Untersuchungen zur Toxizität von Blei am Beispiel der Effekte von Pb²⁺ auf den neuronalen spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.1

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Andreas Nolting

Zentrum für Molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg

Hamburg, 2003

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg auf Antrag von Herrn Professor Dr. O. PONGS Weitere Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. M. GEWECKE

Tag der Disputation: 05. Dezember 2003

Hamburg, den 22. November 2003



Professor Dr. A. Frühwald Dekan

I Inhaltsverzeichnis

		_
II	Einleitung	5
1	Die Gruppe der spannungsgesteuerten K+-Kanäle (Kv-Kanäle)	5
2	Aufbau und Zusammensetzung von spannungsabhängigen	
	Kaliumkanälen	
2		10
3	Pharmakologie von spannungsabhangigen Kaliumkanalen	12
4	Ziel der Arbeit	15
III	Material	
1	Herkunft der verwendeten Materialien	
2	Lösungen und Bakterienmedien	
2	Molekulengewichteten dende	25
3	Molekulargewichtstandards	
4	Vektoren	25
5	Bakterienstämme	
IV	Methoden	
1	Malakularhialagigaha Mathadan	77
1		
1.1	Handhabung von Bakterienstämme	
1	1.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien	
1	1.1.2 Transformation von Bakterien	
1.2	Isolierung und Reinigung von DNA	
1	1.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus 3 ml E. coli-Kulturen (Miniprep)	
j	1.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus 50 ml Kulturen (Midiprep)	
j	1.2.3 Ethanolpräzipitation von DNA	29
ĺ	1.2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	29
i	1.2.5 Mikrodialyse von DNA	
1.3	RNA-Synthese durch in vitro Transkription	
1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	
j	1.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung	
j	1.4.2 Vergleich mit einem Mengenstandard	31
j	1.4.3 Konzentrationsbestimmung von RNA durch Floureszenzmessungen	31
1.5	Enzymatische Modifikationen von DNA	
j	1.5.1 Restriktion von DNA	31
i	1.5.2 Auffüllreaktion an überhängenden Enden	
i	1.5.3 Phosphorylierung von PCR-Produkten	
i	1.5.4 Dephosphorylierung von Vektoren	
i	1.5.5 Ligation	
1.6	Klonierung von DNA-Fragmenten	
j	1.6.1 Klonierung durch Fragmentaustausch	
1.7	In vitro-Mutagenese	

1	7.1 Aminosäureaustausch via Overlap-PCR	
1	.7.2 Herstellung rekombinanter DNA-Fragmente	
1.8	Agarosegelelektrophorese	
1	.8.1 Gelelektrophorese von DNA	
1.9	Polymerase-Kettenreaktion	
1	.9.1 Standard PCR Reaktion	
1	.9.2 Hot start PCR	
1	.9.3 Nested PCR	
1.1	.9.4 PCK auf einzeinen Bakierienkoionien	
1.1	1 Computergestützte Sequenzanalysen	
2	Zellbiologische Methoden	
2.1	Handhabung von Xenopus laevis-Oocyten	
2	2.1.1 Präperaton von Xenopus laevis-Oocyten	
2	2.1.2 Mikroinjektion von cRNA	
3	Elektrophysiologische Methoden	
3.1	Die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik	
3	2.1.1 Die Zellmembram als RC-Glied	
3	1.2 Messung des Membranstroms	
3.2	Messlösungen und applizierte Substanzen	
4	Datenerfassung und Auswertung	42
v	Ergebnisse	
1	Der Block von Kv1.1 durch Ph ²⁺ ist snannungsabhängig	
-		
2	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺	46
2	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung	
2 3 4	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition	46 50
2 3 4 5	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition Eingrenzung der potentiellen Pb ²⁺ -Bindestelle mit einer Chimärenstrategie	46 50 52 56
2 3 4 5 6	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition Eingrenzung der potentiellen Pb ²⁺ -Bindestelle mit einer Chimärenstrategie Versuch der Lokalisierung von an der Pb ²⁺ -Bindung beteiligten Aminosäuren im S3S4-Linke	46 50 52 56 er
2 3 4 5 6	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition Eingrenzung der potentiellen Pb ²⁺ -Bindestelle mit einer Chimärenstrategie Versuch der Lokalisierung von an der Pb ²⁺ -Bindung beteiligten Aminosäuren im S3S4-Linke von Kv1.1 durch Mutagenese	46 50 52 56 er 60
2 3 4 5 6 7	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition Eingrenzung der potentiellen Pb ²⁺ -Bindestelle mit einer Chimärenstrategie Versuch der Lokalisierung von an der Pb ²⁺ -Bindung beteiligten Aminosäuren im S3S4-Linke von Kv1.1 durch Mutagenese Perturbationen im Aktivierungsverhalten von Kv1.1 durch Mutationen im S3-S4-Linker	
2 3 4 5 6 7 VI	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition Eingrenzung der potentiellen Pb ²⁺ -Bindestelle mit einer Chimärenstrategie Versuch der Lokalisierung von an der Pb ²⁺ -Bindung beteiligten Aminosäuren im S3S4-Linker von Kv1.1 durch Mutagenese Perturbationen im Aktivierungsverhalten von Kv1.1 durch Mutationen im S3-S4-Linker Diskussion	46 50 52 56 er 60 62 66
2 3 4 5 6 7 VI 1	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition Eingrenzung der potentiellen Pb ²⁺ -Bindestelle mit einer Chimärenstrategie Versuch der Lokalisierung von an der Pb ²⁺ -Bindung beteiligten Aminosäuren im S3S4-Linker von Kv1.1 durch Mutagenese Perturbationen im Aktivierungsverhalten von Kv1.1 durch Mutationen im S3-S4-Linker Diskussion	
2 3 4 5 6 7 VI 1 2	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition Eingrenzung der potentiellen Pb ²⁺ -Bindestelle mit einer Chimärenstrategie Versuch der Lokalisierung von an der Pb ²⁺ -Bindung beteiligten Aminosäuren im S3S4-Linke von Kv1.1 durch Mutagenese Perturbationen im Aktivierungsverhalten von Kv1.1 durch Mutationen im S3-S4-Linker Diskussion Effekte von Pb ²⁺ auf die Aktivierung von Kv1.1. Mechanismus der Modulation von Kv1.1 durch Pb ²⁺	46 50 52 56 er 60 62 66 66 69
2 3 4 5 6 7 VI 1 2 3	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition Eingrenzung der potentiellen Pb ²⁺ -Bindestelle mit einer Chimärenstrategie Versuch der Lokalisierung von an der Pb ²⁺ -Bindung beteiligten Aminosäuren im S3S4-Linke von Kv1.1 durch Mutagenese Perturbationen im Aktivierungsverhalten von Kv1.1 durch Mutationen im S3-S4-Linker Diskussion Effekte von Pb ²⁺ auf die Aktivierung von Kv1.1 durch Pb ²⁺	46 50 52 56 er 60 62 66 66 66 69 71
2 3 4 5 6 7 VI 1 2 3 4	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition Eingrenzung der potentiellen Pb ²⁺ -Bindestelle mit einer Chimärenstrategie Versuch der Lokalisierung von an der Pb ²⁺ -Bindung beteiligten Aminosäuren im S3S4-Linker von Kv1.1 durch Mutagenese Perturbationen im Aktivierungsverhalten von Kv1.1 durch Mutationen im S3-S4-Linker Diskussion Effekte von Pb ²⁺ auf die Aktivierung von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Lokalisation der Pb ²⁺ -Bindungsstelle auf Kv1.1 Verursacht Inhibition von Kv-Kanälen durch Pb2+ physiologische Störungen?	46 50 52 56 er 60 62 66 66 66 66
2 3 4 5 6 7 VI 1 2 3 4 VII	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition Eingrenzung der potentiellen Pb ²⁺ -Bindestelle mit einer Chimärenstrategie Versuch der Lokalisierung von an der Pb ²⁺ -Bindung beteiligten Aminosäuren im S3S4-Linker von Kv1.1 durch Mutagenese Perturbationen im Aktivierungsverhalten von Kv1.1 durch Mutationen im S3-S4-Linker Diskussion Effekte von Pb ²⁺ auf die Aktivierung von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Lokalisation der Pb ²⁺ -Bindungsstelle auf Kv1.1 Verursacht Inhibition von Kv-Kanälen durch Pb2+ physiologische Störungen?	46 50 52 56 er 60 62 66 66 66 69 71 82 84
2 3 4 5 6 7 VI 1 2 3 4 VII VIII	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition Eingrenzung der potentiellen Pb ²⁺ -Bindestelle mit einer Chimärenstrategie Versuch der Lokalisierung von an der Pb ²⁺ -Bindung beteiligten Aminosäuren im S3S4-Linker von Kv1.1 durch Mutagenese Perturbationen im Aktivierungsverhalten von Kv1.1 durch Mutationen im S3-S4-Linker Diskussion Effekte von Pb ²⁺ auf die Aktivierung von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Lokalisation der Pb ²⁺ -Bindungsstelle auf Kv1.1 Verursacht Inhibition von Kv-Kanälen durch Pb2+ physiologische Störungen? Literaturverzeichnis	46 50 52 56 er 60 62 66 66 66 69 66 66 66 64 82 84 86
2 3 4 5 6 7 VI 1 2 3 4 VII VIII VIII IX	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition Eingrenzung der potentiellen Pb ²⁺ -Bindestelle mit einer Chimärenstrategie Versuch der Lokalisierung von an der Pb ²⁺ -Bindung beteiligten Aminosäuren im S3S4-Linke von Kv1.1 durch Mutagenese Perturbationen im Aktivierungsverhalten von Kv1.1 durch Mutationen im S3-S4-Linker Diskussion Effekte von Pb ²⁺ auf die Aktivierung von Kv1.1. Mechanismus der Modulation von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Lokalisation der Pb ²⁺ -Bindungsstelle auf Kv1.1 Verursacht Inhibition von Kv-Kanälen durch Pb2+ physiologische Störungen? Literaturverzeichnis Anhang	46 50 52 56 er 60 62 66 66 66 66 69 71 82 84 84 86 94
2 3 4 5 6 7 VI 1 2 3 4 VII VIII IX 1	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition Eingrenzung der potentiellen Pb ²⁺ -Bindestelle mit einer Chimärenstrategie Versuch der Lokalisierung von an der Pb ²⁺ -Bindung beteiligten Aminosäuren im S3S4-Linke von Kv1.1 durch Mutagenese Perturbationen im Aktivierungsverhalten von Kv1.1 durch Mutationen im S3-S4-Linker Diskussion Effekte von Pb ²⁺ auf die Aktivierung von Kv1.1. Mechanismus der Modulation von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Lokalisation der Pb ²⁺ -Bindungsstelle auf Kv1.1 Verursacht Inhibition von Kv-Kanälen durch Pb2+ physiologische Störungen? Literaturverzeichnis	46 50 52 56 er 60 62 66 66 66 66
2 3 4 5 6 7 VI 1 2 3 4 VII VIII IX 1 2	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition Eingrenzung der potentiellen Pb ²⁺ -Bindestelle mit einer Chimärenstrategie Versuch der Lokalisierung von an der Pb ²⁺ -Bindung beteiligten Aminosäuren im S3S4-Linker von Kv1.1 durch Mutagenese Perturbationen im Aktivierungsverhalten von Kv1.1 durch Mutationen im S3-S4-Linker Diskussion Effekte von Pb ²⁺ auf die Aktivierung von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Lokalisation der Pb ²⁺ -Bindungsstelle auf Kv1.1 Verursacht Inhibition von Kv-Kanälen durch Pb2+ physiologische Störungen? Zusammenfassung Literaturverzeichnis Anhang	46 50 52 56 er 60 62 66 66 66 66 69 71 82 84 84 84 84 86 94 94
2 3 4 5 6 7 VI 1 2 3 4 VII VIII IX 1 2 3	Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Konzentrationsabhängigkeit der Pb ²⁺ -Bindung Kinetik der Erholung aus der Pb ²⁺ -Inhibition Eingrenzung der potentiellen Pb ²⁺ -Bindestelle mit einer Chimärenstrategie Versuch der Lokalisierung von an der Pb ²⁺ -Bindung beteiligten Aminosäuren im S3S4-Linker von Kv1.1 durch Mutagenese Perturbationen im Aktivierungsverhalten von Kv1.1 durch Mutationen im S3-S4-Linker Diskussion Effekte von Pb ²⁺ auf die Aktivierung von Kv1.1 durch Pb ²⁺ Lokalisation der Pb ²⁺ -Bindungsstelle auf Kv1.1 Verursacht Inhibition von Kv-Kanälen durch Pb2+ physiologische Störungen? Zusammenfassung Literaturverzeichnis Ahhang Abkürzungsverzeichnis	46 50 52 56 er 60 62 66 66 66 66 71 82 84 84 84 84 94 94 94 94 94

II Einleitung

1. Die Gruppe der spannungsgesteuerten K⁺-Kanäle (Kv-Kanäle)

Kaliumkanäle bilden eine große heterogene Superfamilie integraler Membranproteine (Chandy und Gutman, 1995). Sie besitzen die Fähigkeit den Fluss von Kaliumionen durch die Membran, angetrieben durch den elektrochemischen Gradienten, zu steuern. Daher spielen sie eine bedeutende Rolle in zellulären Prozessen, die mit Änderungen des Membranpotentials zusammenhängen. Dazu gehören die Aufrechterhaltung des Ruhepotentials, Repolarisation der Membran nach Aktionspotentialen und die Modulation von Aktionspotentialen. Außerdem sind sie an der Kontrolle der endokrinen und exokrinen Sekretion, Zellproliferation und der Regulation des Zellvolumens beteiligt (Connor, 1971; Byrne 1980; Hille, 1992).

Die Gruppe der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle (Kv-Kanäle) kann in drei Hauptfamilien unterteilt werden. Die erste Familie beinhaltet die Shaker-verwandten Kv-Kanäle, die zweite die ether-à-go-go-verwandten Kv-Kanäle und die dritte die KvLQT1 (KCNQ)-verwandten Kv-Kanäle. Die Namen stammen von *Drosophila* und humanen Mutanten, die zur Charakterisierung und Klonierung der jeweils ersten Mitglieder der Familien geführt haben. (Übersicht bei Pongs 1992, 1999). Das erste Mitglied der Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle wurde 1987 aus dem Shaker-Locus von *Drosophila melanogaster* kloniert (Papazian et al., 1987; Kamp et al., 1987; Pongs et al., 1988). Seitdem konnten eine Vielzahl homologer Proteine in Säugetieren aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden.

2. Aufbau und Zusammensetzung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen



Abb 1: Topologisches Modell und Aufbau von Kv-Kanälen. A: Toplogisches Modell einer Kvα-Untereinheit. Die membranständige Region besteht aus sechs hydrophoben Segmenten S1-S6. Die Porendomäne besteht aus S5-S6 und der Porenschleife. S1-S4 umfasst die positiv geladene Spanungssensordomäne mit dem Spannungssensorelement S4. Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus sind cytoplasmatisch lokalisiert. Am proximalen Ende des N-Terminus befindet sich der Inaktivierungsball (I). Davor befindet sich die Tetramerisationsdomäne (T1). B: Vier Kvα-Untereinheiten bilden einen funktionellen Kv-Kanal. C: Profil eines Kv-Kanal-Tetramers mit vier assoziierten cytoplasmatisch lokalisierten Kvβ-Untereinheiten.

Trotz der hohen Anzahl und der funktionellen Vielfalt weisen die Kv-Kanäle eine gemeinsame Struktur auf. Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle setzen sich aus vier homologen α -Untereinheiten zusammen, die jeweils sechs membranintegrierte Bereiche (6TM- Architektur) und cytoplasmatische N- und C-terminale Domänen enthalten (Rudy, 1988; Pongs, 1992; Jan und Jan, 1994). Die Vielfalt der spannungsabhängigen Kaliumkanäle resultiert sowohl aus der hohen Anzahl an porenbildenden α -Untereinheiten (Chandy und Gutman, 1993), als auch aus der möglichen Kombinierung verschiedener α -Untereinheiten durch die Bildung von Heteromultimeren (Isacoff et al., 1990; Ruppersberg et al., 1990; Covarrubias et al., 1991; Li et al., 1992; Shen et al., 1993). Die Interaktion der Kv- α -Untereinheiten wird durch eine cytoplasmatische Tetramerisierungsdomäne (T1) vermittelt, die aminoterminal lokalisiert ist (Li et al, 1992; Shen et al. 1993; Abb 1A).

Die α-Untereinheiten ordnen sich symmetrisch und bilden so eine zentrale Pore aus (Abb1) (MacKinnon, 1991; MacKinnon et al., 1993). Die Transmembransegmente S5 und S6 sowie die Porenschleife bilden die Porendomäne. Sie enthält den Selektivitätsfilter, eine Struktur mit einer in allen Kaliumkanälen konservierten Signatursequenz, die der selektiven Permeation von Kaliumionen dient (Heginbotham et al., 1992, 1994; Jan und Jan, 1994). Der Bereich der Transmembransegmente S1-S4 bildet die Spannungssensordomäne. Das Segment S4 enthält positiv geladene Aminosäuren. Es konnte gezeigt werden, dass Ladungsverschiebungen und Konformationsänderungen im Bereich von S4 in Abhängigkeit von der Membranspannung während des Öffnens und Schließens des Kanals auftreten (Seoh et al., 1996; Aggarwal et al., 1996; Yangb et al., 1995; Larsson et al., 1996; Yusaf et al., 1996; Baker et al., 1998; Mannuzzu et al., 1996; Cha et al., 1997). Diese sind in Form von "*gating*-Strömen" messbar.

In Abhängigkeit vom Spannungspotential der Zellmembran erreichen spannungskontrollierte Kaliumkanäle verschiedene funktionelle Zustände, die charakteristisch für das Schaltverhalten des Kanaltyps sind. Bei negativen Potentialen nimmt der Kanal einen deaktivierten geschlossenen Zustand ein. Depolarisierung der Membran führt zu Konformationsänderungen in der Spannungssensordomäne, der Kanal geht in einen aktivierten Zustand über, was schließlich zum Öffnen des Aktivierungstors der Pore führt. Nur der offene Kanal besitzt einen ionenleitenden Zustand. Dieser kann direkt mit elektrophysiologischen Techniken als Strom gemessen werden. Repolarisation führt zum Schließen der Kanalpore, der Spannungssensor nimmt wieder einen deaktivierten Zustand an. Das Abklingen des Stromflusses während der Deaktivierung kann in Form von Tailströmen beobachtet werden. Viele Kv-Kanäle zeigen auch im aktivierten Zustand bei positiven Spannungspotentialen eine Abnahme der Leitfähigkeit. Dieser Prozess wird als Inaktivierung bezeichnet. Kanäle mit einer stark ausgeprägten Inaktivierung und einer schnellen Aktivierung erzeugen transiente Ströme und können als Gruppe der A-Typ Kanäle zusammengefasst werden. Für die beiden A-Typ Kanäle Shaker und Kv4.2 konnte der molekulare Mechanismus der schnellen Inaktivierung geklärt werden (Hoshi et al., 1990, 1991; Gebauer et al., 2003 eingereicht). Die offene Pore wird intrazellulär durch ein Inaktivierungspartikel verschlossen, das wie ein Ball an einer Kette (ball and chain) als bewegliche Domäne des proximalen N-Terminus mit der Kv-α-Untereinheit verbunden ist. Sie wird daher N-Typ-Inaktivierung genannt (Zagotta et al. 1990). Auch für die aksessorische Untereinheit Kv β 1 konnte ein N-terminales Inaktivierungspartikel nachgewiesen werden Der nicht inaktivierender Kanal (delayed rectifier) Kv1.5 wird durch Koexpression mit Kvβ1 in einen schnell inaktivierenden A-Typ-Kanal umgewandelt (Rettig et al., 1994). Neben der N-Typ-Inaktivierung wurde noch ein zweiter Typ der Inaktivierung beschrieben. Sie wird C-Typ-Inaktivierung genannt, und ist langsamer als die N-Typ-Inaktivierung. Sie wird auf Konformationsänderungen im extrazellulären Mund der Pore zurückgeführt (Choi et al., 1991; Hoshi et al., 1991; Yellen et al., 1994). Es gibt Hinweise, dass Aminosäuren in der extrazellulären Porenregion und im Transmembransegment S6, sowie der Carboxyterminus am Mechanismus der C-Typ-Inaktivierung beteiligt sind. Eine erhöhte extrazelluläre K⁺-Konzentration reduziert den Effekt (Lopez-Barneo et al., 1993), was darauf hinweist, dass die Konformationsänderungen der C-Typ-Inaktivierung von der Besetzung von K⁺-Bindungsstellen im extrazellulären Porenbereich abhängt (Baukrowitz et al., 1995).

Einen bemerkenswerten Einblick in den strukturellen Aufbau und in den molekularen Mechanismus des hochselektiven Kaliumtransports der Pore liefern die Kristallstrukturen verschiedener prokariotischer Kaliumkanäle (Doyle et al., 1998; Jjang et al., 2002;). Der toplogische Aufbau des aus vier α-Untereinheiten bestehenden, pH-kontrollierten Zwei-Transmembran Kaliumkanal KCSA (*Streptomyces lividans*) entspricht der Porendomäne von 6TM-Kv-Kanälen. Abb. 2 stellt die durch Röntgenkristallographie aufgelöste Struktur von KCSA dar. Der obere Bereich zeigt den Selektivitätsfilter, der die Signatursequenz TVGYG enthält. Unterhalb des Selektivitätsfilters erweitert sich der Durchgang zu einer wassergefüllten Höhlung, die von den vier inneren Membranhelices (S6) begrenzt wird. Die Kaliumionen verlieren bei Eintritt in den engen Ionentransportweg ihre Hydrathülle, werden aber durch die polaren Carbonyl-Sauerstoffatome der Hauptgruppen des Selektivitätsfilters stabilisiert, bevor sie in der Höhlung wieder in ein wässriges Milieu eintreten (Zhou et al., 2001; Morais-Cabral et al., 2001). Zusätzliche Stabilisierung der Kaliumionen innerhalb des Selektivitätsfilters sowie eine Erhöhung der Kationen-Selektivität vermittelt der Dipolmoment

der Poren-Helices, der mit dem negativen Pol direkt zum Zentrum der Pore deutet (Roux et al., 1999). (Alle α -Helices besitzen aufgrund der hintereinander angeordneten Wasserstoffbrücken einen Dipolmoment). Neben der Homologie in den primären Aminosäuresequenzen gibt es auch experimentelle Hinweise auf eine hohe Ähnlichkeit der KCSA-Struktur mit den Strukturen der Porendomänen von 6TM-Kv-Kanälen der Eukaryoten. KCSA besitzt Sensitivität zu Skorpiontoxinen, deren Interaktionsstellen innerhalb der äußeren Pore von eukaryotischen Kv-Kanälen intensiv studiert wurde (MacKinnon et al., 1998). Toxinsensitivität konnte durch Austausch definierter Abschnitte der äußeren Pore zwischen KCSA und einem Shaker Kv-Kanal auf KCSA übertragen werden (Legros et al., 2000). Neben KCSA wurde ein zweiter prokariotischer calciumkontrollierter 2-TM Kanal MthK kristallisiert (Jiang et al. 2002). Allgemein wird angenommen, dass die KCSA-Struktur einen Kaliumkanal im geschlossenen Zustand zeigt. MthK dagegen, wurde mit großer Wahrscheinlichkeit im offenen Zustand kristallisiert. Während in der Struktur von KCSA die inneren Helices (S6) am intrazellulär gelagerten Aktivierungstor (Liu et al., 1997; del Camino et al., 2001) ein sich kreuzendes Bündel formen, erscheinen sie in der MthK-Struktur weit auseinander gespreizt. Das ist ein Hinweis auf einen allgemeinen Öffnungsmechanismus von Kaliumkanälen. Die S6-Elemente formen ein intrazelluläres Aktivierungstor, ein in fast allen Kaliumkanälen hochkonservierter Glycinrest innerhalb von S6 funktioniert als Scharnier, um ein Auseinanderweichen der S6-Helices zu ermöglichen.



Abb 2: Strukturmodell von KCSA. (Auflösung: 3.2Å) A: Die Struktur zeigt den Selektivitätsfilter (rot), der durch eine in allen Kaliumkanälen hochkonservierte Signatursequenz innerhalb der Porenschleife definiert ist. Unterhalb des Selektivitätsfilters erweitert sich der Ionentranportweg zu einer wassergefüllten Höhlung.die durch die innere Helix begrenzt wird. Das Aktivierungstor befindet sich am carboxyterminalen Ende der inneren Helix S6 (grün). B: Schematische Darstellung der Organisation des KCSA-Kanals im Profil (modifizert von Doyle et al., 1998).

Im Mai dieses Jahres präsentierte die Mackinnon-Gruppe die Struktur des vollständigen archaebakteriellen Kv-Kanals KvAP (*Aeropyrum pernix*) nach röntgenkristallographischen Experimenten (Jiang et al., 2003a). Interesse erweckten besonders die bisher fehlenden hochauflösenden Strukturinformationen der Spannungssensordomäne eines Kv-Kanals (vergl. Abb 3A), die im Fall von KvAP hohe Sequenzhomologie zu den eukaryotischen Kv-Kanälen besitzt. Die Struktur der Spannungssensordomäne sowie der vorgeschlagene Mechanismus der spannungsabhängigen Aktivierung werden seitdem sehr widersprüchlich anhand der Ergebnisse aus elektrophysiologischen, wie auch flourometrischen Experimenten der letzten zehn Jahre diskutiert (Übersicht Cohen et al., 2003). Im Gegensatz zu herkömmlichen Vorstellungen, die das positiv geladene Spannungssensorelement S4 in einer Wasser- und Proteinumgebung des Kanals lokalisiert, wird hier der Spannungssensor als in der

10

Lipidmembran frei bewegliches "Ruder" an der Perepherie der Kanalstruktur beschrieben. In der geschlossenen Konformation ist das positiv geladene Spannungssensor-Ruder bei einem negativen Ruhepotential in Nähe der intrazellulären Membranoberfläche positioniert. In dieser Konformation sind die innere und äußere Helix der Porendomäne so angeordnet wie in der Struktur von KCSA, einem Kanal der im geschlossenen Zustand kristallisiert wurde. Die Anordnung und Packung der äußeren Porenhelix S5 stabilisiert die geschlossene Konformation des Kanals (Doyle et al., 1998). Bei einer Depolarisation der Membran bewegt sich der Spannungssensor ~ 20 Å durch die Membran in Richtung der extrazellulären Seite. Dabei wird Zugkraft auf den in seiner Struktur flexiblen S4-S5-Linker ausgeübt und die äußere Porenhelix S5 wird von der zentralen Porenachse wegbewegt. Das führt zu Konformationsänderung in der inneren Porenhelix und zum Öffnen des Aktivierungstors. Der Kanal wechselt in einen offenen Zustand (vergl. Abb. 3B). Dieses Gating-Modell basiert nicht nur auf Kristallstrukturdaten, sondern wurde durch elektrophysiologische Studien ergänzt, in denen die Zugänglichkeit des Spannungssensors im offenen und geschlossenen Zustand des Kanals von beiden Seiten einer Lipidmembran mit einer molekularen Sonde untersucht wurde (Jiang et al., 2003b).



Abb 3: Drei-dimensionale Struktur des bakteriellen spannungsabhängigen Kaliumkanals KvAP **A:** Die fehlende Struktur der Spannungssensordomäne (S1-S4) kann mittlerweile durch ein Strukturmodell des KvAP-Kanals ersetzt werden (Jiang et al., 2003a). **B:** Die beiden von der KvAP-Kristallstruktur abgeleiteten Strukturmodelle zeigen die Positionen des Spannungssensors im geschlossenem Kanal (links) und im offenen Kanal (rechts) (Jiang et al., 2003b). Sie sind Grundlage für ein Modell, das zeigt wie Konformationsänderungen in der Spannungssensordomäne während der Kanalaktivierung mit dem Öffnen der Pore gekoppelt sind (vergl Text).

3. Pharmakologie von spannungsabhängigen Kaliumkanälen

Schon vor 30 Jahren wurden Substanzen, die blockierende Wirkung auf Kaliumkanäle besitzen, verwendet, um die Physiologie, Struktur und Funktionsmechanismen von Kaliumkanälen zu studieren. Mit Hilfe von quaternären Aminen wie Tetraethylamonium (TEA), die an eine Rezeptorstelle im intrazellulären Mund der Pore binden und den Kanal daher nur im geöffneten Zustand blockieren, konnte der Aufbau der Kaliumkanalpore aus funktionellen Elementen wie Selektivitätsfilter und einem zur intrazellulären Seite des Kanals gerichteten Aktivierungstor postuliert werden (Armstrong et al., 1971, 1975). Auch konnten durch zielgerichtete Mutagenese Aminosäuren in der Porenschleife identifiziert werden, die an der TEA-Bindung beteiligt sind und daher von der intrazellulären Seite des Kanals zugänglich sind (Mackinnon et al., 1990; Yellen et al., 1991).

In den letzten zehn Jahren konnten eine Vielzahl von kleinen Peptiden, die calciumabhängige und spannungsabhängige Kaliumkanäle blockieren, aus den Giften verschiedener Tiere wie Skorpionen, Schnecken, Schlangen und Spinnen isoliert werden. Diese Toxine blockieren einzelne oder mehrere Mitglieder der Kv-Kanal-Familie sehr spezifisch und mit hoher Affinität (Dissoziationskonstanten zwischen 1-200 nM), wenn sie von der extrazellulären Seite der Membran appliziert werden. Da diese Peptide die Zellmembran nicht passieren können, kommen als Rezeptorstellen nur extrazellulär exponierte Bereiche des Kanals oder Stellen im Inneren der Kanalstruktur, die über wassergefüllte Zugänge erreicht werden können, in Frage. Bisher wurden zwei verschiedene Mechanismen des Kanalblocks durch diese Peptide beschrieben. Die erste Gruppe von Peptidtoxinen blockiert die Pore und damit den Ionentransportweg des Kaliumkanals, indem sie mit dem extrazellulär exponierten Mund der Pore im Verhältnis 1:1 interagieren. Dazu gehören z.B. das Apamin der Bienen, die Conotoxine der Conus-Schnecken sowie das Schlangentoxin Dendrotoxin. Der Mechanismus des Porenverschlusses wurde aber am intensivsten für Skorpiontoxine wie z. B. Charybdotoxin, Kaliotoxin und Agitoxin studiert (Gross et al., 1996; Goldstein et al., 1994; Aiyar et al., 1995). Mutations-Bindungsstudien haben Aminosäuren in der äußeren Pore von Shaker und Kv1.3 identifiziert, die für die spezifische Bindung und der unterschiedlichen Affinität verschiedener Skorpiontoxine verantwortlich sind. Auf demselben Weg wurden Aminosäuren auf dem Toxin gefunden, die an der Interaktion mit dem extrazellulären Bereich der Kanalpore beteiligt sind. Eine besondere Rolle spielt ein in den Toxinen konservierter Lysinrest (Lys-27). Es wird vermutet, dass die positiv geladene Seitenkette dieser Aminosäure direkt mit den Bindungsstellen für Kaliumionen im Selektivitätsfilter des Kanals interagiert und so den Ionentransportweg verschließt (Goldstein et al., 1994). Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur einiger Skorpiontoxine aus NMR-Studien sowie immer detailreichere Informationen über die interagierenden Aminosäurepaare im Toxin-Kanalkomplex, die aus Mutagenesestudien und mutant-cycle-Analysen gewonnen wurden, ergaben bald räumliche Modelle des Komplexes. So konnten die räumlichen Dimensionen des äußeren Kanalmundes der untersuchten Kv-Kanäle abgeschätzt werden (Lipkind et al., 1997).

Der zweite intensiv studierte Mechanismus der Kanalinhibition beruht auf die Modifizierung des spannungsabhängigen Schaltverhaltens des Kanals. Hanatoxin, ein Peptid aus einem Spinnengift (Schwartz et al., 1995), bindet an die extrazelluläre Oberfläche von Kv2.1 außerhalb der Porenrgion. Im Vergleich zu den Skorpiontoxinen, die im Verhältnis 1:1 an den funktionellen Kanal binden, besitzt Kv2.1 mehrfache, wahrscheinlich 4 Bindungsstellen für Hanatoxin (Schwartz et al., 1997a). Die Rezeptorstelle für Hanatoxin konnte in der Spannungssensordomäne auf dem Linker zwischen S3 und S4 identifiziert werden (Schwartz et al., 1997b; Li-Smerin et al., 2000, 2001). Bindung von Hanatoxin verursacht eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung in Richtung positiverer Potentiale. Vermutlich stabilisiert die Hanatoxinbindung den geschlossenen Zustand des Kanals, was zu einer Veränderung des Schaltverhaltens führt. Eine andere Erklärung beruht auf der Idee, dass der Spannungssensor des Kanals durch die Toxinbindung im aktiviertem Zustand festgehalten wird und der Kanal durch eine intensive und verlängerte C-Typ-Inaktivierung seine Leitfähigkeit verliert (Jiang et al., 2003a, 2003b).

Eine Vielzahl von spannungsabhängigen Kaliumkanälen wird außerdem durch eine erhöhte extrazelluläre Konzentration bivalenter Kationen moduliert. So bewirken Ca²⁺ und Mg²⁺-Konzenrationen im millimolaren Bereich eine Verschiebung der Spannungs-Aktivierung-Kurve von spannungsabhängigen Ionenkanälen zu mehr positiven Potentialen hin (Elinder et al., 1998). Diese Beobachtung wurde in vielen Fällen mit der surface-charge-Theorie erklärt (Frankenhäuser und Hodkin, 1957). Hierbei wird angenommen, dass das lokale elektrische Potential an der Membranoberfläche durch die Dichte an Ladungen von ionisierten Gruppen der integralen Proteine und anderer geladener Gruppen der Zellmembran definiert ist und zum elektrischen Feld innerhalb der Membran beiträgt. Eine Neutralisierung dieser Oberflächenladungen durch eine Erhöhung der Konzentration an bivalenten Kationen (Ca²⁺, Mg²⁺; Zn²⁺) führt zu einer Änderung des elektrischen Felds innerhalb der Membran. Darauf reagiert der Spannungssensor eines spannungskontrollierten Ionenkanals wie auf eine Änderung des Membranpotentials. In diesem Fall wird das Membranpotential negativer und der Ionenkanal reagiert erst auf stärkere Depolarisation mit Aktivierung (Hille, 1992). Die durch divalente Kationen induzierten Änderungen im Schaltverhalten können aber auch durch direkte Modulation in Form einer Interaktion mit einer definierten Bindungsstelle auf der extrazellulären Oberfläche des Kanals erfolgen. Das Schaltverhalten des ether-à-go-go (eag)-Kanals wird z. B. durch Bindung von Magnesium an eine Bindungsstelle in der Spannungssensordomäne in unmittelbarer Nähe des Spannungssensors S4 moduliert (Silvermann et al., 2000). In einigen beschriebenen Fällen reichen niedrigere Konzentrationen (~ 100 µM) an bivalenten Kationen aus, um spannungsabhängige Ionen-Kanäle zu modulieren. Diese Effekte können nicht mehr auf eine Verschiebung der spannungsabhängigen Parameter durch die surface-charge-Theorie erklärt werden. So verursacht 100 μ M Zn²⁺ eine bedeutsame Verlangsamung der Aktivierung und Inaktivierung von *Delayed-Rectifyer* Kv-Kanälen in Tintenfisch-Neuronen (Gilly und Armstrong, 1982a, 1982b) sowie bei Shaker Kv-Kanälen (Spires et al., 1994). Den gleichen Effekt hat Zn²⁺ auf den spannungsabhängigen Kanal Kv1.5 (Spires et al., 1992). Für die beiden Kv-Kanäle Kv1.5 und Kv1.3 der Shaker-Familie wurde auch eine Reduzierung der maximalen Stromamplitude sowie eine Verschiebung der Spannungs-Aktivierungskurve entlang der Spannungsachse zu positiveren Potentialen hin in Abhängigkeit von der Konzentration an extrazellulären Zn²⁺-Ionen beobachtet (Zhang et al., 2001; Kehl et al., 2002; Teisseyre, 2002). Es wird allgemein vermutet, dass diese beiden Effekte auf die Existenz von möglicherweise zwei unterschiedlichen Kationbindungsstellen in Shaker-Kv-Kanälen zurückzuführen sind.

Für das divalente Kation Pb^{2+} konnten spannungsabhängige modulatorische Effekte auf Kaliumströme von *Delayed-Rectifier* Kaliumkanälen in isolierten Neuronen des Hippokampus, wie auch für klonierte Kv-Kanäle im heterologen Expressionssystem nachgewiesen werden. Pb^{2+} in mikromolaren Konzentrationen führt zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung der Kaliumströme zu positiveren Potentialen hin, was zu einer Verminderung der Kaliumströme bei niedrigen Potentialen führt (Madeja et al, 1997). Es konnte auch eine Modulation der transienten Auswärtsströme, sowie der durch Hyperpolarisation aktivierten I_h-Ströme durch Pb²⁺ in dorsalen Wurzelganglien beobachtet werden (Talukder et al., 1995; Dai X et al., 2001, 2003). Der genaue Wirkungsmechanismus der Inhibition von Kv-Kanälen durch Pb²⁺ auf molekularer Ebene konnte bisher nicht geklärt werden.

4. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollen die Effekte von Pb^{2+} auf den klonierten spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.1, stellvertretend für die Familie der shakerverwandten Kv-Kanäle, im heterologen Expressionssystem untersucht werden. Basierend auf Untersuchungen von Kanal-Chimären, wurde eine Region des Kanalproteins eingegrenzt, die an der Bindung von Pb²⁺

beteiligt ist. Eine genauere Untersuchung dieser Region beinhaltet die zielgerichtete Mutagenese einzelner Aminosäuren mit dem Ziel Seitenketten zu identifizieren, die an einer Interaktion mit Pb²⁺ mitwirken. Die Ergebnisse sollen dann im Rahmen von dreidimensionalen Strukturmodellen des Kv-Kanals und im Zusammenhang mit den bisher bekannten Mechanismen der Inhibition von Ionenkanälen diskutiert werden.

III Material

1 Herkunft der verwendeten Materialien

Bacto-Agar	GibcoBRL
Hefeextrakt	GibcoBRL
Ampicillin	Boehringer
100 bp DNA Ladder	Biolabs
Agarose	Biozym
alkalische Phosphatase	Boehringer
Caseinhydrolysat	GibcoBRL
Chloroform	Merck
dCTP modifiziert 10x	Ambion
Deoxynucleotidyltransferase	GibcoBRL

Diethylpyrocarbonat	Fluka
Ethanol	Merck
Gentamycin-Stammlsg.	Sigma
GlassMAX-Zentrifugationspatrone	Gibco
Isopropanol	Merck
Kb-DNA Ladder	Stratagene
Klenow (exonucleasefrei)	Ambion
Mikrodialysefilter	Millipore
Oligonukleotide	MWG
p <i>Bluescript</i>	Stratagene
Pfu-Polymerase	Stratagene
pGEM HE Juel	Promega, modifiziert in Jülich
RbCl ₂	Sigma
Restriktionsendonukleasen	Boehringer,fermentas biolaps
RNAse (DNAsefrei)	Boehringer
RNAse-Mix	GibcoBRL
Smart DNA Ladder	Eurogetec

T4-DNA-Ligase	fermentas
T4-DNA-Polymerase	biolaps
T4-Polynukleotidkinase	NEB (New England)
Xenopus laevis Frösche	Kehler

Alle weiteren Materialien und Chemikalien wurden von den Firmen Baker, Fluka, Merck, Serva oder Sigma bezogen. Restriktionsenzyme wurden von biolaps und fermentas bezogen.

2 Lösungen und Bakterienmedien

Ampicillinlösung	0,1	g/ml	Ampicillin in H ₂ O
AP-Puffer	50	mM	Tris-HCl, pH8,5
Dephosphorylierung	100	mM	EDTA
dCTP-Lösung	2	mM	dCTP
			GibcoBRL
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H ₂ O	0,01	%(v/v)	DEPC in H_2O ,
			3 h gerührt, autoklaviert
DNA-Probenpuffer 5x	20	%	Ficoll
	100	mМ	EDTA
	0,025	%	Bromphenolblau
	0.025	%	Xylenxyanol

dNTP-Mix	20	mM	dATP, dCTP, dGTP dTTP
PCR			
DTT	0,1	М	DTT
Ethidiumbromidlösung	10	mg/ml	Ethidiumbromid in H ₂ O
EDTA-Lösung	0,5	М	Na ₂ EDTA, pH 8,0
Gentamycin-Lösung	7,5	mM	NaCl
Oocyten	2,0	mM	KCl
	2,0	mM	CaCl ₂
	1,0	mM	MgCl ₂
	5,0	mM	Na-Pyruvat
	5,0	mM	HEPES
	50,0	µg/ml	Gentamycin
			pH 7.5 (NaOH)
Gentamycin-Stammlösung	50	mg/ml	Gentamycin
IPTG-Stammlösung	1	М	Isopropylthio-β-D-galactosid
			in H ₂ O
LB-Agar	1	1	LB-Medium
	15	g	Bacto-Agar, autoklaviert
LB-Ampicillin-Agar	1	1	LB-Medium
	15	g	Bacto-Agar, autoklaviert
	10	ml	Ampicillinlösung
LB-Medium	10	g/l	NaCl
	10	g/l	Caseinhydrolysat
	5	g/l	Hefeextrakt
			pH 7,4; autoklaviert
Ligationspuffer 10x	0,5	М	Tris/HCl pH 7,5

	0,1	Μ	MgCl ₂
	50	mМ	DTT
Lösung 1	25	mM	Tris/HCl, pH 7,9
Plasmid-Minipräparationen	50	mМ	Glucose
	10	mМ	EDTA
Lösung 2	0,2	М	NaOH
Plasmid-Minipräparationen	1	%	SDS
Lösung 3	3	М	Kaliumacetat, pH 4,8
Plasmid-Minipräparationen			
Messlösung Rb ⁺ 50mM	50	mM	RbCl
Oocyten	50	mМ	NaCl
	2	mМ	CaCl ₂
	1	mМ	MgCl ₂
	5	mМ	HEPES
			pH 7.2 (NaOH)
Mg ²⁺ -Lösung	2	М	MgCl ₂ (1M)
kompetente Zellen			$MgSO_4$ (1M)
MgCl ₂ -Lösung	50	mM	MgCl ₂
PCR			GibcoBRL
MOPS-Puffer (10x)	200	mM	MOPS, pH 7.0
in-vitro Transkription	10	mМ	EDTA, pH 8.0
	50	mМ	Natriumacetat, pH 4.8
N2-Puffer	100	mM	Tris
Plasmid-Midipräparationen	15	%	Ethanol
	900	mМ	KCl
			pH 6,3 (mit H ₃ PO ₄)
N3-Puffer	100	mM	Tris
Plasmid-Midipräparationen	15	%	Ethanol
	1150	mМ	KCl

			pH 6,3 (mit H ₃ PO ₄)
N5-Puffer	100	mM	Tris
Plasmid-Midipräparationen	15	%	Ethanol
	1000	mМ	KCl
			pH 8,5 (mit H ₃ PO ₄)
OR2-Lösung	82,5	mM	NaCl
Oocyten	2	mМ	KCl
	1	mМ	MgCl ₂
	5	mМ	HEPES
			pH 7.5 (NaOH)
PCR-Puffer 10x (Taq)	200	mM	Tris/HCl, pH 8,4
	500	mМ	KCl
			GibcoBRL
Pfu DNA-Polymerease reaction buffer	200	mM	Tris/HCl, pH 8,8
10x	20	mМ	MgCl ₂
	100	mМ	$(NH_4)_2SO_4$
	100	mМ	KCL
	1	%	Triton X-100
	1	mg/ml	nucleasefreies BSA
			Stratagene
Restriktionspuffer A 10x	0,33	М	Tris/Ac pH 7,9
	0,1	М	MgAc
	0,66	М	KAc
	5	mМ	DTT
Restriktionspuffer B 10x	0,1	М	Tris/HCl pH 8,0
	0,05	М	MgCl ₂
	1	М	NaCl
	0,01	М	Mercaptoethanol

Restriktionspuffer H 10x	0,1	Μ	Tris/HCl pH 7,5
	0,1	М	MgCl ₂
	1	М	NaCl
	0,01	М	DTE
Restriktionspuffer M 10x	0,1	М	Tris/HCl pH 7,5
	0,1	М	MgCl ₂
	0,5	М	NaCl
	0,01	М	DTE
Restriktionspuffer R 10x	0,1	М	Tris/HCl pH 8,5
	0,1	М	MgCl ₂
	1	М	NaCl
Restriktionspuffer Y 10x	0,33	М	Tris/Ac pH 7,9
-	0,1	М	MgAc
	0,66	М	KAc
Ribonukleotid-Mix (2x)	15	mM	ATP
	15	mМ	СТР
	15	mМ	UTP
	3	mМ	GTP
	12	mМ	CAP-Analogon
RNA-Gel Premix-Puffer	25	mM	MOPS-Puffer
RNA-Gel	22,6	% (v/v)	Formaldehyd (37%)
	64,5	% (v/v)	Formamid
	,		
RNA-Probenpuffer	95	% (v/v)	Formamid
RNA-Gel	0,5	% (w/v)	EDTA
	0,025	% (w/v)	SDS
	0,025	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,025	% (w/v)	Xylenxyanol
	, -		
S1-Puffer	50	mM	Tris/ HCL, pH 8

Plasmid-Midipräparationen	10	mM	EDTA
	100	µg/ml	RNAse A
S2-Puffer	200	mM	NaOH
Plasmid-Midipräparationen	1	%	SDS
S3-Puffer	2.8	M	Kaliumacetat, pH 5.1
Plasmid-Midipräparationen	2,0		
SDS 20%	200	g	Sodium dodecyl sulfate
SOB-Medium	20	g/l	Bacto-Trypton
	5	g/l	Hefeextrakt
	0,5	g/l	NaCl
	10	ml/l	KCl, pH 7,0; autoklaviert
	10	mM	MgCl ₂
	10	mM	MgSO ₄
TAE-Puffer (50x)	40	mM	Tris
DNA-Gel	10	mM	Essigsäure
	1	mM	EDTA, pH 7,5
Taq-Polymerase-Puffer $(5 \times)$	100	mM	Tris/HCl pH 8,4
	250	mM	KCl
	1,3	mM	MgCl ₂
T4-Polymerase-Reaktionspuffer	50	mM	NaCl
	10	mM	Tris-HCl pH 7.9
	10	mM	MgCl ₂
	1	mM	Dithiothreitol
TB-Puffer	3	g/l	Pipes
kompetente Bakterien	2,2	g/l	CaCl ₂
A	18.6	g/l	KCl
	10.9	g/l	MnCl ₂ , pH 6.7
		6-	- 27 F - 27
	1	1	1

TE (1×)	10	mM	Tris/HCl pH 7,4
	1	mM	EDTA
Wash Puffer	10	mM	Tris-HCl pH 8,0
DNA-Reinigung	1	mM	EDTA

3 Molekulargewichtstandards

Smart DNA Ladder	14 Banden von 200-1000 bp	
	(Eurogentec)	
100 bp DNA Ladder	12 Banden von 100-1517 bp	
RNA Ladder, High Range	8 RNA-Transkripte der Grössen 200,500,1000, 1500, 2000,	
	3000, 4000 und 6000 b.	
	(Fermentas)	

4 Vektoren

pBluescript KS+	Klonierungsvektor	
	(Stratagene)	
pGEM HE Jul	RNA-Transkriptionsvektor (Liman et al., 1992)	
	(modifiziert in Jülich, zur Verfügung gestellt von Dr. Tytgat).	

5 Bakterienstämme

Es wurde der folgende *Escherichia coli* Stamm (Stratagen) verwendet:

XL 1-blue recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 $lac [F'proAB lacI^{q}Z\Delta M15 Tn10 (tet^{R})]^{C}$

IV Methoden

1 Molekularbiologische Methoden

1.1 Handhabung von Bakterienstämmen

1.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

(Inoue *et al.*, 1990)

Ein Aliquot einer bei -70°C gelagerten Bakterienkultur wurde auf einer LB-Platte mit passendem Antibiotikum ausgestrichen und ü. N. bei 37°C inkubiert. 2×125 ml SOB-Medium wurden mit je 5-6 Kolonien angeimpft, hinzugefügt wurden jeweils 1,25 ml einer 2 M Mg²⁺- Lösung. Weiteres Wachstum der Kulturen bis zu einer Zelldichte, die einem OD₆₀₀--Wert im Bereich 0,4-0,6 entspricht, erfolgte ü. N. in einem Wärmeluftschüttler bei 22-25°C mit 25 Upm. Die Bakterien wurden dann in 50 ml Greiner-Röhrchen umgefüllt, 10 min auf Eis abgekühlt und danach in der Zentrifuge *Sigma 2K15* (10 min, 4°C, 3500 Upm, HS-4 Rotor) pelletiert. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurden die Pellets in je 16 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis gekühlt. Für eine erneute Zentrifugation (10 min, 4°C, 3500 Upm, HS-4 Rotor) wurde die Bakteriensuspension in 50 ml Greiner-Röhrchen vereinigt. Die Pellets wurden darauf in je 8 ml TB-Puffer aufgenommen und mit 600 μ l DMSO versetzt (DMSO-Endkonzentration: 7%). Nach 10 min Inkubation auf Eis erfolgte die Aufteilung der Suspension in 200 μ l Aliquots. Diese wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die Kompetenz der Bakterien wurde durch die Transformation definierter Mengen an Plasmid-DNA getestet.

1.1.2 Transformation von Bakterien

(Sambrook et al., 2001)

Ein Ligationsansatz (1.5.5) wurde zu 100 μ l aufgetauten kompetenten Bakterienzellen (1.1.1) gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C, danach erneut Inkubation auf Eis für 5 min. Die transformierten Zellen wurden auf LB/ampbzw. LB/Spec-Platten ausplattiert und ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bei Retransformationen wurde eine geringere Menge kompetenter Zellen (20 μ l) mit 100-500 ng Plasmid-DNA aus einer Mini- (1.2.1) oder Midi-Präperation (1.2.2) versetzt. Vor dem Ausplattieren erfolgte eine Inkubation auf Eis für 5 min.

1.2 Isolierung und Reinigung von DNA

1.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus 3 ml E. coli-Kulturen (Miniprep)

(Birnboim und Doly, 1979; Sambrook et al., 2001)

3 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 μ l/ml) wurden mit einer Einzelkolonie des plasmidtragenden E. coli-Stammes angeimpft und ü. N. bei 37°C und 225 Upm im Wärmeschüttler hochgezogen. Es folgte die Pelletierung von 1,5 ml ü.N-Kultur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (14000 Upm, 5 min, RT). Der Überstand wurde dann mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entfernt und das Pellet in 150 μ l Lösung 1 durch Vortexen resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren, wurden 200 μ l Lösung 2 hinzugefügt, durchgemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 μ l Chloroform und Neutralisation mit 150 μ l Lösung 3 wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (14000 Upm, 10 min, RT) wurden die gefällte bakterielle DNA und Proteine entfernt. Die wässrige Phase wurde dann in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml absoluten Ethanol überführt und die Plasmid-DNA durch Zentrifugation (14000 Upm, 4 min, RT) pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 500 μ l eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen, gefolgt von eine Zentrifugation (14000 Upm, 5min, RT). Im Anschluss wurde das Ethanol entfernt und das Pellet an der Luft für 15 min getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 20 μ l H2O aufgenommen und bei +4°C gelagert.

1.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus 50 ml Kulturen (Midiprep)

(Macherey und Nagel, 1998)

Die Präparation wurde mit dem Nucleobond®AX System von Macherey und Nagel durchgeführt.

50 ml LB/amp-Medium wurden mit einer Einzelkolonie des plasmidtragenden E. coli-Stammes angeimpft und ü. N. bei 37 °C und 25 Upm im Wärmeschüttler inkubiert. Die Bakterienkultur wurde in 50 ml Greinerröhrchen überführt und in einer Sigma-Zentrifuge (6000 Upm, 6 min, 4 °C) pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 4 ml Puffer S1 resuspendiert, 4 ml Puffer S2 hinzugefügt und durch mehrfaches Invertieren des Röhrchens vorsichtig gemischt. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension mit 4 ml Puffer S3 versetzt, wiederum vorsichtig gemischt und für 5 min auf Eis gestellt. Mit einer Zentrifugation (8000 Upm, 25 min, 4°C) wurden die präzipitierte genomische Bakterien-DNA sowie anderer Zellbestandteile sedimentiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde dann durch Filterpapier auf eine zuvor mit 2 ml Puffer N2 äquilibrierte Nucleobond®AX 100 Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 4 ml Puffer N3 gewaschen, danach erfolgte die Eluierung der Plasmid-DNA mit 4 ml Puffer N5. Mit den ersten 350 µl N5 wurde der verbliebene Puffer N3 aus der Säule gespült und verworfen, die übrigen 3650 µl N5 wurden auf drei 2 ml Eppendorf-Gefäße verteilt. Durch Zugabe von je 935 µl (0,8 vol) Isopropanol wurde die DNA gefällt. Nach Zentrifugation (8000 Upm, 30 min, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig entfernt. Die Pellets wurden mit 1 ml eiskaltem 70% tigen Ethanol gewaschen und anschließend mit Hilfe einer Mikropipette in einem Eppendorf-Gefäß vereint. Nach einer erneuten Zentrifugation (14000 Upm, 15 min, RT) und vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurde die DNA 15 min an der Luft getrocknet und anschließend in 30 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt (3.3.1) und auf 1 μ g/ μ l verdünnt.

1.2.3 Ethanolpräzipitation von DNA

(Sambrook et al., 2001)

Eine wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit 1/10 vol. 3M Natriumacetat und 3 vol. 100% tigem Ethanol versetzt und bei -20°C mindestens 1 Std. gefällt. Danach wurde die DNA pelletiert (14000 Upm, 4°C, 30 min) und mit 500 μ l 70% igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung an der Luft wurde das Pellet in TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

1.2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

(Vogelstein und Gillespie, 1979; GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit Handbuch)

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit von Amersham Biosciences verwendet

Nach der Gelelektrophorese (1.8.1) wurden die DNA-Banden mit UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht. Die gewünschte Bande wurde separat aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und mit 100 μ l Capture Puffer (Amersham) für je 100 mg Gel versetzt. Der Ansatz wurde dann für 10 min unter Schütteln bei 60 °C inkubiert. und danach in eine GFX-Säule mit Glasfaser-Matrix überführt. Nach Zentrifugation in einer Eppendorfzentrifuge befand sich der Durchfluss in einem Auffangröhrchen, die an der Säulen-Matrix gebundene DNA wurde durch Zugabe von 500 μ l Waschpuffer und wiederholte Zntrifugation (s.o.) gewaschen. Zur Elution der DNA von der Säule wurden 10-50 μ l Wasser direkt auf die Säule gegeben. Nach einer Minute wurde die GFX-Säule in ein Eppendorf-Gefäß platziert und die DNA-Lösung durch Zentrifugation (14000 Upm, RT, 60 s) in dieses überführt. Die Menge der isolierten DNA konnte dann, nach Gelelektrophorese eines 1-3 μ l Aliquots, durch den Vergleich mit einem Mengenstandard geschätzt werden (1.4.2).

1.2.5 Mikrodialyse von DNA

Die Mikrodialyse wurde eingesetzt, um niedermolekulare Substanzen und Salze aus wässrigen DNA-Lösungen zu entfernen. Ein Anwendungsbeispiel ist der sequentielle Doppelverdau (1.5.1), wenn für das zweite Restriktionsenzym der Puffer neu eingestellt werden muss. Der Reaktionsansatz wurde auf einen Mikrodialysefilter (Nitrozellulose, Porengröße 0.025 μ m, Ø 13 mm, White VSWP) pipettiert und die Dialyse 20 min gegen bidestillertes H2O durchgeführt. Nach 20 min wurde der Reaktionsansatz wieder abgenommen und weiterverwendet.

1.3 RNA-Synthese durch in vitro Transkription

Miligan et al., 1987)

Es wurde das mMESSAGE mMACHINE in vitro-Transkriptionssystem (Ambion) verwendet.

Die verwendeten Glas- und Metallgeräte wurden ü.N. bei 240 °C erhitzt, wässrige Lösungen mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt und Einweggeräte aus gesondertem Vorrat benutzt. 4 μ g des Plasmids mit der Ziel-cDNA als Insertion wurden in 100 μ l Reaktionsvolumen linearisiert, extrahiert (1x Phenol-, 1x Chloroform-Extraktion) und gefällt (Zusatz von (1/10 Vol. 3M Natriumacetat pH 4,8 und 3Vol. Ethanol 100%, 1h, -20 °C). Nach Zentrifugation (15000x g, 4, 20 min) und Waschen mit 70% igem Ethanol wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 6.5 μ l RNase-freiem Wasser aufgenommen. 0.5 μ l der Lösung wurden zur Überprüfung der Linearisierte DNA, 2 μ l T7-Polymerase-Enzym-Mix (Ambion), 2 μ l Transkriptionspuffer (Ambion) und 10 μ l T7-NTP/CAP-Mix, Nach der RNA-Synthese (1-2h, 37 °C) und Zusatz von DNase I (1 U, 15 min, 37 °C) wurde die RNA Phenol-Chloroform-extrahiert und danach gefällt. (s.o.). Das RNA-Pellet wurde gewaschen, luftgetrocknet und in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Es wurden Aliquots zur Quantifizierung durch Floureszenzmessung (1.4.3) und zur gelelektrophoretischen Überprüfung der Qualität (1.8.2) entnommen.

1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

1.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Nach Mini- bzw Midipräparationen (1.2.1-2) konnte die Konzentration an DNA photometrisch durch die Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt werden. Ein gemessener OD260-Wert von 1 entspricht einer Konzentration von 50 μ g/ μ l dsDNA, im Fall von ssDNA einer Konzentration von 33 μ g/ μ l. Zusätzlich kann über das Verhältnis OD260/OD280 die Reinheit der DNA-Präparation bestimmt werden. Während die Basen der

Nukleinsäure ihre Absorptionsmaxima im Bereich von 260 nm haben, absorbieren aromatische Aminosäureseitenketten bei 280 nm. Der Idealwert von OD260/OD280 für Plasmid-DNA liegt bei 1,8 und zeigt an, dass wenig Verunreinigung mit Proteinen vorliegt. Zusätzlich zeigen OD260/OD280-Werte um 1,5 einen vermehrten Anteil an Nukleotiden und Werte um 2,0 eine erhöhte Konzentration an doppelsträngiger DNA an. Die Messung erfolgte nach 100facher Verdünnung der DNA-Probe mit H₂O in einer Quarzküvette. Als Referenz diente reines Wasser.

1.4.2 Vergleich mit einem Mengenstandard

Nach Extraktion von DNA aus Agarosegelen (1.2.4) konnte die Ausbeute mit Hilfe eines Mengenstandards bestimmt werden. Dazu wurde eine erneute Gelelektrophorese mit 1-3 μ l Aliquots der DNA-Lösung und einem Mengenstandard (Kb-DNA Ladder, STRATAGENE) durchgeführt. Anhand eines Vergleiches der Intensitäten der Banden unter UV-Licht konnte die DNA-Konzentration des Eluats grob abgeschätzt werden.

1.4.3 Konzentrationsbestimmung von RNA durch Floureszenzmessungen

(RiboGreen RNA *Quantification Reagent and Kit product information sheet*, Molecular Probes, 1997)

Die Konzentration von *in vitro* transkribierter RNA wurde mit dem RiboGreen RNA Quantification Kit (Molecular Probes) bestimmt.

Mit Hilfe der mitgelieferten Standard-RNA (16S und 23S rRNA, E. coli) wurde eine Eichkurve erstellt. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen in 1 ml TE-Puffer mit 1 ml RiboGreen-Reagenz (1:2000 in TE-Puffer) versetzt und 3-5 min lichtgeschützt inkubiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei ex = 480 nm und λ em 520 nm. (Quarzküvette Schichtdicke 1 cm, Perkin Elmar LS 50B). Zur Konzentrationsbestimmung der Probe wurden verschiedene Verdünnungen der RNA-Lösung eingesetzt und die entsprechenden Werte aus der Eichkurve ermittelt.

1.5 Enzymatische Modifikationen von DNA

1.5.1 Restriktion von DNA

(Sambrook et al., 2001)

Eine bestimmte Menge DNA wurde zusammen mit der gewünschten Restriktionsendonuclease in einem für das Enzym geeigneten Restriktionspuffer (1x Verdünnung) für 1 Std. inkubiert. Die für die Reaktion optimale Inkubationstemperatur sowie die Wahl des Reaktionspuffers richteten sich nach den Herstellerangaben für das jeweilige Enzym. Die erforderliche Menge an Enzymaktivität konnte mit der folgenden Formel abgeschätzt werden:

Benötigte Einheiten U (Units) = $\frac{\text{Länge der }\lambda\text{DNA}}{\text{Länge der }x\text{DNA}} \times \frac{\text{Anzahl der Schnittste llen in }\times\text{DNA}}{\text{Anzahl der Schnittste llen in }\lambda\text{DNA}} \times \text{Menge an xDNA}$

xDNA (μg): Ziel-DNA der Restriktion

In der Regel ist eine Aktivitätseinheit (U) definiert als die Menge des Restriktionsenzyms, die nötig ist, um 1µg λ -DNA in 1 Std. vollständig zu verdauen. In einigen Fällen bezieht sich U auch auf andere DNA-Standards, deren Länge und Anzahl an Schnittstellen dann stellvertretend für die des λ -Standards berücksichtigt werden müssen. Bei Verwendung von DNA aus Mini-Präperationen (1.2.1) wurde den Restriktionsansätzen 0.5 µl RNAase (2 mg/ml) zugefügt. Als Alternative kann die Mini-Präperation direkt mit RNAse behandelt werden. Gleichzeitiger Verdau mit zwei Enzymen konnte nur bei ausreichender Übereinstimmung der jeweils erforderlichen Reaktionsbedingungen durchgeführt werden. Im Fall von Pufferunverträglichkeiten wurde zwischen den beiden sequentiellen Verdauen eine Mikrodialyse gegen H2O (1.2.5), oder eine Ethanolpräzipitation (1.2.3) durchgeführt. Die Reaktionen wurden, wenn möglich, durch Hitzeinaktivierung (10 min, 75°C) der Enzyme gestoppt und, nach Zugabe einer entsprechenden Menge 5× Laufpuffers, gelelektrophoretisch getrennt (1.8.1)

1.5.2 Auffüllreaktion an überhängenden Enden

DNA-Polymerasen ohne 3'-5' Exonukleasefunktion erzeugen häufig überhängende Nukleotide (meist ein Adeninrest). an PCR-Produkten. Für eine Klonierung in Vektoren müssen diese aufgefüllt bzw. entfernt werden. Dazu wurden 1-5 µl des elektrophoretisch aufgetrennten und danach isolierten Fragments (1.8.1) mit T4-DNA-Polymerase behandelt. Die PCR-Produkte wurden mit je 10 nmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 1 U T4-DNA-Polymerase in T4-Reaktionspuffer (biolaps) inkubiert (1h, 37 °C). Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms (10 min, 75°C) wurde die DNA mittels Gelelektrophorese gereinigt.

1.5.3 Phosphorylierung von PCR-Produkten

(Sambrook et al., 2001)

Eine Phosphorylierung wurde durchgeführt, um DNA-Fragmente mit fehlenden 5'-terminalen Phosphatgruppen (z.B. PCR-Produkte der Pfu-Polymerase) für Ligationen (1.5.5) vorzubereiten.

1 µg Ziel-DNA wurde zusammen mit 2 µl Kinasepuffer, 0,5 ATP (10 mM) und 8 U T4-Polynukleotidkinase in einem 20 µl- Ansatz bei 37°C für 1 Std. inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms (10 min, 65 °C) wurde die phosphorylierte DNA durch Gelelektrophorese (1.8.1) gereinigt.

1.5.4 Dephosphorylierung von Vektoren

(Sambrook et al., 2001)

Die Dephosphorylierung von Vektor-DNA, die mit nur einem Restriktionsenzym linearisiert oder mit glatten Enden (blunt end) produzierenden Enzymen verdaut wurde, hatte das Ziel, eine Religation des Vektors während einer Ligationsreaktion (1.5.5) zu verhindern. Im Anschluß an den Verdau wurden zu einem 20 μ l Ansatz 3 μ l 10x AP-Puffer und 1 U alkalische Phosphatase/50 pmol 5'-Enden gegeben und dann bis zu einem Endvolumen von 30 μ l mit Wasser aufgefüllt. Inkubation erfolgte für 1 Std. bei 37°C. Das Enzym wurde durch Hitzebehandlung (10 min, 65°C) inaktiviert und die dephosphorylierte DNA durch Gelelektrophorese (1.8.1) gereinigt.

1.5.5 Ligation

(Sambrook et al., 2001)

Die geschnittene Vektor-DNA wurde mit einem dreifachen molaren Überschuss an Fragment-DNA in 1x Ligationspuffer mit 1U T4-DNA-Ligase inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug wahlweise 2 oder 3 Std. bei Raumtemperatur.

1.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

1.6.1 Klonierung durch Fragmentaustausch

Das rekombinante PCR-Produkt wurde mit ausgewählten Restriktionsenzymen verdaut (1.5.1) und das Ziel-Fragment isoliert (1.8.1). Nach Restriktionsverdau des Vektors wurde das herausgefallene Fragment in der Ligationsreaktion durch das Ziel-Fragment ersetzt. Wenn zwei kompatible Enden im Akzeptormolekül durch den Verdau mit einem Restriktionsenzym oder der Generierung von glatten Enden (blunt ends) erzeugt wurden, war vor der Ligation (1.5.5) eine Dephosphorylierung (1.5.4) notwendig.

1.7 In vitro-Mutagenese

(Ho et al, 1989)

Punktmutationen und rekombinante DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der PCR-Technik erzeugt.

1.7.1 Aminosäureaustausch via Overlap-PCR

Zuerst wurden separat zwei PCR-Fragmente als Zwischenprodukte hergestellt. Die Reaktionen erfolgten mit zwei komplementären Oligonukleotiden, die die Punktmutation enthielten und zwei spezifischen Oligonukleotiden die an Regionen in den beiden DNA-Abschnitten binden, die die Zielstelle der Mutation flankieren. Die Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgereinigt (1.8.1) und als Matrize in äquimolaren Mengen in eine dritte PCR-Reaktion eingesetzt. In dieser Reaktion erfolgte eine Hybridisierung der Fragmente in ihrem überlappenden Bereich und eine Synthese des mutierten DNA-Moleküls mit den beiden spezifischen Oligonukleotiden aus den Start-Reaktionen. Das die Mutation enthaltende PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgereinigt (1.8.1) und in Klonierungen eingesetzt.

1.7.2 Herstellung rekombinanter DNA-Fragmente

Ziel war es, einen definierten DNA-Abschnitt in einem DNA-Fragment 1 zu deletieren und dafür ein DNA Fragment 2 einzusetzen.

Zuerst wurde in einer PCR-Reaktion das DNA-Fragment Nr. 2 amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide besitzen am 5'-Ende Regionen, die komplementär zu den später an Fragment 2 anschließenden Enden von Fragment 1 sind. In zwei separaten PCR-Reaktionen wurde Fragment 2 zusammen mit einem Konstrukt, dass Fragment 1 enthält als Matrize eingesetzt. Amplifiziert wurde jeweils mit einem rekombinanten Primer aus der ersten Reaktion und einem Primer, der spezifisch an eines der äußeren Enden von Fragment 1 bindet. Als Ergebnis wurde Fragment 2 an die beiden im rekombinanten Fragment enthaltenden Abschnitte von Fragment 1 angehängt. In einer weiteren PCR wurden die neuen Zwischenprodukte in einem äquimolaren Verhältnis als Matrize eingesetzt. In dieser Reaktion erfolgten eine Hybridisierung der Fragmente in ihrem aus Fragment 2 bestehenden überlappenden Bereich und eine Synthese des gesamten rekombinanten DNA-Moleküls mit den an den äußeren Enden von Fragment 1 hybridisierenden Oligonukleotiden. Das rekombinante PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgereinigt(1.8.1) und in Klonierungen eingesetzt.

1.8 Agarosegelelektrophorese

1.8.1 Gelelektrophorese von DNA

(Sambrook et al., 2001)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach Größe der Fragmente in 1-2% igen Agarosegelen (Sambrook et al., 1989, Tab. 6.1). Um ein Gel der Größe von 80 cm² herzustellen, wurde die Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht. Vor dem Ausgießen wurde als Nachweismittel Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 $\mu g/\mu l$ zugefügt. Die Elektrophorese erfolgte in Gelelektrophoresekammern (AGS) mit 1x TAE als Laufpuffer bei einer Spannung von 70-120V und einer Laufdauer von 30-60 min. Danach wurde das Resultat mit Hilfe des Geldokumentationssystems BioDocTM II ausgewertet.

1.8.2 Gelelektrophorese von RNA

Ein Aliquot der RNA-Lösung wurde in 19 μ l Premixpuffer aufgenommen und denaturiert (5 min 65 °C, 1 min Eis). Die Auftrennung erfolgte nach Zugabe von 5 μ l RNA-Probenpuffer in einem Agarosegel (Agarose 1% (w/v) in MOPS-Puffer, Formaldehyd 2 M f.c., Formamid 10% (v/v) f.c.). Als Laufpuffer diente MOPS-Puffer mit 0.5 μ g/ml Ethidiumbromid als Nachweisreagenz. Bei einer Spannung von 80 V betrug die Trenndauer 60-90 min.

1.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die spezifische Amplifikation von durch die Primerabstände definierten DNA-Fragmenten. In dieser Arbeit wurde sie zur Modifikation von DNA-Sequenzen eingesetzt.

1.9.1 Standard PCR Reaktion

(Saiki et al., 1988)

Ein typischer Standard PCR Reaktionsansatz (50 µl Endvolumen) ist aus den folgenden Bestandteilen zusammengesetzt.

Matritze: Plasmid-DNA	20-50	ng
Oligonukleotid (+) 10 pMol	2	μl
Oligonukleotid (-) 10 pMol	2	μl
dNTPs (20 mM)	0.5	μl
PCR-Puffer (10x)	5	μl
TurboPfu-Polymerase (5 U/µl)	1	μl
H ₂ 0	ad 50	μl

Es wurden ausschließlich PCR-Blöcke mit Vorrichtungen zur Beheizung der Deckel der Reaktionsgefäße verwendet, um ein ungleichmäßiges Erhitzen der Probe verhindern. Bei PCR-Blöcken ohne diese Funktion wäre das Überschichten des Ansatzes mit 1-3 Tropfen Mineralöl vor der Reaktion notwendig gewesen.

Alle PCR-Reaktionen wurden in 500 µl PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Als Reaktionsstart erfolgte die vollständige Denaturierung der Matrizen-DNA bei 94°C. Die Inkubationszeit von 5-10 min richtete sich nach der Komplexität der Matrizen-DNA. Zur Amplifikation wurden dann die folgenden Temperaturschritte in 20-35 Zyklen durchlaufen:

Denaturierung	94 °C	0,5-2	2 min
Anlagerung	$T_m - 4 \ ^\circ C$	1-2	min
DNA-Polymerisation	72 °C	1	min/kb

Die Schmelztemperatur T_m ist die Temperatur, bei der 50% der Oligonukleotide unhybridisiert vorliegen. Sie kann mit folgender Formel für das einzelne Oligonukleotid näherungsweise berechnet werden:

 $T_m = 4x (G + C) + 2x (A+T)$

Im Idealfall sollten beide Primer eine übereinstimmende T_m haben. War dies nicht der Fall, erfolgte die Hybridisierung bei der niedrigeren Temperatur.

1.9.2 Hot start PCR

(Chou et al., 1992)

Im Fall von komplexen Matrizen, z.B. genomische DNA, wurde die Polymerase erst 2 min nach Beginn des Denaturierungsschrittes am Start der Reaktion bei 94 °C zugefügt. So wurden unspezifische Interaktionen zwischen Oligonukleotid und Matrize während der Aufwärmphase verhindert, die in den Folgereaktionen zur Amplifikation unerwünschter nichtspezifischer Produkte führen konnten.

1.9.3 Nested PCR

(Novati et al., 1992; Zazzi et al., 1992)

Eine Nested PCR wurde mit Primern durchgeführt, deren Bindungsstellen innerhalb der Sequenz eines zuvor amplifizierten PCR-Produktes lagen. Als Matrize wurde entweder ein Aliquot aus der ersten PCR-Reaktion (0,5–1 μ l), oder ein über Gelelektrophorese isoliertes PCR-Fragment (1-5 μ l) eingesetzt. Auf diese Weise konnte ein erwünschtes Fragment mit hoher Spezifität aus einer mit Nebenprodukten verunreinigten primären PCR amplifiziert werden.

1.9.4 PCR auf einzelnen Bakterienkolonien

Bei diesem Verfahren zur Selektion positiver Klone wurden einzelne Bakterienkolonien mit einer sterilen Mikropipettenspitze von der LB/Amp-Platte abgenommen und in 20 μ l bidestilliertem H2O resuspendiert. 10 μ l der Bakteriensuspension wurden als Matrize für eine PCR-Reaktion (1.9) eingesetzt. Bei Nachweis des gewünschten DNA-Fragments wurde mit den restlichen 10 μ l der Suspension 50 ml LB-Medium für eine Midiprep (1.2.2) angeimpft.
1.10 Sequenzierung von DNA

(Sanger *et al*., 1977)

0,5 µg Plasmid-DNA wurde mit 10 pmol Oligonukleotid versetzt und mit 8 µl destillierten H2O und 4 µl Big Dye Terminator-Sequenzier-Premix auf ein Endvolumen von 12 µl aufgefüllt. Mit dem Ansatz wurde dann eine PCR-Reaktion mit 25 Zyklen durchgeführt:

- 94 °C 2 min 94 °C 30 s
- 50 °C 1 min
- 60 °C 4 min

Nach Zugabe von H2O ad 100 μ l wurde im selben Reaktionsgefäß eine Ethanolfällung (1.2.3) durchgeführt. Das Pellet wurde in 20 μ l Template Suppression Reagent (TSR) aufgenommen, und nach Denaturierung (95 °C, 2 min) direkt auf Eis gestellt. Die Sequenzierung wurde mir einem ABI PRISM DNA Analyser 310 von (Perkin Elmer) durchgeführt. Die zur Auftrennung verwendete Kapillare (47 cm, 50 μ m) war mit der Polymatrix POP–6TM (Performance optimized polymer-6, PE) gefüllt. Die Injektionszeit betrug 30s bei einer Injektionsspannung von 4 kV. Die Laufspannung war 15 kV bei einer Lauftemperatur von 50 °C. Als Laufpuffer wurde 1x Genetic Analyser buffer mit EDTA verwendet.

1.11 Computergestützte Sequenzanalysen

Analysen von DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem GCG-Programmpaket (Wisconsin Package, Fa. Genetic Computer Group, Version 9, <u>www.gcg.com</u>) und Vector NTI Suite 7.0 (InforMax, Inc.) durchgeführt. Datenbankrecherchen wurden mit der BlastSearch-Funktion und dem PubMed-Server des NCBI (National Center for Biotechnology Information, <u>www.ncbi.nlm.nih.gov</u>) ausgeführt.

2 Zellbiologische Methoden

2.1 Handhabung von Xenopus laevis-Oocyten

2.1.1 Präperaton von Xenopus laevis-Oocyten

(Goldin, 1992)

Zur chirurgischen Entnahme von Xenopus laevis-Oocyten wurde der Frosch zuerst mit 0.12% Trician (Sigma) anästhetisiert. Nach Überprüfung der Narkose wurde der untere Bauchraum auf einer Seite geöffnet und Teile des Ovars entnommen. Die Oocyten wurden während der weiteren Versorgung des Frosches in Ca^{2+} freier OR2-Lösung gelagert. Zur Entfernung der follikulären Zellen wurden die Oocyten mit Kollagenase A (1,3 mg/ml, Boehringer Mannheim) in Ca^{2+} freier OR2-Lösung inkubiert (Horizontalschüttler Stufe 1, RT, 2-4 h). Nach wiederholtem Waschen mit Ca^{2+} freier OR2-Lösung wurden die Oocyten selektioniert (Stadium IV und Stadium V) und in Gentamycin-Lösung überführt. ÜN-Inkubation der Oocyten erfolgte bei 18 °C.

2.1.2 Mikroinjektion von cRNA

(Stühmer, 1992)

Injektion der Oocyten erfolgte in Ca²⁺- freier OR2-Lösung. Stadium IV- und V- Oocyten wurden mit jeweils 50 nl cRNA-Lösung (1-5 ng cRNA/ Oocyte) injiziert. Anschließend wurden die Oocyten in Gentamycin-Lösung überführt und bei 18 °C inkubiert. Das Medium wurde täglich gewechselt und Oocyten schlechter Qualität ausgesondert. Die elektrophysiologische Messung der heterolog exprimierten Kanalproteine in den Oocyten erfolgte 1-3 Tage nach der Injektion.

3 Elektrophysiologische Methoden

3.1 Die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik

Zur elektrophysiologischen Analyse der in den Oocyten heterolog exprimierten Kanalproteine wurde die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik verwendet. Bei dieser Methode wird das Membranpotential der Zelle durch zwei intrazelluläre Mikroelektroden kontrolliert. Die erste Elektrode misst das aktuelle Membranpotential während durch die zweite Elektrode Strom das erwünschte Potential aufrechtzuerhalten. Das wird durch fließt, um einen Rückkopplungsschaltkreis im Operationsverstärker erreicht. Verursacht das Kommandopotential ein Öffnen von spannungsabhängigen Ionenkanälen, verändern sich der Membranwiederstand und damit auch das Membranpotential. Der Messparameter ist die Stromgröße, die zur Wiederherstellung des Soll-Potentials benötigt wird.

3.1.1 Die Zellmembram als RC-Glied

Figur 1 zeigt den vereinfachten equivalenten Stromschaltkreis der Zellmembran mit intrazellulären Messelektroden und Badelektroden. Der Eintrittswiederstand R_a beinhaltet hauptsächlich den Wiederstand der Elektrode (1 M Ω). Der Membranwiederstand R_m (1 M Ω) und die Membrankapazität C_m (100 nF) beziehen sich auf die für Oocyten gemessenen Durchschnittswerte. Der Serienwiederstand R_s befindet sich in Serie mit R_m und R_a zwischen Zellmembran und Badelektrode (1 K Ω).



Abb. 1: Vereinfachter equivalenter Stromschaltkreis der Zellmembran mit intrazellulären Messelektroden und Badelektroden. Weitere Erklärungen befinden sich im Text.

Der Strom I_m , der durch die Membran fließt, ist die Summe aus dem durch Ionenkanäle verursachtem Strom I_i und dem Kapazitätsstrom:

$$I_m = I_i + C \frac{dV}{dt}$$

Da in einem Voltage-Clamp Experiment die Änderung der Spannung sehr schnell erfolgt, erscheinen die Kapazitätsströme als kurze Spitzen am Anfang und Ende des Spannungspulses. Sobald das Potential konstant ist (dV/dt=0), wird der durch die Ionenkanäle vermittelte Strom frei von Kapazitätsströmem gemessen.

Das schematische Diagramm in Figur 2 zeigt stark vereinfacht den Aufbau eines Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Schaltkreises. Die Kontrolle des Membranpotentials erfolgt im Hauptverstärker. Das gemessene Membranpotential V_m wird hierzu mit dem Sollpotential V_c verglichen, die Differenz beider Potentiale um den Ertragsfaktor A verstärkt und durch den Eintrittswiederstand als Output V_0 zur Stromelektrode geschickt:

$$V_0 = A(E - V_m)$$

Bei Vernachlässigung des Serienwiederstands verteilt sich V_o auf den Eintrittswiederstand R_a (besteht aus Elektroden- und Cytoplasmawiederstand) und Membran:

$$V_0 = V_m + R_a I$$

Daraus ergibt sich:

$$V_m = V_c \frac{A}{1+A} - \frac{R_a I}{I+A}$$

Folglich gleicht sich das Membranpotential an das Sollpotential bei einem hohen Ertragsfaktor (bis zu 10000 möglich) an.

Die Messung des Membranpotentials erfolgt als Differenz zwischen der intrazellulären Spannungselektrode und einer Referenzelektrode in der Badlösung. Sie hat einen hohen Eingangswiederstand, um Stromfluss in ihr zu vermeiden.

3.1.2 Messung des Membranstroms

Der Membranstrom wurde in diesem Fall über eine Badelektrode gemessen die durch einen Strom-Spannungswandler eine virtuelle Erdung besitzt. Das funktioniert mit einer Rückkopplungsschleife, die einen Strom liefert, die dem Betrag des Membranstroms gleicht. Der Operatiosverstärker (OPA) liefert eine Spannung, die proportional zur Differenz des

Membranstroms Im und der Erde, aber viel größer als diese ist. Aufgrund des Spannungsunterschiedes zwischen den Punkten 1 und 2 muss Strom über den Rückkopplungswiederstand R_f fließen. An R_f entsteht somit eine Spannung, die proportional zum Membranstrom Im ist. Der Operationsverstärker besitzt einen sehr hohen Eingangswiederstand, daher kann der Strom nicht zurück in den OPA fließen, das Potential an der Badelektrode wird verändert und erfährt eine virtuelle Erdung.



Abb. 2: Vereinfachtes Schaltbild des Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Schaltkreises. Nähere Erläuterungen finden sich im Text.

3.1.3 Aufbau und Bestandteile der Messaparatur

Die Messaparatur war auf einer Metallplatte auf einem Tisch aufgebaut. Zur Beobachtung der Manipulationen innerhalb der Messkammer diente ein Binokular (WILD M3C, Heerbrugg). Die Messelektroden konnten durch an den Tisch magnetisch fixierten mechanischen Manipulatoren bewegt werden. Die Messkammer hatte ein Volumen von ca. 500 μ l. Die Badlösung konnte durch ein schwerkraftbetriebenes Perfusionssystem und einer mit Druckluft betriebenen Absaugvorrichtung innerhalb von 10 s ausgetauscht werden, wie die Bestimmung der Austauschrate durch den Wechsel zweier Lösungen mit unterschiedlicher K⁺-Konzentration zeigte.

Die Mikroelektroden wurden aus dünnwandigen Borsilikatglas-Röhrchen hergestellt. Die Glasröhrchen wurden mit Hilfe eines vertikalen Elektrodenziehgerätes in zwei Ziehschritten ausgezogen und die Spitzen unter optischer Kontrolle mit einer Microforge (Narishige) abgebrochen, bis der Durchmesser der Pipettenspitze 1.5-3 μ m betrug. Die Pipetten wurden mit 3M KCL-Lösung gefüllt. Der Elektrodenwiederstand lag zwischen 1-2 M Ω . Als Kontakt

dienten Elektroden aus Silberdraht, die durch eine Reaktion mit Cl_2 mit einer AgCl-Schicht überzogen waren. Als Badelektroden wurden Silberdrähte mit einem MgCl-Pellet benutzt.

Die gemessenen Signale wurden über den Vorverstärker an den Verstärker Oocyte-Clamp OC-725C (Warner Instrument Corp.)geschickt. Die Signale wurden durch einen Besselfilter im Bereich gefiltert. Zur Datenaufnahme war der Verstärker über eine ITC16-AD/DA-Schnittstelle mit einem Computer (Power Mac, Macintosh) verbunden, als Software diente das Programm PULSE (HEKA, Lambrecht). Das analoge Messsignal wurde bei 16 bit Auflösung mit Aufnahmefrequenzen von 1.70-5 kHz digitalisiert und auf die Festplatte gespeichert. Alle Messungen wurden in Hoch-Rubidium-Extrazellularlösung durchgeführt. Das Haltepotential war bei allen Experimenten -80 mV. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.2 Messlösungen und applizierte Substanzen

Für die Messungen befanden sich die Oocyten unter ständigem Durchfluss in einer extrazellulären Badlösung die wie folgt zusammengesetzt war (Alle Angaben in mM): NaCl 5, CaCl₂ 1, MgCl₂ 2, Rb⁺ 50, Hepes 5. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7.2 eingestellt. Der zu untersuchende Kanalblocker Pb²⁺ wurde der extrazellulären Messlösung als Chloridsalz zugesetzt. Als Vorrat wurde eine 10 mM PbCl₂-Lösung angesetzt. Da PbOH₂ ein sehr niedriges Löslichkeitsprodukt besitzt (Löslichkeitsprodukt Pb(OH)₂ = 1.43×10^{-20}), wurde der pH-Wert mit HCl auf 4 eingestellt um Präzipitation von Pb²⁺ als Bleihydroxid zu vermeiden. Mit der Stammlösung wurde die Pb²⁺-haltige Extrazellulär-Lösung vor jeder Messung neu hergestellt.

4 Datenerfassung und Auswertung

Für die Programmierung der Pulsprotokolle, Steuerung des Verstärkers und Aufnahme der Daten wurde das Programm PULSE (HEKA) verwendet. Die Stromaufnahmen wurden mit PULSFIT (HEKA) ausgewertet. Die Daten wurden mit Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA, USA) weiterverarbeitet. Alle Mittelwerte wurden mit Standardfehler angegeben.

Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Analyse von thermodynamischen Veränderungen der Aktivierung in Kanal-Mutanten: Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurde aus deaktivierenden Einwärtsströmen berechnet, die nach einer Serie von

Pulsen auf Spannungen unterschiedlicher Stärke durch Repolarisation zurück zum Ruhepotential erzeugt wurden. Die negativen Amplituden I_{tail} dieser Ströme konnten als direktes Maß für die Leitfähigkeit G verwendet werden. Die Werte der Leitfähigkeit G wurden auf die maximale Leitfähigkeit bei +60 mV (G_{max}) normalisiert und mit einer einfachen Boltzmannfunktion gefittet die den Übergang zwischen zwei Zuständen (geschlossen und offen) beschreibt. (V¹/₂: Potential der halbmaximalen Aktivierung, V_m: Membranpotential k: Steigungsfaktor):

$$\frac{G}{G_{\max}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_m - V_{1/2}}{k}}}$$

Der Steigungsfaktor k fast den Term RT/zF zusammen, F ist die Faraday-Konstante, R ist die Gaskonstante, T ist die Temperatur (Kelvin) und z ist die Anzahl der während der Aktivierung pro Kanal über die Membran verschobenen Ladung.

Die Differenz in der freien Gibbs Energie zwischen dem geschlossenen und offenen Zustand bei 0 mV (Δ G0) wurde nach folgender Gleichung berechnet:

 $\Delta G_0 = 0.2389 z F V_{1/2}$

Die durch die Mutationen verursachten Veränderungen in $\Delta G0$ ergaben sich als

$$\Delta \Delta G_0 = \Delta G_0^{mut} - \Delta G_0^{wt}$$

Aktivierungskinetik makroskopischer Ströme: Für die Bestimmung der Aktivierungskinetik wurden Stromspurfamilien durch Depolarisation auf Potentiale unterschiedlicher Stärke erzeugt und 10- 90% des maximalen Anstiegs der einzelnen Stromspuren zu Beginn des Testpotentials auf eine einfach-exponentielle Funktion gefittet.

(*I*: Strom, *A*: relative Amplitude, *t*: Zeit, *τ*: Zeitkonstante)

Deaktivierungskinetik makroskopischer Ströme: Tailströme wurden in 50 mM Rubidium aus der Repolarisation zum Ruhepotential (-80 mV) nach Vorpulsen verschiedener Stärke erzeugt. Die Kinetik der Tailströme wurde mit einem Fit einer exponentiellen Funktion mit einer Zeitkonstante beschrieben (vergl. Aktivierungskinetik).

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

(*I*: Strom, *A*: relative Amplitude, *t*: Zeit, *τ*: Zeitkonstante)

Analyse der Interaktion zwischen Kanal und Pb²⁺: Die Konzentrationsabgängigkeit der Pb²⁺-Bindung an KCNA1 wurde anhand der Fraktion des nichtinhibierten Tailstroms nach Applikation von verschiedenen Konzentrationen Pb²⁺ (0.1 μ M bis 50 μ M) bei einer Spannung nahe der Aktivierungschwelle (-40 mV) des Kanals bestimmt. Die so entstandene Konzentrations-Wirkungsbeziehung konnte mit einer Funktion beschrieben werden, die vier unabhängige Bindungsstellen annimmt.

$$\frac{I}{I_0} = \left(1 - \frac{\left[Pb^{2^+}\right]}{\left[Pb^{2^+}\right] + Kd}\right)^4$$

Um die Bindungsaffinität der Kanal-Mutanten zu bestimmen, wurden mindestens zwei verschiedene Pb^{2+} -Konzentrationen (2.5 und 10 μ M) eingesetzt. Die Gleichgewichts-Dissoziations-Konstante Kd wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$Kd = \left(\frac{1}{1 - (I/I_0)^{\frac{1}{4}}} - 1\right) [Pb2 +]$$

Für Kanal-Mutanten mit veränderten Aktivierungseigenschaften wurden die Pulsprotokolle in Bezug auf Testpulsdauer und Stärke angepasst. Die Testpulse sollten Tailströme erzeugen, die 10% der Stromamplitude des maximal aktivierten Kanals nicht überschreiten.

V Ergebnisse

1 Der Block von Kv1.1 durch Pb²⁺ ist spannungsabhängig

Zu Anfang wurde die Wirkung von Pb²⁺ auf Kv1.1 bei verschiedenen Membranpotentialen getestet. Der Kanal wurde mit Depolarisation von -60 mV bis +60 mV in 10 mV-Schritten mit einer Länge von 200 ms aktiviert. Repolarisierung auf -80 mV nach jedem Testpuls erzeugte einwärts gerichtete Tailströme. Abb. 1 zeigt die Aktivierungskurven der normalisierten Tailstromamplituden bei extrazellulärer Zugabe von 50 µM Pb²⁺. Pb²⁺ verschiebt die Öffnungswahrscheinlichkeit von Kv1.1 zu mehr positiven Potentialen hin. Fits mit einfachexponentiellen Boltzmannfunktionen zeigen, dass 50 µM Pb²⁺ eine Verschiebung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung (V¹/₂= -27.2 mV \pm 0.48 nach 0.0 mV \pm 0.46, n=4) um ~ +27 mV erzeugt. Die Steigung der Leitfähigkeits-Spannungskurve wurde ebenfalls beeinflusst. Der z-Wert wurde durch 50 μM Pb^{2+} von 3.9 \pm 0.25 auf 2.9 \pm 0.14 reduziert. Werden die Tailstromamplituden I_{tail} nach Pb^{2+} -Applikation auf die maximale Tailstromamplitude der Kontrolle normiert, kann man eine Abnahme der maximalen Leitfähigkeit um ~18% beobachten (Abb. 2b links). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der inhibierende Effekt von Pb²⁺ auf Kv1.1 bei niedrigen Testpotentialen nahe der Aktivierungsschwelle des Kanals (zwischen -40 und +10 mV) auf die Reduzierung des Stroms durch die Verschiebung der Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen hin zurückzuführen ist.



Abb. 1: Spannungsaktivierungskurven von Kv1.1wt in Abwesenheit (Kreise) und Anwesenheit von 50 μ M Pb²⁺ (Dreiecke). Die Kurven zeigen die Tailstromamplituden (I_{tail}) im Verhältnis zur maximalen Tailstromamplitude (I_{max}) der Kontrolle (links) und auf I_{max} normalisiert (rechts). Die durchgezogenen Linien kennzeichnen Fits mit einfachen Boltzmannfunktionen. Es ergaben sich Werte für das Spannungspotential bei halbmaximaler Aktivierung (V_{1/2}) und der Steigung der Kurve (z) für die Kontrolle von -27.2 mV ± 0.48 und 3.8 ± 0.25 und in Anwesenheit von 50 μ M Pb²⁺ von 0.0 mV ± 0.48 und 2.9. ± 0.14. Alle Symbole repräsentieren Mittelwerte ± SEM von 4 Oocyten.

2 Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.1 durch Pb²⁺

Es wurde der Effekt von extrazellulärem Pb²⁺ auf die Aktivierungskinetik von Kv1.1 untersucht. (Daten zur Verfügung gestellt von Madeja). Die Aktivierungkinetik der Kv1.1-Auswärtsströme wurde durch einen Fit von 90% des Stromanstiegs während der Aktivierungsphase mit einer einfach-exponentiellen Funktion quantifiziert. Die daraus resultierenden Aktivierungs-Zeitkonstanten τ_{act} sind in Abb. 2 als Funktion der Spannung aufgetragen. Die τ_{act} -Werte der Kontrollmessungen wie auch unter Einfluss von 50 µM Pb²⁺ sind stark spannungsabhängig und zeigen eine exponentielle Beschleunigung der Aktivierung



Abb. 2: Effekt von Pb²⁺ auf die Aktivierungskinetik von Kv1.1. Spannungsabhängigkeit der Aktivierungs-Zeitkonstanten in Kontrollmessungen (Kreise) und in Anwesenheit von 50 μ M Pb²⁺ (Rechtecke). Die Aktivierungs-Zeitkonstanten τ_{act} wurden durch einen einfach exponentiellen Fit von 90% des Stromanstiegs der Aktivierungsphase des Kanals nach Depolarisierung erhalten. Alle Symbole repräsentieren Mittelwerte ±SEM, n = 4. Die Daten wurden freundlicherweise von M. Madeja zur Verfügung gestellt.

Pb²⁺-Zugabe verlangsamt an. bei zunehmender Stärke der Testspannung den Aktivierungsverlauf. Der Effekt von 50 μ M Pb²⁺ entspricht einer Verschiebung der τ_{act} -Werte entlang der Spannungsachse um ~29 mV, unabhängig vom Testpotential. Das entspricht ziemlich genau der Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung von Kv1.1 zu positiven Potentialen in Anwesenheit von Pb²⁺ (vergl. Abb.1). Sie könnte deshalb eine Folge der verzögerten Aktivierungszeitspanne während der Kanalaktivierung sein. Offensichtlich stabilisiert Pb²⁺ einen geschlossenen Zustand von Kv1.1 und erschwert so die spannungskontrollierte Aktivierung und das Erreichen eines ionenleitenden Zustandes.

Wichtige Hinweise auf einen möglichen Mechanismus, dem die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv1.1 zugrunde liegen könnte, lieferte die Deaktivierungskinetik von Kv1.1. In Charakterisierung der Abbildung 3A sind Testpotentiale Tailstromspuren für einige nach Zugabe von verschiedenen Bleikonzentrationen abgebildet. Die untere Reihe zeigt dieselben Ströme nach Normierung auf die Spitzenamplitude der Kontrolle. Hier lässt sich deutlich eine Beschleunigung der Deaktivierung mit Zunahme der Pb²⁺-Konzentration erkennen. Dieser Effekt ist außerdem abhängig von der Größe des vorhergegangenen Testpotentials. Bei -40 mV wird eine Sättigung schon bei Anwesenheit von 2.5 µM Pb²⁺ erreicht, während bei einem Testpotential von -10 mV Zugabe von 50 µM Pb²⁺ noch eine beachtliche Zunahme der Beschleunigung der Tailkinetik hervorruft. Es wurden alle Deaktivierungszeitkonstanten (τ_{deact}) durch Fits mit einfach-exponentiellen Funktionen bestimmt und in Abb 3B gegen die Testpotentiale aufgetragen. Wie schon in Abb. 3A beobachtet, wird die Deaktivierungskinetik mit Zunahme der Pb²⁺-Konzentration deutlich schneller. Im Bereich von -10 mV bis 40 mV ist die Verminderung der τ_{deact} -Werte spannungsunabhängig. Sowohl die τ_{deact} -Werte der Kontrolle als auch τ_{deact} in Anwesenheit von Pb²⁺ steigen mit Testpotentialen zunehmender Stärke an und erreichen ein Plateau bei 30 bis 40mV. Bei niedrigen Potentialen (-40 mV bis -20 mV) sind die Verhältnisse komplizierter. Hier erreichen die τ_{deact} -Werte in Anwesenheit und Abwesenheit von Pb²⁺ ein Minimum, dabei kommt es bei hohen Pb²⁺-Konzentrationen (10-50 µM) zu einer Annährung der Deaktivierungskonstanten. Es kann aufgrund der Spannungsabhängigkeit der Pb²⁺-Effekte vermutet werden, dass die offene Kanal-Fraktion bei niedrigen Potentialen keine Pb²⁺-Ionen gebunden hat und daher eine ähnliche Kinetik wie der Kontrollstrom zeigt, während im Fall von stärkeren Depolarisationen auch Kanäle mit gebundenen Pb²⁺-Ionen und veränderter Kinetik öffnen. Diese Theorie würde für einen "gating-modifizierenden" Mechanismus der Pb²⁺-Inhibition sprechen, der für eine Klasse von Spinnentoxinen wie Hanatoxin (Grammostola spatulata), und Heteropodatoxin (Heteropoda venatoria) beschrieben wurde (Schwartz, et al., 1997; Sanguinetti et al., 1997). Dagegen macht dieses Verhalten einen Mechanismus der Kanal-Inhibition durch einen äußeren Block der ionenleitenden Pore unwahrscheinlich.



Abb. 3: Einfluss von Pb²⁺ auf die Deaktivierungskinetik von Kv1.1. **A**: Stromspuren der Tailströme in Anwesenheit von 2,5 μ M, 10 μ M und 50 μ M Pb²⁺. Nach verschiedenen Testpotentialen (+10, -20, und -40 mV) wurden die Tailströme durch Repolarisation zurück zum Haltepotential (-80 mV) erzeugt. Jeder Testpuls hatte eine Länge von 200ms. Die untere Reihe zeigt die normierten Aufnahmen für alle drei Pb²⁺-Konzentrationen. Für das Testpotential -40 mV sind Stromspuren bei Anwesenheit von 0.5 μ M und 2.5 μ M Pb²⁺ dargestellt, da die Ströme ab 10 μ M vollständig blockiert werden. **B** Deaktivierungs-Zeitkonstanten τ_{deact} bei verschiedenen Pb²⁺-Konzentrationen, aufgetragen gegen das Testpotential. Kreis: Kontrolle, Rechteck: 2.5 μ M, Dreieck: 10 μ M, Raute 50 μ M. Datenpunkte entsprechen Mittelwerten \pm SEM, n= 4.

3 Konzentrationsabhängigkeit der Pb²⁺-Bindung

Am Beispiel des intensiv studierten Spinnentoxins Hanatoxin konnte gezeigt werden, dass gating-modifizierende Substanzen insgesamt vier Bindungsstellen, jeweils eine in den vier Spannungssensordomänen des Kv-Kanaltetramers, besetzen können (Schwartz et al., 1997). Da in dieser Studie ein spannungsabhängiger Kaliumkanal untersucht wird, der im heterologen Expressionssystem mit aus vier identischen Untereinheiten vier Spannungssensordomänen besteht, ist es möglich, dass ein funktioneller Kv1.1 Kanal vier Pb²⁺-Ionen bindet, wobei jede Untereinheit eine identische Bindungsstelle besitzt. In Anwesenheit von Pb²⁺ könnten mindestens fünf verschiedene Kanalpopulationen existieren, Kanäle, die frei von Pb²⁺ sind und Kanäle die ein bis vier Pb²⁺-Ionen binden. Deshalb müssen für eine Messung der Konzentrationsabhängigkeit der Pb2+-Inhibition des Kanals Bedingungen gefunden werden, bei denen ein Pb²⁺-Ion ausreicht, um den Kanal zu blockieren, d. h. die Fraktion der Kanäle mit gebundenem Pb²⁺ sollte der Fraktion des in seiner Leitfähigkeit blockierten Kanals entsprechen. Eine solche Situation liegt wahrscheinlich bei negativen Potentialen nahe der Aktivierungsschwelle des Kanals vor. Ein Blick auf die Aktivierungskurven in Abb 1 zeigt, dass eine nahezu vollständige Inhibition der Kanäle bei einem Einsatz von 50 μ M Pb²⁺ bei einem Testpotential von -40 mV nahe der Aktivierungsschwelle erreicht werden kann. Höhere Pb²⁺-Konzentrationen als 50 µM wurden in den Bindungsexperimenten nicht verwendet, da die Löslichkeit von Pb2+ bei einem pH-Wert der Messlösung von 7.2 gering ist und Pb(OH)2 ausfällt (Löslichkeitsprodukt von $Pb(OH)_2 = 1.43 \times 10^{-20}$). Außerdem sollten Oberflächen-Ladungseffekte durch zu hohe Konzentrationen an Kationen in der extrazellulären Messlösung vermieden werden, da sie zu unerwünschten Veränderungen in der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung führen können, die die eigentlichen Messdaten verfälschen würden (vergl. Einleitung). Abb. 4 zeigt die Fraktion der nichtinhibierten Kanäle als Funktion der Pb2+-Konzentration. Die Datenpunkte sind Mittelwerte der Tailstromamplituden, gemessen bei einem Testpotential von -40mV und einem Tailpotential von -80 mV in Anwesenheit verschiedener Pb2+-Konzentrationen. Die Abhängigkeit der nichtinhibierten Tailstromfraktion von der Pb2+-Konzentration lässt sich am besten mit Gleichung (1) beschreiben, die vier gleichwertige und unabhängige Bindungsstellen annimmt. Aus dem Fit (Abb. 4, durchgezogene Linie) ergibt sich eine Dissoziationskonstante (K_d) von 2.05 μ M.

$$\frac{I}{I_0} = (1 - \frac{\left[Pb^{2+}\right]}{\left[Pb^{2+}\right] + Kd})^4 \tag{1}$$

Im Vergleich zeigen die Daten für die Fraktion des nichtinhibierten Tailstroms deutliche Abweichungen von einer Kurve, die aus einer Funktion mit einer einfachen Bindungsstelle resultiert (Abb. 4A, gestrichelte Linie). Auch eine Gleichung, die eine vollständige Besetzung von vier Bindungsstellen annimmt (Abb. 4B gestrichelte Linie) beschreibt die Datenpunkte vergleichsweise unzureichend. Die konzentrationsabhängigen Veränderungen der Fraktionen des nichtinhibierten Tailstroms stimmen mit einem einfachen Bindungsmodell mit vier unabhängigen und gleichwertigen Bindungsstellen überein.

(Mit der aus Gleichung 1 resultierenden Dissoziationskonstante von 2.05 μ M würde der Kanal theoretisch bei Pb²⁺-Konzentrationen > 1000 μ M eine vollständige Besetzung aller vier Bindungsstellen erreichen (Abb.4C, gestrichelte Linie).



Abb 4: Konzentrationsabhängigkeit der fraktionellen Besetzung von Kv1.1 mit Pb²⁺. Die Fraktion des nichtinhibierten Tailstroms wurde nach einer 200 ms Depolarisation auf -40 mV bei einem Tailpotential von -80 mV gemessen. Die durchgezogene Linie entspricht einem Fit der Datenpunkte mit der Funktion $I/I_0=([Pb^{2+}]/[Pb^{2+}]+K_d)^4$, die vier unabhängige Bindungsstellen annimmt mit $K_d= 2.05$ für eine einzelne Bindungsstelle. **A:** Die gestrichelte Linie ist ein versuchter Fit auf $I/I_0=(1-[Pb^{2+}]/[Pb^{2+}]+K_d)$ mit nur einer Bindungsstelle und einem Kd = 326 nM. **B:** Die gestrichelte Linie wurde mit der Funktion $I/I_0=1-([Pb^{2+}]/[Pb^{2+}]+K_d)^4$ erzeugt die eine volle Besetzung von 4 Bindungsstellen annimmt mit Kd= 62 nM. **C:** Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf für die volle Besetzung von 4 Bindungsstellen für Kd= 2.05 µM.

4 Kinetik der Erholung aus der Pb²⁺-Inhibition

Es wurden Untersuchung zum zeitlichen Verlauf der Erholung aus der Pb²⁺-Inhibition bei Testspannungen verschiedener Stärke durchgeführt, um weitere Informationen über die Anzahl und Besetzung der putativen Pb²⁺-Bindungsstellen zu erhalten. Das folgende sequentielle Bindungsschema beinhaltet vier gleichwertige und unabhängige Bindungsstellen:



C ist der ungebundene Kanal und CH_n steht für Kanäle, die ein bis vier Pb^{2+} -Ionen gebunden haben. K_{on} ist die Assoziations-Geschwindigkeits-Konstante zweiter Ordnung ($M^{-1}s^{-1}$) für die Bindung von Pb^{2+} an eine einzelne Bindungsstelle, k_{off} ist die Dissoziations-Geschwindigkeits-Konstante erster Ordnung (s^{-1}) für eine einzelne unabhängige Bindungsstelle.

Abb. 5 zeigt ein Auswaschexperiment zur Untersuchung der Kinetik der Erholung der Kanäle nach Pb²⁺-Inhibition. Drei Testpulse verschiedener Stärke wurden in schneller Reihenfolge appliziert. Die erste Depolarisierung nach -40 mV liegt nahe der Aktivierungsschwelle von Kv1.1. Der zweite Puls ist eine Depolarisation nach -20 mV, der dritte auf 0 mV. Das Pulsprotokoll wurde in einem Zeitabstand von 5 ms wiederholt, um eine ausreichende Auflösung der schnellen Dissoziationskinetik zu erhalten. Es wurde zu Beginn eine Pb2+-Konzentration von 100 µM eingesetzt, um eine nahezu vollständige Besetzung der putativen Bindestellen des Kanals mit Pb^{2+} zu erreichen. Es sollten dann theoretisch ~90% der Kanäle bei Annahme von vier Bindungsstellen vollständig besetzt sein (vergl. Abb. 4C). Nach Entfernung von Pb²⁺ aus der Messkammer konnte eine sofortige Zunahme der Tailstromamplitude bei Depolarisation auf 0 mV und -20 mV beobachtet werden. Innerhalb von 400 s wurden fast die Kontrollstromamplituden vor Pb²⁺-Zugabe erreicht. Der Verlauf der Erholung konnte in beiden Fällen mit einer einfach-exponentiellen Funktion mit τ_{0mV} = 18s und τ_{-20mV} = 8s ausreichend beschrieben werden (Abb. 5A). Die Erholung bei niedriger Depolarisation auf -40 mV besitzt dagegen einen sigmoidalen zeitlichen Verlauf. Die Zunahme der Tailstromamplitude setzt erst mit einer Verzögerung von ~15s ein und erreicht nach 400s Auswaschzeit nur ~40% der Kontrolle. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit der Erwartung, dass ein vollständig besetzter Kanal mit vier Bindungsstellen bei sehr niedriger Depolarisation nicht öffnen kann bevor nicht alle Pb²⁺-Ionen vom Kanal dissoziiert sind. Für die Annahme, dass der Kanal vier unabhängige Bindungsstellen besitzt, sollte der Dissoziationsverlauf der Gleichung (2) folgen.

$$\frac{I}{I_0} = (1 - e^{-tkoff})^4$$
(2)

Der durch Gleichung (2) beschriebene sigmoidale Verlauf sollte weniger stark betont sein, wenn bei stärkeren Depolarisationen auch Pb²⁺-gebundene Kanäle geöffnet werden können. In Abb. 5B wurde der Verlauf der Erholung bei -40 mV mit einer auf Gleichung (2) basierenden Funktion der vierten Potenz beschrieben. Es ergab sich ein Wert für die Dissoziationszeitkonstante von $4,7x10^{-2}$ s⁻¹. In Abbildung 5C wurde in einem Doppel-log Graph der Logarithmus der Tailstromamplitude nach schwacher Depolarisation auf -40 mV gegen (1-e^{-tkoff}) aufgetragen. Die Datenpunkte liegen auf der Gerade einer linearen Funktion mit k_{off} = $4.7x10^{-2}$ s⁻¹(durchgezogene Linie). Die Gerade hat eine Steigung von 3.7. Das stimmt mit der Annährung der relativen Stromamplituden in Abb 5B an eine Beziehung der vierten Potenz überein. Dieses Ergebnis liefert ein weiteres wichtiges Argument, dass mehrere, vielleicht 4 Bindungsstellen für Pb²⁺ auf Kv1.1 existieren.



Abb. 5: Erholung aus der Inhibition durch Pb^{2^+} bei Depolarisation verschiedener Stärke. **A:** Die Stromaufnahmen wurden durch ein dreifaches Pulsprotokoll erhalten, das nach 5 s wiederholt wurde. Die hier dargestellten Aufnahmen wurden vor Applikation von 100 μ M Pb²⁺ (1), in Anwesenheit von 100 μ M Pb²⁺ (2) und 400 s nach dem Auswaschen von Pb²⁺ aus dem Bad aufgenommen. **B:** Der Graph zeigt die relativen Tailstromamplituden nach Depolarisation auf -40 mV (ausgefüllte Kreise), -20 mV (offene Kreise) und 0 mV (Rechtecke) in Abhängigkeit von der Zeit. Stromzunahme nach Depolarisation auf -20 mV und 0 mV konnten mit einer einfachexponentiellen Funktion beschrieben werden und ergaben tau-Werte T_{0mV}= 18 s, T-20mV= 8s. Links ist die Zunahme der relativen Tailstromamplitude nach schwacher Depolarisation auf -40 mV vergrößert dargestellt. Die durchgezogene Linie entspricht einer Annährung an I/I₀= A(1-e^{-tkoff}) mit K_{off}= 4.7x 10⁻²s⁻¹ und A= 0.45. **C:** Die relative Stromamplitude nach Depolarisation auf -40 mV, logI/I₀ wurde gegen log(1-e^{-tkoff}) aufgetragen. Die durchgezogene Gerade ist ein Fit der Datenpunkte mit logI/I₀= mlog((1-e^{-tkoff})+b, m ist die Steigung (3.7) und b ist die Schnittstelle mit der Y-Achse.

5 Eingrenzung der potentiellen Pb²⁺-Bindungsstelle mit einer Chimärenstrategie

Kanal	$\Delta V_{1/2}$	Anzahl der
		Messungen n
Kv1.1	28.0±1.9	7
Kv1.2	18.2 ±0.4	8
Kv1.3	18.1 ±1.1	7
Kv1.4	14.0 ±0.9	7
Kv1.5	12.4 ±1.1	8
Kv2.1	2.2 ±0.4	7
Kv3.1	5.2 ±0.7	6
Kv3.2	6.6 ±0.7	7
Kv3.4	9.9 ±0.7	5
Kv4.2	28.3 ±1.1	5

Tabelle 1: Verschiebungen der Spannungs-Aktivierungskurven verschiedener Kv-Kanäle auf der Spannungsachse in Anwesenheit von 50 μ M Pb²⁺ (Die Daten wurden freundlicherweise von M. Madeja zur Verfügung gestellt) Zahlen entsprechen Mittelwerten ± SEM, n= 5-8.

Tabelle 1 zeigt, dass die Mitglieder der Shaker Kv-Kanal Familie (Kv1.1 bis 1.6) unter den bisher auf Pb²⁺-Sensitivität untersuchten spannungsabhängigen Kaliumkanälen im Oocyten-Expressionssystem die größte Spannungsverschiebung bei Pb²⁺-Applikation aufweisen, man kann also vermuten, dass diese Kanäle eine vergleichsweise hohe Pb²⁺-Affinität besitzen. Die niedrigste Affinität besitzt folglich Kv2.1 (Spannungsverschiebung um lediglich 2.2 mV). Abbildung 6 zeigt eine Konzentrations-Wirkungskurve für Kv1.1 und Kv2.1. Aus den K_d-Werten von Kv1.1 (327 nM für eine Bindungsstelle, 2.0 μ M für eine von vier unabhängigen Bindungsstellen) und Kv2.1 (51 μ M für eine Bindungsstelle, 310 μ M für eine von vier unabhängigen Bindungsstellen) lässt sich eine ~ 150-fach geringere Pb2+-Affinität für Kv2.1 ableiten.



Abb 6: Konzentrationsabhängigkeit der fraktionellen Besetzung von Kv1.1 (Kreise) und Kv2.1 (Rechtecke) durch Pb²⁺. Die Fraktion des nichtinhibierten Tailstroms wurde nach einer 200 ms Depolarisation auf -40 mV (Kv1.1) oder -20 mV (Kv2.1) bei einem Tailpotential von -80 mV bzw. -50 mV gemessen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einem Fit der Datenpunkte mit der Funktion $I/I_0=([Pb^{2+}]/[Pb^{2+}]+K_d)^4$, die vier unabhängige Bindungsstellen annimmt oder mit $I/I_0=([Pb^{2+}]/[Pb^{2+}]+K_d)$ für eine einzelne Bindungsstelle mit den K_d-Werten für Kv1.1 (327 nM für eine Bindungsstelle, 2.0 μ M für eine von vier unabhängigen Bindungsstellen) und Kv2.1 (51 μ M für eine Bindungsstelle, 310 μ M für eine von vier unabhängigen Bindungsstellen), Datenpunkte entsprechen Mittelwerte± SEM. n= 4-8.

Um eine potentielle Pb²⁺-Bindungsstelle auf einen Bereich der Kanalproteine der Shaker-Familie einzugrenzen, wurden im Vorfeld dieser Studie (M. Madeja, unveröffentlichte Daten) eine Vielzahl von Chimären zwischen Kv1.2 und Kv2.1 auf Pb²⁺-Sensibilität getestet. Als Maß wurde wieder die Verschiebung der Spannungsaktivierung zu positiveren Potentialen hin untersucht. Am deutlichsten war ein positiver Spannungsshift bei der Kv2.1-Chimere Mu15 mit der Linker-Region zwischen dem S3 und dem S4-Segment von Kv1.2 zu erkennen. Abb 7A zeigt die Aminosäuresequenz dieses kritischen Abschnittes im Vergleich zu Kv1.2 und Kv2.1, platziert unter einem konventionellen Topologiemodell einer einzelnen Kv-α-Kanal Untereinheit. In den Sequenzen sowie im Modell sind die Anteile von Kv2.1 blau gefärbt. Rot steht für den S3-S4-Linker von Kv1.2. Abb. 7B zeigt die Spannungsverschiebung in den Aktivierungskurven nach Zugabe von 50 µM Pb²⁺ für Mu15 (links ~14 mV) und Kv2.1 (rechts ~4.4 mV). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass der S3-S4-Linker die Pb²⁺-Bindungsstelle beinhaltet, oder dazu beiträgt. Da der S3-S4-Linker ein Teil der Spannungssensordomäne des Kanals ist und sich in der Primärsequenz so wie auch in der kürzlich bestimmten Kristallstruktur der Spannungssensordomäne des bakteriellen Kv-Kanals KvAP (Jiang et al., 2003a) in unmittelbarer Nähe zum Spannungssensor (S4-Segment) befindet, könnte das eine Erklärung für die modulierenden Effekte von Pb²⁺ auf die Aktivierung von Kv-Kanälen der Shaker-Familie sein. Auch der bisher am umfassendsten charakterisierte Gating-Modulator, das Spinnentoxin Hanatoxin, bindet mit hoher Affinität und Spezifizität an mindestens drei Aminosäuren im S3-S4-Linker des Kv-Kanals Kv2.1 (Schwartz et al., 1997; Li-Smerin et al., 2000a, 2000b). Kv2.1-Kanäle zeigen bei Bindung von Hanatoxin sehr ähnliche Eigenschaften (Verschiebung der Aktivierung zu positiveren Potentialen und Beschleunigung der Deaktivierungskinetik) wie hier für Pb²⁺ beschrieben.



KCNB1 WKFFKGPLNAIDLLAILPYYVTIFLTE-SNKSVLQFQNV----RRVVQIFRIMRILRILKLARHSTG
 KCNA2 AGFFTNIMNIIDIVAIIPYFITLG-TELAEKPEDAQQGQQAMSLAILRVIRLVRVFRIFKLSRHSKG
 Mu15 WKFFKGPLNAIDLLAILPYYVTLG-TELAEKPEDAQQGQQAMSLAILQIFRIMRILRILKLARHSTG



Abb 7: Aminosäuresequenz im S3-S4-Linker und Pb²⁺-Effekt auf die Spannungsaktivierung von Mu15 und Kv2.1. A: Topologie-Modell einer einzelnen Kv- α -Kanal Untereinheit, blau gefärbt ist der Anteil von Kv2.1, der rot gefärbte Teil entspricht dem Linker zwischen den Transmembransegmenten 3 und 4 von Kv1.2 in der Chimäre Mu15. Darunter dargestellt sind die Aminosäuresequenzen dieses Abschnittes im selben Farbcode. Schwarzgefärbte Buchstaben entsprechen den positiv geladenen Aminosäuren im Spannungssensorelement S4 B: Spannungsaktivierungskurven für Mu15 und Kv2.1 als Kontrolle (Kreise) und in Anwesenheit von 50 μ M Pb²⁺ (Rechtecke). Die durchgezogenen Linien repräsentieren einen Fit mit einer einfachen Boltzmannfunktion. Sichtbar ist ein positiver Spannungsschift für Mu15 um 14 mV und für Kv2.1 um 4.4 mV. Messungen erfolgten an einer Oocyte.

6 Versuch der Lokalisierung von an der Pb²⁺-Bindung beteiligten Aminosäuren im S3-S4-Linker von Kv1.1 durch Mutagenese

Um Aminosäuren einer putativen Pb²⁺-Bindungsstelle im S3-S4-Linker zu identifizieren, wurde der Effekt von Punktmutationen in diesem Bereich auf die Pb²⁺-Affinität hin untersucht. Als Zielkanal wurde Kv1.1 verwendet, da dieser aufgrund des sehr großen $\Delta V_{\frac{1}{2}}$ Wert (+27.2 mV) bei Pb2+-Applikation als Mitglied der Shaker-Familie mit der größten Pb²⁺-Affinität betrachtet werden kann. Abbildung 8 vergleicht die Aminosäuresequenzen des S3-S4-Linkers von Kv1.2 mit Kv1.1. Beide Sequenzen zeigen eine hohe Anzahl identischer Aminosäuren (grau unterlegt) besonders im C-terminalen Bereich des S3-S4-Linkers, so dass angenommen werden kann, dass Aminosäuren, die an einer putativen Bindungsstelle in dieser Region beteiligt sind, in beiden Kanälen konserviert sind. Das ist wichtig, da wir bisher durch die Chimäre Mu15 nur einen Indiz für Pb²⁺-Bindung im S3-S4-Linker von Kv1.2 haben. Die Möglichkeiten der Koordinierung von bivalenten Kationen in Proteinen sind sehr vielfältig. Prinzipiell könnten alle polaren, hydrophilen und negativ geladenen sowie auch aromatische Aminosäuren als Koordinierungspartner in Frage kommen. Weiterhin ist zusätzliche Koordinierung durch Wassermoleküle und Carboxylgruppen der Hauptgruppen möglich. Es wurden daher systematisch 20 Aminosäuren von T268 bis S287 des S3-S4-Linkers (vergl. Abb. 8) zu Alanin oder Lysin substituiert.

 TMS-3
 S3-S4-Linker
 TMS-4

 KCNA2
 MNIIDIVAIIPYFITLGTELAEKPEDAQQGQQAMSLAILRVIRLVRVFRIFKLSR

 KCNA1
 MNFIDIVAIIPYFITLGTELAEQ-EGNQKGEQATSLAILRVIRLVRVFRIFKLSR

Der Austausch durch die kleine neutrale Methylgruppe von Alanin sollte Auskunft über eine direkte Interaktion der Seitenkette der Zielaminosäure mit dem Pb²⁺-Kation geben, die Substitution mit der positiv geladenen Aminosäure Lysin sollte, im Vergleich zum Alaninaustausch, im Fall einer Beteiligung der Aminosäure an der Pb²⁺-Bindung zu einer Verstärkung der Abnahme der Pb²⁺-Affinität führen. Alle Mutanten konnten in Oocyten als

Abb 8: Vergleich der Aminosäuresequenzen des S3-S4-Linkers von Kv1.1 und Kv1.2. Die mit einem schwarzen Balken versehenen Bereiche entsprechen dem N-Terminus von S3 (links) und dem C-Terminus des Spannungssensors S4 (rechts) mit positiv geladenen Aminosäuren in blau. Die grau unterlegten Aminosäuren des S3-S4-Linkers sind in beiden Kanälen identisch. Der durch blaue Punkte markierte Bereich T268 bis S287 wurde in KCNA1 in der Punktmutagenese zu Ala und Lys mutiert.

funktionelle Kanäle exprimiert werden. Die Pb²⁺-Sensitivität wurde anhand der Fraktion der nichtinhibierten Tailstromamplitude in Anwesenheit von zwei Pb²⁺-Konzentrationen, 2.5 μ M und 10 μ M, bestimmt. Die Messung erfolgte bei einem Deaktivierungspotential von -80 mV. Der depolarisierende 200 ms Vorpuls lag, abhängig von der Aktivierungsschwelle der einzelnen Mutanten, zwischen -30 mV und -40 mV. Aus den nichtinhibierten Stromfraktionen wurde dann ein K_d^{mut}-Wert unter der Annahme von vier unabhängigen Bindungsstellen nach folgender Gleichung berechnet:

$$Kd = \left(\frac{1}{1 - (I/I_0)^{\frac{1}{4}}} - 1\right) [Pb2 +]$$

Abb. 9 zeigt das Verhältnis Kd^{mut}/Kd^{wt} für die Ala- und Lys- Mutanten in zwei Balkendiagrammen. Unter den Alaninmutanten fällt als erstes E283A im C-terminalen Abschnitt des S3-S4-Linkers durch eine ~ acht-fache Verminderung der Pb²⁺-Affinität auf. Ein Lysin in derselben Position erzeugt eine vergleichbare Erhöhung des K_d-Wertes (~ sieben-fach). Eine signifikante Reduzierung der Pb²⁺-Affinität zeigten außerdem die Punktmutanten E272A und E272K (Kd^{mut}-Kd^{wt}-Verhältnis von 3 bzw 5). Die größte Änderung der Pb²⁺-Affinität (~ 10-fach) besitzt die Mutante T286K, während die entsprechende Alanin-Mutante T286A keine bemerkenswerte Änderung des K_d-Wertes aufweist. Es konnte keine Mutante mit einer für Kv2.1 vergleichbaren niedrigen Pb²⁺-Affinität (~150-fach niedriger als Kv1.1) identifiziert werden. Die Doppelmutante E272, 283A zeigte im Vergleich zu E283A nur eine leicht erhöhte Änderung in der Pb²⁺-Sensitivität, was einer Addition der Änderung der Kd-Werte beider Einzelmutanten entsprechen könnte.



Abb 9: Kd-Verhältnis von wt-Kanal und Kanalmutanten. Die Fraktion des nichtinhibierten Tailstroms wurde in Anwesenheit von 2,5 μ M und 10 μ M Pb²⁺ bei einem Tailpotential von -80 mV nach einem Vorpuls auf -30 mV bis -40 mV abhängig von der Aktivierungsschwelle der Mutante, gemessen. Die Berechnung der Kd-Werte erfolgte nach Kd=(1/(1-(I/I₀)^{1/4})-1)[Pb²⁺]. Die Balken entsprechen den Mittelwerten des Kd-Verhältnis von wt-Kanal und Kanalmutanten ± SEM, n=3-7.

7 Perturbationen im Aktivierungsverhalten von Kv1.1 durch Mutationen im S3-S4-Linker

Die Mutationen innerhalb des S3-S4-Linkers führten zu Perturbationen der Aktivierungsparameter von Kv1.1. Diese lassen sich als Änderungen in der freien Energie Δ G0, dem Energiebetrag der für den Übergang vom geschlossenem zum offenen Zustand des Kanals notwendig ist, beschreiben (Δ \DeltaG0 kcal/mol). Genauere Angaben zur Berechnung von Δ \DeltaG0 aus den Fits der Aktivierungskurven mit einfachen Boltzmanfunktionen finden sich unter Methoden, Abschnitt 4. In Abb 10 sind die Δ \DeltaG0-Werte für alle innerhalb des S3-S4-

Linkers eingeführten Mutationen dargestellt. Mutanten mit $|\Delta\Delta G0| < 1$ werden bezüglich der thermodynamischen Aktivierungseigenschaften als mit dem wt-Kanal gleichwertig betrachtet. Auf dem ersten Blick fällt auf, dass die meisten Ala-Mutanten mit $|\Delta\Delta G0| > 1$ negative $\Delta\Delta G0$ -Werte besitzen (11 von 20), equivalent zu einer Stabilisierung des offenen Zustandes des Kanals, während Substitution mit der positiv geladenen Aminosäure Lys tendenziell positive Änderungen von ΔG0 im S3-S4-Linker von Kv1.1 erzeugen (9 von 20) und daher das Öffnen des Kanals erschweren. Die Position S287 reagiert allerdings auf eine Substitution mit Lys mit einer deutlichen Verschiebung von $\Delta G0$ in negative Richtung. Vergleicht man die Verteilung der Mutanten mit $|\Delta\Delta G0| > 1$, so findet man diese im Fall von Lys-Substitutionen gehäuft im COOH-termialen Abschnitt, die Aminosäuren mit den größten ΔG0-Änderungen (T286K, S287K) sind dagegen am N-terminalen Ende platziert. Während Lysin-Mutationen im Abschnitt I273 bis G282 keine bedeutsamen Δ G0-Änderungen hervorrufen, führt dort die Neutralisierung von geladenen und polaren Seitengruppen durch Alanin-Substitution zu einer Ansammlung von Mutanten mit Verschiebungen von $\Delta G0$ in negative Richtung. Auffällig ist die Mutation T286K. Sie zeigt die stärkste Verschiebung von $\Delta G0$ in positive Richtung und besitzt außerdem die stärkste Verminderung der Pb²⁺-Sensitivität (vergl Abb 9). In Abb. 11 sind die Spannungsaktivierungskurven der Mutanten in den Positionen, für die signifikante Verminderung der Pb²⁺-Konzentration gefunden wurde, dargestellt. Die deutlichste Verschiebung der Spannungsaktivierung zu positiven Potentialen sowie eine Verschiebung zu positiveren $\Delta G0$ –Werten zeigt die Mutante T286K.



Abb. 10: Perturbationen in den Aktivierungsparamentern von Kv1.1 durch Ala- und Lys-Mutationen im S3-S4-Linker **A:** Darstellung von $\Delta\Delta$ G0-Werten, die aus Veränderungen der Spannungsaktivierungskurven durch Punktmutationen im S3-S4-Linker resultieren. Links Ala-Punktmutanten, rechts Lys-Punktmutanten. **B:** Änderungen der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung der Punktmutanten. Dargestellt ist die Differenz der V½-Werte von wt-Kanal und Kanal-Mutante (mV), links Ala-Punktmutanten, rechts Lys-Punktmutanten. Die Balken entsprechen den Mittelwerten des Kd-Verhältnis von wt-Kanal und Kanalmutanten ± SEM, n=3-8.



Abb. 11: Spannungsaktivierungskurven von Ala- und Lys-Mutanten an Positionen, in denen veminderte Pb2+-Affinität gefunden wurde. Es werden die Aktivierungskurve vom wT-Kanal (Kreise) sowie die Kanalmutante (Rechtecke) zusammen in einem Graph dargestellt. Die durchgezogene Linie entspricht einem Fit mit einer einfachen Boltzmannfunktion.

VI Diskussion

1. Effekte von Pb²⁺ auf die Aktivierung von Kv1.1

In dieser Arbeit wurden die inhibierenden Eigenschaften von Pb²⁺-Kationen auf den spannungsaktivierten Kaliumkanal Kv1.1 untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass Pb²⁺ Konzentrationen (50 μM) eine deutliche Verschiebung in geringen der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu positiveren Potentialen verursacht. Auch die Steilheit der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung nimmt in Anwesenheit von Pb²⁺ ab. 50 µM Pb²⁺ verursachten außerdem eine relativ leichte Reduktion der maximalen Sromamplitude (vergl. Abb1, Ergebnisse). Eine durch divalente Kationen verursachte Spannungsverschiebung der Kanalaktivierung konnte auch bei anderen klonierten Ionenkanälen in Anwesenheit von Pb²⁺ (vergl. Tabelle 1, Ergebnisse) oder bei vergleichbaren Konzentrationen an Zn^{2+} bei Kv1.5 beobachtet werden (Zhang et al. 2001; Kehl et al., 2002; Teisseyre et al., 2002).

Die Effekte des Pb²⁺ auf die Spannungsabhängigkeit der Kv1.1-Aktivierung sind vermutlich nicht durch eine Neutralisation der fixen Oberflächenladung der Membranoberfläche zu erklären (vergl. Einleitung). In einer Studie zur "Surface-Charge Theorie" (Elinder et al., 1996) wurde beschrieben, dass Sr²⁺ in einer Konzentration von 5 mM bei klonierten Kv-Kanälen nur eine Verschiebung von $V_{1/2}$ um 4.2 ± 0.3 mV (n=8) verursacht.

Eine Veränderung in der Steigung der Spannungsaktivierungskurve oder eine Reduktion der maximalen Stromamplitude wurde nicht beobachtet. Da eine viel geringere Konzentration (50 μ M) an Pb²⁺ eine deutlich größere Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung verursacht (~27 mV), muss angenommen werden, dass der Pb²⁺-Effekt auf eine spezifische Bindung von Pb²⁺ an Kv1.1 zurückzuführen ist.

Eine einfache Erklärung wäre, dass Pb²⁺ eine Bindungsstelle in Kv1.1 besetzt, was zu einer Veränderung des Verhaltens des Spannungssensors führt: Der geschlossene Zustand des Kanals wird stabilisiert und im Vergleich zum Wild-Typ Kanal werden stärkere Depolarisationen benötigt, um den Kanal zu öffnen. Für diese Erklärung spricht die Beobachtung, dass die Aktivierung des Kv1.1-Kanals in Anwesenheit von Pb²⁺ stark verzögert ist (vergl. Abb 2, Ergebnisse), d. h. Pb²⁺ bewirkt eine Verlangsamung des Übergangs des geschlossenen Kanals in den offenen Zustand (gating). Dazu passt die beobachtete Verschiebung von V_{1/2} zu positiveren Potentialen.

Weitere Hinweise welcher Zustand oder Zustandswechsel während der Aktivierung des Kanals durch Pb²⁺ beeinflusst wird, liefert die Untersuchung der Effekte von Pb²⁺ auf die "Gating"-Ströme (vergl. Abb. 1). Die Experimente erfolgten an einer Porenmutante (W434F) des Shaker Kv-Kanals, der direkt mit Kv1.1 verwandt ist. Die Mutante besitzt keine Ionenleitfähigkeit mehr (Perozo et al., 1993) und erlaubt deshalb die Messung der "Gating"-Ströme. Diese werden durch die Verschiebung von Ladungen des Spannungssensors im elektrischen Feld der Membran während der Aktivierung des Kv-Kanals hervorgerufen. Ihre Kinetik wurde als Zeitintervall der Abnahme der Ströme bis auf ihren halbmaximalen Wert (t_{0.5}) gemessen. Betrachtet man die Größe der bewegten Ladungen (Q) in Abhängigkeit des Testpotentials (V_a), so zeigte sich eine Verschiebung der Q/V-Beziehung zu positiveren Potentialen hin (Abb. 1B, in Anwesenheit von Pb²⁺ Verschiebung von $V_{a^{1/2}}$ um ~+19 mV). Außerdem wurde durch Pb²⁺ die maximale Amplitude der Gating-Ströme verringert, und die "on-gating"-Ströme (gating-Ströme, die durch Übergang des Spannungssensors vom deaktivierten in den aktivierten Zustand hervorgerufen werden) wurden verlangsamt. (Abb 1C, Erhöhung von $t_{0.5}$ in Anwesenheit von Pb²⁺ ~ 189%, 0 mV). Off-gating"-Ströme (gating-Ströme, die durch Übergang des Spannungssensors vom aktivierten in den deaktivierten Zustand hervorgerufen werden) erfuhren hingegen eine Beschleunigung (Abb. 1D, Verringerung von $t_{0.5}$ in Anwesenheit von Pb²⁺ auf ~75%, 0 mV).

Die beobachtete Verschiebung der Q/V-Beziehung, sowie die Verlangsamung der Kinetik der on-gating-Ströme liefern ein starkes Indiz, dass Pb²⁺ die Bewegung des Spannungssensors im elektrischen Feld, die mit der Aktivierung der Kv-Kanäle verbunden ist, stark beeinflusst.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Die Modulation der gating-Ströme durch Pb^{2+} in guter Übereinstimmung mit den Effekten von Pb^{2+} auf die Aktivierung der Ionenleitfähigkeit von Kv1.1 ist.

Die Beobachtung, dass Pb²⁺ die Kinetik der "off-gating-Ströme" sowie die Deaktivierung von Kv1.1 beschleunigt, ist von erheblicher Bedeutung. Diese lässt weitere Schlüsse über einen möglichen Mechanismus der Pb²⁺-Modulation zu. Eine Schlussfolgerung ist, dass Kv1.1-Kanäle, die Pb²⁺ gebunden haben, einen offenen, K⁺ leitenden Zustand einnehmen können. Diese Fraktion an offenen Kanälen unterscheidet sich von offenen Kanälen, die kein Pb²⁺ gebunden haben, durch eine veränderte (beschleunigte) Deaktivierungskinetik, d.h. durch einen beschleunigten Übergang in den geschlossenen Zustand. Das ist ein weiteres starkes Argument dafür, dass Pb²⁺ einen spannungskontrollierten Schritt der Kv1.1 Kanalaktivierung beeinflusst. Aus diesen Überlegungen folgt auch, dass die Kinetik der Deaktivierung als Maß für den Anteil an offenen Kv1.1 Kanälen mit besetzten Pb²⁺-Bindungsstellen genommen werden kann.

Bei sehr niedrigen Potentialen nahe der Aktivierungsschwelle von Kv1.1 konnte keine wesentliche Veränderung der Deaktivierungskinetik beobachtet werden. Das heißt, dass unter diesen Bedingungen die Fraktion der offenen Kanäle auch der Fraktion der von Pb²⁺-freien Kanäle entspricht. Dies war eine wichtige Voraussetzung zur Bestimmung der Zahl der Pb²⁺-Bindungsstellen pro Kv1.1-Kanal.



Abb 1: Effekt von Pb²⁺ auf Gating-Ströme der nichtleitfähigen Shaker-Mutante W434F. Messung erfolgte in Oocyten (Xenopus laevis), cut-open-Technik. Offene Kreise zeigen Datenpunkte der Kontrolle, gefüllte Kreise zeigen Datenpunkte für Messungen in Anwesenheit von Pb²⁺ (200 μM). **A:** Aufnahmen bei Potentialen von -70 mV bis +30 mV in 20 mV-Schritten. WASH: Gating-Ströme aufgenommen 20 min nach dem Auswaschen von Pb²⁺. **B:** Ladungs-Spannungsbeziehung des on-Gating-Stroms. Die Werte für die gating-Ladungen (Q_{on}) wurden auf die entsprechenden Maximalwerte der Kontrolle normalisiert Die Symbole repräsentieren Mittelwerte ± SEM (n=3).**C:** Spannungsabhängigkeit des zeitlichen Verlaufs des on-gating-Stroms. t_{0.5} beschreibt das Zeitintervall der Abnahme der Ströme bis auf ihren halbmaximalen Wert der Kontrolle. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte ± SEM (n=5). **D:** Spannungsabhängigkeit des zeitlichen Verlaufs des off-gating-Stroms. t_{0.5} beschreibt das Zeitintervall der Abnahme der Ströme bis auf ihren halbmaximalen Wert der Kontrolle. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte ± send (n=5). **D:** Spannungsabhängigkeit des zeitlichen Verlaufs des off-gating-Stroms. t_{0.5} beschreibt das Zeitintervall der Abnahme der Ströme bis auf ihren halbmaximalen Wert der Kontrolle. Die Symbole repräsentieren Mittelwerte ± send (n=5). Die hier präsentierten Experimente wurden von M. Madeja durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2. Mechanismus der Modulation von Kv1.1 durch Pb²⁺

Die in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien ergaben deutliche Hinweise, dass Kv1.1 mehrfache Pb²⁺-Bindungsstellen besitzt. So war die Konzentrationsabhängigkeit der Besetzung von Kv1.1 mit Pb²⁺-Ionen bei niedrigen Potentialen nahe der Aktivierungsschwelle des Kanals, besonders im Bereich von Pb²⁺-Konzentrationen die zu einer fast vollständigen

Inhibition führten, steiler als für eine Beziehung, die ein stoichiometrisches Verhältnis zwischen Kanal und Pb²⁺-Ion von 1:1 annimmt. Die Daten konnten gut mit einem einfachen Bindungsmodell mit vier unabhängigen, gleichwertigen Pb²⁺-Bindungsstellen beschrieben werden (vergl. Abb. 4, Ergebnisse). Auswaschexperimente (vergl. Abb.5, Ergebnisse) ergaben eine starke Spannungsabhängigkeit der Kinetik der Erholung von Kv1.1 aus der Pb²⁺-Inhibition. Bei nur einer Pb²⁺-Bindungsstelle auf dem Kv1.1-Kanal würde man keine Spannungsabhängigkeit der Erholung aus der Inhibition erwarten. Hingegen wurde bei niedrigen Potentialen nahe der Aktivierungsschwelle des Kv1.1-Kanals eine deutliche Verzögerung der Erholung des Kv1.1 Kanals beobachtet. Das spricht dafür, dass die Kv1.1 Kanal gebundenen Pb²⁺-Ionen die vier Bindungsstellen des Kv1.1-Kanals verlassen haben.

Auch die Abhängigkeit der Deaktivierungskinetik, sowohl von der Stärke des Testpotentials wie auch von der Pb²⁺-Konzentration, weist auf eine Komplexität der Bindungsverhältnisse durch die Existenz von verschiedenen Kv1.1-Kanalpopulationen hin, die eine unterschiedliche Anzahl an Pb²⁺-Ionen gebunden haben. Daher wurden in dieser Studie Randbedingungen für die Bindungsstudien gesucht, bei denen die Fraktion der offenen Kv1.1 Kanäle der Fraktion der Kanäle, die kein Pb²⁺ gebunden haben, annährend entspricht, um die Besetzung der Bindungsstellen des Kv1.1-Kanals in Abhängigkeit zur Pb²⁺-Konzentration elektrophysiologisch messen zu können. Das ist offensichtlich bei niedrigen Testpotentialen nahe der Aktivierungsschwelle des Kanals der Fall (siehe oben, Schwartz et al., 1997a).

Zusammenfassend kann die Schlussfolgerung aus den Bindungsstudien gezogen werden, dass Kv1.1 vier Bindungsstellen für Pb²⁺-Kationen aufweist. Sowohl ein Hill Koeffizient von 3.1 aus dem Fit der Konzentrationsabhängigkeit der Pb²⁺-Inhibition mit einer Langmuir Gleichung als auch die angemessene mathematische Beschreibung des Verlaufes der Erholung aus der Pb²⁺-Inhibition mit einer Funktion der vierten Potenz unterstützen die Vermutung, dass jeweils eine der vier α -Untereinheiten eine unabhängige und gleichwertige Pb²⁺-Bindungstelle besitzt. Da vier Bindungsstellen gleichzeitig besetzt werden können, kann vermutet werden, dass sie sich räumlich nicht überlappen.

Die für die Bindungsstudien untersuchte Inhibition des Kanals bei niedrigen Potentialen, resultiert hauptsächlich aus der Verschiebung der Spannungsaktivierungskurve zu positiveren Potentialen in Anwesenheit von Pb²⁺. Das lässt darauf schließen, dass die hier beschriebene Bindung von Pb²⁺ an Kv1.1 auch für die beobachtete Verlangsamung des Übergangs vom geschlossenem zum offenen Zustand des Kanals (Beeinflussung der Aktivierungskinetik sowie der Gating-Ströme) verantwortlich ist.

Die modulatorischen Effekte von Pb²⁺ auf die Aktivierung von Kv1.1 sind charakteristisch für einen relativ neu beschriebenen Mechanismus der Kv-Kanal-Inhibition, der auf einer Modifizierung des Schaltverhaltens des Kanals während der spannungsabhängigen Aktivierung beruht. Dieser Mechanismus wurde am intensivsten an dem Spinnentoxin Hanatoxin untersucht, welches als "Gating-Modifizierer" Kv2.1 Kanäle inhibiert. Wie bei Pb²⁺-Inhibition resultiert der Kanalblock durch Hanatoxin hauptsächlich aus einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu positiven Potentialen. Hanatoxin bewirkt eine drastische Beschleunigung der Deaktivierung und Bindungsstudien bei niedrigen Potentialen weisen auf vier Toxinbindungsstellen pro Kv2.1-Kanal hin (Schwartz et al., 1997a, 1997b; Li-Smerin et al., 2000; vergl. Einleitung). Es wird angenommen, dass Hanatoxin einen geschlossenen Zustand des Kanals vor dem eigentlichen Öffnen der Pore stabilisiert, und dadurch die Kanalaktivierung verzögert. Somit beeinflusst die Bindung von Hanatoxin (wie auch die von Pb²⁺) das Schaltverhalten des Kv-Kanals während der spannungsabhängigen Aktivierung. Die in den Arbeiten über Hanatoxin wie auch in den hier durchgeführten Pb²⁺-Bindungsstudien gemessenen deaktivierenden Tailströme beschreiben den Übergang vom offenen zum geschlossenen Zustand des Kanals. Die Veränderung der Kinetik dieser Tailströme durch Hanatoxin und Pb²⁺ lässt deshalb Gating-Modifizierer die direkte vermuten, dass beide Kopplung der Konformationsänderungen des Spannungssensors bei Aktivierung an das Öffnen der ionenleitenden Pore beeinflussen.

3. Lokalisation der Pb²⁺-Bindungsstelle auf Kv1.1

Pb²⁺ zeigt die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte auf Kv1.1 nur, wenn es von der extrazellulären Seite der Membran appliziert wird. Folglich kommen als potentielle Bindungstelle für Pb²⁺ Bereiche des Kanals in Frage, die zur extrazellulären Oberfläche des Kanals hin lokalisiert sind oder für Pb²⁺ von der äußeren Membranfläche aus zugänglich sind. Für extrazellulär wirksame inhibitorische Substanzen von Kv-Kanälen wurden bisher zwei Rezeptorregionen charakterisiert und im Detail studiert (vergl Einleitung). (1)Verschluss des

Ionentransportweges durch Bindung von inhibitorischen Substanzen an die äußere Porenregion des Kanals (Skorpiontoxine, Gross et al. 1996, Goldstein et al., 1994, Aiyar et al., 1995) oder durch eine verlängerte Interaktion von Kationen wie Ba²⁺ mit den Ionenbindungsstellen innerhalb des Selektivitätsfilters von Kv-Kanälen (Neyton und Müller, 1988a,b; Harris et al., 1998; Jiang et al., 2000).

(2) Modifikation des spannungsabhängigen Schaltverhaltens des Kanals durch Bindung der Substanzen an Bereiche innerhalb der Spannungssensordomäne. Zwei gut untersuchte Beispiele für diesen Typ der Modulation sind das Spinnentoxin Hanatoxin sowie die Mg^{2+} von mit zwei geladenen Interaktion negativ Aminosäuren in den Transmembransegmenten S3 und S4 von eag-Kanälen (vergl Einleitung, Schwartz et al., 1995, 1997a; Silvermann et al. 2000). In beiden Fällen wird eine Modulation der konformationellen Änderungen des Spannungssensors während der Kanalaktivierung als Mechanismus vermutet (Terlau et al., 1996; Silvermann et al., 2000; Tang et al., 2000).

Im Vorfeld dieser Studie wurde versucht, mit einer Chimärenstrategie eine Region des Kv-Kanals Kv1.2 zu identifizieren, die die putative Pb^{2+} -Bindungstelle enthält (M. Madeja, unveröffentlichte Daten). Die Beobachtung, dass der Kv-Kanal Kv2.1 eine ~ 100 Mal geringere Pb^{2+} -Sensitivität als der Kanal Kv1.1 besitzt, lässt vermuten, dass die Mitglieder der Shaker-Familie eine Pb^{2+} -Bindungsstelle besitzen, die auf Kv2.1 nicht vorhanden ist. Dann wäre es theoretisch möglich, die Pb^{2+} -Sensitivität durch den Austausch homologer Domänen auf Kv2.1 zu übertragen. Als Maß für eine erhöhte Pb^{2+} -Sensitivität wurde die Verschiebung der Spannungsaktivierungskurve zu positiveren Potentialen entlang der Spannungsachse gedeutet. Sie wurde als Hinweis für eine direkte Beteiligung der ausgetauschten Region an der Bindung von Pb^{2+} gewertet.

In den ersten Experimenten wurden Chimären untersucht, in denen ganze funktionelle Domänen ausgetauscht wurden. Die putative Pb^{2+} -Bindungsstelle konnte so auf die Spannungssensordomäne (S1-S4) eingegrenzt werden. Bei einem Austausch. der Porendomäne wurden keine Anzeichen auf eine erhöhte Pb^{2+} -Sensitivität gefunden. Offensichtlich ist diese Modulation der Kanalaktivierung auf eine Interaktion von Pb^{2+} mit Elementen der Spannungssensordomäne zurückzuführen. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass Pb^{2+} -Inhibition auf eine Modulation der spannungsabhängigen Aktivierung beruht und Pb^{2+} als Gating-Modifizierer funktioniert.

Um die Position der putativen Pb²⁺-Bindungsstelle auf eine Region innerhalb der Spannungssensordomäne S1-S4 zu begrenzen, wurden eine Vielzahl weiterer Chimären, untersucht. Diese Chimären wurden unter Berücksichtigung des konventionellen 6-
Transmemebran-Segment Modells der Topologie von Kv-Kanälen konstruiert. Es wurden einzelne Elemente wie Transmembransegmente und Linkerregionen ausgetauscht. Bei diesen Chimären konnte eine Erhöhung der Sensitivität für Pb²⁺ beobachtet werden, wenn im ausgetauschten Bereich der S3-S4-Linker des Pb²⁺-sensitiven Kanals Kv1.2 enthalten war. Mit der Chimäre Mu15 konnte ein minimaler Abschnitt von 20 Aminosäuren, der den vollständigen S3-S4-Linker enthält, identifiziert werden, der bei Übertragung auf Kv2.1 zu einer deutlichen Erhöhung der Pb²⁺-Sensitivität führt. (vergl. Abb. 7 Ergebnisse).

Bisher gibt es wenig Informationen über den Aufbau einer Pb²⁺-Bindungsstelle in Proteinen. Über Anzahl und chemischen Charakter der an einer Pb²⁺-Bindung beteiligten Liganden in einer Proteinumgebung habe ich keine Hinweise in der Literatur finden können. Einen Hinweis liefert aber die Beobachtung, dass Pb²⁺ in der Lage ist calciumabhängige Kaliumkanäle (SK und BK-Kanäle), Troponin C-abhängige ATPase und Calmodulinabhängige Phosphodiesterase zu aktivieren (Ying-Jun et al., 1999; Habermann et al., 1983; Chao et al., 1995). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Pb²⁺ in submikromolaren Konzentrationen an Ca²⁺-Bindungsstellen von regulatorischen Molekülen wie Calmodulin und Troponin C bindet (Habermann et al., 1983, 1985; Chao et al., 1990). Die Bindung von Pb²⁺ an diese Ca²⁺-regulatorischen Proteine führt daher offensichtlich zu funktionellen Konformationsänderungen in diesen Signalproteinen, die eine Interaktion und Stimulation der Zielproteine ermöglichen. Das weist auf eine Koordinierung von Pb²⁺ durch dieselben Liganden wie bei Ca²⁺-Bindung hin. Die Ca²⁺-Bindungsstellen in Calmodulin und Troponin C in diesen Proteinen sind sehr gut charakterisiert.

In der Literatur werden sie als EF-Hand-Motiv bezeichnet (Überblick: Lewit-Bentley und Rety, 2000). In einem Helix-Schleife-Helix Bereich wird Ca²⁺ durch sechs bis acht negativ geladene und ungeladenen polare Sauerstoffatome koordiniert, die von den Seitenketten negativ geladener Aminosäuren wie Glutamat und Aspartat oder in Form von Carbonylgruppen der Hauptketten bereitgestellt werden (vergl. Abb.2). Auch Sauerstoffatome von gebundenen Wassermolekülen können beteiligt sein.

Interessanterweise wurde eine Modulierung des Gatings von Shaker Kv-Kanälen durch hohe extrazelluläre Konzentrationen an Ca²⁺-Ionen (40 mM) beschrieben, die große Ähnlichkeit zu den in dieser Arbeit beschriebenen Pb²⁺-Effekten aufweist (Gomez- Lagunas et al., 2002). Der Ca²⁺-Block ist spannungsabhängig und verursacht eine Beschleunigung der Kinetik der offgating-Ströme und der Kanaldeaktivierung bei Repolorisation der Membran. Möglich wäre deshalb, dass auch Ca²⁺ mit einer sehr viel geringeren Affinität mit der putativen Pb²⁺-

Bindungsstelle interagiert. Auskunft darüber könnten kompetetive Bindungsstudien mit Pb²⁺ und Ca²⁺ geben.

Für den bakteriellen Kv-Kanal KvAP existiert eine Kristallstruktur des Spannungssensors (Jiang et al., 2003). Abb. 3 zeigt die Aminosäuresequenzen der S3-S4-Linker von Kv1.2,



Abb. 2: Darstellung des EF-Motivs. **Links:** Ribbondarstellung des EF-Motivs. Die Schleife zwischen den beiden helikalen Elementen E und F liefert die Ca²⁺-Bindungsstelle. **Mitte:** Das EF-Hand-Motiv kann durch eine rechte Hand symbolisiert werden. Der Zeigefinger zeigt die Ausrichtung der Helix E, Helix F verläuft in Richtung des Daumen und der gebogene Mittelfinger entspricht den 12 Aminosäuren in der Loopstruktur, die die Ca²⁺-Bindungsstelle enthält. **Rechts:** Das Ca²⁺-Kation wird in einem der EF-Hand Motiven des Signalproteins Troponin C durch sechs Sauerstoffatome koordiniert. Diese werden von den Seitenketten der Aminosäuren D9, N11, D13, E20, von einer Hauptgruppe in Position 15 und einem Wassermolekül bereitgestellt (aus Brandon und Tooze, "Introduction to Proteinstructure",)

Kv1.1 und Kv2.1 im Vergleich zu der entsprechenden Sequenz des KvAP-Kanals. Die S3-S4-Linker der Shaker Kv-Kanäle Kv1.1 und Kv1.2 besitzen einen hohen Anteil an identischen Aminosäuren von ~70% (vergl. Abb. 8, Ergebnisse) und enthalten eine Vielzahl an Aminosäuren mit negativ geladenen sowie hydrophilen Seitenketten, die möglicherweise an einer Bindung von Pb²⁺ beteiligt sein könnten. Die Struktur des Spannungssensors von eukaryotischen Kv-Kanälen kann im Kontext der Kristallstruktur des vollständigen spannungsabhängigen bakteriellen KvAP-Kanals (Jiang et al., 2003) diskutiert werden. Sequenzhomologien von KvAP mit Kanälen der Shakerfamilie besonders im Bereich S3b-S4 weisen auf eine ähnliche Struktur der Spannungssenssordomänen in eukaryotischen Kv-Kanälen hin (Ruta et al., 2003; Jiang et al., 2003a, b). Abb. 4A zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus der Spannungssensordomäne mit den helikalen Elementen S3a, S3b und S2 (blau). Der für die Pb²⁺-Bindung relevante S3-S4-Linker entspricht den helikalen Elementen S3b und dem N-terminus von S4 (vergl Abb 3). Ein zusätzlicher Bereich von ca 10 Aminosäuren in der Kv1.1 und Kv1.2-Sequenz stellt eine Erweiterung des Loops zwischen

	S3b	S3-S4 Linker		S 4
KvAP	EIPALV P AGLLALIEGHLAG		LGLFRLVRI	LLRFLRILLIISF
Kv2.1	DLLAIL P YYVTIFLTESNKS	VLQFQNV	RRVVQIFRI	MRILRILKL-AF
Kv1.1	DIVAII P YFITLGTEIAEQE	GNQKGEQ ATS	LAILRVIRI	LVRVFRIFKL-SF
Kv1.2	DIVAII P YFITLGTELAEKP	EDAQQGQQAMS	LAILRVIRI	LVRVFRIFKL-SF
Mu15	DLLAIL P YYVTLGTELAEKP	EDAQQGQQAMS	LAILQIFRI	MRILRILKL-AR

Abb. 3: Sequenzvergleich des S3-S4-Linkers der Kv-Kanäle Kv1.1, Kv1.2 und Kv2.1 mit der homologen Region des bakteriellen Kv-Kanals KvAP. Die durch Balken markierten Bereiche entsprechen den helikalen Elementen S3b und S4 der KvAP-Kristallstruktur. Die grau markierten Positionen in der Kv2.1 Sequenz kennzeichnen die Aminosäuren I273, F274 und E277, die an der Interaktion mit Hanatoxin beteiligt sind. Der grau gekennzeichnete Bereich in Mu15 entspricht der Sequenz des ausgetauschten S3-S4-Linkers von Kv1.2, die für eine Übertragung der Pb²⁺-Sensitivität auf Kv2.1 notwendig ist.

S3b und S4 im Vergleich zu KvAP dar (vergl. Abb. 3). Daher kann über die Struktur oder Orientierung dieses Bereichs keine Aussage gemacht werden. Helix-Loop-Helix Strukturen werden im Spannungssensor durch die Verknüpfung der helikalen Elemente S3a und S3b, sowie im Spannungssensor-Paddel (S3b bis S4) ausgebildet (vergl. Abb.4). Die Abfolge der Elemente Helix-Loop-Helix wie auch die Länge der potentiellen Schleife zwischen S3b und S4 von ~10- 12 Aminosäuren passt auf das Motiv der EF-Hand. Die Lage und Ausrichtung der helikalen Elemente im Spannungssensor zeigen aber zumindest in dieser Konformation Ähnlichkeiten des KvAP-Kanals. keine zum generellen **EF-Hand-Motiv** der Calciumbindungsstellen.

Wie in Abschnitt 1 diskutiert, zeigen die modulatorischen Effekte von Pb²⁺ bezüglich der Aktivierung und Deaktivierung und der Stoichiometrie der Bindungsstellen eine große Ähnlichkeit zum gatingmodifizierenden Mechanismus der durch Hanatoxin vermittelten Kanalinhibition (Schwartz et al., 1997a). Beide Inhibitoren gehören zur Klasse der Gating-Modifizierer. Diese Übereinstimmungen in der Beeinflussung der Kanalaktivierung könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die Bindungsstellen für Pb²⁺ und Hanatoxin überlappen oder sogar homologe Aminosäurepositionen in den durch Pb²⁺ und Hanatoxin modulierten Kanälen an der Bindung beider Effektoren beteiligt sind. Bindungsstudien mit Hanatoxin an Chimären und Punktmutanten zeigen, dass Hanatoxin mit drei Aminosäuren in der S3-S4 Linkerregion von Kv2.1 interagiert (Schwartz et al., 1997b; Li-Smerin 2000, 2001). Diese

Positionen sind im Sequenzvergleich in Abb. 3 wie auch in der KvAP-Struktur (Abb 4) markiert und befinden sich tatsächlich in einem Bereich, der durch die Chimäre Mu15 als essentiell für die Pb²⁺-Bindung definiert wurde.

Um zu Überprüfen, ob homologe Positionen auf Kv1.1 in diesem für die Hanatoxinbindung wichtigen Bereich an der Bindung von Pb²⁺ beteiligt sind, wurden zunächst fünf Aminosäuren, T267 bis E272, (vergl. Abb. 8, Ergebnisse) der Reihe nach zu Alanin und Lysin mutiert. Es konnte aber nur eine Position E272 mit einer geringfügig verminderten Pb²⁺Sensitivität (3- bzw 5-fache Erhöhung des Kd^{mut}-Kd^{wt}-Verhältnis) identifiziert werden. Daher wurde die Mutagenese auf die Region des Loops zwischen S3b und S4 bis einschließlich der Position S287 um 15 Aminosäuren erweitert. Substitution von E283 mit Alanin oder Lysin führt zu einer 8-fachen Verminderung der Pb²⁺-Sensitivität. Austausch von T286 gegen Lysin verursachte eine 10-fache Reduzierung der Pb²⁺-Affiniät. Eine Alaninsubstitution in dieser Position bewirkt weder eine Perturbation im Gatingverhalten noch weist sie eine veränderte Pb2+-Sensitivität auf. Im Fall von E272 und E283 führen Alanin und Lysinmutationen zu einer vergleichbaren Reduzierung der Pb²⁺-Sensitivität (vergl. Abb. 10, Ergebnisse). Möglicherweise ist die Seitenkette von T286 nicht direkt an einer Pb²⁺-Koordinierung beteiligt, da sonst ein Austausch gegen eine Methylgruppe durch Alanin-Substitution zu einer Verminderung der Pb²⁺-Affinität führen sollte. Auffälligerweise führt die Einführung einer positiven Ladung zu einer Verschiebung des $V_{\frac{1}{2}}$ -Wertes der Mutante T286 zu mehr positiven Potentialen, was dem Effekt der Pb²⁺-Bindung an Kv1.1wt entspricht (vergl Abb 10, Ergebnisse). Eine Erklärung wäre, dass die positive Ladung der Lysinseitenkette in Position 286 elektrostatische Kräfte innerhalb der eigentlichen Pb²⁺-Bindungstelle ausübt, was zu vergleichbaren Effekten auf das Gating der Mutante führt, wie sie bei Pb²⁺-Bindung an Kv1.1 beobachtet wurden. Gleichzeitig verliert die Mutante S286K an Pb²⁺-Affinität, da die Zugänglichkeit der Pb²⁺-Bindungstelle für Pb²⁺ aufgrund der positiven Ladung des Lysins erschwert wird. Eine ähnliche Beobachtung wurde für eine Mutante L342H im Bereich des S3-S4-Linkers des HERG-Kanals gemacht. Diese Muation eliminiert die Modulation des HERG-Kanals durch Mg²⁺ (Tang et al., 2000). Es ist unwahrscheinlich, dass Leucin an einer Bindung von Mg²⁺ beteiligt ist. Trotzdem werden die Bindungseigenschaften von Mg²⁺ oder die Kopplung des Mg²⁺-Effekts mit dem Spannungssensor verändert. Auch könnte die Einführung eines möglicherweise positiv geladenen Histidins die Zugänglichkeit der Bindungsstelle für Mg²⁺ erschweren.

Es konnte keine Mutante mit einer für Kv2.1 vergleichbaren niedrigen Pb²⁺-Affinität (~150fach niedriger als Kv1.1) identifiziert werden. Die moderaten Veränderungen der Pb²⁺- Sensitivität durch Mutationen in den oben genannten Positionen könnte auf eine schwache elektrostatische Interaktion von Pb²⁺ mit diesen hydrophilen und negativ geladenen Aminosäuren hinweisen. Eine vergleichbare Beobachtung wurde für die Mutation E519A im Bereich des S3-S4-Linkers des HERG-Kanals gemacht (Johnson et al., 2001). Sie verursacht eine moderate Verminderung der modulatorischen Effekte von extrazellulären Ca²⁺ auf HERG in mikromolaren Konzentrationen. Es ist unwahrscheinlich, dass diese Position an einer hochaffinen Ca²⁺-Koordinierungstelle, vergleichbar mit einem EF-Hand Bindungsmotiv, beteiligt ist. Es besteht daher die Vermutung, dass zusätzlich andere, bisher nicht identifizierte Bereiche des Kanals Kv1.1 an der Pb²⁺-Bindungsstelle beteiligt sind und dass diese für den Unterschied der Pb²⁺-Sensitivität zwischen den beiden Kv-Kanälen Kv1.1 und Kv2.1 verantwortlich sind und die hohe Pb²⁺-Affinität von Kv1.1 mitbestimmen.

Das ist überraschend, da mit der hier durchgeführten Mutagenese der in der Chimäre Mu15 ausgetauschte Bereich des S3-S4-Linkers vollständig untersucht wurde. Die Interpretation der durch den Linkeraustausch erworbenen Pb²⁺-Sensitivität von Mu15 stellte eine wichtige experimentelle Grundlage für den nachfolgend durchgeführten Mutagenesescan im S3-S4-Linker dar. Hierbei wurde vorausgesetzt, dass die wesentlichen Elemente der Pb²⁺-Bindungsstelle mit dem Austausch des S3-S4-Linkers auf den Pb²⁺-insensitiven Kanal übertragen wurden und die Erhöhung der Pb²⁺-Sensitivität aus einer direkten Interaktion dieser "neuen" Bindungsstelle mit Pb²⁺ resultiert. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass andere Regionen maßgeblich an der Pb²⁺-Bindungstelle beteiligt sind.

Der Austausch des S3S4-Linkers könnte Konformationsänderungen in der Struktur von Kv2.1 verursachen, die eine Beteiligung von Regionen außerhalb des ausgetauschten Elements an der Pb²⁺-Bindung ermöglichen. Mu15 ($V_{1/2}$ = -18 mV) besitzt im Vergleich zu Kv2.1wt ($V_{1/2}$ = 0.6 mV) eine zu negativen Potentialen verschobene Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. Veränderungen im Gating konnten auch bei Deletionen und Mutationen innerhalb des S3-S4-Linkers von eag-Kanälen beobachtet werden (Tang et al., 1996, 1997, 1998, 2000). Das könnte ein Hinweis sein, dass der Linkeraustausch eine Konformationsänderung des Spannungssensors hervorruft, die u. a. auch die Pb²⁺-Bindungsstelle beeinflusst. Beispielsweise konnten für Splicevarianten das bovinen Homolog des eag-Kanals mit unterschiedlichen Längen des S3-S4-Linkers Unterschiede in der Sensitivität für die Modulation durch Mg²⁺ festgestellt werden (Schönher et al., 1999).

Es stellt sich die Frage, ob und welche Elemente der Spannungssensordomäne sich in räumlicher Nähe der an der Pb^{2+} -Bindung beteiligten Aminosäuren im S3-S4-Linker befinden und vielleicht wesentlich an der Pb^{2+} -Bindungsstelle beteiligt sind. Abb. 4B zeigt einen

vergrößerten Ausschnitt aus der Spannungssensordomäne mit den Elementen S3a, S3b und S2 (blau). Hier sind zwei Aminosäuren markiert die an der Mg^{2+} -Bindung in eag-Kv Kanälen beteiligt sind. Es handelt sich dabei um zwei negativ geladene Aspartatreste D278 in S2 und D327 in S3b, die in diesen Positionen nur in eag-Kanälen zu finden sind. Die Neutralisierung der negativen Ladungen dieser Aminosäuren durch Interaktion mit Mg^{2+} führt zu einer deutlichen Verlangsamung der Aktivierungskinetik von eag (Silverman et al., 2000).

In der KvAP-Struktur besitzen diese beiden Aminosäuren eine räumliche Entfernung von ~ 18 Å voneinander. Die Koordinierung von Mg^{2+} erfordert aber eine viel größere räumliche Nähe der Liganden. In hochauflösenden Proteinstrukturen mit gebundenem Mg^{2+} beträgt der Abstand zwischen den Zentren von Mg^{2+} und koordinierenden Sauerstoffatomen ~ 2.2Å (Kankare et al., 1996; Larsen et al., 1997; Sliz et al 1997). Daher kann vermutet werden, dass sich die helikalen Elemente S3b und S2 im eag-Kanal in atomarer Nähe zueinander befinden. Diese Abweichung von der KvAP-Struktur kann zum einen mit generellen strukturellen Unterschieden beider Kanäle begründet werden. Es muss aber auch beachtet werden, dass es sich hierbei um flexible Strukturen handelt, die potentiell ihre räumliche Lage in Abhängigkeit vom Zustand des Kanals verändern können. So konnten durch fluorometrische Messungen Veränderungen in der Struktur des Spannungssensors, während der spannungsabhängigen Aktivierung von Shaker-Kanälen festgestellt werden (Mannuzzu et al., 1996; Cha und Bezanilla 1997, 1998; Cha et al., 1998, 1999; Ghandi ett al., 2000).

Vielleicht ist für die $Mg^{2+}Bindung$ in eag-Kanälen eine Konformation der Spannungssensordomäne erforderlich, die der Kanal während der spannungsabhängigen Aktivierung in Form von Übergangszuständen einnimmt, bevor er in eine offene Kanalkonformation übergeht. Es wäre möglich, dass Kv1.1 sich bei Pb²⁺-Bindung in einer vergleichbaren Konformation wie der Mg²⁺-bindende eag-Kanal befindet. In diesem Fall kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich, wie für den eag-Kanal gezeigt, das S2-Element in atomarer Nähe zu S3b und S4 befindet und an der Pb²⁺-Bindungsstelle beteiligt ist. Für Shaker-Kanäle gibt es Hinweise auf eine direkte Interaktion von S4 und S2 über Salzbrücken (Silvermann et al., 2003), insbesondere im N-terminalen Bereich von S4, also in der Nähe der Positionen E283 und T286 (vergl. Abb. 3).



D



Abb. 4: Strukturmodell des Kv-Kanals basierend auf röntgenkristallographische Daten des KvAP-Kanals Jiang et al., 2003). **A:** Der Ausschnitt aus dem Modell zeigt vergrößert die Elemente S3a, S3b, S4 und S2 in blauer Farbe. Die rot gefärbten Aminosäuren entsprechen den Positionen von I273 (S3b), F274 (S3b) und E277(S3b) die im Kv2.1 an der Hanatoxinbindungsstelle beteiligt sind. **B:** Der Auschnitt zeigt vergrössert die Elemente S3a, S3b, S4 und S2 in blauer Farbe. Die rot gefärbten Aminosäuren entsprechen den Positionen von I273 (S3b), f274 (S3b) und E277(S3b) die im Kv2.1 an der Hanatoxinbindungsstelle beteiligt sind. **B:** Der Auschnitt zeigt vergrössert die Elemente S3a, S3b, S4 und S2 in blauer Farbe. Die rot gefärbten Aminosäuren entsprechen den Positionen von D278 (S2) und D327 (S3b), die im eag-Kanal an der Mg²⁴-Bindungsstelle beteiligt sind. **C:** Der selbe Ausschnitt der KvAP-Struktur wie in B, die rotgefärbte Seitenkette entspricht der Position E272 in Kv1.1. **D:** Die Kanalstruktur zeigt drei KvAP α -Untereinheiten, die Porendomäne ist in orange dargestellt, der Spannungssensor (S3a, S3b und S4) grün, das S2-Segment ist rot gefärbt (Jiang et al., 2003a, modifiziert von R. Born).

Abb 4D zeigt ein Modell des spannungsabhängigen bakteriellen KvAP-Kanals, basierend auf der Kristallstruktur (Jiang et al., 2003) des vollständigen Kanals (vergl. Einleitung). Es zeigt die relative Position des Spannungssensorruders im Verhältnis zur zentralen Porendomäne. Grün dargestellt sind die helikalen Elemente S3a, S3b und S4. S3b und S4 bilden den eigentlichen beweglichen Spannungssensor der positiv geladene Aminosäuren trägt. Die Struktur zeigt, dass sich dieser Bereich am äußeren Rand der Kanalstruktur befindet, während das zentrale Element (orange) die Porendomäne bildet. Beide Elemente sind räumlich durch

ein weiteres helikales Elememt, dem S2-Segment (rot) voneinander getrennt. Die Konformation des Kanals in der KvAP-Kristallstruktur (Abb 4C) stellt aufgrund der Lokalisation des Spannungssensors nahe der intrazellulären Seite der Membran vermutlich den geschlossenen Kanal bei einem stark hyperpolaren Membranpotential dar. (Einleitung, Jiang et al., 2003a). Es ist nicht ohne weiteres vorstellbar, dass die in Abb. 1 gezeigte Konformation der putativen Bindungsstelle für Mg²⁺ bzw. Pb²⁺ für geladene Kationen von der extrazellulären Seite her zugänglich ist. Das Problem der Zugänglichkeit der Bindungsstelle gilt auch für gatingmodifizierenden Spinnentoxine, welche viel größere räumliche Dimensionen besitzen als Metallkationen (Oberfläche von Hanatoxin: ~20x30Å, Takahshi et al., 2000). Jiang et al. postulieren einen Mechanismus für gating-modifizierende Toxine, der sich von dem bisher angenommenen Mechanismus, der Stabilisierung der geschlossenen Konformation des Kanals, unterscheidet. Diese Idee basiert auf der Beobachtung, dass für die Inhibition von KvAP durch das Toxin VSTX1 eine Depolarisation der Membran notwendig ist (Jiang et al., 2003b). Offensichtlich ist eine Bindung des Toxins an das Spannungssensorruder nur möglich, wenn dieser eine aktivierte Konformation einnimmt.

Mackinnon und Mitarbeiter untersuchten die Position des Spannungssensorruders innerhalb der Lipidmembran im geschlossenen und aktivierten KvAP-Kanal mittels einer molekularen Biotinsonde, die kovalent an in die Struktur eingeführte Cysteinreste gebunden war. Als Maß der Zugänglichkeit dieser Sonde diente ihre Fähigkeit Avidin zu binden, das zu beiden Seiten der Membran hinzugefügt wurde. Die Studien lieferten ein vorläufiges Modell des offenen KvAP-Kanals (Jiang et al., 2003b, vergl. Einleitung Abb. 3). In diesem Modell befindet sich das Spannungssensorruder an der äußeren Membranoberfläche. Überträgt man die Positionen des Hanatoxinrezeptors in Kv2.1 auf die Struktur des offenen KvAP-Kanals, würde sich die Toxinbindungsstelle im offenen Zustand in einer extrazellulär exponierten Lage befinden (vergl. Abb. 5). Bindung eines Peptidinhibitors hält den Spannungssensor in der aktivierten Konformation fest und verhindert die Deaktivierung des Kanals bei Membranrepolarisation. Das könnte zu einem Verlust der Ionenleitfähigkeit des Kanals durch eine verstärkte und verlängerte C-Typ-Inaktivierung führen. Auch die in dieser Studie identifizierten, an der Pb²⁺-Bindung beteiligten Aminosäuren befinden sich in der KvAP-Struktur des offenen Kanals in extrazellulär exponierten Positionen (vergl. Abb. 3). Daher kann die Möglichkeit, dass die Bindung von divalenten Kationen wie Pb²⁺ und Zn²⁺ eine aktivierte Konformation des



Abb. 5: Position des Spannungssensorruders von KvAP in der Lipidmembran (Jiang et al., 2003b) **A** geschlossener Zustand **B** offener Zustand. Das Modell basiert auf elektrophysiologischen Experimenten, in denen die zustandsabhängige Zugänglichkeit des Spannungssensorruders mit einer molekularen Sonde untersucht wurde (Jiang et al., 2003b), nähere Erläuterungen finden sich im Text. Der rote Kreis grenzt die Region ein, die homolog zu der Hanatoxinbindungsstelle ist (vergl. Abb. 3).

Spannungssensors stabilisiert, die zu einem Kollaps der Pore und verminderter Ionenleitfähigkeit führt, nicht ausgeschlossen werden. Weiterführende elektrophysiologische Experimente könnten sich daher mit der Frage befassen, ob Pb²⁺-Bindung, vergleichbar mit HaTx-Bindung an Kv2.1, eine Depolarisation der Membran, d.h. eine offene Konformation des Kanals erfordert.

Der shakerverwandte Kv-Kanal Kv1.3 besitzt eine ausgeprägte C-Typ-Inaktivierung. Er bietet daher ein interessantes Ziel für Untersuchungen des Effektes von Pb²⁺ auf die Inaktivierung von Kv-Kanälen.

Interessanterweise wird die Inhibition von Kv1.5 durch Zn²⁺ durch eine Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration vermindert (Zhang et al., 2001). Es ist bekannt, dass die K⁺-Konzentration die C-Typ-Inaktivierung von Shaker-Kanälen beeinflusst und extrazelluläres K⁺ essentiell für eine Stabilisierung des Ionentransportweges der Pore ist. Untersuchung zur Beeinflussung des Pb²⁺-Effektes auf Kv-Kanäle durch Veränderungen der extrazellulären K⁺-Konzentration könnten daher Hinweise liefern, ob Pb²⁺ einen destabilisierenden Effekt auf die Pore ausübt und ob dieser durch K⁺ vermindert werden kann.

Eine Vorraussetzung für eine Zugänglichkeit des Spannungssensorruders ist die Annahme, dass die Organisation der Doppellipidschicht der Membran in der Umgebung des Kanalproteins unterbrochen ist und Platz für Höhlungen lässt, die mit dem wässrigen Milieu des extrazellulären Raums kommunizieren. Geladene Ionen wie Mg²⁺ oder Pb²⁺ könnten so zur Bindungsstelle im Spannungssensor diffundieren. Studien haben gezeigt, dass Teile des Spannungssensorelement S4 nach Einführung von Cysteinmutationen für thiolreaktive Reagenzien und Metall-Kationen zugänglich sind. (Larrson et al., 1996; Yusaf et al., 1996). Das weist stark auf eine zum Teil wässrige Umgebung der beweglichen Spannungssensorelemente hin.

4. Verursacht Inhibition von Kv-Kanälen durch Pb²⁺ physiologische Störungen?

Wird ein Organismus hohen Konzentrationen des Schwermetalls Blei (Pb²⁺) ausgesetzt, verursacht dieses eine Vielzahl von schwerwiegenden physiologischen Störungen, die sich auf die roten Blutzellen, Muskeln und inneren Organe auswirken können. Auch das Gehirn erleidet Funktionsstörungen. Diese neurologischen Symptome einer Pb²⁺-Vergiftung äußeren sich sowohl in einer Depression der neuronalen Aktivität mit Lähmungen und komatösen Zuständen als auch in einer Erhöhung der neuronalen Aktivität mit Unruhezuständen und Krampfanfällen. Untersuchungen zum Mechanismus der Pb²⁺-Effekte ergaben, dass Pb²⁺ inhibierende Wirkung auf die Aktivität von spannungsabhängigen wie auch N-methyl-D-asparta t(NMDA)-aktivierten Calciumkanälen besitzt. (Audesirk et al., 1991a, 1991b; Busselberg et al., 1991, 1994a, 1994b; Peng et al. 2002). Es wurde auch eine herabgesetzte Aktivität von NMDA-Rezeptoren und dem Enzym Adenylat-Cyclase beobachtet (Alkondon et al., 1990; Uteshev et al., 1993; Yamada et al., 1995). Am intensivsten wurde die blockierende Wirkung von Pb²⁺ auf Calciumkanäle untersuch. Dieser Effekt wird allgemein als Hauptursache für die Neurotoxizität von Pb²⁺ angesehen (Audesirk, 1993).

Wie in dieser Studie gezeigt, wird auch die Aktivität von neuronalen spannungsabhängigen Kaliumkanälen durch Anwesenheit von Pb^{2+} reduziert (Madeja et al., 1997). Es konnte auch eine Modulation der transienten Auswärtsströme, sowie der durch Hyperpolarisation aktivierten I_n-Ströme durch Pb^{2+} in dorsalen Wurzelganglien beobachtet werden (Talukder et al., 1995; Dai X et al., 2001, 2003). Kaliumkanäle spielen eine bedeutende Rolle in zellulären

Prozessen, die mit Änderungen des Membranpotentials zusammenhängen wie z.B. die Aufrechterhaltung des Ruhepotentials, Repolarisation der Membran nach Aktionspotentialen und die Modulation von Aktionspotentialen (Connor, 1971; Byrne 1980; Hille, 1992). Daher könnte eine Einschränkung der Aktivität von Kaliumkanälen durch Pb²⁺ mit ein Grund für die beobachtete Erhöhung der neuronalen Aktivität nach Bleiintoxikation sein (Talukder et al., 1995; Dai X et al., 2001).

Interessanterweise können vererbbare Krankheiten wie Episodische Ataxie und Myocymia, auf Mutationen in Kv1.1 zurückgeführt werden (Litt et al., 1994; Browne et al., 1994; Comu et al., 1996; Scheffer et al., 1998). Die funktionelle Analyse einiger dieser Mutationen zeigten Veränderungen in den Gatingeigenschaften von Kv1.1, die Ähnlichkeiten mit den modulatorischen Effekten von Pb²⁺ haben. Beispielsweise zeigt die Mutation T226M im S2-Segment eine Reduzierung der Stromamplitude, Verlangsamung der Aktivierung und Deaktivierung sowie einen Schift der spannungsabhängigen Aktivierung zu positiveren Potentialen (Zerr et al., 1998; Rea et al. 2002). Das könnte ein Hinweis sein, dass die bei einer Bleivergiftung beobachteten Krampfanfälle auch auf die Modulation von Kv1.1 durch Pb²⁺ zurückzuführen ist.

VII Zusammenfassung

Kv-Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Membranspannung erregbarer Zellen. Sie sind an der Steuerung der Aktivität von neuronalen Zellen beteiligt. Eine Vielzahl verschiedener Substanzen besitzen inhibierende und modulierende Effekte auf Kv-Kanäle.

In dieser Arbeit wurde die Modulation der Aktivierung von Kv-Kanälen der Shaker-Familie durch divalente Kationen des Schwermetalls Blei (Pb²⁺) am Beispiel des Kanals Kv1.1 im heterologen Expressionssystem mittels der Two-Elektrode Voltage Clamp Technik untersucht.

Die Pb²⁺-Effekte auf Kv1.1 zeigen eine große Ähnlichkeit zu der Modulation der Aktivierung eines anderen Kv-Kanals Kv2.1 durch den Gating-Modifizierer Hanatoxin: Die Inhibition des Kv1.1-Kanals durch extrazelluläres Pb²⁺ wird hauptsächlich durch die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu positiveren Potentialen hin verursacht. Es konnte eine Verlangsamung der Aktivierung und eine Beschleunigung der Deaktiverungskinetik in Anwesenheit von Pb²⁺ beobachtet werden. Eine genauere Analyse der Deaktivierungskinetik zeigte, dass dieser Effekt stark vom Membranpotential abhängig ist.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Pb^{2+} -Inhibition von Kv1.1 wie auch die Dissoziationskinetik von Pb^{2+} in Auswaschexperimenten bei Membranpotentialen nahe der Aktivierungsschwelle des Kanals lassen sich gut mit Modellen beschreiben, die vier gleichwertige und unabhängige Bindungsstellen pro Kv1.1-Kanal annehmen.

Diese Ergebnisse weisen auf einen "gating-modifizierenden" Mechanismus der Pb^{2+} -Inhibition von Kv1.1 hin. Es kann vermutet werden, das Pb^{2+} mit Bindungsstellen innerhalb der vier Spannungssensordomänen des Kanals interagiert.

Durch die Untersuchung von Kanal-Chimären, in denen verschiedene homologe Regionen von einem Kv-Kanal mit hoher Pb²⁺-Sensitivität (Kv1.2) auf einem Kv-Kanal mit ~100-fach niedriger Pb²⁺-Sensitivität (Kv2.1) übertragen wurden, konnte ein Bereich von 20 Aminosäuren im S3-S4-Linker identifiziert werden, der Pb²⁺-Sensitivität auf Kv2.1 überträgt.

Innerhalb dieses Bereiches, konnten in Kv1.1 drei Positionen identifiziert werden, die nach zielgerichteter Mutagenese zu einer moderaten Verminderung der Pb^{2+} -Sensitivität von Kv1.1 führten. Wahrscheinlich sind diese Positionen an einer schwachen elektrostatischen Interaktion mit Pb^{2+} beteiligt. Es ist daher möglich, dass noch andere Elemente des Kv1.1-Kanals an der Pb^{2+} -Bindungsstelle beteiligt sind.

Kv1.1 ist an zellulären Prozessen beteiligt, die mit Änderungen des Membranpotentials zusammenhängen wie z.B. die Aufrechterhaltung des Ruhepotentials, Repolarisation der Membran nach Aktionspotentialen und die Modulation von Aktionspotentialen. Daher könnte eine Einschränkung der Aktivität von Kaliumkanälen durch Pb²⁺ mit ein Grund für die beobachtete Erhöhung der neuronalen Aktivität nach Bleiintoxikation sein.

VIII Literaturverzeichnis

AGGARWAL, S.K. & MACKINNON, R. (1996). Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K+ channel. *Neuron*, **16**, 1169-77.

AIYAR, J., WITHKA, J.M., RIZZI, J.P., SINGLETON, D.H., ANDREWS, G.C., LIN, W., BOYD, J., HANSON, D.C., SIMON, M., DETHLEFS, B. & ET AL. (1995). Topology of the pore-region of a K+ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron*, **15**, 1169-81.

ARMSTRONG, C.M. (1975). Evidence for ionic pores in excitable membranes. Biophys J, 15, 932-3.

ARMSTRONG, C.M. (1971). Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen Physiol*, **58**, 413-37.

AUDESIRK, G. & AUDESIRK, T. (1993). The effects of inorganic lead on voltage-sensitive calcium channels differ among cell types and among channel subtypes. *Neurotoxicology*, **14**, 259-65.

AUDESIRK, G. & AUDESIRK, T. (1991a). Effects of inorganic lead on voltage-sensitive calcium channels in N1E-115 neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*, **12**, 519-28.

AUDESIRK, T., AUDESIRK, G., FERGUSON, C. & SHUGARTS, D. (1991b). Effects of inorganic lead on the differentiation and growth of cultured hippocampal and neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*, **12**, 529-38.

BAKER, O.S., LARSSON, H.P., MANNUZZU, L.M. & ISACOFF, E.Y. (1998). Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in shaker K+ channel gating. *Neuron*, **20**, 1283-94.

BAUKROWITZ, T. & YELLEN, G. (1995). Modulation of K+ current by frequency and external [K+]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron*, **15**, 951-60.

BIRNBOIM, H.C. & DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-23.

BRANDEN, C. & TOOZE, J. (1991). Intoduction to Protein Structure. New York and London: Garland Publishing, Inc.

BROWNE, D.L., GANCHER, S.T., NUTT, J.G., BRUNT, E.R., SMITH, E.A., KRAMER, P. & LITT, M. (1994). Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1. *Nat Genet*, **8**, 136-40.

BUSSELBERG, D., MICHAEL, D. & PLATT, B. (1994a). Pb2+ reduces voltage- and N-methyl-D-aspartate (NMDA)-activated calcium channel currents. *Cell Mol Neurobiol*, **14**, 711-22.

BUSSELBERG, D., PLATT, B., MICHAEL, D., CARPENTER, D.O. & HAAS, H.L. (1994b). Mammalian voltageactivated calcium channel currents are blocked by Pb2+, Zn2+, and Al3+. *J Neurophysiol*, **71**, 1491-7.

BYRNE, J.H. (1980). Analysis of ionic conductance mechanisms in motor cells mediating inking behavior in Aplysia californica. *J Neurophysiol*, **43**, 630-50.

CHA, A. & BEZANILLA, F. (1997). Characterizing voltage-dependent conformational changes in the Shaker K+ channel with fluorescence. *Neuron*, **19**, 1127-40.

CHA, A. & BEZANILLA, F. (1998). Structural implications of fluorescence quenching in the Shaker K+ channel. *J Gen Physiol*, **112**, 391-408.

CHA, A., SNYDER, G.E., SELVIN, P.R. & BEZANILLA, F. (1999). Atomic scale movement of the voltagesensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature*, **402**, 809-13.

CHANDY, K.G. & GUTMAN, G.A. (1995). Handbook of Receptors and Channels. Boca Raton: CRC Press.

CHANDY, K.G. & GUTMAN, G.A. (1993). Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol Sci*, **14**, 434.

CHAO, S.H., BU, C.H. & CHEUNG, W.Y. (1990). Activation of troponin C by Cd2+ and Pb2+. Arch Toxicol, 64, 490-6.

CHAO, S.H., BU, C.H. & CHEUNG, W.Y. (1995). Stimulation of myosin light-chain kinase by Cd2+ and Pb2+. *Arch Toxicol*, **69**, 197-203.

CHOI, K.L., ALDRICH, R.W. & YELLEN, G. (1991). Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K+ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5092-5.

CHOU, Q., RUSSELL, M., BIRCH, D.E., RAYMOND, J. & BLOCH, W. (1992). Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1717-23.

COHEN, B.E., GRABE, M. & JAN, L.Y. (2003). Answers and Questions from the KvAP Structures. *Neuron*, **39**, 395-400.

COMU, S., GIULIANI, M. & NARAYANAN, V. (1996). Episodic ataxia and myokymia syndrome: a new mutation of potassium channel gene Kv1.1. Ann Neurol, **40**, 684-7.

CONNOR, J.A. & STEVENS, C.F. (1971). Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *J Physiol*, **213**, 31-53.

COVARRUBIAS, M., WEI, A.A. & SALKOFF, L. (1991). Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K+ current systems. *Neuron*, **7**, 763-73.

DAI, X.Q., KARPINSKI, E. & CHEN, X.Z. (2003). Pb2+ inhibits the hyperpolarization-activated current in acutely isolated dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, **120**, 57-63.

DEL CAMINO, D. & YELLEN, G. (2001). Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K(+) channel. *Neuron*, **32**, 649-56.

DOYLE, D.A., MORAIS CABRAL, J., PFUETZNER, R.A., KUO, A., GULBIS, J.M., COHEN, S.L., CHAIT, B.T. & MACKINNON, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K+ conduction and selectivity. *Science*, **280**, 69-77.

ELINDER, F., MADEJA, M. & ARHEM, P. (1996). Surface Charges of K channels. Effects of strontium on five cloned channels expressed in Xenopus oocytes. *J Gen Physiol*, **108**, 325-32.

FRANKENHAEUSER, B. & HODGKIN, A.L. (1957). The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J Physiol*, **137**, 218-44.

GANDHI, C.S., LOOTS, E. & ISACOFF, E.Y. (2000). Reconstructing voltage sensor-pore interaction from a fluorescence scan of a voltage-gated K+ channel. *Neuron*, **27**, 585-95.

GILLY, W.F. & ARMSTRONG, C.M. (1982a). Divalent cations and the activation kinetics of potassium channels in squid giant axons. *J Gen Physiol*, **79**, 965-96.

GILLY, W.F. & ARMSTRONG, C.M. (1982b). Slowing of sodium channel opening kinetics in squid axon by extracellular zinc. *J Gen Physiol*, **79**, 935-64.

GOLDIN, A.L. (1992). Maintenance of Xenopus laevis and oocyte injection. Methods Enzymol, 207, 266-79.

GOLDSTEIN, S.A., PHEASANT, D.J. & MILLER, C. (1994). The charybdotoxin receptor of a Shaker K+ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron*, **12**, 1377-88.

GOMEZ-LAGUNAS, F., MELISHCHUK, A. & ARMSTRONG, C.M. (2003). Block of Shaker potassium channels by external calcium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 347-51.

GROSS, A. & MACKINNON, R. (1996). Agitoxin footprinting the shaker potassium channel pore. *Neuron*, 16, 399-406.

HABERMANN, E., CROWELL, K. & JANICKI, P. (1983). Lead and other metals can substitute for Ca2+ in calmodulin. *Arch Toxicol*, **54**, 61-70.

HARRIS, R.E., LARSSON, H.P. & ISACOFF, E.Y. (1998). A permanent ion binding site located between two gates of the Shaker K+ channel. *Biophys J*, **74**, 1808-20.

HEGINBOTHAM, L., ABRAMSON, T. & MACKINNON, R. (1992). A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K+ channels. *Science*, **258**, 1152-5.

HEGINBOTHAM, L., LU, Z., ABRAMSON, T. & MACKINNON, R. (1994). Mutations in the K+ channel signature sequence. *Biophys J*, **66**, 1061-7.

HILLE, B. (1992). Ionic Channels of Exitable Membranes. Sutherland, Massachusetts: Sinauer Associates.

HO, S.N., HUNT, H.D., HORTON, R.M., PULLEN, J.K. & PEASE, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51-9.

HOSHI, T., ZAGOTTA, W.N. & ALDRICH, R.W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science*, **250**, 533-8.

HOSHI, T., ZAGOTTA, W.N. & ALDRICH, R.W. (1991). Two types of inactivation in Shaker K+ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron*, **7**, 547-56.

INOUE, H., NOJIMA, H. & OKAYAMA, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, **96**, 23-8.

ISACOFF, E.Y., JAN, Y.N. & JAN, L.Y. (1990). Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in Xenopus oocytes. *Nature*, **345**, 530-4.

JAN, L.Y. & JAN, Y.N. (1997). Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev* Neurosci, 20, 91-123.

JAN, L.Y. & JAN, Y.N. (1994). Potassium channels and their evolving gates. Nature, 371, 119-22.

JIANG, Y., LEE, A., CHEN, J., CADENE, M., CHAIT, B.T. & MACKINNON, R. (2002). Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, **417**, 515-22.

JIANG, Y., LEE, A., CHEN, J., RUTA, V., CADENE, M., CHAIT, B.T. & MACKINNON, R. (2003a). X-ray structure of a voltage-dependent K+ channel. *Nature*, **423**, 33-41.

JIANG, Y. & MACKINNON, R. (2000). The barium site in a potassium channel by x-ray crystallography. *J Gen Physiol*, **115**, 269-72.

JIANG, Y., RUTA, V., CHEN, J., LEE, A. & MACKINNON, R. (2003b). The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K+ channel. *Nature*, **423**, 42-8.

JOHNSON, J.P., JR., BALSER, J.R. & BENNETT, P.B. (2001). A novel extracellular calcium sensing mechanism in voltage-gated potassium ion channels. *J Neurosci*, **21**, 4143-53.

KAMB, A., IVERSON, L.E. & TANOUYE, M.A. (1987). Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell*, **50**, 405-13.

KANKARE, J., SALMINEN, T., LAHTI, R., COOPERMAN, B.S., BAYKOV, A.A. & GOLDMAN, A. (1996). Crystallographic identification of metal-binding sites in Escherichia coli inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry*, **35**, 4670-7.

KEHL, S.J., EDULJEE, C., KWAN, D.C., ZHANG, S. & FEDIDA, D. (2002). Molecular determinants of the inhibition of human Kv1.5 potassium currents by external protons and Zn(2+). *J Physiol*, **541**, 9-24.

KERN, M., AUDESIRK, T. & AUDESIRK, G. (1993). Effects of inorganic lead on the differentiation and growth of cortical neurons in culture. *Neurotoxicology*, **14**, 319-27.

KERN, M., WISNIEWSKI, M., CABELL, L. & AUDESIRK, G. (2000). Inorganic lead and calcium interact positively in activation of calmodulin. *Neurotoxicology*, **21**, 353-63.

LARSEN, T.M., BENNING, M.M., WESENBERG, G.E., RAYMENT, I. & REED, G.H. (1997). Ligand-induced domain movement in pyruvate kinase: structure of the enzyme from rabbit muscle with Mg2+, K+, and L-phospholactate at 2.7 A resolution. *Arch Biochem Biophys*, **345**, 199-206.

LARSSON, H.P., BAKER, O.S., DHILLON, D.S. & ISACOFF, E.Y. (1996). Transmembrane movement of the shaker K+ channel S4. *Neuron*, **16**, 387-97.

LEGROS, C., POLLMANN, V., KNAUS, H.G., FARRELL, A.M., DARBON, H., BOUGIS, P.E., MARTIN-EAUCLAIRE, M.F. & PONGS, O. (2000). Generating a high affinity scorpion toxin receptor in KcsA-Kv1.3 chimeric potassium channels. *J Biol Chem*, **275**, 16918-24.

LEWIT-BENTLEY, A. & RETY, S. (2000). EF-hand calcium-binding proteins. Curr Opin Struct Biol, 10, 637-43.

LI, M., JAN, Y.N. & JAN, L.Y. (1992). Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science*, **257**, 1225-30.

LIPKIND, G.M. & FOZZARD, H.A. (1997). A model of scorpion toxin binding to voltage-gated K+ channels. J *Membr Biol*, **158**, 187-96.

LI-SMERIN, Y. & SWARTZ, K.J. (1998). Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltagegated Ca2+ and K+ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8585-9.

LI-SMERIN, Y. & SWARTZ, K.J. (2001). Helical structure of the COOH terminus of S3 and its contribution to the gating modifier toxin receptor in voltage-gated ion channels. *J Gen Physiol*, **117**, 205-18.

LI-SMERIN, Y. & SWARTZ, K.J. (2000). Localization and molecular determinants of the Hanatoxin receptors on the voltage-sensing domains of a K(+) channel. *J Gen Physiol*, **115**, 673-84.

LITT, M., KRAMER, P., BROWNE, D., GANCHER, S., BRUNT, E.R., ROOT, D., PHROMCHOTIKUL, T., DUBAY, C.J. & NUTT, J. (1994). A gene for episodic ataxia/myokymia maps to chromosome 12p13. *Am J Hum Genet*, **55**, 702-9.

LIU, Y., HOLMGREN, M., JURMAN, M.E. & YELLEN, G. (1997). Gated access to the pore of a voltage-dependent K+ channel. *Neuron*, **19**, 175-84.

LOPEZ-BARNEO, J., HOSHI, T., HEINEMANN, S.H. & 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**, 61-71.

MACHEREY & NAGEL (1998). Nucleobond AX Properties and Applications. MACKINNON, R. (1991). Using mutagenesis to study potassium channel mechanisms. *J Bioenerg Biomembr*, **23**, 647-63.

MACKINNON, R., ALDRICH, R.W. & LEE, A.W. (1993). Functional stoichiometry of Shaker potassium channel inactivation. *Science*, **262**, 757-9.

MACKINNON, R., COHEN, S.L., KUO, A., LEE, A. & CHAIT, B.T. (1998). Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science*, **280**, 106-9.

MACKINNON, R. & YELLEN, G. (1990). Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltageactivated K+ channels. *Science*, **250**, 276-9.

MADEJA, M., BINDING, N., MUSSHOFF, U., PONGS, O., WITTING, U. & SPECKMANN, E.J. (1995). Effects of lead on cloned voltage-operated neuronal potassium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **351**, 320-7.

MADEJA, M., MUSSHOFF, U., BINDING, N., WITTING, U. & SPECKMANN, E.J. (1997). Effects of Pb2+ on delayed-rectifier potassium channels in acutely isolated hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, **78**, 2649-54.

MANNUZZU, L.M., MORONNE, M.M. & ISACOFF, E.Y. (1996). Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science*, **271**, 213-6.

MILLIGAN, J.F., GROEBE, D.R., WITHERELL, G.W. & UHLENBECK, O.C. (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res*, **15**, 8783-98.

MORAIS-CABRAL, J.H., ZHOU, Y. & MACKINNON, R. (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K+ selectivity filter. *Nature*, **414**, 37-42.

NEYTON, J. & MILLER, C. (1988a). Discrete Ba2+ block as a probe of ion occupancy and pore structure in the high-conductance Ca2+ -activated K+ channel. *J Gen Physiol*, **92**, 569-86.

NEYTON, J. & MILLER, C. (1988b). Potassium blocks barium permeation through a calcium-activated potassium channel. *J Gen Physiol*, **92**, 549-67.

NOVATI, R., THIERS, V., MONFORTE, A.D., MAISONNEUVE, P., PRINCIPI, N., CONTI, M., LAZZARIN, A. & BRECHOT, C. (1992). Mother-to-child transmission of hepatitis C virus detected by nested polymerase chain reaction. *J Infect Dis*, **165**, 720-3.

PAPAZIAN, D.M., SCHWARZ, T.L., TEMPEL, B.L., JAN, Y.N. & JAN, L.Y. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from Drosophila. *Science*, **237**, 749-53.

PAPAZIAN, D.M., SILVERMAN, W.R., LIN, M.C., TIWARI-WOODRUFF, S.K. & TANG, C.Y. (2002). Structural organization of the voltage sensor in voltage-dependent potassium channels. *Novartis Found Symp*, **245**, 178-90; discussion 190-2, 261-4.

PENG, S., HAJELA, R.K. & ATCHISON, W.D. (2002). Characteristics of block by Pb2+ of function of human neuronal L-, N-, and R-type Ca2+ channels transiently expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol*, **62**, 1418-30.

PEROZO, E., MACKINNON, R., BEZANILLA, F. & STEFANI, E. (1993). Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K+ channels. *Neuron*, **11**, 353-8.

PONGS, O. (1992). Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol Rev*, 72, S69-88.

PONGS, O. (1999). Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Lett*, **452**, 31-5.

PONGS, O., KECSKEMETHY, N., MULLER, R., KRAH-JENTGENS, I., BAUMANN, A., KILTZ, H.H., CANAL, I., LLAMAZARES, S. & FERRUS, A. (1988). Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of Drosophila. *Embo J*, **7**, 1087-96.

REA, R., SPAUSCHUS, A., EUNSON, L.H., HANNA, M.G. & KULLMANN, D.M. (2002). Variable K(+) channel subunit dysfunction in inherited mutations of KCNA1. *J Physiol*, **538**, 5-23.

RETTIG, J., HEINEMANN, S.H., WUNDER, F., LORRA, C., PARCEJ, D.N., DOLLY, J.O. & PONGS, O. (1994). Inactivation properties of voltage-gated K+ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature*, **369**, 289-94.

RICHARDT, G., FEDEROLF, G. & HABERMANN, E. (1986). Affinity of heavy metal ions to intracellular Ca2+binding proteins. *Biochem Pharmacol*, **35**, 1331-5.

ROUX, B. & MACKINNON, R. (1999). The cavity and pore helices in the KcsA K+ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science*, **285**, 100-2.

RUDY, B. (1988). Diversity and ubiquity of K channels. Neuroscience, 25, 729-49.

RUPPERSBERG, J.P., SCHROTER, K.H., SAKMANN, B., STOCKER, M., SEWING, S. & PONGS, O. (1990). Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature*, **345**, 535-7.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.H., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. (1988). Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with Thermostable DNA Polymerase. *Science*, **239** (**4839**), 487-491.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press.

SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.

SANGUINETTI, M.C., JOHNSON, J.H., HAMMERLAND, L.G., KELBAUGH, P.R., VOLKMANN, R.A., SACCOMANO, N.A. & MUELLER, A.L. (1997). Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. *Mol Pharmacol*, **51**, 491-8.

SANGUINETTI, M.C. & XU, Q.P. (1999). Mutations of the S4-S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in Xenopus oocytes. *J Physiol*, **514** (**Pt 3**), 667-75.

SCHEFFER, H., BRUNT, E.R., MOL, G.J., VAN DER VLIES, P., STULP, R.P., VERLIND, E., MANTEL, G., AVERYANOV, Y.N., HOFSTRA, R.M. & BUYS, C.H. (1998). Three novel KCNA1 mutations in episodic ataxia type I families. *Hum Genet*, **102**, 464-6.

SCHONHERR, R., HEHL, S., TERLAU, H., BAUMANN, A. & HEINEMANN, S.H. (1999). Individual subunits contribute independently to slow gating of bovine EAG potassium channels. *J Biol Chem*, **274**, 5362-9.

SEOH, S.A., SIGG, D., PAPAZIAN, D.M. & BEZANILLA, F. (1996). Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K+ channel. *Neuron*, **16**, 1159-67.

SHEN, N.V. & PFAFFINGER, P.J. (1995). Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K+ channel subunit proteins. *Neuron*, **14**, 625-33.

SILVERMAN, W.R., ROUX, B. & PAPAZIAN, D.M. (2003). Structural basis of two-stage voltage-dependent activation in K+ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2935-40.

SILVERMAN, W.R., TANG, C.Y., MOCK, A.F., HUH, K.B. & PAPAZIAN, D.M. (2000). Mg(2+) modulates voltage-dependent activation in ether-a-go-go potassium channels by binding between transmembrane segments S2 and S3. *J Gen Physiol*, **116**, 663-78.

SLIZ, P., ENGELMANN, R., HENGSTENBERG, W. & PAI, E.F. (1997). The structure of enzyme IIAlactose from Lactococcus lactis reveals a new fold and points to possible interactions of a multicomponent system. *Structure*, **5**, 775-88.

SPIRES, S. & BEGENISICH, T. (1992). Chemical properties of the divalent cation binding site on potassium channels. *J Gen Physiol*, **100**, 181-93.

SPIRES, S. & BEGENISICH, T. (1994). Modulation of potassium channel gating by external divalent cations. J Gen Physiol, **104**, 675-92.

STARACE, D.M. & BEZANILLA, F. (2001). Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the shaker k+ channel. *J Gen Physiol*, **117**, 469-90.

STARACE, D.M., STEFANI, E. & BEZANILLA, F. (1997). Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker K+ channel. *Neuron*, **19**, 1319-27.

STÜHMER, W. (1992). Electrophysiological Recording from Xenopus Oocytes. *Methods Enzymol*, 207, 319-352.

SWARTZ, K.J. & MACKINNON, R. (1997a). Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K+ channel through multiple binding sites. *Neuron*, **18**, 665-73.

SWARTZ, K.J. & MACKINNON, R. (1995). An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron*, **15**, 941-9.

SWARTZ, K.J. & MACKINNON, R. (1997b). Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent K+ channels. *Neuron*, **18**, 675-82.

TAKAHASHI, H., KIM, J.I., MIN, H.J., SATO, K., SWARTZ, K.J. & SHIMADA, I. (2000). Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent K(+) channels: common surface features of gating modifier toxins. *J Mol Biol*, **297**, 771-80.

TALUKDER, G. & HARRISON, N.L. (1995). On the mechanism of modulation of transient outward current in cultured rat hippocampal neurons by di- and trivalent cations. *J Neurophysiol*, **73**, 73-9.

TANG, C.Y., BEZANILLA, F. & PAPAZIAN, D.M. (2000). Extracellular Mg(2+) modulates slow gating transitions and the opening of Drosophila ether-a-Go-Go potassium channels. *J Gen Physiol*, **115**, 319-38.

TANG, C.Y. & PAPAZIAN, D.M. (1997). Transfer of voltage independence from a rat olfactory channel to the Drosophila ether-a-go-go K+ channel. *J Gen Physiol*, **109**, 301-11.

TANG, C.Y., SCHULTEIS, C.T., JIMENEZ, R.M. & PAPAZIAN, D.M. (1998). Shaker and ether-a-go-go K+ channel subunits fail to coassemble in Xenopus oocytes. *Biophys J*, **75**, 1263-70.

TEISSEYRE, A. & MOZRZYMAS, J.W. (2002). Inhibition of the activity of T lymphocyte Kv1.3 channels by extracellular zinc. *Biochem Pharmacol*, **64**, 595-607.

TERLAU, H., LUDWIG, J., STEFFAN, R., PONGS, O., STUHMER, W. & HEINEMANN, S.H. (1996). Extracellular Mg2+ regulates activation of rat eag potassium channel. *Pflugers Arch*, **432**, 301-12.

UTESHEV, V., BUSSELBERG, D. & HAAS, H.L. (1993). Pb2+ modulates the NMDA-receptor-channel complex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **347**, 209-13.

VOGELSTEIN, B. & GILLESPIE, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 615-9.

YAMADA, Y., UJIHARA, H., SADA, H. & BAN, T. (1995). Pb2+ reduces the current from NMDA receptors expressed in Xenopus oocytes. *FEBS Lett*, **377**, 390-2.

YANG, N. & HORN, R. (1995). Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron*, **15**, 213-8.

YELLEN, G., JURMAN, M.E., ABRAMSON, T. & MACKINNON, R. (1991). Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K+ channel. *Science*, **251**, 939-42.

YELLEN, G., SODICKSON, D., CHEN, T.Y. & JURMAN, M.E. (1994). An engineered cysteine in the external mouth of a K+ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys J*, **66**, 1068-75.

YU, K., GE, S.Y., DAI, X.Q. & RUAN, D.Y. (2003). Effects of Pb^{2+} on the transient outward potassium current in acutely dissociated rat hippocampal neurons. *Can J Physiol Pharmacol*, **81**, 825-33.

YUSAF, S.P., WRAY, D. & SIVAPRASADARAO, A. (1996). Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel. *Pflugers Arch*, **433**, 91-7.

ZAGOTTA, W.N., HOSHI, T. & ALDRICH, R.W. (1990). Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science*, **250**, 568-71.

ZAZZI, M., ROMANO, L., BRASINI, A. & VALENSIN, P.E. (1992). Nested polymerase chain reaction for detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in clinical specimens. *J Med Virol*, **38**, 172-4.

ZERR, P., ADELMAN, J.P. & MAYLIE, J. (1998). Characterization of three episodic ataxia mutations in the human Kv1.1 potassium channel. *FEBS Lett*, **431**, 461-4.

ZHANG, S., KEHL, S.J. & FEDIDA, D. (2001a). Modulation of Kv1.5 potassium channel gating by extracellular zinc. *Biophys J*, **81**, 125-36.

ZHANG, S., KWAN, D.C., FEDIDA, D. & KEHL, S.J. (2001b). External K(+) relieves the block but not the gating shift caused by Zn(2+) in human Kv1.5 potassium channels. *J Physiol*, **532**, 349-58.

ZHOU, Y., MORAIS-CABRAL, J.H., KAUFMAN, A. & MACKINNON, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K+ channel-Fab complex at 2.0 A resolution. *Nature*, **414**, 43-8.

IX Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

Ω	Ohm
×g	relative Erdbeschleunigung
μ	micro (10 ⁻⁶)
А	Adenin
amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CHTX	Charybdotoxin
СТР	Cytosintriphosphat
DHS-I	Dehydrosoyasaponin I
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige (double strand) DNA
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanosin
HaTx	Hanatoxin
Ι	Inosin
J	Joule
k	kilo (10 ³)
kb	Kilobasenpaare
KDS	Kaliumdodecylsulfat
1	Liter
LB	Luria Bertani
m	milli (10 ⁻³)
М	Molar
min	Minute
MOPS	(4-(N-Morpholino)-propan)-sulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	nano (10 ⁻⁹)
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pfu	Pyrococcus furiosus
PNK	Polynukleotidkinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
ssDNA	einzelsträngige (single strand) DNA
Std.	Stunde
Т	Thymin
Taq	Thermophilus aquaticus
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
TM	Transmembranregion
U	Enzymeinheit (Unit)
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht

V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vol.	Volumen
wt	Wild-Typ
w/v	Gewicht pro Volumen

Ein-Buchstaben-Symbole der Aminosäuren

А	Alanin	С	Cystein	D	Aspartat
Е	Glutamat	F	Phenylalanin	G	Glycin
Н	Histidin	Ι	Isoleucin	Κ	Lysin
L	Leucin	М	Methionin	Ν	Asparagin
Р	Prolin	Q	Glutamin	R	Arginin
S	Serin	Т	Threonin	V	Valin
W	Tryptophan	Y	Tyrosin		

2. Klonkarten und Sequenzen der verwendeten Klone





rKv1.1 cDNA

81	CAATTCCCCGGGGATCCGAATTCTGCAGATTCGACGGTATCGATAAGCTTGATGATCCCCCAATTCACTCGAGACGCGCTTCACT
165	GGGGGCCCTTAGGCGAGAGGAGTTTCCAAATTGGGTAAAAGGCAGAGTGGAGGGGGGGG
249	CTCTGAACCTTCTGGGTCTGAAGCCCCTCCCTGTGAGCGTGGGGGGGG
333	
555	Bat FIT
	S G E N A D E A S A A P G H P O D G S Y P R O A D H D D
417	TCAGGGGAGAATGCAGACGAGGCTTCGGCCGCCCCAGGTCACCCCCAGGATGGCAGCTACCCAAGGCAGGC
	H E C C E R V V I N I S G L R F E T Q L K T L A Q F P N
501	CACGAATGCTGCGAGCGCGTGGTGATCAACATCTCCGGGCTGCGCTTCGAGACGCAGCTCAAGACTCTGGCCCAGTTCCCCAAC
585	ACGCTGCTGGGCAACCCGAAGAAACGCATGCGCTACTTTGACCCTCTGAGGAATGAGTACTTCTTTGACCGCAACCGGCCCAGC
	F D A I L Y Y Y Q S G G R L R R P V N V P L D M F S E E
669	TTCGATGCCATCCTTTATTACTACCAGTCGGGGGGGGGG
	I K F Y E L G E E A M E K F R E D E G F I K E E E R P L
753	ATTAAATTTTACGAGTTGGGCGAGGAGGAGGCCATGGAGAAGTTCCGGGAAGATGAGGGCTTCATCAAGGAAGAGGAGCGCCCCCTA
	AccIII
	~~~~~
	PEKEYQRQVWLLFEYPESSGPARVIAIV
837	CCCGAGAAGGAGTACCAGCGCCAGGTGTGGCTGCTCTTTGAGTATCCGGAGAGCTCAGGACCTGCACGGGTTATTGCCATTGTA
	S V M V I L I S I V I F C L E T L P E L K D D K D F T G
921	TCCGTCATGGTCATCCTCATCTCCATAGTCATCTTTTGCCTGGAGACTCTCCCTGAGCTGAAGGATGACAAGGACTTCACGGGC
	T I H R I D N T T V I Y T S N I F T D P F F I V E T L C
1005	ACCATTCACCGCATCGATAACACCACAGTCATCTACACTTCTAACATCTTCACAGACCCTTTCTTCATTGTGGAAACCTTGTGT
1	I I W F S F E L V V R F F A C P S K T D F F K N I M N F
1089	ATCATCTGGCTTGTTGTGTGGGGTGGTGGGGCTTCTTCGCCTGCCCCAGCAAGACAGAC
1100	
11/3	ATCGACATIGTGGCCATCATCCCTTATTTCATTACCCTGGGCACAGAGAGTGGCAGGGGGAATCAGAGGGGGAATCAGAAGGGCGAGCAG
	DSLAI
	<b>2 T S</b> I. 2 T I. P V T P I. V P V F P T F K I. S P H S K C I.
1257	
1257	
1341	
	S S A V Y F A E A E E A E S H F S S T P D A F W W A V V
1425	TCTAGTGCAGTGTACTTTGCGGAGGGGAAGAAGTGAGTCGCACTTCTCCAGTATCCCCCGATGCTTTCTGGTGGGGGGGG
	SMTTVGYGDMYPVTTGGKTVGSLCATAG
1509	TCCATGACCACTGTGGGATACGTGACATGTACCCTGTGACAATTGGAGGCAAGATCGTGGGCTCCTTGTGTGCCATCGCTGGT
	V L T I A L P V P V I V S N F N Y F Y H R E T E G E E O
1593	GTGCTGACAATTGCCCTGCCCGTACCTGTCATTGTGTCCCAATTTCAACTATTTCTACCACCGAGAAACTGAGGGGGAAGAGCAG
	A Q L L H V S S P N L A S D S D L S R R S S S T I S K S
1677	GCTCAGTTGCTCCATGTTAGTTCTCCTAACTTAGCCTCTGACAGTGACCTCAGCCGCCGCAGCTCCTCTACTATCAGCAAGTCT
	E Y M E I E E D M N N S I A H Y R Q A N I R T G N C T A
1761	GAGTACATGGAGATCGAAGAGGACATGAACAATAGCATAGCCCACTACAGGCAGG
	HindIII BstEII
	~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
	T D Q N C V N K S K L L T D V *
1845	ACTGATCAAAACTGCGTTAATAAGAGCAAGCTCCTGACCGATGTTTAATTCTCTAGAGCAAGCTTGATCTGGTTACCACTAAAC

Aminosäure- und DNA-Sequenz der Kv1.1 cDNA des Klones Kv1.1 pgem HE-Juel. Die fett-markierten Aminosäuren entsprechen den Positionen, die in dieser Studie zu Alanin und Lysin mutiert wurden. Es wurden via Overlap-PCR (Methoden 1.7.1) Fragmente mit dem erwünschten Aminosäureaustausch generiert und in das Konstrukt Kv1.1 pgem HE-Juel kloniert (Methoden 1.6.1). Für alle mutierten Positionen mit Ausnahme von T286 und S287 wurden AccIII/BstXI- Fragmente kloniert. Für T286 und S287 wurden BstEII-Fragmente eingefügt.



Kv2.1 cDNA

	M P A G M T K H G S R S T S S L P P F P M F T V R S
85	TCCCCTATGCCGGCGGCATGACGAAGCATGGCTCCCCCCACCAGCTCGCCGCCCCAGGAGCTCGTGCCGCCGCAGCCAGGAGATCGTGCGCGCCGAGC
169	A C S K K V K L N V G G L A H E V L W K I L D K L P K AAGGCGTGCTCTCGGCGGGTCCGCCTCAACGTCGGGGGGGCTGGCGCACGAGGTACTCTGGCGTACCCTGGACCGCCTGCCCCGC
	T R L G K L R D C N T H D S L L E V C D D Y S L D D N E
253	ACGCGGCTGGGCAAGCTCCGCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC
337	TACTTCTTTGACCGCCACCCGGGCGCCTTCACCTCCATCCTCCACCTCCACCTCCACCGCGCGACTGCACATGATGGAGGAGAGAG
421	C A L S F S Q E L D Y W G I D E I Y L E S C C Q A R Y H TGCGCGCTCAGCTAGCCAAGAGCTCGACTACTGGGGGCATCGACGAGAGTCTACCTGGCAGGCCCGCCAGCCA
505	Q K K E Q M N E E L K R E A E T L R E R E G E E F D N T CAGAAGAAAGAGGAGGAGGAGGAGGGAGGGGAGGGGAG
500	C C A E K R K K L W D L L E K P N S S V A A K I L A I I
589	TGCTGCGCAGAGAGAGAGAGAAAAACTCTGGGACCTACTGGAGAAGCCCAATTCCTCTGTGGCTGCCAAGATCCTTGCCATAATT S I M F I V L S T I A L S L N T L P E L Q S L D E F G Q
673	TCCATCATGTTCATCGTCCTCCACCATTGCCCTGTCCCTCAACACGCTGCCTGAGCTACAGAGCCTCGATGAGTTCGGCCAG
757	TCCACAGACAACCCCCAGCTGGCCCACGTGGAGGCCCGTGTGCATCGCATGGGTTCACCATGGAGGTACCTGCTGAGGTTCCTCTCC
	Bsp120I
0.41	SPKKWKFFKGPLNAIDLLAILPYYVTIF
841	TCGCCCAAGAAGTGGAAGTTCTTCAAGGGCCCACTCAATGCCATTGACTTGTTGGCCATTCTGCCATACTATGTCACCATTTTC EcoRI
	~~~~~
0.25	L T E S N K S V L Q F Q N V R R V V Q I F R I M R I L R
925	T L K L A R H S T G L O S L G F T L R R S V N F L G L L
1009	ATCCTTAAGCTTGCACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
	I L F L A M G I M I F S S L V F F A E K D E D D T K F K
1093	ATCCTCTTCCTTGCCATGGGCATTATGATCTTCTCCCAGCCTTGTCTTTGCTGAGAAGGATGAGGACGACACCAAGTTCAAA
1177	AGCATCCCAGCCTCTTTCTGGTGGGCCACCATCACCATGACTACTGTTGGGTATGGAGACATCTACCCCAAGACTCTCCTGGGG
	K I V G G L C C I A G V L V I A L P I P I I V N N F S E
1261	AAAATTGTTGGGGGACTCTGCTGCATTGCAGGAGTCCTGGTGATTGCTCTCCCATCACCACTAACTTCTCTGAG
1345	TTCTATAAGGAGCAGAAGAGAGAGAGAGAGAGCAATCAAACGGCGAGAGGGCTCTGGAGAGAGGCCAAGAGGAATGGCAGCATCGTA
	SMNMKDAFARSIEMMDIVVEKNGENMGK
1429	TCCATGAACATGAAGGATGCTTTTGCCCGGAGCATTGAGATGATGATGGACATTGTGGTTGAGAAAAATGGGGAGAATATGGGTAAG K D K V O D N H L S P N K W K W T K R T L S E T S S S K
1513	AAAGACAAAGTACAAGATAACCACTTGTCTCCTAACAAATGGAAATGGACAAAGAGGACACTGTCTGAAACCAGCTCAAGTAAG
1507	S F E T K E Q G S P E K A R S S S S P Q H L N V Q Q L E
1391	D M Y N K M A K T Q S Q P I L N T K E S A A Q S K P K E
1681	GACATGTACAATAAGATGGCCAAGACCCAATCCCAACCCATCCTCAATACCAAGGAGTCAGCAGCAGAGCAAAACCAAAGGAA
1765	ELEMESIPSPVAPLPIRIEGVILDURSSMAAA
1705	S I D S F I S C A T D F P E A T R F S H S P L T S L P S
1849	AGCATTGATAGTTTCATTAGCTGTGCCACAGACTTCCCTGAGGCCACCAGATTCTCCCACAGCCCTTTGACATCACTCCCCAGC
1933	K T G G S T A P E V G W R G A L G A S G G R F V E A N P AAGACTGGGGGCAGCACAGCCCCAGAAGTGGGCTGGCGGGGAGCTCTGGGTGGCCAGTGGTGGTAGGTTTGTGGAGGCCAACCCC
	S P D A S Q H S S F F I E S P K S S M K T N N P L K L R
2017	AGCCCTGATGCCAGCCAGCACTCTAGTTTCTTCATCGAGAGCCCCCAAGAGTTCCATGAAAACTAACAACCCTTTGAAGCTCCGA A I, K V N F M E G D P S P I, I, P V I, G M Y H D P I, R N R
2101	${\tt GCacttaaagtcaacttcatggagggtgaccccagtccactcctccccgttctagggatgtaccatgaccctctcaggaaccgg}$
21.05	G S A A A A V A G L E C A T L L D K A V L S P E S S I Y
2185	GGGAGIGCIGCGGCIGCIGCGCIGGACIGGGGCIGGGCCAGGGCIGCIGCGGGGCCGGGGCCGGGGCCCGGGGCCCGGGGCCCGGGGCCCGGGG
2269	ACCACAGCAAGTGCTAAGACACCCCCCCGGTCTCCTGAGAAACACACAC
2252	Y I D A D T D D E G Q L L Y S V D S S P P K S L P G S T
4333	S P K F S T G T R S E K N H F E S S P L P T S P K F L R
2437	AGTCCGAAGTTCAGCACGGGGACAAGATCGGAGAAAAACCACTTTGAAAGCTCCCCCTTTACCCACCTCCCCTAAGTTCTTAAGG
0501	Q N C I Y S T E A L T G K G P S G Q E K C K L E N H I S
7271	CAGAAUTGTATTTACTUCACAGAAGCATTGACTGGCAAAAGGCUCCCAGTGGTCAGGAAAAGTGCAAACTTGAGAAACCACATCTCC
2605	CCTGACGTCCGTGTGTTGCCAGGGGGGGGGGGGGGGGGG

Aminosäure -und DNA-Sequenz der Kv2.1 cDNA des Klones Kv2.1 pgem HE-Juel. In der Chimäre Mu15 wurde der hier fett-markierte Bereich im S3-S4-Linker gegen die Kv1.1 S3-S4Linker-Sequenz: LGTEIAEQEGNQKGEQLAI ausgetauscht. Es wurde ein rekombinantes Fragment via Overlap-PCR (Methoden 1.7.2) hergestellt und als Bsp120I/EcoRI-Fragment in Kv2.1 pgem HE-Juel kloniert (Methoden 1.6.1).

## 3. Verwendete Primer

Name	Sequenz (5'3')	DNA-Tamplate	Funktion
		(+/-)-Strang	
P100	gagcagatacgaatggctac	pGEM HA-Jul	
		(-) bp 217-bp 236	
T7	aatacgactcactataggg	pGEM HA-Jul	
		(+) bp3033-bp3	
P105	ccctgggcacagcgatagctgagcag	rKCNA1 (Klon AN1)	site-directed
		(+)	mutagenesis (E272A)
P106	ctgctcagctatcgctgtgcccaggg	rKCNA1 (Klon AN1)	site-directed
		(-)	mutagenesis (E272A)
P107	ttcattaccctggccacagagatagc	rKCNA1 (Klon AN1)	site-directed
		(+)	mutagenesis (G270A)
P108	gctatctctgtggccagggtaatgaa	rKCNA1 (Klon AN1)	site-directed
		(-)	mutagenesis (G270A)
P109	cttatttcattaccgcgggcacagag	rKCNA1 (Klon AN1)	site-directed
		(+)	mutagenesis (L269A)
P110	ctctgtgcccgcggtaatgaaataag	rKCNA1 (Klon AN1)	site-directed
		(-)	mutagenesis (L269A)
P111	taccctgggcgcagagatagctgag	rKCNA1 (Klon AN1)	site-directed
		(+)	mutagenesis (L271A)
P112	ctcagctatctctgcgcccagggta	rKCNA1 (Klon AN1)	site-directed
		(-)	mutagenesis (L271A)
P113	tctcggtggtagaagtagttg	rKv1.1 (Klon AN1)	Sequencing
		(-) bp1638-bp1658	
P114	ttccgtgaggacgagggcttcatcaagg	rKCNA1 (Klon AN1)	Sequencing
<b>D</b> 116	aagaggag	(+) bp//93-bp828	
P116	gatcaacatctctgggctg	rKCNA1 (Klon AN1)	Sequencing
D115		(+) bp525-bp543	
P117	ctgggcacagaggcagctgagcagg	rKCNAI (Klon AN1)	Site directed
D110		(+)	mutagenesis (12/3A)
P118	cctgctcagctgcctctgtgcccag	rKCNAI (Klon ANI)	Site directed
D110		(-)	mutagenesis (12/3A)
P119	ggcacagagatatgggagcaggagg	$\mathbf{rKCNA1} (\mathbf{Klon} \mathbf{AN1})$	Site directed
D120	<u>gg</u>	(+)	Site dimeted
F120	cccciccigcicccatatcicigigcc	()	sile difected
P121		(-)	Site directed
1121			muta ganagia (E275 A)
P122		(+)	Site directed
1122	galleeeeleelgegeagelaleleig		muta genesis (F275 $\Delta$ )
P123	agastaactagaacaagaagagagagagag	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
	a		mutagenesis (0276A)
P124		rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (O276A)
P125		rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
	ad	(+)	mutagenesis (E277 A)
P126		rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (E277A)

P127	ctgagcaggaggcgaatcagaaggg	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (Q278A)
P128	cccttctgattcgcctcctgctcag	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (Q278A)
P129	gagcaggagggggctcagaagggcg	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
	ag	(+)	mutagenesis (N279A)
P130	ctcgcccttctgagccccctcctgctc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (N279A)
P131	gcaggaggggaatgcgaagggcgag	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
	C	(+)	mutagenesis (Q280A)
P132	gctcgcccttcgcattcccctcctgc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (Q280A)
P133	gaggggaatcaggcgggcgagcagg	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
	С	(+)	mutagenesis (K281A)
P134	gcctgctcgcccgcctgattcccctc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (K281A)
P135	ggaatcagaaggccgagcaggccac	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (G282A)
P136	gtggcctgctcggccttctgattcc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (G282A)
P137	gaatcagaagggcgcgcaggccactt	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
<b>D120</b>	C	(+)	mutagenesis (E283A)
P138	gaagtggcctgcgcgcccttctgattc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
D120		(-)	mutagenesis (E283A)
1 1 3 9		(1)	site difected
P140	9	(+)	Site directed
1140		(-)	mutagenesis $(0.284 \text{ A})$
P141	tagtggtaaccagate	nGEMHeIul	Sequencing
		(-) hn119-hn134	sequeneing
P142		hK v2.1	Chimera
	aa	(+)	Kv2.1 S3S4Kv1.1
P143		hK v2.1	Chimera
	aa	(-)	Kv2.1 S3S4Kv1.1
P144	acttetttacetace	rKCNA1 (Klon AN1)	Sequencing
		(+) bp1121-bp1135	
P145	tatttcattaagctgggcacagag	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (T268K)
P146	ctctgtgcccagcttaatgaaata	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (T268K)
P147	atttcattaccaagggcacagag	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (L269K)
P148	ctctgtgcccttggtaatgaaat	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (L269K)
P149	ttcattaccctgaagacagagatagc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (G270K)
P150	gctatctctgtcttcagggtaatgaa	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (G270K)
P151	taccctgggcaaagagatagctgag	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (T271K)

P152	ctcagctatctctttgcccagggta	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (T271K)
P153	ccctgggcacaaagatagctgagc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (E272K)
P154	gctcagctatctttgtgcccaggg	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (E272K
P155	tgggcacagagaaagctgagcagg	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (I273K)
P156	cctgctcagctttctctgtgccca	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (I273K)
P157	gcacagagataaaggagcaggaggg	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (A274K)
P158	ccctcctgctcctttatctctgtgc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (A274K)
P159	catactatgtcaccctgggcacagag	hK v2.1	Chimera
		(+)	Kv2.1_S3S4Kv1.1#2
P160	catgatgcggaagatcctgaggatggc	hK v2.1	Chimera
		(-)	Kv2.1_S3S4Kv1.1#2
P161	cccagcttcgatggc	rKCNA1 (Klon AN1)	Sequencing
1/11		(+) bp664-bp678	~
P162	cagagatagctaagcaggaggggaa	rKCNAI (Klon AN1)	Site directed
D1(2		(+)	mutagenesis (E2/5K)
P103	ttcccctcctgcttagctatctctg	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
<b>D16</b> /		(-)	Mutagenesis (E2/5K)
1104	gagalagcigagaaggagggggaalc		muta gapagia (O276K)
P165	aottopostopttotopostototo	(+)	Site directed
1100	gallecelecticicagetatete		mutagenesis (O276K)
P166	tanctnancanaannnnaatcan	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (E277K)
P167	ctgattccccttctgctcagcta	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (E277K)
P168		rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (G278K)
P169	ccttctgattcttctcctgctcag	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (G278K)
P170	gcaggaggggaagcagaagggcga	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
	g	(+)	mutagenesis (N279K)
P171	ctcgcccttctgcttcccctcctgc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (N279K)
P172	caggaggggaataagaagggcgagc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (Q280K)
P173	gctcgcccttcttattcccctcctg	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (Q280K)
P174	gggaatcagaagaaggagcaggcca	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
	С	(+)	mutagenesis (G282K)
P175	gtggcctgctccttcttctgattccc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
2176		(-)	mutagenesis (G282K)
P176	tcagaagggcaagcaggccacttc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (E283K)

P177	gaagtggcctgcttgcccttctga	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (E283K)
P228	cagaagggcgagaaggccacttcc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (Q284K)
P229	ggaagtggccttctcgcccttctg	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (Q284K)
P230	gcgagcaggccgcttccctggcc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (T286A)
P231	ggccagggaagcggcctgctcgc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (T286A)
P232	cgagcaggccaagtccctggccatc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (T286K)
P233	gatggccagggacttggcctgctcg	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (T286K)
P234	gcaggccactgccctggccatc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(+)	mutagenesis (S287A)
P235	gatggccagggcagtggcctgc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
Daak		(-)	mutagenesis (S287A)
P236	gcaggccactaagctggccatcctc	rKCNAI (Klon AN1)	Site directed
D005		(+)	mutagenesis (S287K)
P237	gaggatggccagcttagtggcctgc	rKCNAI (Klon AN1)	Site directed
<b>D220</b>		(-)	mutagenesis (S28/K)
P238	gtactttgcggcggcggaagaagc	rKCNAI (Klon ANI)	Site directed
P230	a ottottoo a o o a o o a to o	(+)	Site directed
1 239	genencegeegeegeaaagiae		muto ganagia (E248 A)
P240	ataatttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	(-)	Site directed
1240	giaciligogaaggoggaagaago	$(\pm)$	muta gapesis (F3/8K)
P241	acttetteegeettegeegegtee	$(\top)$ rKCNA1 (Klop AN1)	Site directed
1 2 1 1	genericegeenegeaaagiae		mutagenesis (F3/8K)
P242	tatttcattoccctogocacagag	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
	lanicaligeeeigggeaeagag		mutagenesis (T268A)
P243		rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (T268A)
P244	gggcgagcagaagacttccctgg	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
	333-3-3-3-23-23-23-23-23-23-23-23-23-23-	(+)	mutagenesis (A285K)
P245	ccagggaagtcttctgctcgccc	rKCNA1 (Klon AN1)	Site directed
		(-)	mutagenesis (A285K)

### 4. Lebenslauf

geboren am 24. 10. 72

Diplom-Biologie an der Universität Göttingen
Vordiplom: Okt. 1995
Diplom-Biologie an der Universität Hamburg
Diplom: Jan. 2000
Diplomarbeit im Institut von Prof. Dr. O. Pongs
am Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg.
Titel: "Klonierung und Charakterisierung neuer $\beta$ -
Untereinheiten von BK-Kanälen"
Dissertation im Institut von Prof. Dr. O. Pongs
am Zentrum für Molekulare Neurobiologie in
Hamburg. Thema: "Untersuchungen zur
neuronalen Toxizität von Pb ²⁺ "
Kings College, London, UK
Teilnahme am Studien-Austauschporgramm
"Erasmus" im Fachbereich Biologie

#### Publikationen

Behrens, R., A. Nolting, et al. (2000). "hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family." FEBS Lett **474**(1): 99-106.

Ich danke Herren Prof. Dr. O. Pongs für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Institut für Neurale Signalverarbeitung am Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg durchführen zu können. Auch für die intensive Betreuung und hilfreiche Diskussionen bin ich dankbar.

Bei Herren Prof. Dr. Gewecke bedanke ich mich für die Bereitschaft, diese Arbeit als externe Promotion zu betreuen.

Für die Betreuung während der ersten zwei Jahre meiner Arbeit möchte ich mich auch bei Dr Christian Legros bedanken.

Bei Herren Prof. Dr. Madeja bedanke ich mich für die Überlassung elektrophysiologischer Ergebnisse, die mir bei der Diskussion meiner Arbeit sehr hilfreich waren.

Ein Dank gilt auch Vitya Vardanyan für die geduldige Einführung in elektrophysiologische Arbeitstechniken.

Für oft hilfreiche Diskussionen und ermutigende Worte danke ich Dr. Manuel Gebauer, Dr. Nicole Schmidt, Dr. Christian Peters, Birgit Grafelmann, Iris Meier, Elena Fernandez, Sönke Hornig, Britta Callsen und Malte Stockebrand.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft.