker* IR-Kanals unter diesen Bedingungen bei 20,1 \pm 3,1 % (n = 7) lag (Abbildung 4.36 D). Die inaktivierende Stromkomponente ist also spannungsabhängig. Sie tritt verstärkt bei zunehmender die Erholung Depolarisation auf. Auch von der Inaktivierung zeigte eine Spannungsabhängigkeit. Interessanterweise wurde die Erholung von der Inaktivierung aber nicht wie bei Kv4.2 durch Hyperpolarisation beschleunigt. Vielmehr war die Erholung von der Inaktivierung bei Sh/Kv4.2:S4-S5;S6 bei einem Potenzial von -55 mV mit einer Zeitkonstante von 0.535 ± 0.035 s (n = 5) deutlich schneller als bei -100 mV (54,1 ± 3,0 s; n = 5; Abbildung 4.37 A). Dieses Verhalten spiegelte sich auch in der Steady-State-Inaktivierungskurve in Abbildung 4.37 B wider. Für den Testpuls wurde hier ein Potenzial von +100 mV gewählt, um die Auswirkung des Vorpulses auf die inaktivierende Komponente untersuchen zu können. Bei negativen Potenzialen war die Erholung von der Inaktivierung offensichtlich so langsam, dass es selbst nach 30 Sekunden noch zu keiner vollständigen Erholung kam. Die maximale Stromantwort ergab sich für Vorpulspotenziale von -55 bis -40 mV. Bei positiveren Potenzialen nahm die Stromantwort langsam ab, was auf C-Typ-Inaktivierung zurückzuführen sein dürfte, da es bei diesen Vorpulspotenzialen bereits zur Aktivierung des Kanals kommt (vgl. Abbildung 4.36 C). Hervorzuheben ist außerdem der sprunghafte Abfall der Stromantwort zwischen -120 mV und -115 mV. Aus diesem Sprung wird deutlich, dass die Inaktivierung des Kanals nicht bei negativen Potenzialen einsetzt, sondern erst durch die erste Depolarisation zu +100 mV ausgelöst wird. Der Datenpunkt bei -120 mV repräsentiert die Stromamplitude des ersten depolarisierenden Testpulses. Erst während dieses Pulses setzt die Inaktivierung ein, von der sich der Kanal während des folgenden Vorpulses zu -115 mV nicht erholt. Aufgrund dieser ungewöhnlichen Spannungsabhängigkeit der Erholung von der Inaktivierung wurde zur Generierung der Aktivierungskurve (Abbildung 4.36 C) vor jedem Testpuls ein 20 Sekunden langer Puls bei einem Potenzial von -55 mV durchgeführt, um die maximale Verfügbarkeit während des Testpulses zu gewährleisten.

Durch die Chimären-Experimente konnte gezeigt werden, dass die Kv4.2-Kopplungsstelle zwischen Spannungssensor und S6-Gate in einem nicht inaktivierenden *Shaker*-Kanal eine schnelle Inaktivierung vermittelt. Diese Inaktivierung tritt bei starker Depolarisation auf und zeigt eine ungewöhnliche Spannungsabhängigkeit der Erholung von der Inaktivierung. Übertragen auf eine mechanistisch strukturelle Ebene bedeutet dies, dass die Entkopplung zwischen Spannungssensor und Gate erst bei starker Depolarisation stattfindet, wenn der Spannungssensor also mit großer Kraft nach außen gezogen wird. Die Erholung, also die Wiederherstellung der Kopplung hat ein Maximum bei Potenzialen leicht negativ der Aktivierungsschwelle. Es ist vorstellbar, dass der Spannungssensor bei diesen Potenzialen eine Position einnimmt, die für die Wiederherstellung der Kopplung mit dem S6 günstiger ist als bei negativeren Potenzialen.

5 Diskussion

5.1 Kopplung von Deaktivierung und Inaktivierung

Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Deaktivierung und Inaktivierung in Kv4-Kanälen geben Modifikationen des Schaltverhaltens, die zu einer Verlangsamung der Deaktivierungskinetik führen, welche von einer Verlangsamung der makroskopischen Inaktivierung begleitet ist. Für zwei Kv4-Mutanten wurde eine Verlangsamung von Inaktivierung und Deaktivierung beschrieben (Jerng *et al.*, 1999; Gebauer *et al.*, 2004). Auch die Verwendung von Rb⁺ als Ladungsträger führt in Kv4-Kanälen, bedingt durch die längere Verweildauer in der Pore, zur Verlangsamung von sowohl Deaktivierung als auch Inaktivierung (Bähring et al., 2001a; Shahidullah und Covarrubias, 2003). In dieser Arbeit wurden zwei weitere Modifikationen des Kv4-Schaltverhaltens auf den Zusammenhang von Deaktivierung und Inaktivierung hin untersucht: N-terminale Deletion und Koexpression von β -Untereinheiten. Auch hier zeigte die Korrelation der Zeitkonstanten von Inaktivierung und Deaktivierung und Inaktivierung an. Zusammengenommen lassen es diese Befunde wahrscheinlich erscheinen, dass die Kopplung von Deaktivierung und Inaktivierung eine generelle Eigenschaft des Kv4-Schaltverhaltens darstellt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Erholung von der Inaktivierung der Kv4-Kanäle nach Depolarisation nicht über den Offen-Zustand erfolgt. Das bedeutet die Kanäle akkumulieren auch bei anhaltender Depolarisation in einem geschlossen-inaktivierten Zustand (I_C in Abbildung 4.9; Bähring *et al.*, 2001a). Für Korrelation von Deaktivierung und makroskopischer Inaktivierung sind zwei Erklärungen vorstellbar: Entweder die Kanäle durchlaufen nach dem Öffnen bei anhaltender Depolarisation die Zustände $O \rightarrow C \rightarrow I_C$ (vgl. Abbildung 4.9 und Abschnitt 1.4), wobei der Übergang $O \rightarrow C$ limitierend für Geschwindigkeit dieses Übergangs ist, oder die Kanäle gehen vom Offen-Zustand direkt in den geschlossen-inaktivierten Zustand über ($O \rightarrow I_C$; Abbildung 4.9). Bei der zweiten Möglichkeit wäre die Rückstellung des S6-Gates in die Geschlossen-Position limitierend sowohl für die Geschwindigkeit der Deaktivierungsreaktion ($O \rightarrow C$) als auch für die Inaktivierungsreaktion ($O \rightarrow I_C$). Durch die Ausbildung von Metallbrücken zwischen S6-Segmenten benachbarter Untereinheiten konnte die Deaktivierung in Shaker-Cystein-Mutanten extrem verlangsamt werden, da eine Rückstellung der S6-Segmente in die Geschlossen-Position durch die Metallbrücken erschwert wurde (Holmgren et al., 1998). In Kv4.2-Cystein-Mutanten war es nicht möglich, die Deaktivierung durch die Ausbildung von Metallbrücken zu verlangsamen (Abbildung 4.8). Es ist möglich, dass die Position der eingefügten Cysteine für die Ausbildung der Metallbrücken ungünstig ist. Die Tatsache, dass die Metallbrücken im Shaker-Kanal S6-Segmente zweier benachbarter a-Untereinheiten miteinander verbinden, lässt es wahrscheinlich erscheinen, dass schon geringe Sequenzunterschiede zwischen Shaker und Kv4.2 Auswirkungen auf die relative Lage der beiden eingeführten Cysteine zueinander haben. Einen anderen Erklärungsansatz für die Befunde aus Abschnitt 4.1.5 bildet die Favorisierung des Geschlossen-Zustands von Kv4-Kanälen. Da die Kv4-Kanäle bei auch Depolarisation im geschlossen-inaktivierten Zustand akkumulieren wurde angenommen, dass das Gleichgewicht zwischen Geschlossen-Zustand und Offen-Zustand (C↔O vgl. Abschnitt 1.4) bei Kv4-Kanälen stark auf der Seite des Geschlossen-Zustands liegt. Computersimulation des Schaltverhaltens von Kv4.2-Kanälen auf der Grundlage von Gating-Schemata unterstützen diese Theorie (Bähring et al., 2001a, Barghaan et al., 2008). Das heißt die Geschlossen-Position des S6-Segments ist energetisch sehr viel günstiger als die Offen-Position (vgl. Abbildung 4.9). Es ist daher vorstellbar, dass die Ausbildung einer Metallbrücke in den Kv4.2-Cystein-Mutanten zwar möglich ist, deren Bindungsenergie aber nicht ausreicht, um die Deaktivierung des Kanals zu verlangsamen bzw. zu verhindern.

5.2 Dynamische Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate

Bei dem in dieser Arbeit vorgeschlagenen Mechanismus (Abbildung 4.9) führt die Rückstellung des S6 in die Geschlossen-Position (Abbildung 4.9; I_C und C_R) sowohl bei der Inaktivierung ($O \rightarrow I_C$) als auch bei der Deaktivierung ($O \rightarrow C_R$) zum Verlust der Leitfähigkeit des Kv4.2-Kanals. Bei der Deaktivierung ist die Rückstellung des S6-Segments von einer Rückstellung des Spannungssensors begleitet. Der Kanal befindet sich in einem aktivierbaren Zustand. Bei der Inaktivierung bewegt sich das S6-Segment ohne den Spannungssensor in die Geschlossen-Position zurück. Die Verbindung zwischen Spannungssensor und Gate wird gelöst. Es kommt zur Entkopplung von Spannungssensor und Gate. Dieser Zustand ist refraktär, da die Rückstellung des Spannungssensors erst bei negativen Potenzialen erfolgt und der Kv4.2-Kanal erst nach der erneuten Etablierung der Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate wieder aktivierbar ist. Um die Relevanz dieser Kopplung für die Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung zu zeigen, wurde in der Region der putativen Kopplungsstelle ein Alanin-Mutagenese-Scan durchgeführt.

Der Bereich des Scans beinhaltete Regionen, die im *Shaker*-Kanal die Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate bei der Aktivierung vermitteln (Lu *et al.*, 2001, 2002; Yifrach und MacKinnon, 2002). Viele der in Kv4.2 in diesem Bereich eingeführten Alanin-Mutationen beeinflussten die Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung und verschoben die Steady-State-Inaktivierungskurve ohne deren Steigung wesentlich zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu führt die Neutralisierung von positiven Ladungen im S4 des Spannungssensors von Kv4.3 zu einer Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve, die von einer Änderung der Steigungsfaktoren begleitet ist (Skerritt *et al.*, 2007). Dies macht deutlich, dass sowohl Spannungssensor als auch Gate an dem Mechanismus der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung beteiligt sind. Die relativ gleich bleibende Steigung der Steady-State-Inaktivierungskurven bei den Kv4.2-S4-S5- und S6-Mutanten in der vorliegenden Arbeit (siehe Tabelle 4.3) zeigt, dass die Funktion des Spannungssensors erhalten geblieben ist und gibt Hinweise darauf, dass die Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurven tatsächlich durch eine Schwächung bzw. Stärkung der Kopplungsstelle von Spannungssensor und Gate hervorgerufen wird.

Die Effekte der Mutationen konnten durch die Berechnung der Affinitäten für den geschlossen-inaktivierten Zustand quantifiziert werden (Abschnitt 4.2.2.1). Diese Analyse zeigte, dass einige Kv4.2-Mutanten die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung fördern, während bei anderen Mutanten eine Hemmung der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung zu beobachten war. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Regionen des Alanin-Mutagenese-Scans eine wichtige Rolle bei der Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung spielen. Einen weiteren interessanten Aspekt des Mutagenese-Scans stellen die Kv4.2-Mutanten dar, die keine funktionelle Expression in *Xenopus*-Oozyten zeigten (vgl. Abbildung 4.11). Mutationen in den hoch konservierten Bereichen des S6-Segments könnten zu einer Veränderung der Sekundärstruktur und damit zum Funktionsverlust des Kanals führen. Andererseits könnte aber auch eine starke Verschiebung der Steady-State-Inaktivierungskurve und der Aktivierungskurve einen scheinbaren Funktionsverlust der Kv4.2-Mutanten bewirken. Wird die Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate durch die Mutation derart geschwächt, dass eine Entkopplung und damit die Inaktivierung schon bei sehr negativen Potenzialen einsetzt, ist der Kanal durch Depolarisation nicht mehr aktivierbar. Durch ihr extremes

Schaltverhalten entzögen sich solche Mutanten der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse. Es ist aber denkbar, dass die Aminosäurepositionen, an denen eine Mutation zu einem derartigen Funktionsverlust des Kanals führt, ebenfalls wichtige Strukturdeterminanten der Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung darstellen.

Die kinetische Analyse der Einzelmutanten des Alanin-Mutagenese-Scans verdeutlichte die Relevanz der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region für die Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung. Durch die Double-Mutant-Cycle-Analyse war es möglich die Rolle dieser Regionen bei der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung weiter zu spezifizieren. Es konnte eine Aminosäureinteraktion zwischen S4-S5-Linker-Region und S6-Region nachgewiesen werden (Abschnitt 4.2.2.2.4). Dieser Nachweis erfolgte auf der Grundlage einer kinetischen Analyse der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung. Dies zeigt, dass die Kopplung zwischen Spannungssensor und dem S6-Gate eine wichtige Rolle bei der Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung spielt. Die Kopplungsstelle zwischen S4-S5-Linker und S6 wurde bereits im Shaker-Kanal durch eine Double-Mutant-Cycle-Analyse auf der Grundlage von Aktivierungsparametern untersucht. Interessanterweise wurde in Shaker der höchste Grad an Interaktion zwischen den Aminosäuren E395 und V476 mit einer Kopplungsenergie ΔΔzFV_{1/2act} von 3,32 kcal/mol (Yifrach und MacKinnon, 2002) gefunden. Für die homologen Aminosäuren in Kv4.2 E323 und V404 wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein hoher Kopplungskoeffizient ermittelt ($\ln\Omega = 2,86$). Die Kopplungsenergie ($\Delta\Delta G = RT \ln\Omega$) dieser Interaktion ist mit 1,27 kcal/mol in Kv4.2 allerdings geringer. Die Verbindung zwischen S4-S5-Linker und S6 scheint in Kv4.2 also schwächer ausgeprägt zu sein als im Shaker-Kanal.

Die in dieser Arbeit ermittelten Werte der Kopplungskoeffizienten ($\ln\Omega$ zwischen 0,02 und 2,86) sind vergleichbar mit denen einer *Double-Mutant-Cycle*-Analyse zur Bestimmung der Interaktionsstelle zwischen N-terminaler Inaktivierungsdomäne und dem S6 in dem *Shaker* verwandten A-Typ Kaliumkanal Kv1.4 (Zhou *et al.*, 2001). Eine ähnliche Analyse der N-Typ-Inaktivierung in Kv4.2 dagegen ergab mit einem maximalen $\ln\Omega$ -Wert von 0,85 geringere Kopplungskoeffizienten zwischen einzelnen Aminosäuren des N-Terminus und des S6-Segment (Gebauer *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse zeigen, dass die N-Typ-Inaktivierung in Kv4.2 eine eher untergeordnete Rolle spielt und die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung den wesentlichen Inaktivierungsmechansimus darstellt.

Die räumliche Lage der homologen Aminosäuren in der Kv1.2-Kristallstruktur (vgl. Abbildung 4.27) unterstützt die Ergebnisse der *Double-Mutant-Cycle*-Analyse. Die homologen Positionen der Aminosäurepaare mit den höchsten Kopplungskoeffizienten (E323/V404 und S322/V404; vgl. Abbildung 4.27 und 4.28) sind in der Kv1.2-

Kristallstruktur einander zugewandt. Die Double-Mutant-Cycle-Analyse ergab niedrige Kopplungskoeffizienten für das Serin an Position 407 mit beiden der getesteten Aminosäuren im S4-S5-Linker (S322 und E323). Die homologe Position von S407 in der Kv1.2-Kristallstruktur liegt auf der dem S4-S5-Linker abgewandten Seite der α -Helix. Für die Aminosäuren I412 der S6-Region ergab die Double-Mutant-Cycle-Analyse ebenfalls relativ hohe Kopplungskoeffizienten in Kombination mit S322 und E323, obwohl die homologen Positionen in der Kristallstruktur räumlich relativ weit auseinander liegen. Auf der einer Seite ist die Kv1.2-Struktur nur ein Modell für strukturelle Situation des Kv4.2-Kanals. So ist es vorstellbar, dass die tatsächliche relative Lage von S6-Region und S4-S5-Linker-Region zueinander im Kv4.2-Kanal etwas von der in Kv1.2 abweicht. Auf der anderen Seite macht es die starke Sequenzhomologie zwischen Kv1.2 und Kv4.2, gerade in den hochkonservierten Sequenzen der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region, sehr wahrscheinlich, dass die räumliche Anordnung der homologen Aminosäuren in Kv1.2 und Kv4.2 identisch ist. Der scheinbare Widerspruch zwischen der räumlichen Entfernung von I412 und den Interaktionspartnern (S322 und E323) und den relativ hohen Kopplungskoeffizienten lässt vielmehr interessante Schlussfolgerungen über die Dynamik der Kopplungsstelle zwischen Spannungssensor und Gate zu. Denn die Kv1.2-Struktur zeigt nur eine Momentaufnahme des Kanals im offenen Zustand. Es ist daher denkbar, dass die Position I412 bei Änderung der relativen Lage von S4-S5-Linker-Region und S6-Region im geschlossenen Zustand in engere räumliche Nähe zu den Positionen S322 bzw. E323 rückt. Das würde bedeuten, dass die Kopplungsstellen zwischen Spannungssensor und Gate keine starre Verbindung ist, sondern, dass sich S4-S5-Linker-Region und S6-Region bei den Konformationsänderungen, als Folge von Aktivierung, Inaktivierung und Deaktivierung, gegeneinander verschieben. Für eine solche Dynamik der Kopplungsstelle spricht auch die Beeinflussung der Aktivierung durch die spezifische Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen S4-S5-Linker und S6 in den Kv4.2-Cystein-Doppelmutanten (Abschnitt 4.2.3). Die sehr kleinen Amplituden der Auswärtsströme unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von tBHO₂ zeigten, dass die Aktivierung des Kanals offensichtlich durch eine zu starre Verbindung zwischen Spannungssensor und Gate erschwert wird.

Durch die spezifische Redox-Modulation der Kanaleigenschaften der Kv4.2-Cystein-Doppelmutanten konnten die Ergebnisse der *Double-Mutant-Cycle*-Analyse durch einen unabhängigen experimentellen Ansatz untermauert werden. Die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den eingeführten Cysteinen an den Positionen 323 und 404 setzt eine enge räumliche Nähe der beiden Positionen voraus und ist damit konsistent mit dem hohen Kopplungskoeffizienten für E323 und V404 der *Double-Mutant-Cycle*-Analyse. Die Qualität der Auswirkung von Reduktion und Oxidation läßt sich durch den in Abschnitt 4.2 vorgestellten Mechanismus der Entkopplung erklären (Abbildung 4.9). Bei Bildung einer kovalenten Bindung zwischen S4-S5-Linker und S6 wurde die Entkopplung erschwert, was zu einer langsamen makroskopischen Inaktivierung führte. Eine Reduktion der kovalenten Bindung beschleunigte die Inaktivierung, da die Entkopplung von S4-S5-Linker und S6 erleichtert wurde (vgl. Abbildung 4.30 und 4.32).

Auch die Kanalchimären zeigen die Relevanz der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region für die Kv4.2-Inaktivierung. Das Einfügen von Shaker-Sequenzen in den Kv4.2-Kanal verlangsamte die makroskopische Inaktivierung und das Einsetzen der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung stark. Gleichzeitig kam es zu einer Beschleunigung der Erholung von der Inaktivierung (Abbildung 4.35). Diese Befunde lassen sich durch eine Verstärkung der Kopplung zwischen Spannungssensor und Gate erklären. Die Daten zeigen eine tendenzielle Hemmung des geschlossen-inaktivierten Zustandes, auch wenn die Inaktivierung des Kv4.2-Kanals durch das Einführen der Shaker-Sequenzen nicht gänzlich aufgehoben wurde. Hierfür sind mehrere Ursachen vorstellbar. Zum einen ist es denkbar, dass an der Verbindung zwischen Spannungssensor und S6-Gate noch andere, nicht ausgetauschte Aminosäuren beteiligt sind. Zum anderen ist es möglich, dass zwar die vollständige Shaker-Kopplungsstelle in den Kv4.2-Kanal eingeführt wurde, die Energie der Shaker-Kopplungsstelle aber nicht ausreicht, um das S6-Gate des Kv4.2-Kanals bei anhaltender Depolarisation in der Offen-Position zu halten, da die Geschlossen-Position des Kv4.2-S6 energetisch deutlich günstiger ist als die Alfen-Position. Interessanterweise zeigten weder die Kv4.2/Shaker-Chimäre noch die Kv4.2-Mutanten des Mutagenese-Scans eine Spannungsunabhängige Leckstrom-Komponente, wie sie für Shaker/KcsA-Chimären beschrieben wurde (Lu et al., 2002). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Geschlossen-Zustand von Kv4-Kanälen favorisiert wird.

Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass die Kv4.2-Sequenzen der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region eine schnelle Inaktivierung in einem nicht inaktivierenden *Shaker*-Kanal vermitteln (Abbildung 4.36). Die inaktivierende Komponente des makroskopischen Auswärtsstroms trat bei starker Depolarisation auf und nahm mit steigender Depolarisation einen immer größeren Anteil an der Gesamtstromamplitude ein (Abbildung 4.36 B und D). Die Erholung von der Inaktivierung wies eine ungewöhnliche Spannungsabhängigkeit auf. Am schnellsten war die Erholungsreaktion bei mittleren Potenzialen (-55 mV). Bei Hyperpolarisation (-100 mV) erholte sich die Kanalchimäre dagegen nur sehr langsam von

Inaktivierung (Abbildung 4.37 A). Normalweise zeigen spannungsgesteuerte der Kaliumkanäle die schnellste Erholung von der Inaktivierung bei negativen Potenzialen. Die Ursache für dieses untypische Inaktivierungsverhalten der Kanalchimäre könnte in der Entkopplung von Spannungssensor und Gate liegen. Es ist vorstellbar, dass die Sequenzen der S4-S5-Linker-Region und der S6-Region des Kv4.2-Kanals im Shaker-Kanal eine Entkopplung von Spannungssensor und Gate verursachen. Allerdings setzt die Entkopplung bei der Kanalchimäre erst bei Depolarisation ein und nicht wie beim Kv4.2-Kanal schon bei Potenzialen negativ der Aktivierungsschwelle. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass neben den ausgetauschten Sequenzen noch weitere Aminosäuren an der Kopplung von Spannungssensor und Gate beteiligt sind. Die Entkopplung erfolgt bei der Kanalchimäre erst, wenn durch Depolarisation der Membran eine starke Kraft auf den Spannungssensor ausgeübt wird. Damit der Kanal wieder aktivierbar wird, muss die Kopplung von Spannungssensor und Gate während der Erholung von der Inaktivierung wiederhergestellt werden. Hierfür müssen S4-S5-Linker-Region und S6-Region in eine für die Etablierung der Kopplung günstige Position zueinander gebracht werden. Die optimale Position dafür scheint bei der Kanalchimäre bei mittleren Potenzialen erreicht zu werden. Bei negativeren Potenzialen hingegen könnte der Spannungssensor zu weit in Richtung der Membraninnenseite verschoben sein, so dass eine Wiederherstellung der Verbindung mit dem Gate erschwert wird. Gegenüber dem Kv4.2-Wildtyp-Kanal ist die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung und die Spannungsabhängigkeit der Erholung von der Inaktivierung bei der Kanalchimäre zu positiveren Potenzialen verschoben. Es ist vorstellbar, dass auch beim Kv4.2-Kanal die Erholung von der Inaktivierung bei sehr negativen Potenzialen wieder langsamer wird, diese Potenziale aber negativ von den getesteten Erholungspotenzialen liegen (vgl. Abbildung 4.6 C). Eine Untersuchung negativerer Erholungspotenziale war jedoch aufgrund schnell einsetzender Zelldegeneration bei stark hyperpolarisierenden Potenzialen weder in Oozyten noch in HEK293 Zellen möglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung mechanistisch auf einem Entkoppeln der Verbindung zwischen Spannungssensor und Gate beruht. Ein solcher Mechanismus wurde für den spHCN-Kanal aus einem Seeigel beschrieben (Shin *et al.*, 2004). Da der Kanal nach Entkopplung von Spannungssensor und Gate nicht mehr durch Änderung des Membranpotenzials geöffnet werden kann, wurde dieser Mechanismus als Desensitisierung gegenüber der Spannung (*Desensitization to voltage*) bezeichnet.

Eine aktuelle Studie unterstützt den in dieser Arbeit vorgestellten Mechanismus der Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung (Dougherty et al., 2008). In der Studie wurde die Rolle der Spannungssensorbewegung bei der Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung untersucht. Bei der Bewegung des Spannungssensors kommt es zu einer Verschiebung der positiven Ladungen des S4-Segments über die Membran (Gating-Charge). Diese Ladungsverschiebung kann elektrophysiologisch abgeleitet werden und wird als Gating-Strom bezeichnet. Dougherty et al. konnten zeigen, dass es die Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung mit einer Inaktivierung des Spannungssensors einhergeht. Nach unterschwelligen Vorpulsen sind bei Depolarisation die Amplituden der Gating-Ströme wesentlich kleiner als nach negativen Vorpulsen. Erst bei sehr negativen Potenzialen kommt es zu einer Erholung von dieser Spannungssensor-Inaktivierung. Offensichtlich nimmt der Spannungssensor in dem inaktivierten Zustand eine stabile Konformation ein. Interessanterweise folgt die Inaktivierung des Spannungssensors dem Zeitverlauf des Einsetzens der Geschlossen-Kanal-Inaktivierung und ist unabhängig vom N-Terminus des Kanals. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass Spannungssensor-Inaktivierung und Geschlossen-Kanal-Inaktivierung im Kv4.2-Kanal äquivalent sind. Mechanistisch könnte die Spannungssensorinaktivierung auf einer Konformationsänderung des Spannungssensors bei Depolarisation beruhen, die ein Öffnen des Gates verhindert. In Verbindung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist es sehr wahrscheinlich. Konformationsänderung dass diese von der Entkopplung von Spannungssensor und Gate begleitet ist.

5.3 Physiologische Relevanz

Der im Soma und im Dendriten von Neuronen auftretende unterschwellig aktivierte A-Typ Strom I_{SA} ist Kv4.2 vermittelt. Die neuronalen I_{SA} -Kanäle sind jedoch nicht allein aus Kv4.2 α -Untereinheiten aufgebaut; vielmehr wird dieser Strom von ternären Kanalkomplexen aus Kv4.2 α - und β -Untereinheiten vermittelt. Die Kv-Kanal interagierenden Proteine (KChIPs; An *et al.*,2000) und die Dipeptidyl-Aminopeptidase-ähnlichen Proteine (DPPs; Nadal *et al.*, 2003) bilden zusammen mit Kv4.2 α -Untereinheiten den funktionellen I_{SA} -Kanalkomplex. Die Anlagerung dieser β -Untereinheiten verleiht dem Kanalkomplex die charakteristischen I_{SA} -Eigenschaften, wie beispielsweise eine sehr schnelle Erholung von der Inaktivierung und eine Aktivierung negativ der Aktivierungsschwelle von Natriumkanälen (Jerng *et al.*, 2005; Amarillo, *et al.*, 2008). Obwohl beide β -Untereinheiten (KChIPs und DPPs) das Kv4.2Schaltverhalten in mehr oder weniger additiver Weise modulieren (Barghaan *et al.*, 2008), sind es hauptsächlich die DPPs, die dem Kanalkomplex die typischen Eigenschaften des I_{SA} verleihen, indem sie sowohl die Aktivierung als auch die Steady-State-Inaktivierung zu negativeren Potenzialen hin verschieben (Nadal *et al.*, 2003). Dies geschieht offensichtlich durch eine direkte Interaktion von DPP mit dem Spannungssensor der Kv4.2 α -Untereinheit (Dougherty *et al.*, 2006) und ermöglicht die unterschwellige Aktivierung der I_{SA} -Kanalkomplexe.

Die unterschwellige Aktivierung und die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung der I_{SA}-Kanalkomplexe spielen eine wichtige physiologische Rolle in Nervenzellen. So wirkt der ISA der retrograden Ausbreitung von Aktionspotenzialen entlang des Dendriten (backpropagation) entgegen (Hoffman et al., 1997). Die unterschwellige Aktivierung des I_{SA} vermindert dabei die Aktivierung von Natriumkanälen, so dass die rückläufigen Aktionspotenziale entlang des Dendriten immer weiter abgeschwächt werden. Auf diese Weise nehmen I_{SA}-Kanalkomplexe eine Funktion als neuronaler "Stoßdämpfer" wahr, die eine unkontrollierte Erregungsausbreitung verhindert. Eine Verminderung der ISA-Stromdichte konnte mit Epilepsie in Zusammenhang gebracht werden. So wurde in Patienten mit Temporallappen-Epilepsie eine Mutation im Kv4.2-Gen (KCND2) gefunden, die in einer Deletion 44 C-terminaler Aminosäuren resultiert. Diese Deletion führt zu einer Abnahme der Stromdichte im heterologen Expressionssystem (Singh et al., 2006). Die Auswirkung dieser Deletion auf das Schaltverhalten des Kanals ist bisher allerdings nicht beschrieben und bietet einen interessanten Ansatz für zukünftige Untersuchungen. Dabei wäre insbesondere zu klären, ob die Erniedrigung der Stromdichte allein für das Krankheitsbild verantwortlich ist, oder ob zusätzlich eine Modulation des Inaktivierungsverhaltens, wie zum Beispiel die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung ebenfalls dazu beitragen.

Neben der unterschwelligen Aktivierung spielt auch die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung der I_{SA} -Kanalkomplexe eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle dendritischer Erregbarkeit. Die unterschwellige Geschlossen-Kanal-Inaktivierung der I_{SA} -Kanalkomplexe gepaart mit der schnellen Erholung von dem geschlossen-inaktivierten Zustand erlauben eine sehr präzise Detektion gleichzeitiger prä- und postsynaptischer Aktivität (Koinzidenzdetektion), die zum Einsetzen von Langzeit-Potenzierung (LTP) führen kann (Ramakers *et al.*, 2002). Schon durch exzitatorische postsynaptische Potenziale (EPSPs) geringer Amplitude können die I_{SA} -Kanalkomplexe in den geschlossen-inaktivierten Zustand übergehen. Bedingt durch die

schnelle Erholung von der Inaktivierung bei negativen Potenzialen ist die Refraktärzeit dieses Zustandes sehr kurz. Tritt in dieser Zeit ein rückläufiges Aktionspotenzial auf kommt es lokal zu einer verstärkten Depolarisation im Dendriten, die eine Langzeit-Potenzierung zur Folge haben kann. Die hohe Sensitivität dieser Koinzidenzdetektion wird erst durch die Geschlossen-Kanal-Inaktivierung ermöglicht, da durch die unterschwellige Inaktivierung der I_{SA} -Kanalkomplexe bereits schwache präsynaptische Aktivität im postsynaptischen Neuron registriert werden kann. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass das Fehlen des I_{SA} in hippocampalen CA1 Neuronen die Induktion von Langzeit-Potenzierung erleichtert (Chen *et al.*, 2006). Unklar hingegen ist, inwieweit die Feinabstimmung der dendritischen Erregungskontrolle, bedingt durch Kv4.2-Geschlossen-Kanal-Inaktivierung, die synaptische Plastizität beeinflusst. Weitere Mausmodelle auf Grundlage der in dieser Arbeit beschriebenen Kv4.2-Mutanten könnten in Zukunft hierüber Aufschluss geben.

6 Literaturverzeichnis

- Aguilar-Bryan, L und Bryan, J. (1999): Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr. Rev.* **20** (2), S.101-35.
- Amarillo, Y., De Santiago-Castillo, J.A., Dougherty, K., Maffie, J., Kwon, E., Covarrubias, M. und Rudy, B. (2008): Ternary Kv4.2 channels recapitulate voltage dependent inactivation kinetics of A-type K⁺ channels in cerebellar granule neurons. *J.Physiol.* [Epub ahead of print].
- An, W.F., Bowlby, M.R. Betty, M., Cao, J., Ling, H.P. Mendoza, G., Hinson, J.W., Mattsson, K.I., Strassle, B.W., Trimmer, J.S. und Rhodes, K.J. (2000): Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* **403** (6769), S.553-6.
- Bähring, R., Boland, L.M., Varghese, A., Gebauer, M. und Pongs, O. (2001a): Kinetik analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A.type potassium channels. *J.Physiol.* 535 (Pt1), S.65-81.
- Bähring, R., Dannenberg, J., Peters, H.C., Leicher, T., Pongs, O. und Isbrandt, D. (2001b): Conserved N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. J. Biol. Chem. 276 (26), S.23888-94.
- Baldwin, T.J., Tsaur, M.L., Lopez, G.A., Jan, Y.N. und Jan, L.Y. (1991): Characterization of a mammalian cDNA for an inactivating voltage-sensitive K⁺ channel. *Neuron* **7** (3) S.471-83.
- Barghaan, J., Tozakidou, M., Ehmke, H. und Bähring, R. (2008): Role of N-terminal domain and accessory subunits in controlling deactivation-inactivation coupling of Kv4.2 channels. *Biophys. J.* 94 (4), S.1276-94.
- Barry, D.M., Xu, H., Schuessler, R.B. und Nerbonne, J.M. (1998): Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4 α-subunit. *Circ Res.* **83** (5), S.560-7.
- Baukrowitz, T. und Yellen, G. (1995): Modulation of K⁺ current and external [K⁺]: at tale of two inactivation mechansims. *Neuron* **15** (4), S.951-60.
- Beck, E.J., Bowlby, M., An, W.F., Rhodes, K.J. und Covarrubias, M. (2002): Remodeling inactivation gating of Kv4 channels by KChIP1, a small-molecular-weight calcium-binding protein. J. Physiol. 538 (Pt 3), S.691-706.
- Bezanilla, F. (2002): Voltage sensor movements, J. Gen. Physiol. 120 (4), S.465-73.
- Blaustein, R.O. und Miller, C. (2004): Ion channels: shake, rattle or roll? *Nature* **427** (6974), S.499-500.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. (1987): XL1-blue a high efficiency plasmid transforming Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, S.376-8.

- Burgoyne, R.D. und Weiss, J.L. (2001): The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-bindung proteins. *Biochem. J.* **353** (Pt 1), S.1-12.
- Buxbaum, J.D., Choi, E.K., Luo, Y., Lilliehook, C., Crowley, A.C., Merriam, D.E. und Wasco,W. (1998): Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the pesenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat. Med.* 4 (10), S.1177-81.
- Carrión, A.M., Link, W.A., Ledo, F., Mellström; B. und Naranjo, J.R. (1999): DREAM is a Ca²⁺ regulated transcriptional repressor. *Nature* **398** (6722), S.80-4.
- Carter, P.J., Winter, G., Wilkinson, A.J. und Fersht, A.R. (1984): The use of double mutants to detect structural changes in the active site of the tyrosyl tRNA synthetase (*Bacillus stearothermophilus*). *Cell* **38** (3), S.835-40.
- Chabala, L.D., Bakry, N. und Covarrubias, M. (1993): Low molecular weight poly(A)⁺ mRNA species encode factors that modulate gating of a non-*Shaker* A-type K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* **102** (4), S.713-28.
- Chen, X., Yuan, L.L., Zhao, C., Birnbaum, S.G., Frick, A., Jung, W.E., Schwarz, T.L., Sweatt, J.D. und Johnston, D. (2006): Deletion of Kv4.2 gene eliminates dendritic A-type K⁺ current and enhances induction of long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. J. *Neurosci.* 26 (47), S.12143-51.
- Choi, K.L., Adrich, R.W. und Yellen, G. (1991): Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (12), S.5092-5.
- Coetzee, W.A., Amarillo, Y., Chui, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M.S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz de Miera, E. und Rudi, B. (1999): Molecular Diversity of K⁺ channels. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 868, S.233-285.
- Cole, K.S. (1979): Mostly membranes (Kenneth S. Cole). Annu. Rev. Physiol.41, S.1-24.
- Connor, J.A. und Stevens, C.F. (1971a): Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under voltage clamp. *J. Physiol.* **213** (1), S.1-19.
- Connor, J.A. und Stevens, C.F. (1971b): Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J. Physiol.* **213** (1), S.21-30.
- del Camino, D., und Yellen, G. (2001): Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K⁺ channel. *Neuron* **32** (4), S.649-56.
- Demo, S.D. und Yellen, G. (1991): The inactivation gate of the *Shaker* K⁺ channel behaves like an open-channel blocker. *Neuron* **7** (5), S. 743-53.
- Derst, C. und Karschin, A. (1998): Evolutionary link between prokaryotic and eukaryotic K⁺ channels. *J. Exp. Biol.* **201** (Pt 20), S.2791-9.
- Dixon, J.E., und McKinnon, D., (1994): Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circ. Res.* **75** (2), S.252-60.

- Dougherty, K., und Covarrubias, M. (2006): A dipeptidyl aminopeptidase-like protein remodels gating charge dynamics in Kv4.2 channels. *J. Gen. Physiol.* **128** (6), S.745-53.
- Dougherty, K., De Santiago-Castillo, J.A. und Covarrubias, M. (2008): Gating charge immobilization in Kv4.2 channels: the basis of closed-state inactivation. J. Gen. Physiol. 131 (3), S.257-73.
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. und MacKinnon, R. (1998): The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280** (5360), S.69-77.
- Durell, S.R., Hao, Y. und Guy, H.R. (1998): Structural models of the transmembrane region of voltage.gated and other K⁺ channels in open, closed and inactivated conformations. *J. Struct. Biol.* 121 (2), S.263-84.
- Faivre, J.F., Calmels, T.P., Rouanet, S., Javré, J.L., Cheval, B. und Bril, A. (1999): Characterisation of Kv4.3 in HEK293 cells: comparison with the rat ventricular transient outward potassium current. *Cardiovasc. Res.* **41** (1), S.16-8.
- Fenner, G. (1931): Das Genauigkeitsmaß von Summen, Produkten und Quotienten der Beobachtungsreihen. Die Naturwissenschaften 19, S.310.
- Frick, A., Magee, J. and Johnston, D. (2004): LTP is accompanied by an enhanced local exitability of pyramidal dendrites. *Nat. Neurosci.* **7** (2), S.126-35.
- Gebauer, M., Isbrandt, D., Sauter, K., Callsen, B., Nolting, A., Pongs, O. und Bähring, R. (2004): N-type inactivation features of Kv4.2 channel gating. *Biophys J.* **86** (1 Pt 1), S.210-23.
- Goldstein, S.A., Wang, K.W., Ilan, N. und Pausch, M:H: (1998): Sequence and function of the two P domain potassium channels: implication of an emerging superfamily. *J. Mol. Med.* 76 (1), S.13-20.
- Guo, W., Li, H., Aimond, F., Johns, J.D., Rhodes, K.J., Trimmer, J.S. und Nerbonne, J.M. (2002a):Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K⁺ currents. *Circ. Res.* **90** (5), S.586-93.
- Guo, W., Malin, S.A., Johns, D.C., Jeromin, A. und Nerbonne, J.M. (2002b): Modulation of Kv4encoded K⁺-currents in the mammalian myocardium by neuronal calcium sensor-1. *J. Biol. Chem.* **277** (29), S.26436-43.
- Guo, W., Jung, W.E., Marionneau, C., Aimond, F., Xu, H., Yamada, K.A., Schwarz, T.L., Demolombe, S. und Nerbonne, J.M. (2005): Targeted Deletion of kv4.2 eliminates *I_{TO,f}* and results in electrical and molecular remoldeling, with no evidence of ventricular hypertrophy or myocardial dysfunction. *Circ. Res.* **97** (12), S.1342-50.
- Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., MacKinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stühmer, W. and Wang, X. (2005):

International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationship of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **57** (4), S.473-508.

- Hall, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acid Symp. Ser.* **41**, S. 95-8.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., und Sigworth, F.J. (1981): Improved patchclamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391** (2), S.85-100.
- Heinemann, S.H., Rettig, J., Graack, H.R. und Pongs, O. (1996): functional charaterization of Kv channel β-subunits from rat brain. *J. Physiol.* **493** (625-33).
- Hidalgo, P. und MacKinnon, R. (1995): Revealing the architecture of a K⁺ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science* **268** (5208), S.307-10.
- Higuchi, R., Krummel, B. und Saiki, R. (1988): A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16** (15), S.51-67.
- Hille, B. (2001): Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Hodgkin, A.L. und Huxley, A.F. (1952): A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117** (4), S.500-44.
- Hoffman, D.A., Magee, J.C., Colbert, C.M. und Johnston, D. (1997): K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippcampal pyramidal neurons. *Nature* 387 (6636), S.869-75.
- Holmqvist, M.H., Cao, J., Hernandez-Pineda, R., Jacobson, M.D., Carroll, K.I., Sung, M.A., Betty, M., Ge, P. Gilbride, K.J., Brown, M.E., Jurman, M.E., Lawson, D., Silos-Santiago, I., Xie, Y., Covarrubias, M., Rhodes, K.J., Distefano, P.S. und An, W.F. (2002): Elimination of fast inactivation in Kv4 A-type potassium channels by an auxiliary subunit domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2), S.1035-40.
- Holmgren, M., Shin, K.S. und Yellen, G. (1998): The activation gate of a voltage gated K+channel can be trapped in the open state by an intersubunit metal bridge. *Neuron* **21** (3), S.617-21.
- Honoré, E. (2007): The neuronal background K_{2P} channels: focus on TREK1. *Nat. Rev. Neurosci.*6 (4), S.251-61.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N. und Aldrich, R.W. (1990): Biophysical and molecular mechanisms of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science* **250** (4980), S.533-8.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N. und Aldrich, R.W. (1991): Two types of inaction in *Shaker* K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* **7** (4), S.547-56.
- Imredy, J.P. und MacKinnon, R. (2000): Energetic and structural interactions between δ -dendrotoxin and a voltage-gated potassium channel. *J. Mol. Biol.* **296** (5), S.1283-94.

- Isbrandt, D., Leicher, T., Waldschütz, R., Zhu, X., Luhmann, U., Michel, U., Sauter, K. und Pongs, O. (2000): Gene structures and expression profiles of three human KCND (Kv4) potassium channels mediating A-type currents I_{TO} and I_{SA} . Genomics **64** (2), S.144-54.
- Jerng, H.H. und Covarrubias, M. (1997): K⁺ channel inactivation mediated by the concerted action of the cytoplasmic N- and C-terminal domains. *Biophys. J.* **77** (1), S.163-74.
- Jerng, H.H., Shahidullah, M. und Covarrubias, M. (1999): Inactivation gating of Kv4 potassium channels: molecular interactions involving the inner vestibule of the pore. J. Gen. Physiol. 113 (5), S.641-60.
- Jerng, H.H., Pfaffinger, P.J. und Covarrubias, M. (2004a): Molecular physiology and modulation of somatadendritic A-type potassium channels. *Mol. Cel. Neurosci.* **27** (4), S.343-369.
- Jerng, H.H., Qian, Y. und Pfaffinger, P.J. (2004b): Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys. J.* **87** (4), S.2380-96.
- Jerng, H.H., Kunjilwar, K. und Pfaffinger, P.J. (2005): Multiprotein assembly of KChIP3 and DPP10 produces ternary channel complexes with *I*_{SA}-like properties. *J. Physiol.* **568** (Pt 3), S.767-88.
- Jerng, H.H., Lauver, A.D. und Pfaffinger, P.J. (2007): DPP10 splice variants are localized in distinct neuronal populations and act to differentially regulate the inactivation properties of Kv4-based ion channels. *Mol. Cell Neurosci.* **35** (4), S.604-24.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T. and MacKinnon, R. (2002): Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* **417** (6888), S.515-22.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T. und MacKinnon, R. (2003a): X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423** (6935), S.33-41.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A. und MacKinnon, R. (2003b): The Principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423** (6935), S.42-8
- Kamb, A., Tseng-Crank, J. und Tanouye, M.A. (1988): Multiple products of the Drosophila *Shaker* gene may contribute to potassium channel diversity. *Neuron* **1** (5), S.421-430.
- Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K. und Goldstein, S.A. (1995): A new family of outwadrly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376** (6542), S.690-5.
- Kim, L.A., Furst, J., Butler, M.H., Xu, S., Grigorieff, N. und Goldstein, S.A. (2004a): *I*_{TO} channels are octameric complexes with four subunits of each Kv4.2 and K⁺ channel-interacting protein 2. *J. Biol. Chem.* **279** (7), S.5549-54.
- Kim, L.A., Furst, J., Gutierrez, D., Butler, M.H., Xu, S., Goldstein, S.A., und Grigorieff, N. (2004b): Three-dimensional structure of *I_{TO}*; Kv4.2-KChIp2 ion channels by electron microscopy at 21 Å resolution. *Neuron* **41** (4), S.513-9.

- Kobertz, W.R., Williams, C. und Miller, C. (2000): Hanging gondola structure of the T1 domain in a voltage-gated K⁺ channel. *Biochemistry* **39** (34), S.10347-52.
- Kreusch, A., Pfaffinger, P.J., Stevens, C.F. und Choe, S. (1998): Crystal structure of the tetramerization domain of the *Shaker* potassium channel. *Nature* **392** (6679), S.945-8.
- Kunjilwar, K., Strang, C. DeRubeis, D. und Pfaffinger P.J. (2004): KChIP3 rescues the functional expression of Shal channel tetramerization mutants. *J. Biol. Chem.* **279** (52), S.54542-51.
- Kuo H.C., Cheng, C.F., Clak, R.B., Lin, J.J., Lin, J.L., Hoshijima, M., Nguyêñ-Trân, V.T., Gu, Y., Ikeda, Y., Chu. P.H., Ross, J., Giles, W.R. und Chien, K.R. (2001): A defect in Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of *I_{TO}* and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* **107** (6), S.801-13.
- Lebaudy, A., Véry, A.A. and Sentenac, H. (2007): K⁺ channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS Lett.* **581** (12), S.2357-66.
- Ledwell, J.L. und Aldrich, R.W. (1999): Mutations in the S4 region isolate the final voltage.dependent cooperative step in potassium channel activation. *J. Gen. Physiol.***113** (3), S.389-414.
- Li, M., Jan, Y.N. und Jan, L.Y. (1992): Specification of subunit assembley by the hydrophilic amino-terminal domain of the *Shaker* potassium channel. *Science* **257** (5974), S.1225-30.
- Li-Smerin, Y., Hackos, D.H. and Swartz, K. (2000): A localized interaction surface for voltagesensing domais on the pore domain of a K⁺ channel. *Neuron* **25** (2), S.411-23.
- Long, S.B., Campbell, E.B. und MacKinnon, R. (2005a): Crystal structure of a mammalian voltage dependent *Shaker* family K⁺ channel. *Science* **309** (5736), S.897-903.
- Long, S.B., Campbell, E.B. und MacKinnon, R. (2005b): Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* **309** (5736), S.903-8.
- López-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S.H. und Aldrich, R.W. (1993): Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of *Shaker* potassium channels. *Receptors Channels* 1 (1), S.61.71.
- Lu, Z., Klem, A.M. und Ramu, Y. (2001): Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* **413** (6858), S.809-13.
- Lu, Z., Klem, A.M. und Ramu, Y. (2002): Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J Gen Physiol* **120** (5), S.663-76.
- Magee, J.C. and Johnston, D. (1997): A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* **275** (5297): S.209-13.
- Maljevic, S., Lerche, C., Seebohm, G., Alekov, A.K., Busch, A.E. und Lerche, H. (2003): C-terminal interaction of KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels. *J. Physiol.* **548** (Pt 2), S.353-60.
- Nadal. M.S., Ozaita, A., Amarillo, Y., Vega-Saenz de Miera, E., Ma, Y., Mo, W., Goldberg, E.M., Misumi, Y., Ikehara, Y., Neubert, T.A. und Rudy, B. (2003): The CD26-related

dipeptidyl aminopeptidas-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-Typ K⁺ channels. *Neuron* **37** (3), S.449-61.

- Nadal, M.S., Amarillo, Y., Vega-Saenz de Miera, E. und Rudi, B. (2006): Differential characterization of three alternative spliced isoforms of DPPX. *Brain Res.* **1094** (1), S. 1-12.
- Nakamura, T.Y., Coetzee, W.A., Vega-Saenz de Miera, E., Artman, M. und Rudy, B. (1997): Modulation of Kv4 channels, key components of rat ventricular transient outward K⁺ current, by PKC. *Am. J. Physiol.* **273** (4 Pt 2) S.H1775-86.
- Nakamura, T.Y., Pountey, D.J., Oziata, A., Nandi, S., Ueda, S., Rudy, B. und Coetzee, W.A. (2001): A role of frequenin, a Ca²⁺-binding protein as a regulator of Kv4 K⁺-currents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (22), S.12808-13.
- Neher, E. und Sakmann, B. (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* **260** (5554), S-799-802.
- Nerbonne, J.M. und Krass, R.S. (2005): Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol. Rev.* **35** (4), S.1205-53.
- Numberger, M. und Draguhn, A. (1996): Patch-Clamp-Technik, Labor im Fokus, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heildelberg.
- O'Connell, A.D., Morton, M.J. und Hunter, M. (2002): Two-pore domain K⁺ channels molecular sensors. *Biochim Biophys. Acta* **1566** (1-2), S. 152-61.
- Pak, M.D-. Baker, K., Covarrubias, M., Butler, A., Ratcliffe, A. und Salkoff, L. (1991): mShal, a subfamily of A-type K⁺ channel cloned from mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (10), S. 4386-90.
- Pardo, L.A. (2004): Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology (Bethesda)* 19, S.285-92.
- Pioletti, M., Findeisen, F., Hura, G.L. und Minor D.L. Jr. (2006): Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13 (11), S.987-95.
- Pongs, O., Kecskemethy, N., Müller, R., Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H.H., Canal, I., Llamazares, S. und Ferrus, A. (1988): *Shaker* encondes a family of pitative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* **7** (4), S.1087-96.
- Qi, S.Y., Riviere, P.J., Trojnar, J., Junien, J.L. und Akinsanya, K.O. (2003): Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases, *Biochem. J.* **373** (Pt 1), S.179-89.
- Radicke, S., Cotella, D., Graf, E.M., Ravens, U., und Wettwer, E. (2005): Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative β-subunit of a human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3. J. Physiol. 565 (Pt 3), S.751-6.

- Ramakers, G.M. und Storm, J.F. (2002): A postsynaptic transient K⁺ current modulated by arachidonic acid regulates synaptic integration and threshold for LTP induction in hippocampal pyramidal cells. *Proc. Natl. Sci. USA* **99** (15), S.10144-9.
- Ranganathan, R., Lewis, J.H. und MacKinnon, R. (1996): Spatial localization of the K⁺ channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. *Neuron* **16** (1) S.131-9.
- Ren, X., Shand, S.H. und Takimoto, K. (2003): Effective association of Kv channel-interacting proteins with Kv4 channel is mediated with their unique core peptide. *J. Biol. Chem.* 278 (44), S.43564-70.
- Ren, X., Hayashi, Y., Yoshimura, N. und Takimoto, K. (2005): Transmembrane interaction mediates complex formation between peptidase homologues and Kv4 channels. *Mol. Cell Neurosci.* 29 (2), S.320-32.
- Rettig, J., Heinemann, S.H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D.N., Dolly, J.O. und Pongs, O. (1994): Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels. *Nature* **369** (6478), S.289-94.
- Robert, S.K. (2003): TOK homologue in Neuospora crassa: first cloning and functional characterization of an ion channel in a filamentous fungus. *Elkaryot. Cell* **2** (1), S.181-90.
- Ruppersberg, J.P., Frank, R., Pongs, O. und Stocker, M. (1991): Cloned neuronal IK(A) channels reopen during recovery from inactivation. *Nature* **352** (6345): S.657-60.
- Sala, S. und Matteson, D.R. (1991): Voltage-dependent slowing of K channel closing kinetics by Rb⁺. J. Gen. Physiol. **98** (3), S.535-54.
- Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C. und Wei, A. (2006): High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat. Rev. Neurosci.* **7** (12), S. 921-31.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (12), S.5463-7.
- Scannevin, R.H., Wang, K., Jow, F., Megules, J., Kopsco, D.C., Edris, W., Carroll, K.C., Lu, Q., Xu, W., Xu, Z., Katz, A.H., Olland, S., Lin, L., Taylor, M., Stahl, M., Malakian, K., Somers, W., Mosyak, L., Bowlby, M.R., Chanda, P. und Rhodes, K.J. (2004): Two N-terminal domains of Kv4 K⁺ channels regulate binding to and modulation by KChIP1. *Neuron* 41 (4), S.587-98.
- Schmitt, N., Schwarz, M., Peretz, A., Abitol, I., Attali, B. und Pongs, O. (2000): A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J.* **19** (3), S.332-40.
- Schoppa, N.E. und Westbrook, G.L. (1999): Regulation of synaptic timing in the olfactory bulb by an A-type potassium channel. *Nat. Neurosci.* **2** (12), S.1106-13.
- Schrempf, H., Schmidt, O., Kümmerlen, R., Hinnah, S., Müller, D., Betzler, M., Steinkamp, T. und Wagner, R. (1995): A procaryotic ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* **14** (21), S.5170-8.

- Schröter, K.H., Ruppersberg, J.P., Wunder, F., Rettig, J., Stocker, M. und Pongs, O. (1991): Cloning and functional expression of a TEA-sensitive A-type potassium channel from rat brain. *FEBS Lett.* **278** (2), S.211-6.
- Schwake, M., Jentsch, T.J. und Friedrich, T. (2003): A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly. *EMBO Rep.* **4** (1), S.76-81.
- Schwarz, T.L:, Tempel, B.L., Papazian, D.M., Jan, Y.N. und Jan, L.Y. (1988): Multiple potassium channel components are produced by alternative splicing at the *Shaker* locus in Drosophila. *Nature* 331 (6152), S.137-42.
- Serôdio, P., Kentros, C. und Rudy, B. (1994): Identification of molecular components of A-type channels activating at subthreshold potentials. *J. Neurophisiol.* **72** (4), S.1516-29.
- Serôdio, P., Vega-Saenz de Miera, E. und Rudy, B. (1996): Cloning a novel component of A-type K⁺ channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. J. *Neurophysiol.* **75** (5), S.2174-9.
- Serôdio, P. und Rudy, B. (1998): Differential Expression of Kv4 K⁺ cahnnel subunits mediating subthreshold transient K⁺ (A-type) currents in rat brain. *J. Neurophysiol.* **79** (2), S.1081-91.
- Shahidullah, M. und Covarrubias, M. (2003): The link between ion permeation and inactivation gating of Kv4 potassium channels. *Biophys. J.* **84** (2 Pt 1), S.928-41.
- Shen, N.V. und Paffinger, P.J. (1995): Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated proteins. *Neuron* **14** (2), S.271-84.
- Shibata, R., Misonou, H., Campomanes, C.R., Anderson, A.E., Schrader, L.A., Doliveira, L.C., Carroll, K.I., Sweatt, J.D., Rhodes, K.J. und Trimmer, J.S. (2003): A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J. Biol. Chem.* 278 (38), S.36445-54.
- Shin, K.S., Maertens, C., Proenza, C., Rothberg, B.S. und Yellen, G. (2004): Inactivation in HCN channels results from reclosure of the activation gate: desensitization to voltage. *Neuron* 41 (5), S.737-44.
- Singh, B., Ogiwara, I., Kaneda, M., Tokonami, N., Mazaki, E., Baba.K., Matsuda, K., Inoue, Y. und Yamakawa, K. (2006): A Kv4.2 truncation mutation in a patient with temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 24 (2), S.245-53.
- Solkova, o., Kolmakova-Partensky, L. und Grigorieff, N. (2001): Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel an 2.5 nm resolution. *Structure* **9** (3), S.215-20.
- Strop, P., Bankovich, A.J., Hansen, K.C., Garcia, K.C. und Brunger, A.T. (2004): Structure of a human A-type potassium channel interacting protein DPPX, a member of the dipeptidyl aminopeptidase family. J. Mol. Biol. 343 (4), S.1055-65.

- Stühmer, W., Ruppersberg, J.P., Schröter, K.H., Sakmann, B., Stocker, M., Giese, G.P., Perschke,
 A., Baumann, A. und Pongs, O. (1989): Molecular basis of functional diversity of voltagegated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J.* 8 (11), S.3235-44.
- Stühmer, W. (1992): Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol* 207, S.319-39.
- Takimoto, K., Hayashi, Y., Ren, X. und Yoshimura, N. (2006): Species and tissue differences in the expression of DPPY splicing variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348 (3), S.1094-100.
- Tempel B.L., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Jan, Y.N. und Jan L.Y. (1987): Sequence of a probable potassium channel component encoded at *Shaker* locus of Drosophila. *Science* 237 (4816), S.770-5.
- Tombola, F., Pathak, M.M. und Isacoff, E.Y. (2005): How far will you go to sense voltage? *Neuron* **48** (5), S.719-25.
- Vega-Saenz de Miera, E., Moreno, H., Frühlling, D., Kentros, C. und Rudy, B. (1992): Cloning of ShIII (Shaw-like) cDNAs encoding a novel high-voltage-activating, TEA-sensitive, type-A K⁺ channel. *Proc. Biol. Sci.* 248 (1321), S.9.18.
- Wada, K., Yokotani, N., Hunter, C., Doi, K., Wenthold, R.J. und Shimasaki, S. (1992): Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1), S.197-201
- Wang, G., Strang, C., Pfaffinger, P.J. und Covarrubias, M. (2007a): Zn²⁺-dependent redox switch in the intracellular T1-T1 interface of a Kv channel. *J. Biol. Chem.* **4** (18), S.13637-47.
- Wang, H., Yan, Y., Liu, Q., Huang, Y., Shen, Y., Chen, L., Chen, Y., Yang, Q., Hao, Q., Wang,
 K. und Chai, J. (2007b): Structural basis for modulation of Kv4 K⁺ Channels by auxiliary
 KChIP subunits. *Nat. Neurosci.* 10 (1), S.32-9.
- Watanabe, S., Hoffman, D.A., Migliore, M. und Johnston, D. (2002): Dendritic K⁺ channels contribute to spike-time dependent long-term potentiation in hippocampal pyramidal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.99 (12), S.8366-71.
- Webster, S.M., Del Camino, D., Dekker, J.P. und Yellen, G. (2004): Intracellular gate opening in *Shaker* K⁺ cannels defined by high-affinity metal bridges. Nature **428** (6985), S.864-8.
- Yamada, M., Inanobe, A. und Kurachi, Y. (1998): G protein regulation of potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **50** (4), S.723-60.
- Yifrach, O. und MacKinnon, R. (2002): Energetics of pore opening in a voltage-gated K⁺ channel. *Cell* **111** (2), S.231-9.
- Xu, J., Yu, W., Jan, Y.N., Jan, L.Y. und Li, M. (1995): Assembly of voltage-gated potassium channels. Conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the α-subunits. *J. Biol. Chem.* **270** (42), S.24761-8.

- Zagha, E., Ozaita, A., Chang, S.Y., Nadal, M.S., Lin, U., Saganich, M.J., McCormack, T., Akinsanya, K.O., Qi, S.Y. und Rudy, B. (2005): Dipeptidyl peptidase 10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels. *J. Biol. Chem.* **280** (19), S.18853-61.
- Zhou, M., Morais-Cabral, J.H., Mann, S. und MacKinnon, R. (2001): Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quarternary amine inhibitors. *Nature* **411** (6838), S.657-61.
- Zhu, X.R., Netzer, R., Böhlke, K., Liu, Q. und Pongs, O. (1999): Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K⁺ current. *Receptors channels* **6** (5), S.387-400.

7 Anhang

7.1 Plasmidkarten



Abbildung 7.1: Kv4.2 in pGEM HEJuel. Das Kv4.2-Gen wurde mit *Xma*I und *EcoR*I zwischen die *Xenopus laevis* β -Globin UTR Sequenzen in den Vektor einkloniert und steht unter Kontrolle des T7-Promotors. Zur Selektion trägt der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen. Die Regionen des Alanin-Mutagenese-Scans sind gelb markiert. Das Einfügen der Mutationen erfolgte über *Overlap*-PCR (siehe Abschnitt 3.1.9). Das mutierte PCR-Fragment wurde mit Hilfe der beiden äußeren Primer (fwd. Primer, rev. Primer) amplifiziert und nach einem *NruI/Bam*HI-Verdau in den Vekor kloniert.


Abbildung 7.2: Kv4.2 in pcDNA3. Die Kv4.2 cDNA wurde über *Eco*RI in den Vektor kloniert und steht unter Kontrolle des CMV-Promotors. Die N-terminal deletierten Kv4.2 Konstrukte $\Delta 2$ -10, $\Delta 2$ -20 und $\Delta 2$ -40 (ΔN -Terminus) wurden über einen *Hind*III/*Eco*RI Verdau pcDNA3 kloniert und enthalten daher nicht die grau dargestellten Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI. Die Bindungsstellen der äußeren Primer für das Einfügen der Punktmutationen sind blau dargestellt (fwd. Primer, rev. Primer). Zur Selektion trägt der Vektor Resistenzgene für Ampicillin und Neomycin.



Abbildung 7.3: Sh H4 IR in pBSTA. Die Sh H4 IR cDNA wurde über *Hind*III/*Bgl*II zwischen die Sequenzen des *Xenopus laevis* β -Globin UTR in pBSTA einkloniert und steht unter der Kontrolle des T7-Promotors. Die Regionen, in denen die *Shaker*-Sequenzen gegen Kv4.2-Sequenzen ausgetauscht wurden sind gelb markiert. Die Bindungsstellen der äußeren Primer, die in der *Overlap*-PCR zu Amplifikation des mutierten Fragmentes eingesetzt wurden sind blau dargestellt (fwd. Primer, rev. Primer). Die Klonierung des mutierten Fragmentes erfolgte über die singulären Restriktionsschnittstellen *Spe*I und *Mfe*I. Zur Selektion trägt der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen.

7.2 Abkürzungen

CMV	Cytomegalievirus		
ddNTP	Diedesoxynukleotidtriphaphat		
DEPC	Diethylpyrocarbonat		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat		
DTT	Dithiothreitol		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
EGFP	enhanced green fluorescent protein (verbessertes grün fluoreszierendes		
	Protein)		
ER	Endoplasmatisches Reticulum		
HCN	hyperpolarisatio- activated cyclic nucleotide-gated		
HEK	human embryonic kidney (aus einer menschlichen embryonalen		
	Nierenzelle gewonnene immortalisierte Zelllinie		
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl-)Piperazin-1-Ethansulfonat		
KChIP	K-channel-ineracting-protein (Kaliumkanal-interagierendes Protein)		
NTP	Nukleotidtriphosphat		
OD ₆₀₀	optisch Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm		
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)		
PEG	Polyethylenglykol		
PSG	Penicillin-Streptomycin-Glutamin		
RNA	Ribonukleinsäure		
RT	Raumtemperatur		
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwertes)		
tBHO ₂	tert-Butylhydroperoxid		
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan		
Upm	Umdrehungen pro Minute		
UTR	Untranslated Region (untranslatierte Region)		

7.3 Wissenschaftlicher Werdegang

1997-2004:	Biologie-Studium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
2003-2004:	Diplomarbeit an der Bundesanstalt für Milchforschung, Institut
	für Mikrobiologie.
	Thema: "Analyse der Regulation der Expression des
	plasmidkodierten shsp-Gens von Streptococcus thermophilus".
2005-2008	Promotion bei PD Dr. Robert Bähring am Institut für Neurale
	Signalverarbeitung im Zentrum für Molekulare Neurobiologie
	Hamburg (ZMNH) und am Institut für Vegetative Physiologie
	und Pathophysiologie des Universitätsklinikums Hamburg-
	Eppendorf.
	Thema: "Strukturdeterminanten für das Schaltverhalten des
	humanen spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv4.2".

7.4 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen:

- Barghaan, J., Tozakidou, M., Ehmke, H. und Bähring, R. (2008): Role of N-terminal domain and accessory subunits in controlling deactivation-inactivation coupling of Kv4.2 channels. *Biophys. J.* 94 (4), S.1276-94.
- Barghaan, J. und Bähring, R. (2008): Dynamic coupling of voltage sensor and gate involved in closed-state inactivation of Kv4.2 channels. Eingereicht zur Publikation beim *Journal of General Physiology*.

Kongressbeiträge:

Barghaan, J. und B\u00e4hring, R. (2006): Kv4.2 channel closed-state inactivation: mechanism and structural determinants. Posterbeitrag bei der 85. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in M\u00fcnchen.

- Barghaan, J. und Bähring, R. (2007): Voltage sensor uncoupling involved in Kv4.2 closedstate inactivation. Posterbeitrag auf dem 51. Jahrestreffen der *Biophysical Society* in Baltimore.
- Barghaan, J. und Bähring, R. (2007): Voltage sensor uncoupling involved in Kv4.2 closedstate inactivation. Posterbeitrag auf der 86. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Hannover.
- Barghaan, J. und Bähring, R. (2007): Struktur- Funktionsbeziehungen in somatodendritischen und kardio-ventrikulären A-Typ-Kanalkomplexen. Vortrag auf dem XII. Treffen der Ostseephysiologen in Kiel.
- Barghaan, J. und B\u00e4hring, R. (2008): Inaktivierungsmechanismen des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv4.2. Vortrag auf dem XIII. Treffen der Ostseephysiologen in Rostock.

7.5 Danksagung

Bei PD Dr. Robert Bähring bedanke ich mich für die interessante Fragestellung und die hervorragende Betreuung. Während der gesamten Zeit war er offen für alle Fragen und Probleme und gab mir die Möglichkeit, meinen wissenschaftlichen Horizont auf Kongressen zu erweitern.

Prof. Dr. Konrad Wiese danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Olaf Pongs und Prof. Dr. Heimo Ehmke danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit unter exzellenten Bedingungen am Institut für Neurale Signalverarbeitung im ZMNH und am Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie des UKE durchführen zu können.

Außerdem gilt mein Dank allen Kollegen an beiden Instituten, die mich herzlich aufgenommen haben und immer bereit waren mich durch Anregungen und Tipps zu unterstützen. Sönke Hornig, Dr. Li Juan Ma und Dr. Cornelia Siebrands weihten mich in die Kunst der Präparation von "guten" Oozyten ein. Dr. Sven Hartmann konnte mir in vielen Situationen durch Sachverstand, Gelassenheit und trockenen Humor weiterhelfen. Prof. Dr. Christiane Bauer, Dr. Günter Glassmeier und Dr. Alexander Schwoerer standen mir besonders bei Fragen zur Lehre zur Seite. Peter Bassalay war stets ein kompetenter Ansprechpartner bei allen technischen Problemen und unterstützte mich insbesondere beim Aufbau eines Oozyten-Messstandes. Birgit Hirsch-Hoffmann, Dr. Heike Kilp und Dr. Marco Mewe waren immer zu einer wissenschaftlichen Diskussion auf dem "Sonnendeck" bereit.

Mein besonderer Dank geht an die Mitglieder der Mittagsrunde, Jacqueline Alig, Sönke Hornig, Quyen Le, Christoph Ogrodowczyk und Kathrin Sauter, die mir durch ihre stete Diskussionsbereitschaft bei vielen fachlichen Problemen eine große Hilfe waren. Neben den angenehmen Mittagspausen erlebte ich mit ihnen auch unvergessene Momente innerhalb- und außerhalb des Instituts.

Für ihre Unterstützung, Geduld, Aufmunterung und Vertrauen danke ich Jacqueline und meiner Familie.