

**Untersuchung  
der Inaktivierung des humanen Kv4.2-Kanals  
und der Effekte von Kv-Kanal-interagierenden  
Proteinen (KChIPs)**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
im Fachbereich Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Manuel Gebauer**

Hamburg 2004

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: 11. Juli 2003

Hamburg, den 25. Juni 2003



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Frühwald'.

Professor Dr. A. Frühwald  
Dekan

## Zusammenfassung

Kv4-Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Membranspannung erregbarer Zellen. Sie vermitteln in Herzmuskelzellen den transienten  $K^+$ -Auswärtsstrom ( $I_{to}$ ) und in Neuronen den somatodendritischen A-Typ-Strom. In dieser Arbeit wurden die Steuerungseigenschaften von humanen Kv4.2-Kanälen und deren Modulation durch Varianten einer akzessorischen Untereinheit ( $K^+$ -Kanal interagierendes Protein, KChIP) untersucht. Dazu wurden funktionelle Kanäle mit und ohne KChIP-Varianten in humanen, embryonalen Nierenzellen (HEK 293) und in Ovarienzellen des chinesischen Zwerghamsters (CHO) transient exprimiert und Kv-Kanal vermittelte  $K^+$ -Ströme mit der Patch-Clamp Technik in der Whole-Cell- und Inside-Out-Konfiguration gemessen. Die Analyse der Steuerungseigenschaften von Kv4.2-Kanälen in HEK 293-Zellen zeigte, dass der Kv4.2-Inaktivierung zwei Prozesse zugrunde liegen: eine Inaktivierung des geschlossenen Zustands und eine Inaktivierung des offenen Zustands. Beide Prozesse tragen zum schnellen Abfall der Ströme während der Inaktivierung bei. Zum Ende eines depolarisierenden Puls akkumulieren die Kanäle jedoch in dem geschlossen-inaktivierten Zustand. Die Untersuchung einer N-terminalen Deletionsmutante (Kv4.2 $\Delta$ 2-40) sowie einer Kanal-Chimäre (Kv2.1(4.2NT)), in welcher der cytoplasmatische N-Terminus des Kv2.1-Kanals durch den entsprechenden Bereich des Kv4.2-Kanals ersetzt wurde, führte zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei der Inaktivierung des offenen Zustands von Kv4.2-Kanälen um die Blockierung des Kanals durch eine N-terminale Inaktivierungsdomäne handelt. Es wurden dreizehn KChIP-Varianten untersucht (KChIP1.1, KChIP2.1 - 2.6, KChIP3.1 - 3.2 und KChIP4.1-4.4), die nach ihren Effekten in drei Gruppen eingeteilt werden konnten: (1) Varianten ohne deutliche Effekte auf Kv4.2-Ströme, (2) Varianten, die sowohl die Kv4.2-Expression erhöhten, als auch die Inaktivierung des Kv4.2-Kanals modulierten und (3) eine einzelne Variante (KChIP4.4), durch welche die Inaktivierung von Kv4.2 besonders stark verlangsamt wurde. Die Effekte von typischen Varianten der 2. Gruppe (KChIP2.1 bzw. KChIP2.2) auf die Steuerungseigenschaften von Kv4.2 konnten auf eine Behinderung der Inaktivierung des offenen Zustands, die Beschleunigung des Schließens der Kanäle und die Verringerung der Energieschwelle für die Inaktivierung im geschlossenen Zustand zurückgeführt werden.

## Abkürzungen

4-AP	4-Aminopyridin
A	Amplitude
AP	Aktionspotential
bp	Basenpaare
BES	<i>balanced electrolyte solution</i>
$C$	Kapazität
$C_p$	Pipettenkapazität
$C_m$	Membrankapazität
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
$G$	Leitfähigkeit
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperzino)-ethanolsulfonsäure
$I$	Strom
$I_{max}$	maximaler Strom (in einer Pulsserie)
$I_{peak}$	maximaler Strom (in einer Stromspur)
$k$	Steigungsfaktor der Boltzmann-Gleichung
$k_{xy}$	Rate eines Zustandsübergangs von x nach y
$[K^+]_i$	intrazelluläre Kaliumkonzentration
$[K^+]_o$	extrazelluläre Kaliumkonzentration
KChIP	<i>K<sup>+</sup>-channel interacting protein</i>

Kv	spannungsgesteuerter K <sup>+</sup> -Kanal
MEM	<i>minimal essential medium</i> , Minimalmedium
NT	N-Terminus eines Proteins
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
RNA	Ribonukleinsäure
R	Widerstand
$R_s$	Serienwiderstand
$R_f$	Rückkopplungswiderstand
$R_g$	Sealwiderstand
$R_m$	Membranwiderstand
S1 bis S6	Membransegmente der Kv-Kanäle
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
$t$	Zeit
$\tau$	Zeitkonstante
T1	Tetramerisierungsdomäne
TEA	Tetraethylammonium
V	Spannung
$V_m$	Membranspannung
$V_{1/2}$	Spannung der halbmaximalen Aktivierung oder Inaktivierung

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung . . . . .	2
Abkürzungen . . . . .	3
<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 A-Typ Kv-Kanäle . . . . .	7
1.2 Akzessorische Untereinheiten von Kv-Kanälen . . . . .	11
1.3 Zielsetzung . . . . .	12
<b>2 Methoden</b>	<b>13</b>
2.1 Proteinexpression . . . . .	13
2.1.1 Verwendete Klone . . . . .	13
2.1.2 Zellkultur . . . . .	14
2.1.3 Transfektion . . . . .	15
2.2 Proteinbiochemische Methoden . . . . .	16
2.2.1 Western-Blot-Analyse . . . . .	16
2.3 Elektrophysiologische Techniken . . . . .	16
2.3.1 Patch-Clamp Technik . . . . .	16
2.3.2 Versuchslösungen und applizierte Substanzen . . . . .	20
2.4 Datenerfassung und Auswertung . . . . .	20
2.5 Modellierung . . . . .	24
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1 Steuerungseigenschaften des Kv4.2-Kanals . . . . .	25
3.1.1 Kv4.2-Ströme in HEK 293-Zellen . . . . .	25
3.1.2 Inaktivierung des Kv4.2-Kanals . . . . .	26
3.1.3 Modellierung der Kv4.2-Inaktivierung . . . . .	31
3.1.4 Effekte N-terminaler Deletion . . . . .	36
3.2 Untersuchung der Kv4.2-Inaktivierung im offenen Zustand . . . . .	40
3.2.1 Inaktivierung des Kv2.1-Kanals durch den Kv4.2-N-Terminus . . . . .	40
3.2.2 Erholung aus der Inaktivierung von Kv2.1(4.2NT) . . . . .	45

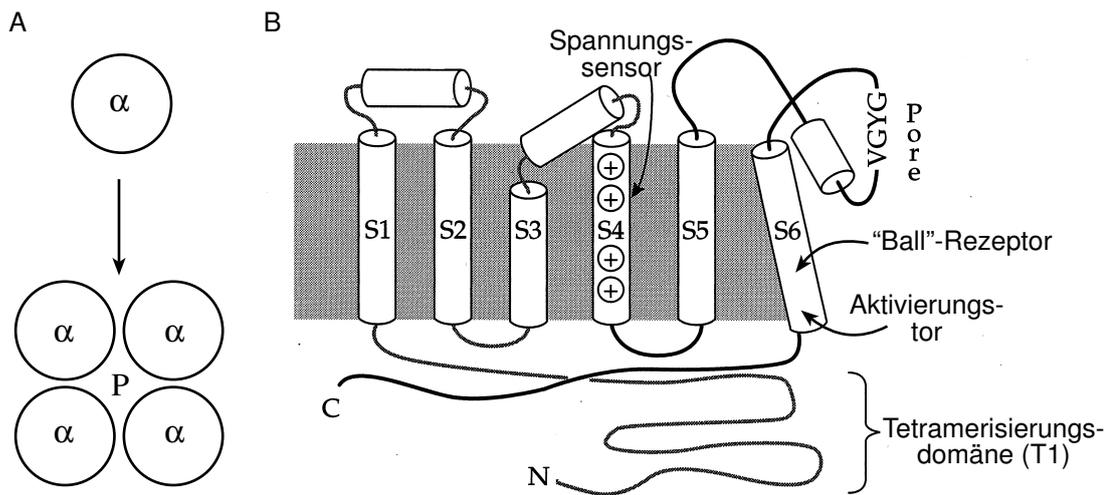
3.2.3	Inaktivierung des offenen Zustands bei Kv4.2 . . . . .	47
3.3	Effekte von KChIP-Varianten auf Kv4.2-Ströme . . . . .	52
3.3.1	Verstärkung der funktionellen Expression durch KChIP . . . . .	54
3.3.2	KChIP-Effekte auf die Kv4.2-Steuerung . . . . .	57
3.4	Analyse der KChIP-Effekte auf die Kv4.2-Inaktivierung . . . . .	64
3.4.1	Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2-Kanälen . . . . .	64
3.4.2	KChIP-Effekte auf die Inaktivierung im offenen Zustand . . . . .	69
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
4.1	Inaktivierungsprozesse der Kv4.2-Steuerung . . . . .	75
4.2	Mechanismen der Modulation durch KChIP . . . . .	80
4.3	Funktionelle Relevanz der KChIP-Effekte . . . . .	85
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>88</b>
	Wissenschaftlicher Werdegang . . . . .	99
	Danksagung . . . . .	100

# 1 Einleitung

## 1.1 A-Typ Kv-Kanäle

Spannungsgesteuerte  $K^+$ -Kanäle (Kv-Kanäle) spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Membranspannung erregbarer Zellen. Den unterschiedlichen Funktionen der Kv-Kanäle entspricht eine Vielfalt von Kv-Kanal-Arten mit einem jeweils typischen Schaltverhalten. Die prinzipielle Struktur ist jedoch für alle Kv-Kanäle gleich (Hille, 2001). Es handelt sich um Tetramere aus  $\alpha$ -Untereinheiten (MacKinnon, 1991), die eine zentrale Pore umkleiden (Abb. 1 A). Die Pore ermöglicht den Fluss von  $K^+$ -Ionen über die hydrophobe Zellmembran. Die  $\alpha$ -Untereinheiten der Kv-Kanäle besitzen sechs Transmembransegmente, die fortlaufend als S1 bis S6 bezeichnet werden (Abb. 1). Die zentrale Pore wird von den S6-Segmenten umgeben. Ein Teil des Bereichs, der die Segmente S5 und S6 miteinander verbindet (S5-S6-Linker, Porenschleife), bildet den Selektivitätsfilter, eine Struktur die der selektiven Permeation von  $K^+$ -Ionen dient (Doyle et al., 1998). Unterhalb des Selektivitätsfilters befindet sich ein weiter Hohlraum der auf der cytoplasmatischen Seite durch ein Tor geschlossen werden kann. Das Aktivierungstor wird durch die C-terminalen Bereiche der S6-Segmente gebildet (Jiang et al., 2002). Das S4-Segment enthält positiv geladene Aminosäuren und stellt den Spannungssensor dar (vgl. Sigworth, 1994; Yellen, 1998) und kann das Aktivierungstor in Abhängigkeit von der Membranspannung öffnen oder schließen. Der cytoplasmatische N-Terminus der Kv-Kanäle enthält eine Tetramerisierungsdomäne (T1), die die Tetramerisierung der  $\alpha$ -Untereinheiten zu funktionellen Kanälen unterstützt (Shen und Pfaffinger, 1995; Li et al., 1992). Die vier cytoplasmatischen T1-Domänen sind als „hängende Gondel“ (*hanging gondola*, Kobertz et al., 2000) über eine Verbindung (Linker) mit den S1-Segmenten verknüpft. Vor der T1-Domäne befindet sich noch eine Sequenz, die hier als proximaler N-Terminus bezeichnet werden soll.

Der den Kanal bildende Proteinkomplex ist keine starre Struktur, sondern kann unterschiedliche Konformationen einnehmen, die die Funktion des Kanals bestimmen.



**Abb. 1:** **A:** Kv-Kanäle sind Tetramere aus vier  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha$ ), die eine zentrale Pore (P) umschließen. **B:** Die  $\alpha$ -Untereinheit der Kv-Kanäle hat sechs Membransegmente (S1 bis S6). Einige Regionen mit bekannter Funktion sind angegeben (nach Hille (2001)).

Häufig auftretende, metastabile Konformationen kann man als Zustände voneinander unterscheiden. Bei negativen Membranspannungen befinden sich Kv-Kanäle in einem deaktivierten, geschlossenen Zustand. Eine Depolarisation der Membran kann zu einer Bewegung des Spannungssensors führen (aktivierter Zustand), die wiederum Voraussetzung für das Öffnen des cytoplasmatischen Tors ist (geöffneter Zustand). Zwischen der deaktivierten und der vollständig aktivierten Stellung der Spannungssensoren liegt eine Reihe unterscheidbarer Zustände, die man als Aktivierungskette bezeichnet. Nur im geöffneten Zustand sind Ionenkanäle leitfähig und so der direkten Beobachtung mit elektrophysiologischen Methoden zugänglich. Eine Repolarisation führt zum Schließen der offenen Kanäle und zur Deaktivierung der Spannungssensoren. Das Schließen der Kanäle während des Deaktivierungsprozess kann man durch die Tailströme beobachten. Neben dem Schließen des Aktivierungstors gibt es bei vielen Kv-Kanälen einen weiteren Prozess, der den Kanal bei positiven Spannungen in einen nicht leitfähigen Zustand versetzt, die Inaktivierung.

Eine Gruppe von Kv-Kanälen, deren Mitglieder sich durch einen transienten, d. h. schnell aktivierenden und schnell inaktivierenden Strom auszeichnen, wird als A-Typ-Kanäle bezeichnet. Die Bezeichnung A-Typ kommt von ihrer Erstbeschreibung in Neuronen der Schnecke *Anisodoris* her (Connor und Stevens, 1971a,b). A-Typ Ströme spielen eine physiologische Rolle bei der prä- und postsynaptischen Erre-

gung (Pongs, 1999), sowie als transients Auswärtsstrom in Herzmuskelzellen (Dixon et al., 1996). Zwar gleichen sich A-Typ-Kanäle in wichtigen Steuerungseigenschaften, sie werden jedoch durch eine eher heterogene Gruppe von Kv-Kanal-Genen kodiert. Das *Shaker*-Gen der Fruchtfliege *Drosophila* war das erste klonierte Gen, das einem  $K^+$ -Kanal zugeordnet werden konnte (Tempel et al., 1987; Kamb et al., 1988; Pongs et al., 1988). Der *Shaker*-Kanal wurde zu einem gut untersuchten Prototypen für das Verständnis der Struktur und Funktion von Kv-Kanälen. So ist der Mechanismus der schnellen *Shaker*-Inaktivierung sehr gut verstanden. Die ihm zu Grunde liegenden Strukturen wurden mit einem Ball an einer Kette (*ball and chain*) verglichen (Hoshi et al., 1990, 1991): Eine bewegliche Domäne des N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit (Zagotta et al., 1990) oder einer akzessorischen  $\beta$ -Untereinheit (Rettig et al., 1994) fungiert als Inaktivierungspartikel, der die offene Pore des Kanals verschließt. Diese Inaktivierung wird als N-Typ-Inaktivierung bezeichnet, da sie durch das Entfernen der N-terminalen, inaktivierenden Domäne unterbunden (Hoshi et al., 1990) und durch Applizieren des N-terminalen Peptids von der cytoplasmatischen Seite wieder hergestellt werden kann (Zagotta et al., 1990). Als Rezeptor für die inaktivierende N-terminale Domäne wurde zunächst eine Stelle an der inneren Porenmündung vorgeschlagen (Isacoff et al., 1991), tatsächlich befindet sich der Rezeptor jedoch tief innerhalb der Pore (Zhou et al., 2001). Die Bindestelle im Hohlraum der Pore überschneidet sich mit einer Bindestelle für quaternäre Amine, die als Kanalblocker wirken. Daher beeinflusst intrazelluläres Tetraethylammonium (TEA) die N-Typ-Inaktivierung (Choi et al., 1991). Der Einstrom von  $K^+$  vertreibt die inaktivierende Domäne von ihrer Bindestelle. Das führt zu einer Beschleunigung der Erholung aus der Inaktivierung bei hoher, extrazellulärer  $K^+$ -Konzentration (Demo und Yellen, 1991). Die N-Typ-Inaktivierung hält den Kanal in einem offen-inaktivierten Zustand und hindert ihn am Schließen. Da deshalb die Erholung aus der Inaktivierung über den offenen Zustand verläuft, zeigen inaktivierte *Shaker*-Kanäle typischerweise deutliche Tailströme in hoher extrazellulärer  $K^+$ -Konzentration, wenn die Membran repolarisiert wird (Demo und Yellen, 1991; Ruppertsberg et al., 1991).

Neben dieser schnellen N-Typ Inaktivierung unterliegen *Shaker*-Kanäle auch einer langsameren C-Typ Inaktivierung (Hoshi et al., 1991), aus der sich die Kanäle nur langsam erholen. Da diese Inaktivierung fortbesteht, wenn die N-terminale Inaktivierungsdomäne entfernt wird, schloss man auf eine Rolle eher C-terminal gelegener Bereiche der  $\alpha$ -Untereinheit und wählte daher den Name C-Typ. Die C-Typ-Inaktivierung ist sensitiv gegenüber externem TEA und gegenüber Mutationen im

extrazellulären Mündungsbereich der Pore (Lopez-Barneo et al., 1993). Der Mechanismus der C-Typ-Inaktivierung besteht darin, dass der äußere Porenbereich kollabiert. Dieser Vorgang wird begünstigt, wenn die Pore nicht mit  $K^+$  besetzt ist und daher durch eine geringe äußere  $K^+$ -Konzentration verstärkt (Baukrowitz und Yellen, 1995). Da nur geöffnete Kanäle der C-Typ-Inaktivierung unterliegen, wird sie durch die N-Typ Inaktivierung begünstigt, welche die Verweildauer des Kanals im offenen Zustand erhöht. Zudem führt die N-Typ-Inaktivierung zu einer Verarmung der Pore an  $K^+$ -Ionen, was ebenfalls die C-Typ-Inaktivierung verstärkt (Baukrowitz und Yellen, 1995). Man spricht daher von einer N-C-Kopplung (Hoshi et al., 1991).

Neben dem *Shaker*-Gen gibt es drei weitere *Drosophila*-Gene (*Shab*, *Shaw*, *Shal*), die Kv-Kanäle kodieren. Diese entsprechen den diversifizierten Kv-Kanal Unterfamilien Kv1, Kv2, Kv3 und Kv4. Typische A-Typ-Ströme werden durch die  $\alpha$ -Untereinheiten von Kv1.4, Kv3.3 und Kv3.4, sowie den drei Mitgliedern der Kv4-Unterfamilie Kv4.1, Kv4.2 und Kv4.3 vermittelt.

Während Kv1.4 in Neuronen axonal und in Axonendigungen lokalisiert ist, vermitteln Kv4-Kanäle den somatodendritischen A-Typ-Strom (Baldwin et al., 1991; Pak et al., 1991; Serodio et al., 1994, 1996), was nahelegt, dass sie postsynaptische Signale regulieren. In CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus unterdrücken Kv4.2-Kanäle starke und schnelle dendritische Depolarisationen und regulieren sowohl orthograde als auch retrograde dendritische Signale (Hoffman et al., 1997; Ramakers und Storm, 2002). Diese Eigenschaft von Kv4.2-Kanälen ist besonders interessant, da die retrograde Leitung von Aktionspotentialen in Dendriten (*back propagation*) mit der Langzeitpotenzierung (*long term potentiation*, LTP) der synaptischen Übertragung (Magee und Johnston, 1997) korreliert ist. In GABA-ergen Körnerzellen des Riechkolbens verlängern A-Typ- $K^+$ -Kanäle das inhibitorische Ausgangssignal (Schoppa und Westbrook, 1999). In dopaminergen Neuronen der Substantia nigra spielen Kv4.3-Kanäle eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Schrittmacherfunktion dieser Zellen (Liss et al., 2001).

Offensichtlich müssen Kv4-Kanäle ein charakteristisches, zeitabhängiges Schaltverhalten aufweisen, um ihren Funktionen als somatodendritische Signalregulatoren nachkommen zu können. Kv4-Kanäle werden bereits bei Membranspannungen unterhalb der Schwelle für das Auslösen von Aktionspotentialen (APs) aktiviert und inaktiviert. Zudem zeigen sie eine schnelle Erholung aus der Inaktivierung im Millisekundenbereich. In diesen Eigenschaften unterscheiden sie sich von anderen A-Typ-

Kanälen. Kv1.4-Kanäle erholen sich nur sehr langsam, in einem Zeitbereich von mehreren Sekunden, aus der Inaktivierung. Anders als die N- und C-Typ-Inaktivierung von *Shaker* setzt die Inaktivierung von Kv4.1 kein vorheriges Öffnen des Kanals voraus (Jerng und Covarrubias, 1997; Jerng et al., 1999). Demzufolge inaktivieren Kv4.1-Kanäle von geschlossenen Zuständen. Offene Kv4.1-Kanäle müssen zunächst schließen, um auf diese Weise inaktiviert werden zu können.

## 1.2 Akzessorische Untereinheiten von Kv-Kanälen

Vier Kv- $\alpha$ -Untereinheiten bilden einen funktionellen Kanal. Native Kv-Kanal-Komplexe bestehen jedoch häufig nicht nur aus den vier  $\alpha$ -Untereinheiten, sondern können zusätzlich akzessorische Untereinheiten enthalten. Diese akzessorischen Untereinheiten können die Funktion des Kanals auf charakteristische Weise beeinflussen, indem sie sich auf dessen Expression oder dessen Steuerung auswirken oder die Modulierbarkeit des Kanals durch bestimmte Substanzen verändern. MinK z. B. ist eine membranständige Untereinheit des KCNQ1-Kanals (Melman et al., 2002). Andere sind gänzlich cytoplasmatische Untereinheiten wie die Kv $\beta$ -Untereinheit, die mit Kv1 $\alpha$  interagiert (Pongs, 1999). Es sind drei Kv $\beta$ -Untereinheiten bekannt: Kv $\beta$ 1 (Rettig et al., 1994), Kv $\beta$ 2 (Scott et al., 1994) und Kv $\beta$ 3 (England et al., 1995). Für Kv $\beta$ 1 wurde gezeigt, dass die durch sie vermittelte schnelle Inaktivierung von Kv1-Kanälen dem Mechanismus der N-Typ-Inaktivierung folgt, wie er von *Shaker*- $\alpha$ -Untereinheiten bekannt ist (Rettig et al., 1994; Heinemann et al., 1996; Zhou et al., 2001). Kv1.5-Kanäle z. B., die keine schnelle Inaktivierung zeigen, weil ihnen der N-terminale Inaktivierungspartikel fehlt, inaktivieren innerhalb von Millisekunden, wenn sie mit Kv $\beta$ 1 koexprimiert werden.

Ein weiterer Typ cytoplasmatischer, akzessorischer Untereinheiten sind die K<sup>+</sup>-Kanal interagierenden Proteine (*K<sup>+</sup>-channel interacting proteins*, KChIPs). Die erste Publikation einer Modulation von Kv4-Strömen durch KChIP beschreibt die drei KChIP-Varianten KChIP1 bis 3, die jeweils einem eigenen Gen zugeordnet sind (An et al., 2000). Später wurde mit KChIP4 ein weiteres KChIP-Gen entdeckt (Holmqvist et al., 2002). Diese KChIPs besitzen eine konservierte Kernregion mit vier EF-Hand-Motiven, die auf Ca<sup>2+</sup>-Bindestellen hinweisen, und einen variablen N-Terminus (vgl. Abb. 18). Ein auffälliger Effekt von KChIP1, 2 und 3 ist, dass bei Koexpression mit Kv4.2-Kanälen die Stromdichte erhöht wird (An et al., 2000). Ohne KChIP sind

Kv4.2-Kanäle diffus in CHO-Zellen verteilt. Nach der Koexpression von KChIP2.2 ist Kv4.2 deutlich an der Zellmembran lokalisiert (Bähring et al., 2001b). Es konnte auch gezeigt werden, dass der N-Terminus des Kv4.2-Kanals notwendig für die Interaktion mit KChIP2.2 ist, denn die Ströme einer N-terminalen Deletionsmutante von Kv4.2 (Kv4.2 $\Delta$ 2-40) werden nicht durch KChIP moduliert (Bähring et al., 2001b). Neben der Expression haben KChIP1, 2 und 3 einen Einfluss auf Steuerungsparametern von Kv4.2-Kanälen in CHO-Zellen. Die Inaktivierung ist verlangsamt und die Erholung aus der Inaktivierung beschleunigt (An et al., 2000).

### 1.3 Zielsetzung

(1) Um ein besseres Verständnis für das Schaltverhalten somatodendritischer A-Typ-Kanäle zu gewinnen, sollte die Kinetik der Inaktivierungsreaktion von Kv4.2-Kanälen in einem heterologen Expressionssystem untersucht werden. Hier sollte besonders die Natur der zu Grunde liegenden Prozesse und ihre Kopplung an geschlossene bzw. offene Zustände des Kanals analysiert werden. Die anhand der kinetischen Daten entwickelte Vorstellung von den bei der Inaktivierung auftretenden Zustandsänderungen wurde in einem Markov-Modell quantifiziert.

(2) Zur Untersuchung der Rolle des Kv4.2-N-Terminus bei der Kanalsteuerung sollte eine N-Terminale Deletionsmutante (Kv4.2 $\Delta$ 2-40) sowie eine Kanal-Chimäre (Kv2.1(4.2NT)) untersucht werden. Es wird die Hypothese entwickelt und getestet, ob die Inaktivierung der Kv4.2-Kanäle vom offenen Zustand dem Mechanismus der von *Shaker*-Kanälen bekannten N-Typ-Inaktivierung folgt.

(3) Die Effekte der bekannten KChIP-Varianten (Gen-Produkte und ihre Splice-Varianten) auf die Expression und einige charakteristische Steuerungsparameter von Kv4.2-Kanälen sollten miteinander verglichen werden.

(4) Die Effekte der Koexpression von KChIP auf Kv4.2-Ströme in HEK-Zellen sollten beispielhaft für eine KChIP-Variante untersucht werden. Dabei wurde gefragt, welchen Einfluss KChIP auf die zuvor analysierten Steuerungseigenschaften des Kv4.2-Kanals nimmt.

## 2 Methoden

### 2.1 Proteinexpression

#### 2.1.1 Verwendete Klone

Für alle Klone wurde der Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, USA) benutzt, mit Ausnahme von Kv2.1, der in Expressionsvektor pcDNA6 vorlag. Alle Konstrukte wurden mit Standard-PCR-Methoden hergestellt, in den entsprechenden Vektor kloniert und zur Kontrolle sequenziert.

Es wurde ein humaner Klon der Kv4.2- $\alpha$ -Untereinheit benutzt (AH009258, Zhu et al., 1999). Der N-terminalen Deletionsmutante Kv4.2 $\Delta$ 2-40 (Zhu et al., 1999) fehlten die Aminosäuren 2 bis 40 des proximalen N-Terminus. Unmittelbar danach beginnt die Tetramerisierungsdomäne der Kv4.2- $\alpha$ -Untereinheit. Konstrukte des Kv4.2-Kanals mit einer größeren N-terminalen Deletion konnten nicht als funktionelle Kanäle exprimiert werden (Zhu et al., 1999).

Für die Kv2.1- $\alpha$ -Untereinheit (NM 004975) wurde ebenfalls ein humaner Klon benutzt. In dem Chimären-Konstrukt Kv2.1(4.2NT) wurde der gesamte cytoplasmatische N-Terminus von Kv2.1, einschließlich des proximalen N-Terminus, der T1-Domäne und des T1-S1-Linker-Bereichs (Aminosäuren 1 - 176), durch die entsprechenden Bereiche von Kv4.2 (Aminosäuren 1 - 180) ersetzt. Dem Konstrukt Kv2.1(4.2NT $\Delta$ 40) fehlte der proximale N-Terminus.

Die humanen Klone der benutzten KChIP-Varianten waren KChIP1.1 (NM\_014592), KChIP2.1 (AF199598), KChIP2.2 (AF347114), KChIP2.3 (AF367018), KChIP2.4 (AF367021), KChIP2.5 (AF367019), KChIP2.6 (AF367020), KChIP3.1 (NM\_013434), KChIP3.2 (AF367022), KChIP4.1 (AF367023), KChIP4.2 (AF367024), KChIP4.3 (AY029176) und KChIP4.4 (AY118170). Aus KChIP2.2 und KChIP2.5 wurden zwei Chimären hergestellt. Die Chimäre KChIP2.2NT/2.5CT entsprach bis einschließlich Intron 11 KChIP2.2, aber anstatt mit Intron 12 schließt

sie C-terminal mit dem Bereich von KChIP2.5 ab, der einer Verschiebung des Leserahmens unterliegt. KChIP2.5NT/2.2CT entspricht bis Intron 11 KChIP2.5, endet aber mit Intron 12 von KChIP2.2 (vgl. Abb. 19).

Die DNA einer nicht bleichenden Mutante (S65T) des Grün Fluoreszierendem Proteins (*enhanced green fluorescent protein*, EGFP) in einem Expressionsvektor für Säugerzellen stammte von Clontech (Palo Alto, CA).

### 2.1.2 Zellkultur

Als heterologes Expressionssystem für die elektrophysiologischen Experimente wurden Zelllinien von humanen embryonalen Nierenzellen (*human embryonic kidney*, HEK 293) sowie von Ovarienzellen des chinesischen Zwerghamsters (*Cricetulus griseus*, *chinese hamster ovary cells*, CHO-Zellen) verwendet. Als Nährmedium diente Dulbecco's MEM / NUT MIX F-12 (Gibco, Karlsruhe) für HEK-Zellen und MEM  $\alpha$ -Medium (Gibco) für CHO-Zellen. Den Nährmedien wurde 10% (50 ml auf 500 ml) hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (Seromed Biochrom) und L-Glutamin (1%) hinzugefügt.

Die Zelllinien wurden in 75 ml Kulturflaschen mit 60 ml Nährmedium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte im Brutschrank (Heraeus) kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen bei etwa 70% Konfluenz umgesetzt. Das Ablösen der Zellen erfolgte während 1 bis 2 min in 5 ml Trypsin-EDTA (Gibco, Karlsruhe). Die Proteasereaktion wurde durch Zugabe von 5 ml serumhaltigen Mediums gestoppt. Die Zellen wurden dann in einer Dichte von ca.  $4 \cdot 10^4$  Zellen/ml in frischem Nährmedium für die fortlaufende Kultur ausplattiert. Ein Teil der Zellen wurde nach Bestimmung der Zelldichte mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und für die Transfektion (s. u.) mit 2 ml Nährmedium in einer Dichte von 1 bis  $4 \cdot 10^4$  Zellen/ml in 35 mm-Kulturschälchen ausplattiert. Der Zustand der Zellen war bei höheren Dichten besser, es war jedoch darauf zu achten, dass die Zellen ausreichend isoliert voneinander blieben, damit sie nicht über Nexone elektrisch leitfähige Verbindungen untereinander ausbildeten. HEK-Zellen benötigten eine etwas höhere Dichte als CHO-Zellen und wurden in Schälchen ausplattiert, die mit 50  $\mu$ g/ml Poly-L-Lysin beschichtet waren.

### 2.1.3 Transfektion

Die Transfektion wurde 24 h nach dem Ausplattieren nach der Liposomen-Einschluss-Methode mit dem Reagenz LipofectAMINE (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Dazu wurden pro 35 mm-Kulturschälchen erstens 1 bis 2  $\mu\text{g}$  DNA mit 100  $\mu\text{l}$  OPTI-MEM (Gibco) sowie zweitens 3  $\mu\text{l}$  LipofectAMINE ebenfalls mit 100  $\mu\text{l}$  OPTI-MEM gemischt. Die beiden Mischungen wurden vereinigt und ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die in Schälchen ausplattierten Zellen wurden mit OPTI-MEM gewaschen und mit 800  $\mu\text{l}$  OPTI-MEM und der LipofectAMINE-DNA-Mischung aufgefüllt. Nach ca. 5 h unter Standardbedingungen im Brutschrank wurde die Transfektionsmischung durch Nährmedium ersetzt.

Für die alleinige Expression von  $\text{Kv}\alpha$ -Untereinheiten wurden in der Regel 1.0  $\mu\text{g}$  DNA pro Schälchen eingesetzt. Für die Koexpression von  $\text{Kv}\alpha$  mit KChIP wurden 0.1  $\mu\text{g}$  KChIP-cDNA und 1.0  $\mu\text{g}$   $\text{Kv}\alpha$ -cDNA eingesetzt. Für die Koexpression von KChIP4.1 bis 4.3 wurde die Menge der  $\text{Kv}\alpha$ -cDNA auf 0.05  $\mu\text{g}$  reduziert. Für die Kontrollexperimente zur Bestimmung der Stromdichte wurde für die Expression von  $\text{Kv}4.2\alpha$  allein die gleiche Menge cDNA (0.1  $\mu\text{g}$ ) eingesetzt, wie bei der Koexpression mit KChIP verwendet. Bei jeder Transfektion wurden pro Schälchen 0.5  $\mu\text{g}$  EGFP beigegeben, um Zellen für elektrophysiologische Ableitung am Tag nach der Transfektion identifizieren zu können.

In wenigen Fällen wurde statt der standardmäßig verwendeten Liposomen-Einschluss-Methode durch  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitation transfiziert. Mit Hilfe von  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  transfizierte HEK 293-Zellen waren für elektrophysiologische Versuche in einem besseren Zustand als mit LipofectAMINE transfizierte Zellen. Der beschriebene Ansatz mit einem Volumen von 1.5 ml ist für 10 35 mm-Kulturschälchen dimensioniert. Pro Schälchen wurden 2 bis 3  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt. Zu 750  $\mu\text{l}$  einer 250 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung wurde die DNA gegeben. Diese DNA-Lösung wurde zu 750  $\mu\text{l}$  2 x BES-Puffer (50 mM BES, 280 mM NaCl, 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.95) gegeben. Kulturschälchen wurden ca. 30 min bei 3%  $\text{CO}_2$  gehalten, bevor das Transfektionsmedium tropfenweise hinzugegeben wurde. Nach weiteren 8 bis 12 h bei 3%  $\text{CO}_2$  wurde die Körnung des Präzipitats mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Nährlösung bei Standardbedingungen gehalten. Auswirkungen der Transfektionmethode auf die Eigenschaften der Untersuchten  $\text{K}^+$ -Ströme wurden nicht beobachtet.

## 2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.1 Western-Blot-Analyse

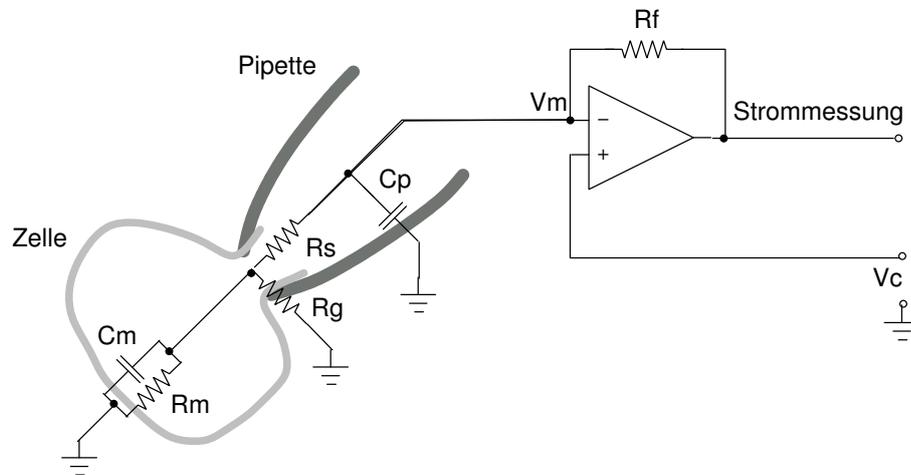
Die Expression von KChIP-Varianten in transfizierten CHO-Zellen wurde durch eine Western-Blot-Analyse überprüft. CHO-Zellen wurden mit Triton-X-100-Lysepuffer inkubiert, von den Kulturschälchen gelöst und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach Hitzebehandlung und Zentrifugation wurden die Lysate durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der immunologische Nachweis der KChIP-Varianten erfolgte durch Inkubation mit einem Pan-KChIP-Antikörper.

## 2.3 Elektrophysiologische Techniken

### 2.3.1 Patch-Clamp Technik

Die Patch-Clamp-Technik (Hamill et al., 1981) basiert darauf, dass zwischen der Zellmembran und der Mündung einer Glaspipette von etwa 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser ein sehr enger Kontakt (das Seal) entstehen kann. Dieser Kontakt ist so dicht, dass der elektrische Widerstand zwischen dem elektrolytgefüllten Inneren der Pipette und dem äußeren Medium (der Seal-Widerstand  $R_g$ ) im  $\text{G}\Omega$ -Bereich liegt. Dies ist die Cell-attached-Konfiguration. Wenn man nun einen Unterdruck an die Pipette anlegt, bis sich die Membran unter der Pipettenöffnungen öffnet, gelangt man in die Whole-Cell-Konfiguration (Abb. 2). In dieser Konfiguration besteht ein Zugang mit sehr geringerem Widerstand (dem Serienwiderstand  $R_s$ ) zum Inneren der Zelle. Über eine Ag/AgCl-Elektrode, die in die Pipettenlösung eintaucht, kann man die Zellmembran (mit dem Membranwiderstand  $R_m$ ) auf eine vorgegebene Spannung ( $V_m$ ) klemmen. Wegen des geringen Serienwiderstands ( $R_s$ ) kann die Zellmembran sehr schnell ( $\tau \approx R_s \cdot C_m$ ) auf die an der Pipettenelektrode angelegte Spannung geklemmt werden. Um die Spannung über der Membran konstant zu halten, ist die Ableitelektrode in der Pipette mit dem Eingang eines Operationsverstärkers verbunden. An den zweiten Eingang des Operationsverstärkers wird das gewünschte Kommandopotential ( $V_c$ ) gelegt. Eine Differenz zwischen  $V_m$  und  $V_c$  bewirkt am Ausgang des Verstärkers einen Ausgleichsstrom durch einen Rückkopplungswiderstand ( $R_f$ ), der  $V_m$  wieder auf  $V_c$  einstellt. Das ist das Prinzip der Spannungsklemme

in der Whole-Cell-Konfiguration. Bei Leitfähigkeitsänderungen in der Zellmembran ( $R_m$ ) muss am Ausgang des Verstärkers ein Strom fließen, der dem Strom entspricht, der über die Membran fließt. Dies ist das gewünschte Messsignal.



**Abb. 2:** Prinzipschaltbild einer Patch-Clamp-Ableitung in der Whole-Cell-Konfiguration. Die passiven elektrischen Eigenschaften der Zellmembran sind durch Ersatzschaltenelemente wiedergegeben.  $C_p$  Pipettenkapazität,  $C_m$  Membrankapazität,  $R_f$  Rückkopplungswiderstand,  $R_g$  Sealwiderstand,  $R_m$  Membranwiderstand,  $R_s$  Serienwiderstand,  $V_m$  Membranspannung,  $V_c$  Kommandospannung.

Eine weitere Konfiguration der Patch-Clamp-Technik ist die Inside-out-Konfiguration. Ausgehend von der Cell-attached-Konfiguration wird das Membranstück unter der Pipettenöffnung (der Patch) durch Zurückziehen der Pipette von der restlichen Zelle getrennt, ohne das Seal zu zerstören. In dieser Konfiguration ist die Innenseite der Patchmembran der Badlösung zugewandt. Diese Konfiguration eignet sich sehr gut zur Applikation von Substanzen auf die Membraninnenseite. Wegen der hohen Widerstände des Seals und des Patches können Membranströme bei sehr geringem Rauschen abgeleitet werden, wodurch sogar die Messung von Einzelkanal-Strömen ermöglicht wird.

## Der Messstand

Die Messapparatur war auf einem schwingungsgedämpften Tisch in einem geerdeten Faradaykäfig aufgebaut. Zur optischen Kontrolle des experimentellen Ablaufs wurde ein inverses Mikroskop (Axiovert, Zeiss) bei Vergrößerungen bis 400-fach mit Nomarski-Phasenkontrast benutzt. Neben der Weißlichtquelle stand eine

UV-Lichtquelle (HBO-UV-Halogenlampe) zur Verfügung für die Identifikation der EGFP-exprimierenden Zellen. Die direkt am Vorverstärker befestigte Pipette konnte durch einen groben mechanischen (Luigs & Neumann) und einen feinen wasserhydraulischen Manipulator (Narishige) bewegt werden. Der Druck innerhalb der Pipette wurde durch einen einfachen Silikonschlauch mit Zweiwege-Hahn gesteuert.

Der Mikroskopisch enthielt eine für die Standard-Kulturschälchen passende Vertiefung. Die Badlösung wurde durch ein schwerkraftgetriebenes Perfusionssystem und eine mit Druckluft betriebene Absaugvorrichtung ständig ausgetauscht. Für die gezielte lokale Applikation stand ein ventilgesteuertes Superfusionssystem (Auto Mate Scientific, San Francisco, CA, USA) mit acht Kanälen zur Verfügung. Das Superfusionssystem wurde mit einer peristaltischen Pumpe angetrieben (BVP, Ismatec).

### **Patchpipetten und Elektroden**

Patchpipetten wurden aus dünnwandigen Borosilikatglas-Röhrchen hergestellt (TW 150F-4, World Precision Instruments). Borosilikatglas ist leicht formbar und seine Rauscheigenschaften sind für Whole-Cell-Experimente völlig ausreichend. Die Glasröhrchen wurden mit Hilfe eines Elektrodenziehgeräts (DMZ-Puller, Zeitz, Augsburg) in drei Schritten hergestellt und unter optischer Kontrolle mit der Hitze eines glühenden Platindrahts (*micro forge*) poliert. Der Durchmesser der Spitzenöffnung betrug etwa  $1\ \mu\text{m}$ , so dass die Pipetten in den verwendeten Standardlösungen einen Widerstand von 1.5 bis  $3\ \text{M}\Omega$  hatten. Für Inside-out-Experimente mit kleinen Strömen lohnte es sich, die Pipetten mit Wachs zu beschichten, um die Pipettenkapazität zu reduzieren.

Die fertige Pipette wurde in einen Elektrodenhalter mit BNC-Anschluss eingesetzt. Die Elektrode bestand aus einem Silberdraht, der durch Reaktion mit  $\text{Cl}_2$  (Chlorix, Budnikowsky, Hamburg) durch eine AgCl-Schicht überzogen wurde, um eine Polarisierung der Elektrode zu verhindern. Als Badelektrode wurde ein Silberdraht mit einem AgCl-Pellet (WPI) benutzt.

### **Verstärker und Messtechnik**

Die gemessenen Signale wurden über einen Vorverstärker an den Patch-Clamp-Verstärker (HEKA, Lambrecht) weitergegeben und durch einen 3-poligen Bessel-

Filter mit 10 kHz gefiltert. Zur Kompensation der Pipettenkapazität ( $C_p$ ) und der Membrankapazität der Zelle ( $C_m$ ) wurden die entsprechenden Funktionen des Verstärkers zum Abgleich von  $C_{fast}$  bzw.  $C_{slow}$  eingesetzt. Typische Pipettenkapazitäten lagen bei 9 pF, typische Membrankapazitäten von HEK 293-Zellen bei 20 pF. Die etwas kleineren CHO-Zellen hatten dementsprechend etwas kleinere Membrankapazitäten. Der Wert für die Kompensation von  $C_{slow}$  wurde auch als Messwert der Membrankapazität zur Berechnung der Stromdichte (s. u.) herangezogen.

Die Verstärker-Funktion zur Kompensation des Serienwiderstands wurde ebenfalls standardmäßig eingesetzt. Dabei wurde der Serienwiderstand maximal zu 90 % kompensiert. Serienwiderstände über 10 M $\Omega$  wurden nicht toleriert.

Für die Steuerung des Verstärkers und die Digitalisierung des gemessenen Signals wurde ein ITC16-AD/DA-Interface in einem Mikrocomputer (Apple Power Macintosh 7600/132) unter der Kontrolle des Programms PULSE (HEKA, Lambrecht) eingesetzt. Das analoge Messsignal wurde hier bei einer Auflösung von 16 bit mit Aufnahmefrequenzen zwischen 0.2 und 20 kHz (Sample-Intervalle zwischen 5 ms und 50  $\mu$ s) digitalisiert. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Daten auf der Festplatte gespeichert.

Die Haltespannung lag -80 mV. Für Kv4.2-Kanäle war das Haltepotential -80 mV und 200 ms Vorpulse auf -100 mV stellten gegebenenfalls sicher, dass die Kanäle vollständig aus der Inaktivierung befreit wurden. Der Membranwiderstand ( $R_m$ ) der Zellen wurde routinemäßig durch Testpulse kontrolliert. Bei einem Haltepotential von -80 mV lagen typische Werte für  $R_m$  zwischen 0.5 und 1.5 G $\Omega$ . Die etwas kleineren CHO-Zellen hatten häufig auch einen etwas höheren Membranwiderstand. Für die meisten Protokolle wurde zur Bestimmung des Leckstroms die P/4-Methode angewandt. Für längere Protokolle wurde der Leckstrom aus dem Haltestrom oder aus kurzen Pulsen im Bereich der Haltespannung berechnet und bei der Auswertung der Daten subtrahiert.

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (20 bis 22 °C) durchgeführt. Für die Berechnung des Nernstpotentials von K<sup>+</sup> galt  $\frac{RT}{F} = 25.26$  mV.

### 2.3.2 Versuchslösungen und applizierte Substanzen

Für Ableitungen in der Whole-Cell-Konfiguration befanden sich die Zellen unter ständigem Durchfluss einer Extrazellulär-Lösung, die folgende Bestandteile enthielt (in mM): NaCl 135, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 2, Hepes 5 und Saccharose 10. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7.4 eingestellt und konnte durch die Zugabe von 0.01 mg/ml Phenolrot überwacht werden. Die Pipetten wurden mit Intrazellulär-Lösung gefüllt, die folgende Bestandteile enthielt (in mM): KCl 125, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, EGTA 11, Hepes 10, Glutathion 2 und K<sub>2</sub>-ATP 2. Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7.2 eingestellt. Für einige Experimente wurde eine Extrazellulär-Lösung mit erhöhter K<sup>+</sup>-Konzentration eingesetzt. Dazu wurde in der Standard-Extrazellulär-Lösung Na<sup>+</sup> durch K<sup>+</sup> ersetzt, wobei eine K<sup>+</sup>-Konzentration erreicht wurde, die mit ca. 130 mM der K<sup>+</sup>-Konzentration in der Intrazellulär-Lösung entsprach (symmetrische K<sup>+</sup>-Konzentration). Für Experimente in der Inside-out-Konfiguration befand sich die Extrazellulär-Lösung in der Pipette und die Zellen wurden mit Intrazellulär-Lösung superfundiert.

Der Kanalblocker TEA wurde der intrazellulären Lösung als Chloridsalz (Sigma) in Konzentrationen zwischen 2, 5 und 10 mM zugesetzt. Synthetische N-terminale Peptide (Jerini, Berlin, Germany) waren C-terminal amidierter Cl<sup>-</sup>-Salze und hatten durch HPLC eine Reinheit von mehr als 75 %. Es wurde zunächst eine Peptid-Lösung mit reinem Wasser hergestellt, die dann zu gleichen Volumina mit einer doppelt konzentrierten Intrazellulär-Lösung aufgefüllt wurde. Das N-terminale Kv4.2-Peptid bestand aus den ersten 20 Aminosäuren des Proteins, das *Shaker*-Peptid bestand aus den ersten 20 Aminosäuren der *Shaker*-Splice-Variante *ShB* mit zwei zusätzlichen Mutationen: *ShB* E12K D13K (Murrell-Lagnado und Aldrich, 1993; Holmgren et al., 1996).

## 2.4 Datenerfassung und Auswertung

Für die Definition der Pulsprotokolle, die Steuerung des Verstärkers und die Aufnahme der Daten wurde das Programm PULSE (HEKA) verwendet. Alle Stromaufnahmen wurden mit PULSEFIT (HEKA) ausgewertet. Für einige Darstellungen wurde eine nachträgliche, digitale Filterung bei 1 kHz durchgeführt. Die erhaltenen

Daten wurden in Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA, USA) oder Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) weiter verarbeitet.

Alle Mittelwerte werden mit dem Standardfehler angegeben. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde ein t-Test mit den Programmen GraphPad InStat (Graphpad Software) oder Kaleidagraph durchgeführt.

**Spannungsabhängigkeit der Aktivierung** Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurde aus Strömen berechnet, die durch eine Serie von Pulsen auf unterschiedliche Spannungen aktiviert wurden (Strom-Spannungsbeziehung). Für die Berechnung der Leitfähigkeiten wurde ein Gleichgewichtspotential für  $K^+$  von  $E_K = -80$  mV zu Grunde gelegt, das über die Nernst-Gleichung für die verwendeten Lösungen berechnet und durch die Umkehr von Tailströmen überprüft wurde. Die Leitfähigkeit  $G$  wurde dann aus dem Peakstrom ( $I_{peak}$ ) bei einer gegebenen Stimulusspannung ( $V_m$ ) berechnet:

$$G = \frac{I_{peak}}{V_m - E_K}$$

Die berechneten Werte wurden auf die maximale Leitfähigkeit bei +70 mV ( $G_{max}$ ) normalisiert und mit einer einfachen Boltzmann-Gleichung gefittet ( $V_{1/2}$  Halbmaximale Spannung der Aktivierung,  $k$  Steigungsfaktor):

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

Der Steigungsfaktor  $k$  fasst den Ausdruck  $\frac{RT}{zF}$  zusammen und ist ein Maß für die während des Aktivierungsschritts pro Kanal über die Membran verschobenen Ladungen.

**Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung** Die Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung wurde aus den maximalen Amplituden  $I$  bei +40 mV nach konditionierenden Pulsen auf unterschiedliche Spannungen bestimmt und auf den größten erzielten Peakstrom ( $I_{max}$ ) normiert. Die Peakströme ( $I/I_{max}$ )

wurden gegen die Spannung des konditionierenden Puls aufgetragen und mit einer Boltzmann-Gleichung wie oben angegeben gefittet.

**Inaktivierung von geschlossenen Zuständen** Um die Kinetik der Inaktivierung von geschlossenen Zuständen zu messen wurde ein Doppelpulsprotokoll verwendet. Der anfängliche Kontrollpuls auf +40 mV und der konditionierende Zwischenpuls variabler Dauer wurden von einer Spannung von -100 mV ausgeführt. Der Peakstrom während des Testpuls auf +40 mV am Ende des Protokolls ( $I$ ) wurde gegen den Peakstrom während des Kontrollpuls ( $I_{max}$ ) normiert und in Abhängigkeit von der Dauer des konditionierenden Puls aufgetragen. Die resultierende Kurve wurde mit einer monoexponentiellen Funktion gefittet ( $I_{max}$  Peakstrom während des Kontrollpuls,  $I$  Peakstrom während des Testpuls,  $A_0$  Steady-State-Amplitude,  $t$  Zeit,  $\tau$  Zeitkonstante):

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

**Inaktivierungskinetik makroskopischer Ströme** Für die Bestimmung der Inaktivierungskinetik makroskopischer Ströme wurden Pulse vom Haltepotential bei -80 mV oder nach Vorpulsen auf -100 mV auf unterschiedliche Spannungen verwendet. Für den Vergleich der Inaktivierungskinetik bei Koexpression der unterschiedlichen KChIP-Splice-Varianten wurde der verbleibende Strom 30 ms nach Beginn des Puls durch den Peakstrom geteilt ( $I_{30\text{ ms}}/I_{peak}$ ). Die Dauer von 30 ms erwies sich deshalb als geeignet, weil zu dieser Zeit der Unterschied im Grad der Inaktivierung für Kv4.2 im Vergleich zu Kv4.2/KChIP2.2 am größten war. Der Parameter ermöglichte einen einfachen Vergleich bei einer komplexen, multiexponentiellen Inaktivierungskinetik.

Für eine genauere Analyse wurde eine Summe von bis zu drei exponentiellen Termen an die Stromkurve gefittet ( $I$  Strom,  $A$  relative Amplitude,  $t$  Zeit,  $\tau$  Zeitkonstante):

$$I = A_0 + A_1e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2e^{-\frac{t}{\tau_2}} + A_3e^{-\frac{t}{\tau_3}}$$

**Erholung aus der Inaktivierung** Die Erholung aus der Inaktivierung wurde durch Doppelpulsprotokolle mit variabler Dauer des Zwischenpulsintervalls gemessen. Der

Peakstrom während des Testpuls (2. Puls) wurde auf den Peakstrom während des Kontrollpuls (1. Puls) normalisiert und gegen die Dauer des Zwischenpuls aufgetragen. Die so bestimmte Kurve wurde mit einer monoexponentiellen Funktion gefittet, wobei eine Steady-State-Amplitude berücksichtigt wurde, wenn die Ströme nicht vollständig inaktivierten ( $I$  Strom während des zweiten Puls,  $I_{max}$  Kontrollstromamplitude  $A_0$  Steady-State-Amplitude,  $t$  Zeit,  $\tau$  Zeitkonstante):

$$\frac{I}{I_{max}} = 1 - (1 - A_0)e^{-\frac{t}{\tau}}$$

**Deaktivierungskinetik** Die Deaktivierungskinetik wurde in einer extrazellulären  $K^+$ -Konzentration von 130 mM bestimmt. Ströme wurden durch depolarisierende Pulse zunächst aktiviert, worauf dann Tailströme bei negativen Spannungen aufgenommen werden konnten. Die Kinetik der Tailströme wurde mit dem Fit einer exponentiellen Gleichung mit ein oder zwei Zeitkonstanten beschrieben (vgl. Inaktivierungskinetik). Für die Untersuchung des Einflusses der Erholung offen-inaktivierter Kanäle auf die Tailströme wurde die Dauer des depolarisierenden Vorpuls variiert.

**Stromdichte** Die Stromdichte wurde aus depolarisierenden Pulsen auf +40 mV nach einem Vorpuls auf -100 mV bestimmt. Sie dient zur besseren Vergleichbarkeit des erzielten Stromlevels unterschiedlich großer Zellen, indem die Stromamplitude auf die Membranfläche der Zelle normiert wird. Als Maß für die Membranfläche konnte die Membrankapazität dienen, weil die spezifische Kapazität von Biomembranen sehr konstant ist ( $\sim 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ). Der resultierende Parameter, die Stromdichte, wird hier angegeben in pA/pF.

Für die Berechnung des Standardfehlers der x-fachen Erhöhung der Stromdichte im Vergleich zum Messwert für die Kontrolle, wurde eine lineare und unabhängige Fortpflanzung des Fehlers angenommen (Bevington und Robinson, 1992). Für den Fehler einer Messgröße  $C \pm s_C$ , die aus dem Quotienten  $A/B$  der Größen  $A \pm s_A$  und  $B \pm s_B$  berechnet wird, gilt:

$$s_C = C \sqrt{\frac{s_A^2}{B^2} + \frac{s_B^2}{B^2}}$$

## 2.5 Modellierung

Für die Entwicklung eines Modells für die Steuerung von Kv4.2-Kanälen wurde zunächst ein selbstgeschriebenes Programm benutzt. Das Schema 4 (S. 34) wurde als Markov-Modell in Form eines Systems von Differentialgleichungen formuliert. Die Übergänge entlang der Aktivierungskette von  $C_0$  bis  $C_4$  wurden durch spannungsabhängige Hin- und Rückraten beschrieben:

$$\alpha = \alpha_0 e^{\frac{z_\alpha V F}{RT}}$$

$$\beta = \beta_0 e^{\frac{-z_\beta V F}{RT}}$$

Darin sind  $\alpha_0$  und  $\beta_0$  die Raten bei 0 mV und  $z_\alpha$  und  $z_\beta$  geben die äquivalente Ladung an, die während des Zustandsübergangs über die Membran bewegt werden. Die numerische Integration über der Zeit wurde durch die Eigenvektor/Eigenwert-Dekomposition der Matrix des Markov-Modells durchgeführt (vgl. Colquhoun und Hawks, 1995). Die Anfangsbedingungen für die Berechnung der Pulsfolgen wurden direkt durch die Lösung der Steady-State-Gleichungen für das Markov-Modell berechnet. Die für die Simulation von Kv4.2-Strömen eingesetzten Parameter sind Tabelle 1 (S. 36) zu entnehmen. Alternativ wurde zur Berechnung des entwickelten Markov-Modells auch das Programm PulseSim (HEKA) eingesetzt (vgl. Steffan, 1998). Die unterschiedlichen Werte für  $z_\alpha$  und  $z_\beta$  wurden für PulseSim in ein Einheitliches  $z$  und einen Symmetriefaktor  $s$  umgerechnet. Die Simulation mit PulseSim erbrachte dieselben Daten wie zuvor, erwies sich jedoch als deutlich komfortabler.

Für die Tailstrom-Analyse (Abb. 15 und 29) wurde das oben beschriebene Modell für die Steuerung des Kv4.2-Kanals benutzt (Bähring et al., 2001a). Die Berechnung erfolgte mit PulseSim. Für die Simulation der Tailströme bei hyperpolarisierten Spannungen von Kv4.2 $\Delta$ 2-40 sowie Kv4.2/KChIP2.1 wurden die Raten angepasst, so dass die Kinetik der Tailströme als auch die Kinetik der durch Depolarisation aktivierten transienten Ströme gleich gut reproduziert werden konnten.

## 3 Ergebnisse

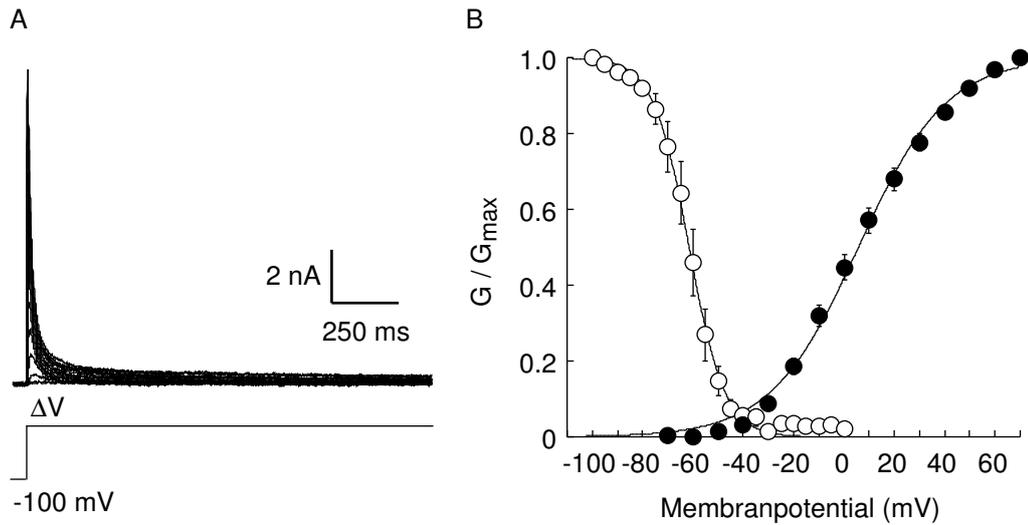
### 3.1 Steuerungseigenschaften des Kv4.2-Kanals

#### 3.1.1 Kv4.2-Ströme in HEK 293-Zellen

Die Transfektion von HEK 293-Zellen mit cDNA des humanen Kv4.2-Kanals führte zur Expression von funktionellen Kanälen. Durch depolarisierende Spannungssprünge von -100 mV auf -40 mV oder positiver konnten transiente  $K^+$ -Ströme aktiviert werden, die durch Kv4.2-Kanäle vermittelt wurden. Depolarisierende Spannungssprünge von -100 mV auf -50 mV oder negativer führten dagegen nicht zur Aktivierung makroskopischer Ströme (Abb. 3 A).

Aus den Peakströmen von Stromfamilien wurden Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehungen abgeleitet, die durch eine Boltzmannfunktion beschrieben werden konnten (Abb. 3 B). anhand dieser Kurven konnte die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Kv4.2-Kanälen durch die Spannung der halbmaximalen Aktivierung  $V_{1/2} = 5.7 \pm 2.2$  mV und den Steigungsfaktor  $k = 16.9 \pm 0.7$  mV ( $n = 10$ ) angegeben werden.

Die Spannungsabhängigkeit der Steady-State Inaktivierung wurde aus den Peakströmen während Testpulsen auf +40 mV bestimmt, denen konditionierende Vorpulse auf unterschiedliche Spannungen vorausgingen. Das Auftragen der normalisierten Peakströme gegen die Vorpulsspannung ergab eine Beziehung, die durch den Fit einer Boltzmannfunktion beschrieben werden konnte (Abb. 3 B). Die Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung konnte so durch die Parameter  $V_{1/2} = -62.0 \pm 2.2$  mV und  $k = 5.6 \pm 0.5$  mV ( $n = 6$ ) angegeben werden. Die Kurve der Steady-State-Inaktivierung zeigt, dass Kv4.2-Kanäle bereits bei -40 mV fast vollständig inaktiviert waren. Schon bei -80 mV war eine geringfügige Inaktivierung zu beobachten. Bei einem Haltepotential von -80 mV wurde deshalb vor Testpulsen, bei denen eine Inaktivierung von Kv4.2-Kanälen unerwünscht war, Vorpulse auf -100 mV ausgeführt.

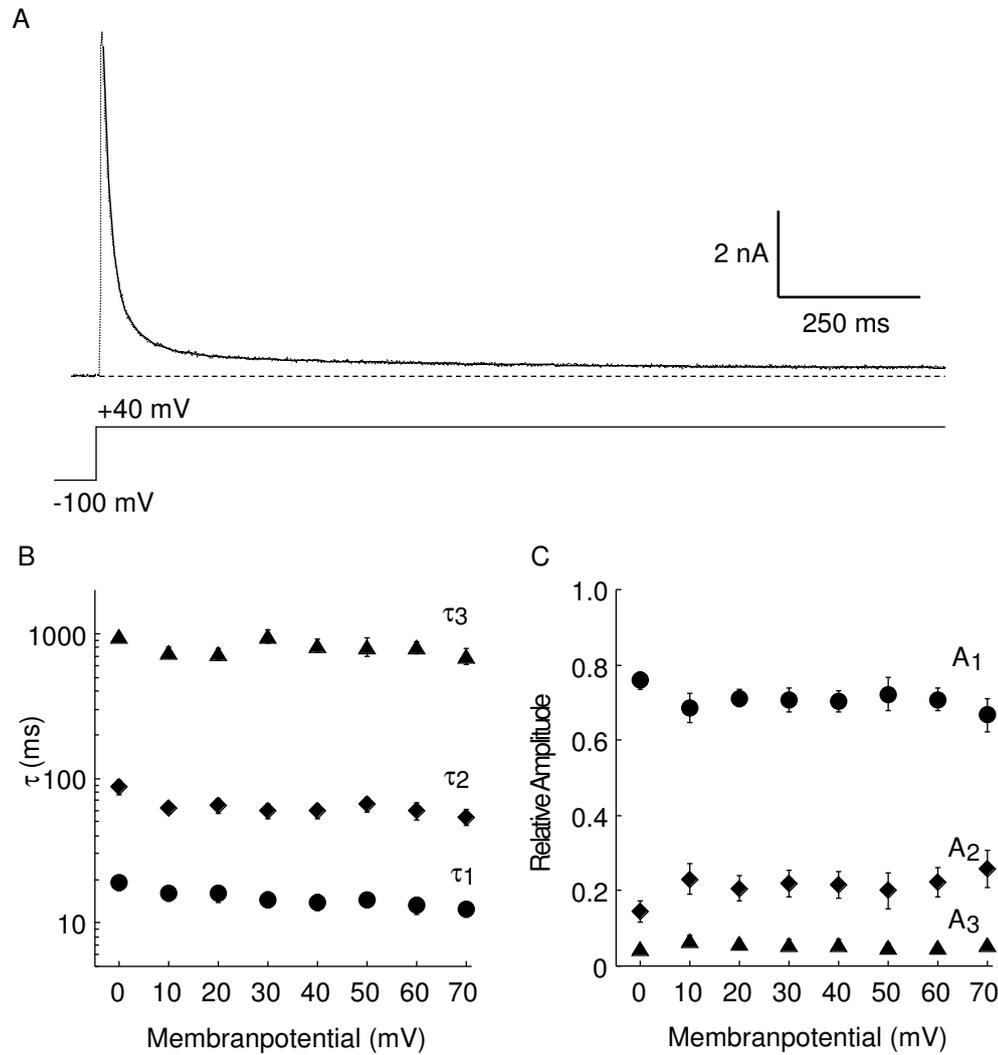


**Abb. 3:** Kv4.2-Ströme in transfizierten HEK 293-Zellen. **A:** Kv4.2-Stromfamilie, aktiviert durch Spannungssprünge von -100 mV auf Spannungen zwischen -50 und -70 mV. Die Nulllinie ist hier und in allen folgenden Abbildungen gestrichelt dargestellt. **B:** Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (ausgefüllte Symbole) und der Steady-State-Inaktivierung (offene Symbole). Fits von Boltzmannfunktionen sind als durchgezogene Linie dargestellt.

### 3.1.2 Inaktivierung des Kv4.2-Kanals

Kv4.2-Ströme, aktiviert durch depolarisierende Spannungspulse auf +40 mV, zeigten eine schnelle Inaktivierung (Abb. 4 A). Innerhalb von weniger als 100 ms war ein großer Anteil des Stroms bereits inaktiviert. Eine bemerkenswerte Eigenschaft der Kv4.2-Ströme ist ihre komplexe Inaktivierungskinetik. Der Verlauf dieser Inaktivierung ließ sich nur mit drei Zeitkonstanten befriedigend beschreiben. Es gibt eine sehr schnelle Phase der Inaktivierung ( $\tau_1 = 14 \pm 2$  ms,  $70 \pm 3\%$ ), während der ein großer Teil des Stroms inaktiviert. Es gibt eine intermediäre Phase ( $\tau_2 = 60 \pm 7$  ms,  $21 \pm 3\%$ ). Und es gibt eine auffällig langsame Phase, während der ein eher geringer Teil des Stromes inaktiviert ( $\tau_3 = 828 \pm 93$  ms,  $6 \pm 3\%$ ,  $n = 8$ ). Kv4.1-Ströme in *Xenopus*-Oocyten wurden ebenfalls mit drei Zeitkonstanten beschrieben (Jerng und Covarrubias, 1997). Der komplexe Verlauf des Stromabfalls während der Inaktivierung des Kv4.2-Kanals ließ den Schluss zu, dass mehr als ein nicht-leitfähiger Zustand des Kanals an der Inaktivierungsreaktion beteiligt ist.

Die Inaktivierung von Kv4.2-Strömen, die bei Spannungen zwischen 0 und +70 mV aktiviert wurden, konnte auf die gleiche Weise mit einer dreifach-exponentiellen

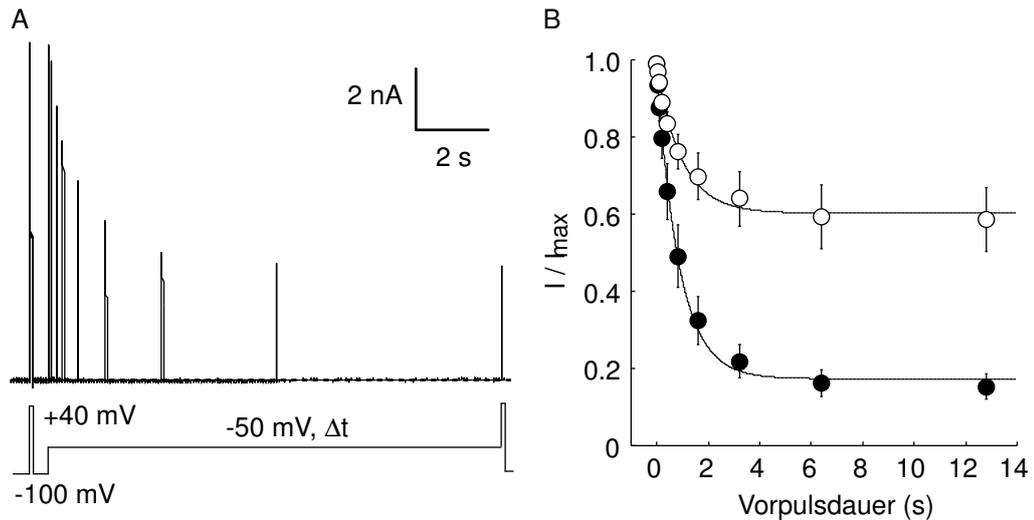


**Abb. 4:** Die Kinetik der Kv4.2-Inaktivierung und ihre Spannungsabhängigkeit. **A:** Beispiel eines Kv4.2-Stroms, der durch einen Spannungssprung von -100 mV auf +40 mV aktiviert wurde. Der Fit einer dreifach-exponentiellen Funktion ist als eine durchgezogene Linie dargestellt. **B:** Die Zeitkonstanten der Inaktivierung wurden bei unterschiedlichen Spannungen gemessen. Die Mittelwerte sind über der Spannung aufgetragen. **C:** Spannungsabhängigkeit der relativen Amplituden zu den in B dargestellten Zeitkonstanten.

Funktion gefittet werden. Die so ermittelten Zeitkonstanten und ihre relativen Amplituden zeigten keine deutliche Spannungsabhängigkeit (Abb. 4 B und C).

Die Spannungsabhängigkeit der Steady-State Inaktivierung hatte gezeigt, dass Kv4.2-Kanäle bereits bei Spannungen eine deutliche Inaktivierung aufweisen, bei denen keine makroskopischen Ströme aktiviert werden (Abb. 3 B). Eine Erklärung dafür ist, dass sie von geschlossenen Zuständen inaktivieren, wie es für Kv4.1-Kanäle gezeigt wurde (Jerng et al., 1999). Kv4.1-Kanäle verhalten sich demnach anders als *Shaker*-Kanäle, bei denen die Inaktivierung an den offenen Zustand gekoppelt ist (vgl. Abschnitt 1.1). Um die Kinetik der Inaktivierung geschlossener Kanäle zu messen, wurde ein Doppelpulsprotokoll verwendet, in dem Kanäle durch einen konditionierenden Vorpuls variabler Dauer in die Inaktivierung getrieben wurden. Der anfängliche Kontrollpuls und der konditionierende Vorpuls wurden von einer Spannung von -100 mV ausgeführt, bei der die Kanäle nicht inaktiviert waren (Abb. 5 A). Die Amplitude während des Testpuls am Ende des Protokolls wurde auf die Amplitude des Kontrollpuls normiert und in Abhängigkeit von der Dauer des konditionierenden Puls aufgetragen. Die resultierende Beziehung beschreibt die Kinetik der Inaktivierung im geschlossenen Zustand. Sie zeigte einen monoexponentiellen Verlauf (Abb. 5 B). Dies wies darauf hin, dass Kanäle direkt in einen einzelnen geschlossen-inaktivierten Zustand übergehen. Bei einer Spannung des konditionierenden Puls von -50 mV war die Zeitkonstante  $\tau = 960 \pm 190$  ms ( $n = 6$ ) und bei -60 mV  $\tau = 1030 \pm 140$  ms ( $n = 5$ ). Bei größeren negativen Spannungen war eine Analyse wegen des geringen Grades an Steady-State-Inaktivierung nicht möglich.

Durch Depolarisierung inaktivierte Kanäle erholen sich während einer Repolarisierung aus der Inaktivierung und stehen dann wieder für die Aktivierung zur Verfügung. Eine auffällige Eigenschaft von Kv4-Kanälen, in der sie sich von *Shaker*-verwandten Kanälen unterscheiden, ist ihre schnelle Erholung aus der Inaktivierung (vgl. Abschnitt 1.1). Wenn, wie oben angenommen, mehrere nicht leitfähige Zustände an der Inaktivierung makroskopischer Kv4-Ströme beteiligt sind, stellt sich die Frage, von welchen dieser Zustände die Erholung aus der Inaktivierung stattfindet und wie dadurch ihre Kinetik bestimmt wird. Die Kinetik der Erholung aus der Inaktivierung wurde durch ein Doppelpulsprotokoll gemessen, in dem ein erster depolarisierender Puls (Kontrollpuls) die Kanäle in die Inaktivierung trieb und ein repolarisierender Zwischenpuls variabler Dauer die Erholung aus der Inaktivierung erlaubte (Abb. 6 A). Der Peakstrom während des Testpuls wurde auf den

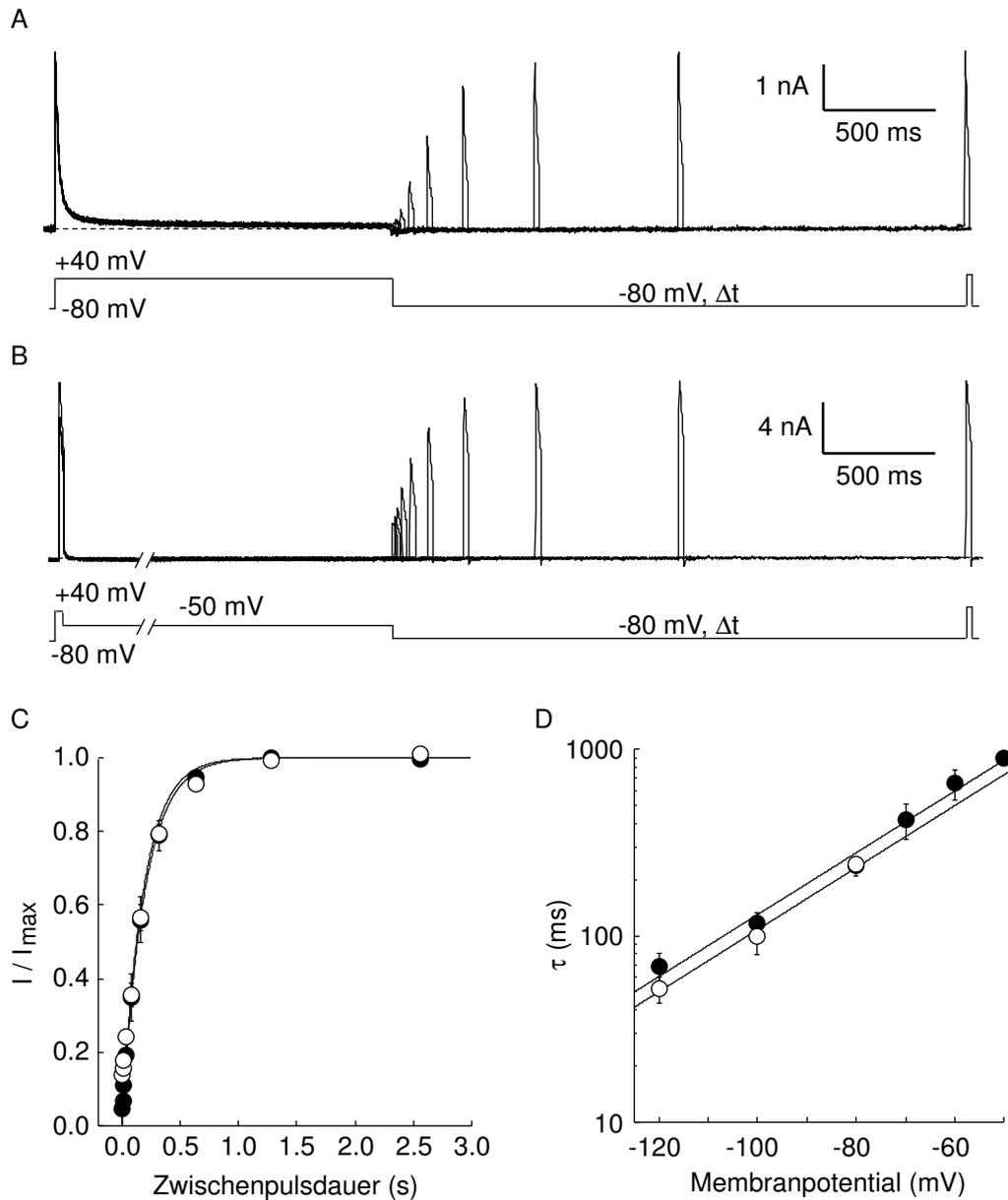


**Abb. 5:** Messung der Inaktivierung geschlossener Kv4.2-Kanäle. **A:** Inaktivierung von Kv4.2-Strömen, aufgenommen durch eine Doppelpulsprotokoll mit Kontrollpulsen von  $-100$  mV auf  $+40$  mV und Testpulsen auf  $+40$  mV, denen ein konditionierender Puls variabler Dauer auf  $-50$  mV vorausging. **B:** Der Peakstrom während des Testpuls wurde auf den Peakstrom während des Kontrollpuls normalisiert und über der Dauer des konditionierenden Puls aufgetragen. Die Spannung des Vorpuls betrug entweder  $-50$  mV (ausgefüllte Symbole,  $n = 6$ ) oder  $-60$  mV (offene Symbole,  $n = 5$ ). Fits monoexponentieller Funktionen sind als durchgezogene Linien dargestellt.

Peakstrom des Kontrollpuls normiert und gegen die Dauer des Zwischenpuls aufgetragen (Abb. 6 C). Die Kinetik der Erholung aus der Inaktivierung konnte sehr gut mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden. Für eine Spannung des Zwischenpuls von  $-80$  mV betrug die Zeitkonstante der Erholung aus der Inaktivierung  $\tau = 236 \pm 26$  ms ( $n = 11$ ). Dass trotz des komplexen Verlaufs der Inaktivierung (Abb. 4) die Erholung mit einer Zeitkonstante beschrieben werden konnte, wies darauf hin, dass Kv4.2-Kanäle in einem einzelnen inaktivierten Zustand akkumulieren.

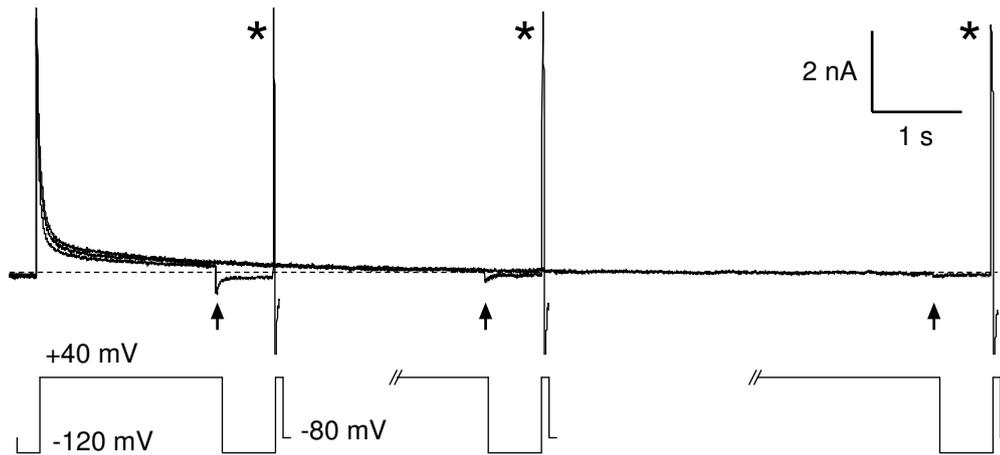
Die Kinetik der Erholung aus der Inaktivierung erwies sich als stark spannungsabhängig. Bei höheren negativen Spannungen des Zwischenpuls war die Erholung aus der Inaktivierung wesentlich schneller als bei geringeren negativen Spannungen (Abb. 6 D). So betrug z. B. die Zeitkonstante der Erholung bei  $-60$  mV  $\tau = 656 \pm 120$  s ( $n = 4$ ). Bei  $-120$  mV betrug die Zeitkonstante  $\tau = 69 \pm 11$  ms ( $n = 3$ ). Die Beschreibung der Spannungsabhängigkeit durch eine exponentielle Funktion ergab eine  $e$ -fache Beschleunigung pro 26 mV Hyperpolarisation.

Während der Kontrollpulse in dem Protokoll zur Messung der Erholung aus der Inaktivierung öffneten die Kanäle zunächst, bevor sie zügig inaktivierten. Es ist jedoch



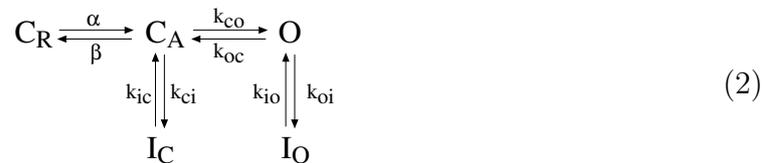
**Abb. 6:** Erholung aus der Inaktivierung von Kv4.2-Strömen. **A:** Erholung von Kv4.2-Kanälen aus der Inaktivierung bei -80 mV nach Kontrollpulsen auf +40 mV. **B:** Erholung aus der Inaktivierung bei -80 mV nach konditionierenden Pulsen auf -50 mV. **C:** Peakströme während Testpulsen wie in A (ausgefüllte Symbole) und B (offene Symbole) wurden auf die Peakströme der Kontrollpulse normalisiert, gemittelt und gegen die Zwischenpulsdauer aufgetragen. Fits monoexponentieller Funktionen sind als durchgezogene Linien gekennzeichnet. **D:** Spannungsabhängigkeit der Erholung aus der Inaktivierung. Zeitkonstanten wurden, wie in C gezeigt, für unterschiedliche Spannungen des Zwischenpuls bestimmt und in Abhängigkeit von der Zwischenpulsspannung auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Ausgefüllte Symbole: Erholung nach Kontrollpulsen auf +40 mV wie in A. Offene Symbole: Erholung nach konditionierenden Pulsen auf -50 mV wie in B. Fits monoexponentieller Funktionen sind als durchgezogenen Linien angegeben.





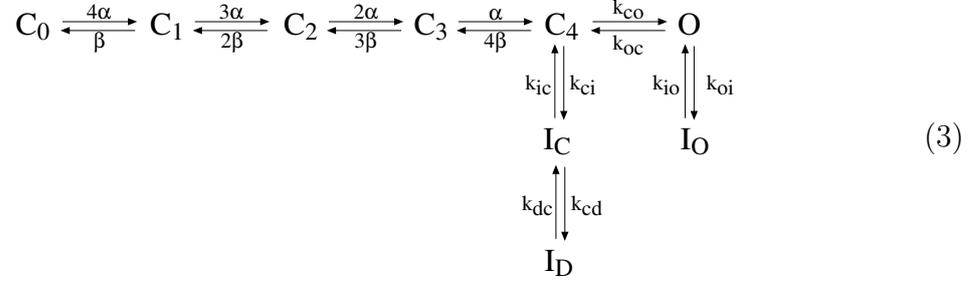
**Abb. 7:** Die Erholung aus der Inaktivierung von Kv4.2-Kanälen wurde bei -120 mV und in symmetrischer 130 mM  $K^+$ -Konzentration gemessen, um zu testen, ob Kanäle während der Erholung den offenen Zustand durchlaufen. Auf depolarisierende Pulse unterschiedlicher Dauer (2, 5 und 10 s) folgte ein Spannungssprung auf -120 mV. Drei Aufnahmen von der gleichen Zelle sind übereinandergelegt. Die Erholung aus der Inaktivierung nach 640 ms bei -120 mV war vollständig (Sternchen). Die darauf folgenden großen Tailströme wurden der Übersichtlichkeit halber teilweise abgeschnitten.

Ein solches Schema beschreibt nicht die Akkumulation von Kv4.2-Kanälen in einem geschlossen-inaktivierten Zustand. Ein Modell, das den besonderen Inaktivierungseigenschaften des Kv4.1 Kanals Rechnung tragen sollte, wurde von Jerng et al. (1999) entwickelt (Schema 2).

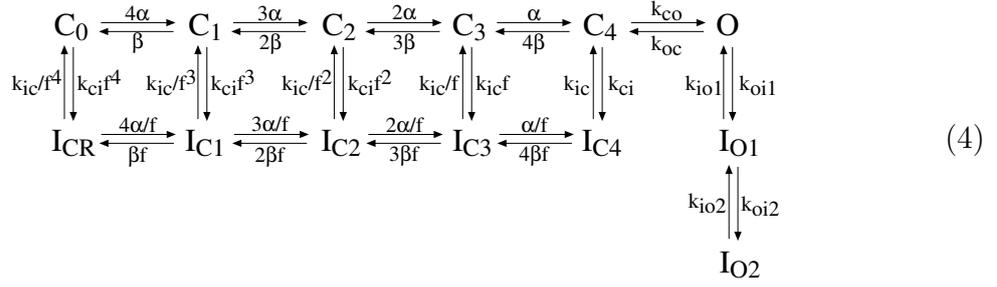


Neben einem offen-inaktivierten Zustand gibt es hier einen geschlossen-inaktivierten Zustand. Um ihn zu erreichen, müssen offene Kanäle zunächst schließen. Dies erklärt Beobachtungen an Kv4.1-Mutanten, bei denen ein verlangsamtes Schließen mit einer verlangsamten Inaktivierung verbunden war (Jerng et al., 1999). Eine wichtige Eigenschaft dieses Modells für Kv4.1-Kanäle ist, dass die Rate des Schließens  $k_{oc}$  schneller ist als die Rate des Öffnens  $k_{co}$ . Das Öffnen ist „reverse biased“. Dies ermöglicht die Akkumulation der Kanäle in dem geschlossen-inaktivierten Zustand  $I_C$ .

Diesem Schema wurde eine Aktivierungskette hinzugefügt, die einen sigmoiden Anstieg der Ströme simulierte (Schema 3). Der geschlossen-inaktivierte Zustand  $I_C$  wurde um einen weiteren geschlossen-inaktivierten Zustand  $I_D$  ergänzt (Jerng et al., 1999).



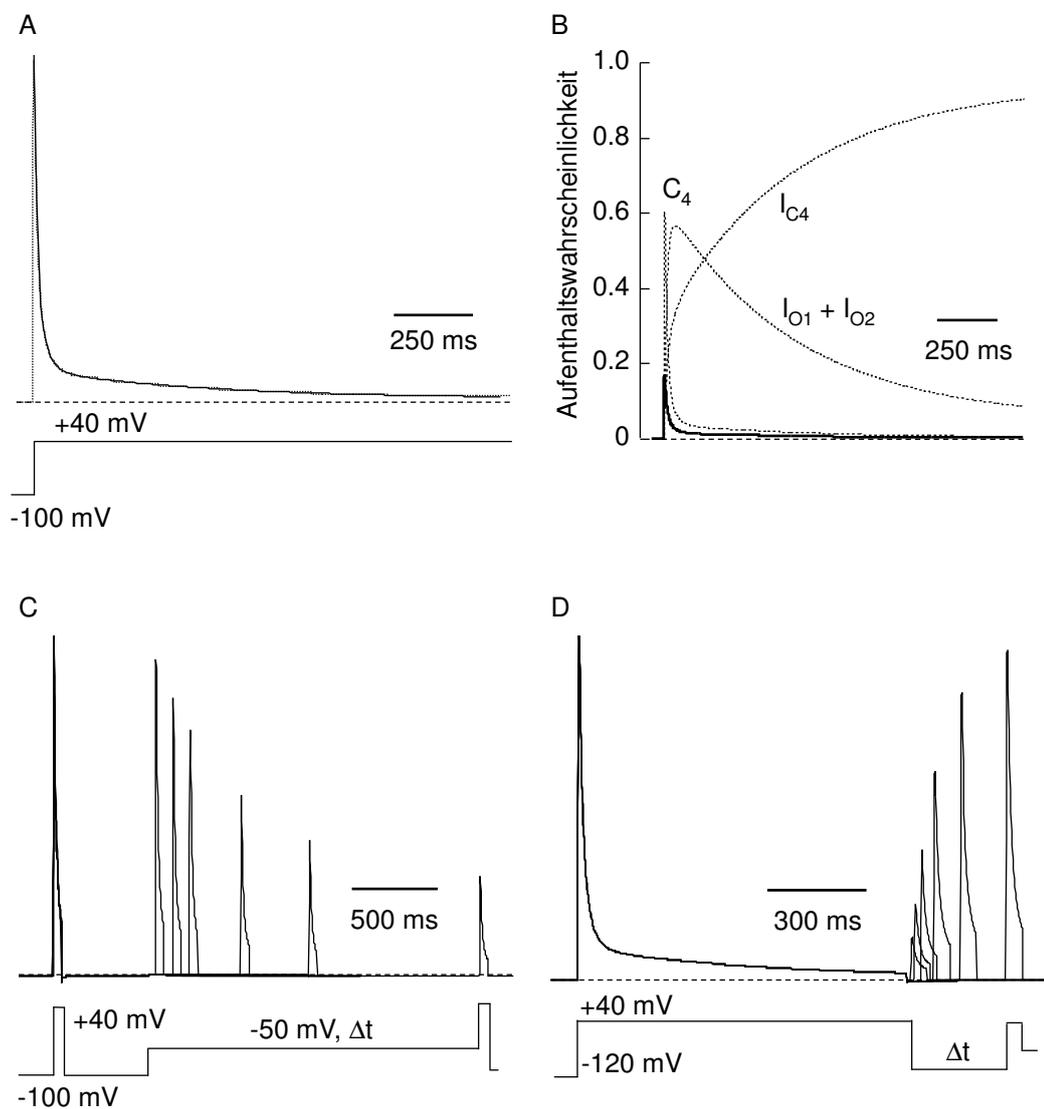
Dieses Schema erwies sich als sehr geeignet, um das Inaktivierungsverhalten von Kv4.1-Kanälen bei positiven Membranpotentialen zu beschreiben. Insbesondere simulierte es die komplexe, multiexponentielle Inaktivierungskinetik von Kv4.1-Strömen. Durch die Umkehr-Betonung des Öffnens und die Stabilität des geschlossen-inaktivierten Zustands  $I_D$  wird erreicht, dass die Kanäle mit zunehmender Zeit der Inaktivierung in einem geschlossen-inaktivierten Zustand akkumulieren. Zumindest ansatzweise bietet das Schema auch eine Erklärung, wie Kanäle bei geringer Depolarisierung in einen geschlossen-inaktivierten Zustand gelangen, ohne zu öffnen. Ein Mangel dieses Schemas ist, dass es nicht die experimentell beobachtete, schnelle und spannungsabhängige Erholung aus der Inaktivierung simulieren kann. Denn die Erholung aus der Inaktivierung ist hier unabhängig von der Spannung durch die Rate  $k_{dc}$  limitiert, mit der Kanäle den sehr stabilen Zustand  $I_D$  verlassen. Diesem Mangel von Schema 3 begegnet die Idee, dass die Inaktivierung des geschlossenen Kanals an den Aktivierungszustand gekoppelt ist. Diese Kopplung wurde durch den sogenannten allosterischen Faktor  $f$  quantifiziert (Schema 4).



Ein ähnliches Modell wurde von Greenstein et al. (2000) für die Simulation von Kv4.3-Strömen benutzt. Die prinzipielle Idee dieser Art von Kopplung beruht auf einem Modell für enzymatische Reaktionen von Monod et al. (1965), wo sie als allosterisch bezeichnet wird. Die Simulation der experimentellen Kv4.2-Daten wurde durch das Aufsplitten des offen-inaktivierten Zustands in  $I_{O1}$  und  $I_{O2}$  wesentlich vereinfacht.

Ein Markov-Modell, das auf Schema 4 und den Parametern in Tabelle 1 basierte, war in der Lage, die experimentell beobachtete Inaktivierungskinetik zu simulieren (Abb. 8 A). Für einen Spannungssprung von -100 auf +40 mV simulierte Stromspuren hatten die Zeitkonstanten  $\tau_1 = 9$  ms (61 %),  $\tau_2 = 27$  ms (31 %) und  $\tau_3 = 544$  ms (9%). Aufschlussreich sind die Zeitverläufe der Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Kanals in bestimmten Zuständen während des Spannungssprungs von -100 auf +40 mV (Abb. 8 B). Durch die spannungsabhängige Aktivierung gelangen die Kanäle sehr schnell in  $C_4$  und öffnen teilweise auch. Die frühe, schnelle Phase der Inaktivierung wird sowohl durch einen Übergang in die offen-inaktivierten Zustände, als auch in den geschlossen-inaktivierten Zustand  $I_{C4}$  verursacht. Die langsame Phase der Inaktivierung beruht auf einer Umschichtung von den offen-inaktivierten Zuständen nach  $I_{C4}$ , wo die Mehrzahl der Kanäle akkumuliert. Diese Simulation zeigt, wie die experimentell beobachtete, komplexe und spannungsunabhängige Inaktivierung (Abb. 4) als auch die Akkumulation in einem geschlossen-inaktivierten Zustand (Abb. 7) durch ein nichtsequenzielles Schema mit umkehrbetontem Öffnungsschritt erklärt werden kann.

Das Modell war ebenfalls in der Lage, die experimentell beobachtete Inaktivierung im geschlossenen Zustand sowie die Erholung aus der Inaktivierung adäquat zu simulieren (Abb. 8 C und D). Die simulierte Inaktivierung bei einer Vorpulsspannung von -50 mV hatte eine Zeitkonstante von  $\tau = 521$  ms (Abb. 8 C). Die simulierte Er-



**Abb. 8:** Simulation der Kv4.2-Inaktivierung durch ein allosterisches Markov-Modell nach Schema 4. **A:** Simulation der Inaktivierung während eines Spannungspuls von -100 auf +40 mV (vgl. Abb. 4). Der Fit einer dreifach-exponentiellen Funktion ist als durchgezogene Linie dargestellt. **B:** Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Kanals für die Zustände  $C_4$ ,  $I_{C4}$ ,  $I_{O1} + I_{O2}$  (in Summe) und O (dicke Linie) während eines Spannungspuls auf +40 mV wie in A. **C:** Simulation der Inaktivierung während eines Vorpuls auf -50 mV (vgl. Abb. 5). **D:** Simulation der Erholung aus der Inaktivierung bei -120 mV (vgl. Abb. 6).

**Tabelle 1:** Werte der im allosterischen Modell (Schema 4) für die Simulation der Kv4.2-Eigenschaften benutzten Parameter. Die spannungsabhängigen Raten haben die Form  $\alpha = \alpha_0 e^{\frac{z_\alpha V F}{RT}}$  für die Hinrate und  $\beta = \beta_0 e^{\frac{-z_\beta V F}{RT}}$  für die Rückrate. Dabei sind  $\alpha_0$  und  $\beta_0$  die Raten bei 0 mV und  $z_\alpha$  und  $z_\beta$  geben die äquivalente Ladung an, die während des Zustandsübergangs über die Membran bewegt wird. Das Öffnen und Schließen des Kanals ist durch  $k_{CO}$  bzw.  $k_{OC}$  definiert, die Inaktivierung des offenen Zustands durch  $k_{OI1}$  und  $k_{IO1}$  bzw.  $k_{OI2}$  und  $k_{IO2}$ . Alle geschlossenen Zustände ( $C$ ) sind mit inaktivierten Zuständen ( $I_C$ ) über  $k_{CI}$  und  $k_{IC}$  verbunden. Die Kopplung von Aktivierung und Inaktivierung ist durch den allosterischen Faktor  $f$  definiert.

$\alpha_0$	200 1/s
$z_\alpha$	1.0
$\beta_0$	41/s
$z_\beta$	1.58
$k_{CO}$	400 1/s
$k_{OC}$	1100 1/s
$k_{OI1}$	300 1/s
$k_{IO1}$	30 1/s
$k_{OI2}$	30 1/s
$k_{IO2}$	15 1/s
$k_{CI}$	30 1/s
$k_{IC}$	0.1 1/s
$f$	0.3

holung aus der Inaktivierung bei -120 mV hatte eine Zeitkonstante von  $\tau = 79$  ms (Abb. 8 D). Schema 4 macht die Inaktivierung von Kv4.2-Kanälen im geschlossenen Zustand ohne vorheriges Öffnen (Abb. 5) verständlich. Es zeigt zudem, wie sich die schnelle Erholung aus der Inaktivierung bei negativen Spannungen (Abb. 6) durch die Kopplung der Inaktivierung an die geschlossenen Zustände der Inaktivierungskette interpretieren lässt.

### 3.1.4 Effekte N-terminaler Deletion

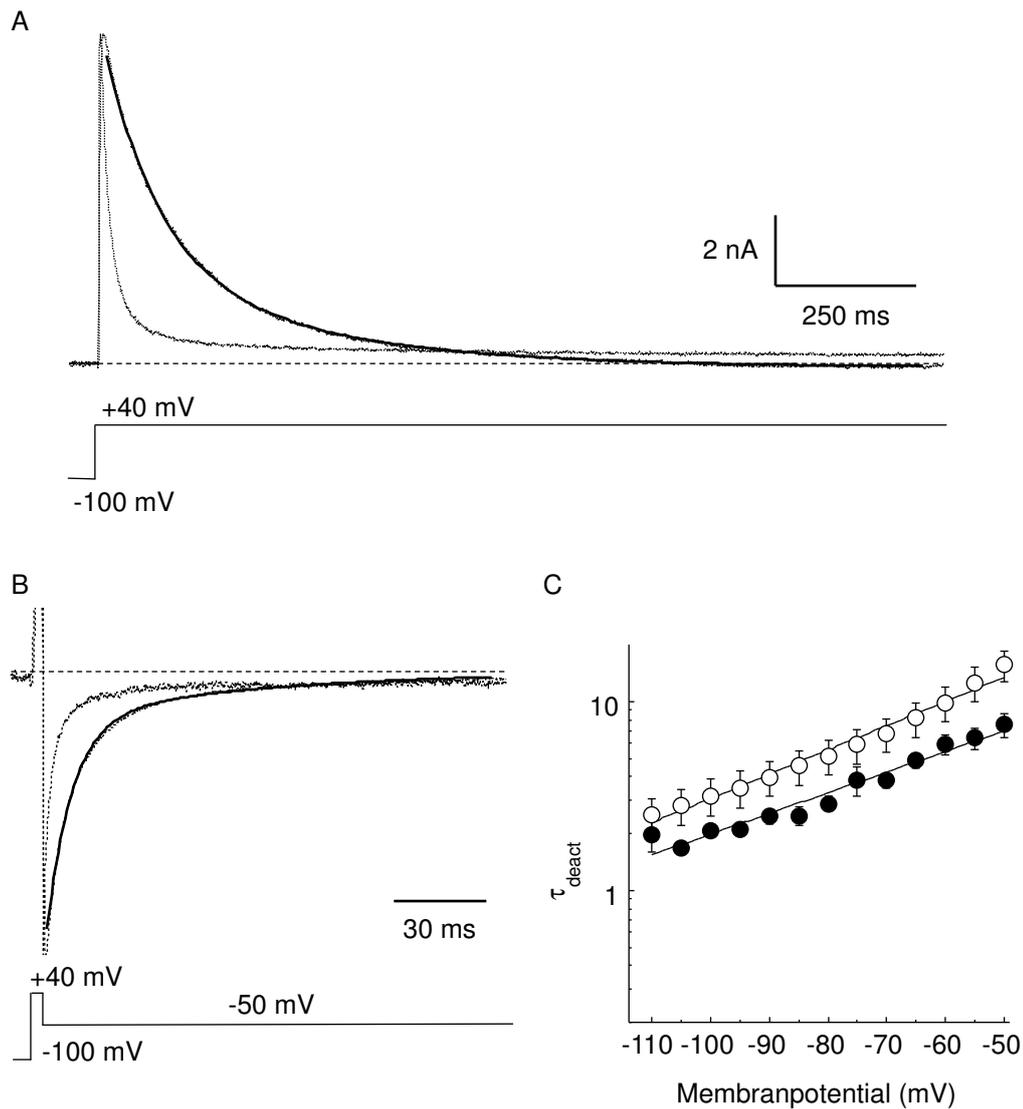
Die N-terminale Deletion ist ein klassisches Experiment zur Untersuchung der Inaktivierung des *Shaker*-Kanals, wo sie die schnelle Inaktivierung vollständig beseitigt (Hoshi et al., 1990). Für den Kv4.1-Kanal führt die N-terminale Deletion zwar zu einer Verlangsamung der Inaktivierung, hebt sie aber nicht vollständig auf (Jerng und Covarrubias, 1997). Für die Untersuchung dieses Effekts im Kv4.2-Kanal wurde eine Deletionsmutante benutzt, deren proximaler N-Terminus bis zur T1-Domäne entfernt war (Kv4.2 $\Delta$ 2-40, Zhu et al., 1999). Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Kanäle vermittelten einen recht zügig inaktivierenden A-Typ-Strom, der innerhalb von wenigen 100 ms fast

vollständig inaktiviert war (Abb. 9 A). Die anfängliche Inaktivierung von Kv4.2 $\Delta$ 2-40 war deutlich langsamer als die des Wildtyp-Kv4.2. Ein ähnliches Ergebnis hatten zuvor Jerng und Covarrubias (1997) für die N-terminale Deletionsmutante Kv4.1 $\Delta$ 2-71 erhalten.

Zwar inaktivierte Kv4.2 $\Delta$ 2-40 anfänglich langsamer als Kv4.2, der Strom erreichte jedoch früher die Nulllinie, den Steady-State der Inaktivierungsreaktion. Diese Unterschiede zwischen Kv4.2 $\Delta$ 2-40 und Kv4.2 in der Inaktivierungskinetik führen zu einem Überkreuzen der normalisierten Stromaufnahmen (Abb. 9 A). Anders als bei Kv4.2 ließ sich die Inaktivierung von Kv4.2 $\Delta$ 2-40 befriedigend mit zwei Zeitkonstanten beschreiben ( $\tau_1 = 100 \pm 23$  ms,  $(59 \pm 3 \%)$ ,  $\tau_2 = 293 \pm 27$  ms,  $(41 \pm 3 \%)$ ,  $n = 5$ ). Auch Jerng und Covarrubias (1997) beschrieben die Inaktivierung von Kv4.1 $\Delta$ 2-71 mit nur zwei Zeitkonstanten. Dieses Ergebnis ließ die Schlussfolgerung zu, dass zwei nicht leitfähige Zustände ausreichend sind, um die Inaktivierung von Kv4.2 $\Delta$ 2-40 zu beschreiben.

Außer auf die Inaktivierung hatte die N-terminale Deletion auch einen Einfluss auf die Kinetik der Deaktivierung. Tailströme wurden bei Membranspannungen zwischen -110 und -50 mV gemessen, nachdem Kanäle durch einen kurzen depolarisierenden Puls aktiviert worden waren. Die Kinetik dieser Tailströme wurde durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben. Kv4.2-Tailströme fielen bei -50 mV mit einer Zeitkonstante von  $\tau = 7.6 \pm 1.1$  ms ( $n = 5$ ) ab, während Tailströme von Kv4.2 $\Delta$ 2-40 mit  $\tau = 15.6 \pm 7.9$  ms ( $n = 3$ ) bei der gleichen Spannungen viel langsamer abfielen (Abb. 9 B). Für beide Kanaltypen verlangsamte sich die Deaktivierung mit zunehmender Depolarisation (Abb. 9 C). Der Fit einer exponentiellen Funktion ergab für Kv4.2 eine  $e$ -fache Verlangsamung der Zeitkonstante pro 34 mV Depolarisierung und für Kv4.2 $\Delta$ 2-40 pro 40 mV. Da die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung von Kv4.2 und Kv4.2 $\Delta$ 2-40 sich nicht stark unterscheidet, ist für die verlangsamte Deaktivierung von Kv4.2 $\Delta$ 2-40 vermutlich kein Übergang in der Deaktivierungskette, sondern das Schließen der Kanäle ( $O \rightarrow C$ ) verzögert.

Offensichtlich unterschieden sich Kv4.2-Kanäle in ihrer Inaktivierung von *Shaker*-Kanälen, bei denen die N-terminale Deletion die schnelle Inaktivierung vollständig aufhob (Hoshi et al., 1990). Die verbleibende Inaktivierung der N-terminalen Deletionsmutante Kv4.2 $\Delta$ 2-40 war nicht auf den N-Terminus angewiesen, folgte also nicht dem *ball and chain*-Modell (siehe Einleitung 1.1). Es boten sich zwei Erklärungen für den Unterschied in der Inaktivierung von Kv4.2 und Kv4.2 $\Delta$ 2-40 an: (1) Ent-



**Abb. 9:** Effekte der N-terminalen Deletion auf Kv4.2-Ströme. **A:** Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Ströme wurden durch einen Spannungspuls von -100 mV auf +40 mV aktiviert. Die Inaktivierung konnte durch eine zweifach-exponentielle Funktion beschrieben werden (durchgezogene Linie). Zum Vergleich wurde ein Kv4.2-Wildtyp-Strom (vgl. Abb. 4) auf das Maximum des Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Stroms normalisiert der Darstellung überlagert. **B:** Tailströme von Kv4.2 und Kv4.2 $\Delta$ 2-40 wurden 4 ms nach der Aktivierung durch einen Spannungssprung von -100 auf +40 mV bei -50 mV in symmetrischer 130 mM K<sup>+</sup>-Konzentration gemessen. Die durchgezogene Linie ist der Fit einer monoexponentiellen Funktion an den Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Tailstrom. Die Ströme wurden auf die maximale Auslenkung normalisiert **C:** Die Deaktivierungskinetik von Kv4.2-Strömen (ausgefüllte Symbole) und Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Strömen (offene Symbole) wurde für unterschiedliche Spannungen bestimmt. Die ermittelten Zeitkonstanten sind über der Spannung aufgetragen. Die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung wurde mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben (durchgezogene Linie).

**Tabelle 2:** Steuerungseigenschaften von Kv4.2 und Kv4.2Δ2-40. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Steady-State-Inaktivierung wurden mit einer Boltzmannfunktion beschrieben (vgl. Abb. 3).  $V_{1/2}$  ist die Spannung der halbmaximalen Aktivierung bzw. Inaktivierung,  $k$  der Steigungsfaktor. Die Inaktivierungskinetik makroskopischer Ströme bei +40 mV wurde durch eine Exponentialfunktion mit drei (Kv4.2) bzw. zwei (Kv4.2Δ2-40) Zeitkonstanten beschrieben (vgl. Abb. 4 und 9). Die Kinetik der Inaktivierung geschlossener Kanäle bei -60 mV bzw. -50 mV wurde durch ein Doppelpulsprotokoll bestimmt wie in Abb. 5 beschrieben. Die Kinetik der Erholung aus der Inaktivierung bei -80 mV wurde entweder durch ein einfaches Doppelpulsprotokoll oder mit konditionierenden Vorpuls auf -50 mV bestimmt (vgl. Abb. 6). Die Deaktivierungskinetik wurde durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben (vgl. Abb. 9).

	Kv4.2	Kv4.2Δ2-40
Spannungsabhängigkeit der Aktivierung		
$V_{1/2}$ (mV)	$5.7 \pm 2.2$	$-3.3 \pm 3.0$
$k$ (mV)	$16.9 \pm 0.7$ ( $n = 10$ )	$16.3 \pm 0.8$ ( $n = 6$ )
Steady-State-Inaktivierung		
$V_{1/2}$ (mV)	$-62.0 \pm 2.2$	$-54.5 \pm 2.2$
$k$ (mV)	$5.8 \pm 0.5$ ( $n = 6$ )	$5.3 \pm 0.7$ ( $n = 5$ )
Inaktivierung bei +40 mV		
$\tau_1$ (ms)	$14 \pm 2$	$100 \pm 23$ ms
$\tau_2$ (ms)	$60 \pm 7$	$297 \pm 27$ ms
$\tau_3$ (ms)	$823 \pm 93$	
$A_1$ (%)	$70 \pm 3$	$59 \pm 3$ %
$A_2$ (%)	$21 \pm 3$	$41 \pm 3$ %
$A_3$ (%)	$6 \pm 3$ ( $n = 8$ )	$(n = 5)$
Inaktivierung bei -60 mV bzw. -50 mV		
$\tau_{-60\text{ mV}}$ (ms)	$1030 \pm 140$ ( $n = 7$ )	$912 \pm 79$ ( $n = 5$ )
$\tau_{-50\text{ mV}}$ (ms)	$959 \pm 188$ ( $n = 6$ )	$774 \pm 79$ ( $n = 5$ )
Erholung aus der Inaktivierung		
$\tau_{-80\text{ mV}}$ (ms)	$236 \pm 26$ ( $n = 11$ )	$260 \pm 80$
Erholung aus der Inaktivierung mit konditionierendem Vorpuls		
$\tau_{-80\text{ mV}}$ (ms)	$241 \pm 19$ ( $n = 17$ )	$203 \pm 23$ ( $n = 15$ )
Deaktivierungskinetik bei -50 mV		
$\tau$ (ms)	$7.6 \pm 1.1$ ( $n = 4$ )	$16 \pm 3$ ( $n = 3$ )

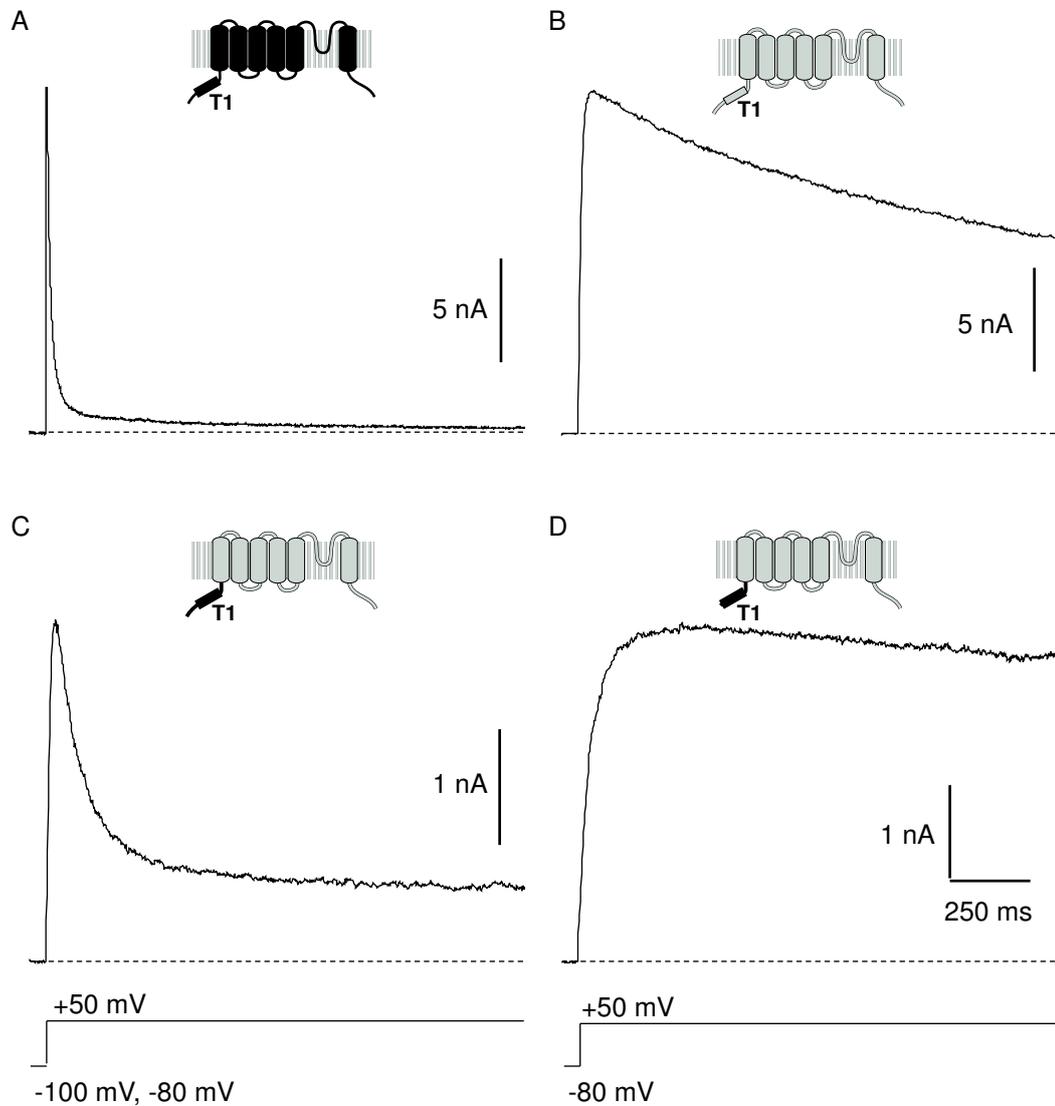
weder besitzt Kv4.2 einen einzigen Inaktivierungsmechanismus, der unabhängig von der Anwesenheit des N-Terminus ist, aber in seiner Kinetik durch den N-Terminus moduliert wird. (2) Oder aber es gibt im Kv4.2-Kanal zwei grundsätzlich verschiedene Inaktivierungsmechanismen, von denen einer auf den N-Terminus angewiesen ist, wie es im *ball and chain*-Modell der Fall ist, während der zweite in der Inaktivierung im geschlossenen Zustand besteht. Durch die N-terminale Deletion wird in diesem Fall die Inaktivierung des offenen Zustands  $I_O$  aufgehoben, während die Inaktivierung des geschlossenen Zustands  $I_{C_4}$  bestehen bleibt (vgl. Schema 4). Jerng et al. (1999) nehmen, wie in der zweiten Erklärung vorgeschlagen, zwei unterschiedliche Mechanismen an, indem sie zwischen einem „schnellen“ und einem „langsamen“ Inaktivierungsprozess unterscheiden. Im Einklang damit steht auch die Schlussfolgerung, dass zwei geschlossene Zustände (nämlich  $C_4$  und  $I_{C_4}$ ) ausreichend sind, um die Inaktivierung von Kv4.2 $\Delta$ 2-40 zu beschreiben, während kein offen-inaktivierter Zustand ( $I_O$ ) mehr vorhanden ist. In den die Inaktivierung im geschlossenen Zustand beschreibenden Parametern (Erholung aus der Inaktivierung, Inaktivierung bei  $-60$  und  $-50$  mV) zeigte Kv4.2 $\Delta$ 2-40 keinen deutlichen Unterschied zu Kv4.2 (Tabelle 2)

## 3.2 Untersuchung der Kv4.2-Inaktivierung im offenen Zustand

Die Eigenschaften von Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Kanälen konnten dadurch erklärt werden, dass die Deletion den offen-inaktivierten Zustand vollständig beseitigte. Es war daher denkbar, dass Kv4.2- $\alpha$ -Untereinheiten, ähnlich wie *Shaker*, in ihrem proximalen N-Terminus eine Inaktivierungsdomäne besitzen. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die ersten zehn Aminosäuren des Kv4.2-N-Terminus unpolar sind, wie es für die entsprechende Inaktivierungsdomäne bei *Shaker* der Fall ist (Murrell-Lagnado und Aldrich, 1993).

### 3.2.1 Inaktivierung des Kv2.1-Kanals durch den Kv4.2-N-Terminus

Für die Analyse der Inaktivierung des Kv4.2 im offenen Zustand ( $O \rightarrow I_O$ ) erwies sich das Vorhandensein weiterer ebenfalls relativ schneller Inaktivierungsprozesse ( $C \rightarrow I_{C_4}$  und  $O \rightarrow C \rightarrow I_{C_4}$ ) als hinderlich. Um die Eigenschaften des offen inaktivierten Zustands zu untersuchen, wurde daher die Kanal-Chimäre Kv2.1(4.2NT)



**Abb. 10:** Der Kv4.2-N-Terminus überträgt eine schnelle Inaktivierung auf Kv2.1. Ströme von Kv4.2 (A) Kv2.1 (B) und der Kanal-Chimäre Kv2.1(4.2NT) mit intaktem (C) oder deletiertem N-Terminus (D) wurden durch Spannungssprünge von -100 (Kv4.2) bzw. -80 mV auf +50 mV aktiviert. Die entsprechenden Konstrukte sind durch Schemata illustriert. Kv4.2-Bereiche sind schwarz, Kv2.1-Bereiche grau gefärbt.

konstruiert, in der der cytoplasmatische N-Terminus des Kv2.1-Kanals vollständig durch den homologen Bereich des Kv4.2 ersetzt wurde. Der Kv2.1-Kanal erschien dafür geeignet, weil er eine vergleichsweise langsame Inaktivierung zeigt (Abb. 10 B), die vor allem von geschlossenen Zuständen erfolgt, während die Inaktivierung des offenen Zustands kaum eine Rolle spielt (Klemic et al., 1998). Zudem führte die Applikation eines Peptids der *Shaker*-Inaktivierungsdomäne zu einer schnellen Blockierung von Kv2.1-Strömen (Isacoff et al., 1991), was zeigt, dass Kv2.1 einen Rezeptor für die N-terminale *Shaker*-Inaktivierungsdomäne besitzt. Es war daher davon auszugehen, dass die Kv2.1-eigene Inaktivierung das Studium einer u. U. durch den Kv4.2-N-Terminus übertragen Inaktivierung des offenen Zustands nicht stören würde.

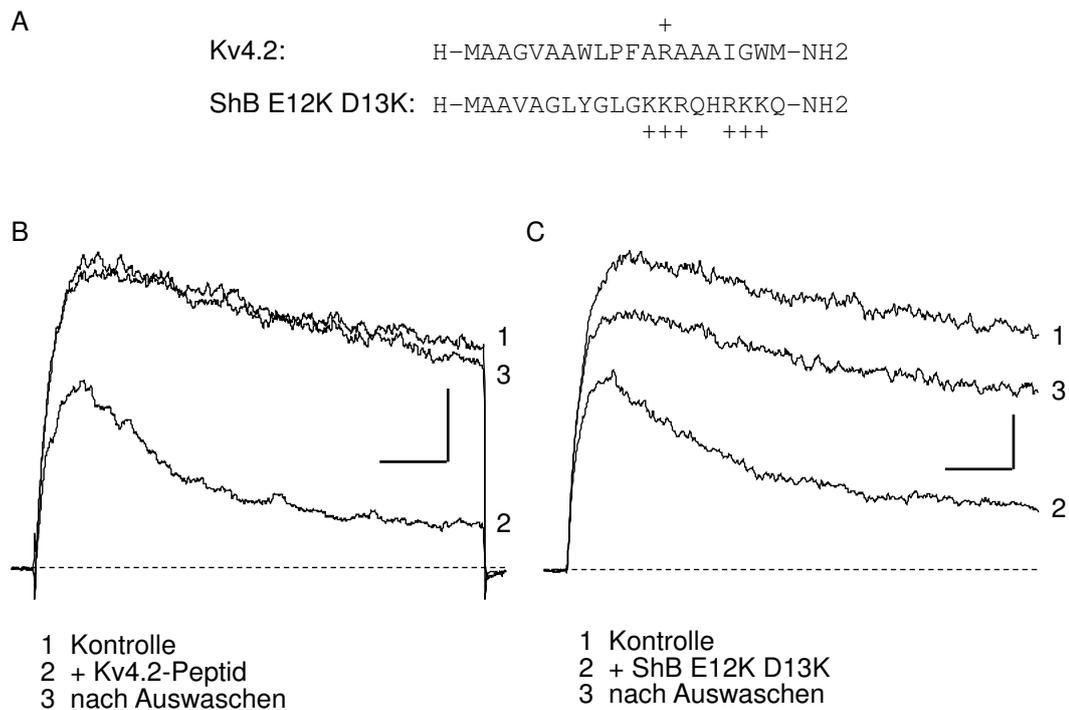
Tatsächlich zeigten die durch die Kanal-Chimäre Kv2.1(4.2NT) vermittelten K<sup>+</sup>-Auswärtsströme eine deutliche Komponente schneller Inaktivierung (Abb. 10 C). Die Inaktivierungskinetik konnte mit zwei Zeitkonstanten beschrieben werden ( $\tau_1 = 120 \pm 13$  ms,  $82 \pm 3$  %;  $\tau_2 = 5.9 \pm 1.1$  s;  $n = 6$ ). Die relative Amplitude des Stroms, der nach 1 s Testpuls bestehen blieb, betrug  $32 \pm 4$  % des Peakstroms. Die Inaktivierung des Kv2.1-Wildtyps dagegen war um mehr als eine Größenordnung langsamer ( $\tau = 3.4 \pm 0.3$  s,  $n = 14$ ). Dieses Ergebnis zeigte deutlich, dass der Kv4.2-N-Terminus eine schnelle Inaktivierung auf Kv2.1 -Kanäle übertrug.

Es stellte sich die Frage, ob in Kv2.1(4.2NT) die schnelle Inaktivierung allein durch die ersten 40 Aminosäuren des Kv4.2-N-Terminus bewirkt wurde, wie es der Vorstellung im *ball and chain*-Modell entsprach. Um dies zu überprüfen wurde das N-terminal deletierte Konstrukt Kv2.1(4.2NT $\Delta$ 40) hergestellt. Diesem Konstrukt fehlten die ersten 40 Aminosäuren der N-Terminale Kv4.2-Sequenz. Die Expression von Kv2.1(4.2NT $\Delta$ 40)-Kanälen führte zu Auswärtsströmen, die sogar langsamer inaktivierten ( $\tau = 11.1 \pm 1.6$  s;  $n = 6$ ) als die Kv2.1-Ströme (Abb. 10 D). Dieses Ergebnis zeigte, dass die Deletion des proximalen N-Terminus die schnelle Inaktivierung der Chimäre vollständig aufhob. Zusammengefasst sind diese Ergebnisse in Einklang mit der Hypothese, dass der proximale Kv4.2-N-Terminus als inaktivierender Bereich fungiert.

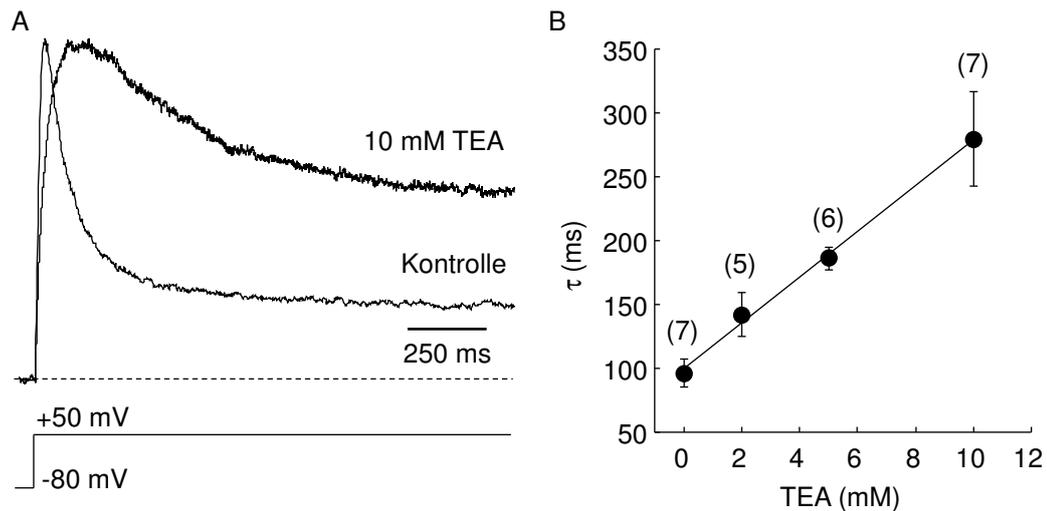
Die N-terminale Inaktivierungsdomäne von *Shaker* führt auch zur Inaktivierung, wenn sie im Inside-Out-Patch als lösliches Peptid auf den nicht inaktivierenden, N-terminal deletierten *Shaker*-Kanal (Zagotta et al., 1990) oder auf Kv2.1-Kanäle (Isacoff et al., 1991) appliziert wird. Es sollte nun untersucht werden, ob der Kv4.2-

N-Terminus einen vergleichbaren Effekt hat, wenn er auf Inside-Out-Patches mit nicht inaktivierenden Kv4.2-Kanälen appliziert wird. Für dieses Experiment wurden zwei Peptide verwendet: (1) ein Kv4.2-Peptid, das den ersten 20 Aminosäuren des Kv4.2-N-Terminus entsprach und (2) zur Kontrolle ein 20 Aminosäuren langes *Shaker*-Peptid (*ShB E12H D13K*), das bereits zuvor beschrieben wurde (Murrell-Lagnado und Aldrich, 1993, Abb. 11 A). Die Applikation des Kv4.2-Peptids auf die cytoplasmatische Seite von Inside-Out-Patches mit Kv2.1-Kanälen führte zu einer schnellen Inaktivierung der Ströme (Abb. 11 B, 2). Die Inaktivierung durch das Peptid konnte durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden. Die Zeitkonstante betrug bei einer Kv4.2-Peptid-Konzentration von  $100 \mu\text{M}$   $\tau = 65 \pm 11 \text{ ms}$  ( $n = 5$ ). Nach dem Auswaschen des Peptids stellte sich wieder der für Kv2.1-Ströme typische, langsame Abfall des Stromes ein (Abb. 11 B, 3). Die Applikation von  $100 \mu\text{M}$  des *ShB E12H D13K*-Peptids führte zu einer ähnlich schnellen Inaktivierung der Kv2.1-Ströme ( $\tau = 51 \pm 11 \text{ ms}$ ,  $n = 5$ ; Abb. 11 C, 2). Auch hier konnte der Block des Kanals durch Auswaschen des Peptids aufgehoben werden (Abb. 11 C, 3). Diese Ergebnisse zeigten, dass das N-Terminale Kv4.2-Peptid ebenso als Porenblocker auf Kv2.1-Kanäle wirken konnte wie das *ShB E12H D13K*-Peptid.

Intrazelluläre Porenblocker wie Tetraethylammonium (TEA) verlangsamten die Inaktivierung von *Shaker*-Strömen, weil der Blocker mit dem N-terminalen Inaktivierungspartikel um die Bindestelle in der Pore kompetitiert (Choi et al., 1991; Zhou et al., 2001). Hier wurde der Effekt von intrazellulärem TEA auf die Inaktivierungskinetik von Kv2.1(4.2NT)-Strömen im Whole-Cell-Modus untersucht. Dazu wurde TEA der intrazellulären Lösung in der Patchpipette hinzugefügt. In Gegenwart von TEA war die Inaktivierung im Vergleich zu Kontrollmessungen ohne TEA verlangsamt. Bei einer TEA-Konzentration von  $10 \text{ mM}$  hatte die schnelle Komponente aus dem zweifach-exponentiellen Fit eine Zeitkonstante von  $\tau_1 = 280 \pm 37 \text{ ms}$  ( $n = 7$ , Abb. 12 A). Der TEA-Effekt war konzentrationsabhängig: Mit steigender TEA-Konzentration verlangsamte sich der Inaktivierungsprozess. Die Zeitkonstante erhöhte sich linear um etwa  $18 \text{ ms}$  pro  $1 \text{ mM}$  erhöhter TEA-Konzentration (Abb. 12 B). Der mittlere Peakstrom bei unterschiedlichen TEA-Konzentrationen variierte stark, vermutlich wegen Expressionsschwankungen in den Stichprobengruppen ( $3.6 \pm 1.0$ ,  $0.8 \pm 0.2$ ,  $1.0 \pm 0.3$  und  $1.2 \pm 0.2 \text{ nA}$  bei 0, 2, 5 bzw.  $10 \text{ mM}$  TEA).



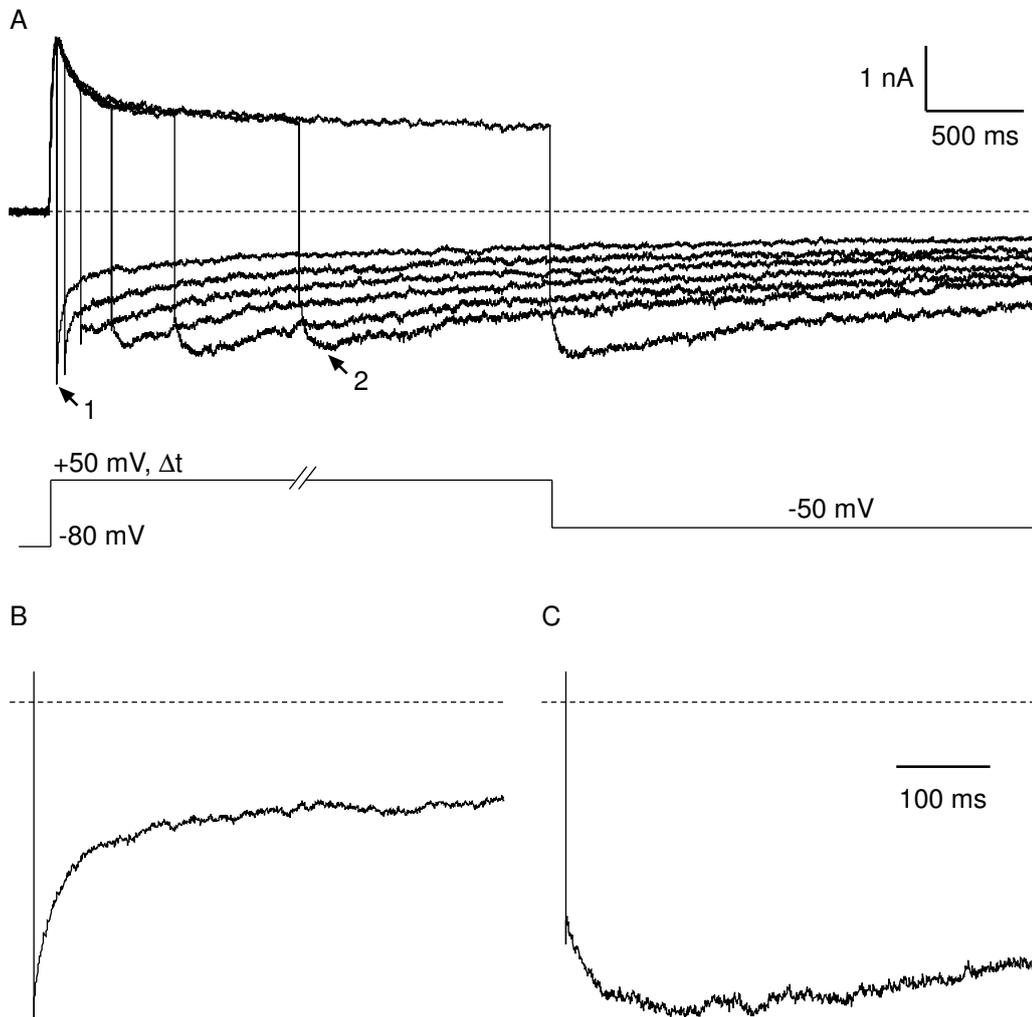
**Abb. 11:** Block von Kv2.1-Kanälen durch Applikation N-terminalen Peptids. **A:** N-terminales Peptid von Kv4.2 bzw. *ShB* mit den Mutationen E12K und D13K. **B:** Applikation von Kv4.2-Peptid auf die intrazelluläre Seite eines Inside-Out-Patches, der Kv2.1-Kanäle enthielt. Die Ströme wurden durch einen Spannungspuls von -100 auf +50 mV aktiviert. Skalierung: 100 pA, 30 ms. **C:** Effekt der Applikation von N-terminalem *ShB* E12K D13K-Peptid. In diesem Experiment wurden die Ströme durch einen Spannungssprung von -100 auf +100 mV aktiviert, um größere Amplituden zu erhalten. Skalierung: 200 pA, 30 ms.



**Abb. 12:** Intrazelluläres TEA beeinflusst die Kv2.1(4.3NT)-Inaktivierung. **A:** Normalisierte Kv2.1(4.2NT)-Stromaufnahmen von zwei unterschiedlichen Zellen in Abwesenheit (Kontrolle) und in Gegenwart von 10 mM TEA. Die Ströme wurden durch Spannungssprünge von -100 auf +50 mV aktiviert. **B:** Konzentrationsabhängigkeit des TEA-Effekts. Der Stromabfall wurde mit zwei Zeitkonstanten beschrieben. Die Darstellung zeigt die mittleren Werte für  $\tau_1$  in Anwesenheit von 0, 2, 5 und 10 mM TEA in der Pipettenlösung. Eine lineare Regression (durchgezogene Linie) ergab eine Erhöhung von  $\tau_1$  um 18 ms pro 1 mM TEA.

### 3.2.2 Erholung aus der Inaktivierung von Kv2.1(4.2NT)

Die Erholung aus der Inaktivierung von *Shaker*-Kanälen zeigt charakteristische Eigenschaften, die in direktem Zusammenhang stehen mit dem Übergang  $I_O \rightarrow O \rightarrow C$  (Demo und Yellen, 1991; Ruppertsberg et al., 1991). Da *Shaker*-Kanäle nach der Erholung aus der Inaktivierung zunächst geöffnet sind, bevor sie deaktivieren, kommt es bei geeigneten experimentellen Bedingungen zu einer kurzzeitigen Zunahme der Tailströme, bevor sie abfallen. Die Untersuchung der Tailströme von Kv2.1(4.2NT)-Kanälen zeigte, dass auch hier inaktivierte Kanäle zunächst wieder öffnen (Abb. 13 A). Die Kinetik der Tailströme hing deutlich von der Dauer der vorausgehenden Depolarisierung ab. Nach kurzen depolarisierenden Vorpulsen (z. B. 40 ms) fielen die Tailströme ohne weitere Verzögerung ab (Pfeil 1 in Abb. 13 A und Abb. 13 B). Nach länger andauernden Depolarisierungen (z. B. mehr als 1 s) war bereits ein großer Anteil der Kv2.1(4.2NT)-Kanäle inaktiviert. Die Repolarisierung führte dann zu Tailströmen mit veränderter Kinetik und zu einer kurzzeitigen Erhöhung der Amplitude (Pfeil 2 in Abb. 13 A und Abb. 13 C). Diese kurzzeitige Erhöhung der Amplitude zeigte, dass inaktivierte Kv2.1(4.2NT)-Kanäle während



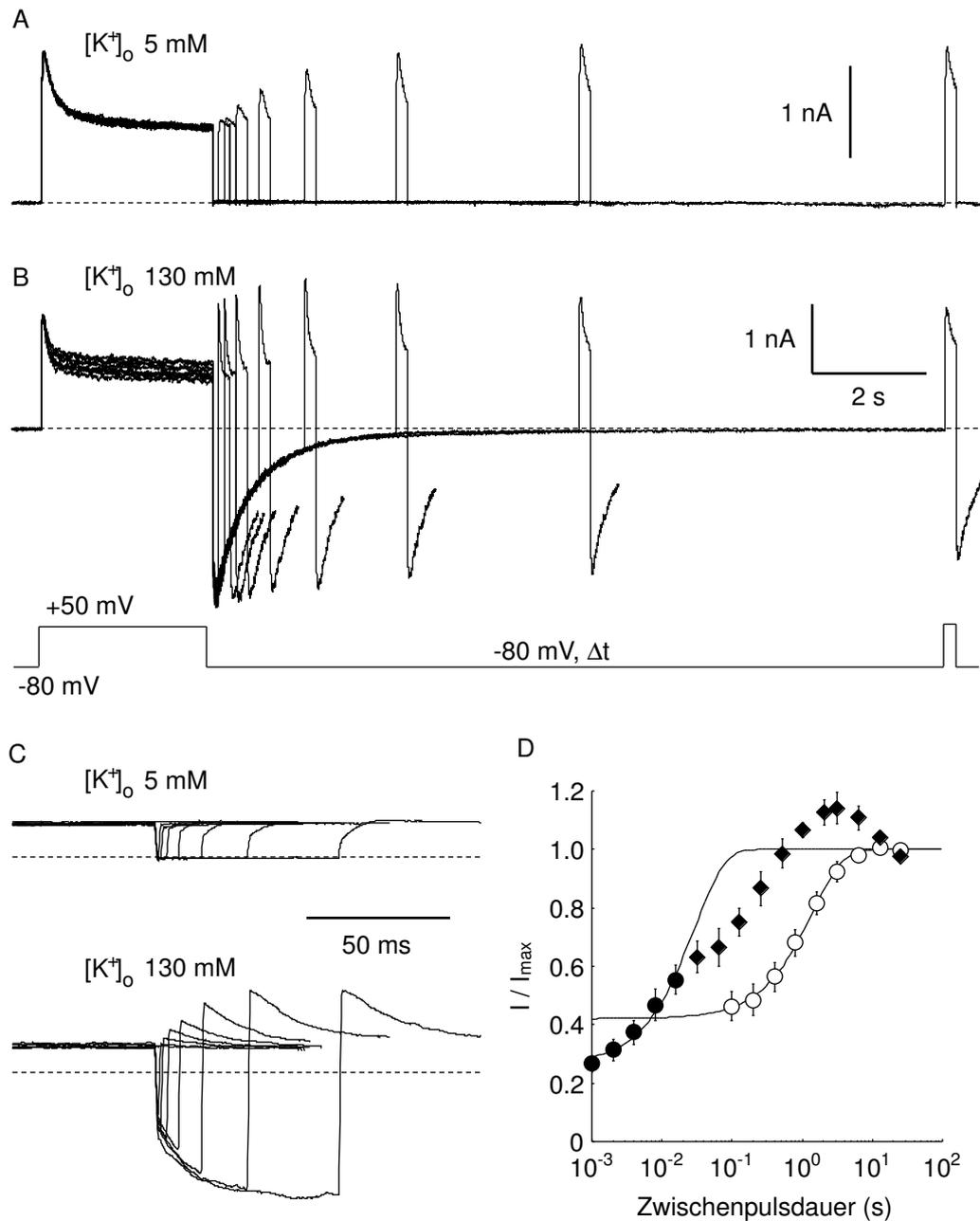
**Abb. 13:** Kv2.1(4.2NT)-Kanäle öffnen während der Erholung aus der Inaktivierung. **A:** Kv2.1(4.2NT)-Tail Ströme wurden in 130 mM  $K^+$  bei -50 mV aufgenommen. Die Dauer des aktivierenden und inaktivierenden Vorpulses von -80 auf +50 mV war variabel. **B, C:** Tailströme nach einer kurzen (40 mV, Pfeil 1 in A) und nach einer langen Depolarisation (1.3s, Pfeil 2 in A) sind vergrößert dargestellt in B bzw. C, wozu sie auf die höchste negative Auslenkung des Stroms normalisiert wurden. Man achte auf den anfänglichen Anstieg des Tailstroms in C, der das Öffnen von inaktivierten Kanälen anzeigt.

der Erholung aus der Inaktivierung zunächst wieder öffnen, bevor sie deaktivieren. Zusätzlich zur kurzzeitigen Erhöhung der Amplitude zeigte sich das Öffnen der inaktivierten Kanäle auch in einem stark verlangsamten Abfall der Tailströme.

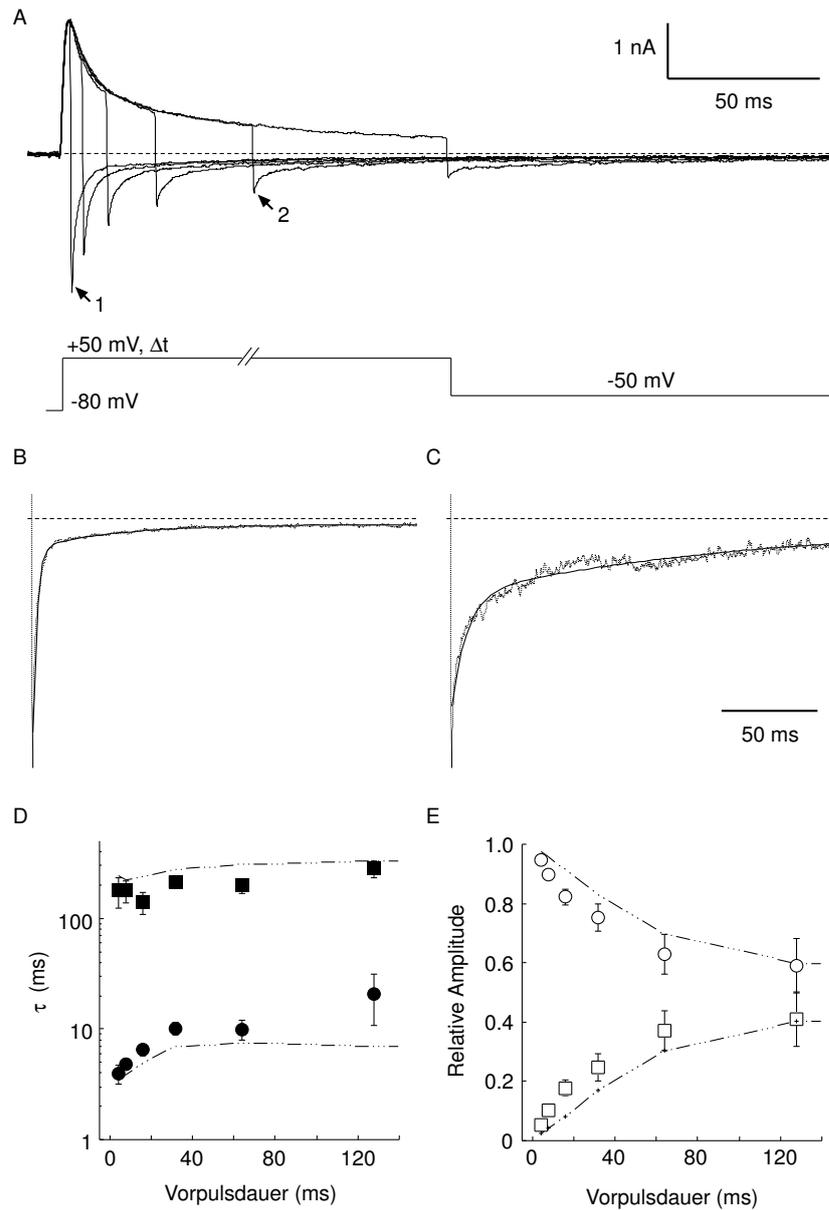
Hohe extrazelluläre  $K^+$ -Konzentrationen, wie sie in den oben beschriebenen Tailstrom-Experimenten verwendet wurden, verringern bei *Shaker* die Affinität der N-terminalen Inaktivierungsdomäne für die Bindestelle in der Kanalpore. Dies führt zu einer Beschleunigung der Erholung aus der Inaktivierung (Demo und Yellen, 1991). Um zu prüfen, ob diese charakteristische Eigenschaft auch für die Erholung aus der Inaktivierung von Kv2.1(4.2NT)-Kanälen zutrifft, wurde der Verlauf der Erholung aus der Inaktivierung in  $[K^+]_o$  von 5 bzw. 130 mM verglichen. Die Erholung aus der Inaktivierung in 5 mM  $K^+$  war relativ langsam (Abb. 14 A). Innerhalb der ersten 40 ms war keine Erholung aus der Inaktivierung erkennbar (Abb. 14 C). Die Kinetik der Erholung konnte gut mit einer einzigen Zeitkonstante ( $\tau_{rec} = 1.5 \pm 0.2$  s,  $n = 5$ ) beschrieben werden (Abb. 14 D). Im Gegensatz dazu war die Erholung aus der Inaktivierung in 130 mM  $K^+$  sehr schnell, so dass Kv2.1(4.2NT)-Ströme sich innerhalb von 40 ms nahezu vollständig aus der Inaktivierung erholten (Abb. 14 B, C). Auf die schnelle Erholung aus der Inaktivierung in 130 mM  $K^+$  folgte bei längeren Zwischenpulsen eine Zunahme des Peakstroms über den Kontrollwert hinaus („overshoot“). Bei noch längeren Zwischenpuls-Intervallen nahm der Peakstrom allmählich wieder ab, bis der Kontrollwert wieder erreicht war. Der overshoot lässt sich dadurch erklären, dass zum einen der Peakstrom während des Kontrollpuls durch die Inaktivierung reduziert ist und zum anderen Kv2.1(4.2NT)-Kanäle sich bei 130 mM  $K^+$  schneller aus der Inaktivierung erholen, als sie deaktivieren. Dies führt zu einer Akkumulation von Kanälen im offenen Zustand, so dass der Peakstrom während des Testpulses den Peakstrom während des Kontrollpulses übersteigt. Fünf Messpunkte innerhalb der ersten 64 ms konnten mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden ( $\tau_{rec} = 27 \pm 7$  ms,  $n = 5$ , Abb. 14 D). Es konnte also erstens gezeigt werden, dass Kv2.1(4.2NT) Kanäle während der Erholung zunächst öffnen, und dass zweitens die Erholung aus der Inaktivierung durch eine erhöhte extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration beschleunigt wird.

### 3.2.3 Inaktivierung des offenen Zustands bei Kv4.2

Die Ergebnisse der Experimente mit der Kanal-Chimäre Kv2.1(4.2NT) zeigten, dass der Kv4.2-N-Terminus zu einer schnellen Inaktivierung führt, basierend auf einem



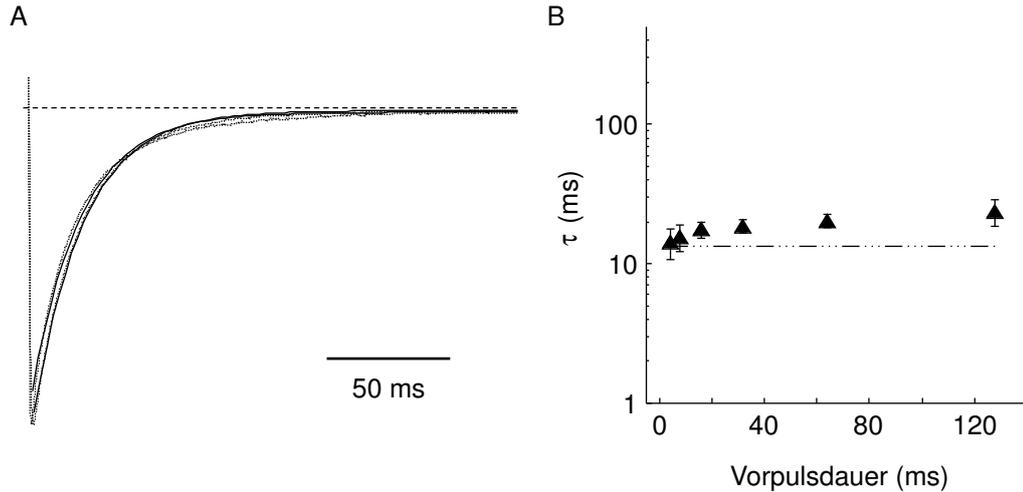
**Abb. 14:** Die extrazelluläres  $K^+$ -Konzentration beeinflusst die Erholung von Kv2.1(4.2NT)-Kanälen aus der Inaktivierung. **A, B:** Beispielaufnahmen der Erholung aus der Inaktivierung von Kv2.1(4.2NT)-Kanälen bei -80 mV mit  $[K^+]_o$  von 5 mM (A) und 130 mM (B) mit derselben Zeitskala. **C:** Während nach 40 ms in 5 mM  $[K^+]_o$  keine Erholung beobachtet werden konnte, erreichten die Amplituden der Ströme in 130 mM  $[K^+]_o$  innerhalb dieses Intervalls die Amplitude der Kontrolle. **D:** Der Peakstrom während des Testpuls wurde auf den Peakstrom während des Kontrollpuls normalisiert und über der Dauer des Zwischenpuls auf einer logarithmischen Zeitskala aufgetragen. Die Kinetik der Erholung aus der Inaktivierung in 5 mM (offene Symbole) und 130 mM  $[K^+]_o$  (ausgefüllte Symbole) wurde durch den Fit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben. Wegen des *overshoot* (siehe Text) wurden nur die ersten fünf Datenpunkte (ausgefüllte Kreise) der in 130 mM  $K^+$  gewonnenen Daten für den Fit berücksichtigt.



**Abb. 15:** Kinetische Analyse der Tailströme von Kv4.2-Kanälen. **A:** Beispielaufnahmen von Kv4.2-Strömen in 130 mM  $[K^+]_o$ , die mit einem Protokoll ähnlich dem für Kv2.1(4.2NT) verwendeten (Abb. 13 A) aufgenommen wurden. **B:** Schneller Abfall der Tailströme nach einer kurzen Depolarisation (4 ms, Pfeil 1 in A). **C:** Tailströme nach einer länger andauernden Depolarisation (64 ms, Pfeil 2 in A) zeigen eine deutliche, langsame Komponente. Durchgezogene Linien in B und C repräsentieren Fits zweifach-exponentieller Funktionen. **D, E:** Zusammenfassung der Ergebnisse des zweifach-exponentiellen Fits. Schnelle (ausgefüllte Kreise) und langsame (ausgefüllte Quadrate) Zeitkonstanten des Abfalls der Tailströme, sowie ihre relativen Amplituden (entsprechende offene Symbole in E) wurden in Abhängigkeit von der Dauer des depolarisierenden Vorpuls aufgetragen. Man beachte, dass die relative Amplitude der langsamen Zeitkonstante mit der Dauer des Vorpuls ansteigt. Durchbrochene Linien in D und E stehen für die Vorhersagen des Kv4.2-Modells (s. o. Abschnitt 3.1).

Block des Kanals durch eine proximale Inaktivierungsdomäne. Vor dem Hintergrund dieser Analyse der Kv2.1(4.2NT)-Inaktivierung wurde nun von neuem die Inaktivierung des Kv4.2-Kanals untersucht. Wenn es zutrifft, dass der Kv4.2-N-Terminus auch im Kv4.2-Kanal eine Inaktivierung durch Blockierung des offenen Kanals hervorruft, so muss sich das Öffnen der auf diese Weise inaktivierten Kanäle über die Kinetik der Tailströme nachweisen lassen. Diese Annahme wurde durch die Untersuchung von Tailströmen überprüft, die bei -50 mV gemessen wurden, nachdem Kanäle durch depolarisierende Pulse variabler Dauer auf +50 mV in unterschiedlichem Grade inaktiviert wurden (Abb. 15). Die Beschreibung der Kv4.2-Tailströme mit einer zweifach-exponentiellen Funktion ergab eine gute Annäherung. Nach kurzen depolarisierenden Vorpulsen (z. B. 4 ms) betrug die Amplitude der schnellen Komponente ( $\tau_1 = 3.9 \pm 0.7$  ms,  $n = 4$ )  $95 \pm 1\%$  des gesamten Stromabfalls (Pfeil 1 in Abb. 15 A und B). Die langsame Komponente trug nur geringfügig zum Stromabfall bei ( $\tau_2 = 10.0 \pm 2.0$  ms,  $n = 4$ ). Nach längeren Depolarisationen (z. B. 64 ms) war die schnelle Komponente verlangsamt ( $\tau_1 = 10.0 \pm 2.0$  ms,  $n = 4$ ) und die relative Amplitude war auf  $63 \pm 7\%$  reduziert (Pfeil 2 Abb. 15 A und C). Die langsame Komponente ( $\tau_2 = 199 \pm 30$  ms,  $n = 4$ ) trug jetzt zu einem größeren Anteil des gesamten Stromabfalls bei. Die Abhängigkeit der Deaktivierungskinetik von der Dauer des depolarisierenden Vorpuls ist in Abbildung 15 D und E zusammengefasst. Diese Unterschiede in der Kinetik der Tailströme könnten darauf beruhen, dass Kanäle öffneten bevor sie deaktivierten.

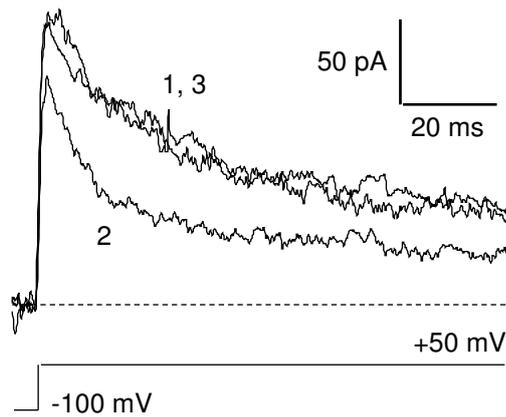
Oben wurde die Hypothese aufgestellt, dass im Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Kanal keine Inaktivierung des offenen Zustands stattfindet, weil die N-terminale Inaktivierungsdomäne deletiert wurde. Die Kinetik der Tailströme wäre dann ausschließlich durch das Schließen der Kanäle bestimmt. Um diese Voraussage zu bestätigen, wurden Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Tailströme nach depolarisierenden Testpulsen unterschiedlicher Dauer analysiert, wie es für Kv4.2-Wildtyp-Kanäle durchgeführt wurde. Die Deaktivierungskinetik von Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Tailströmen erwies sich als unabhängig von der Dauer des depolarisierenden Vorpuls (Abb. 16 A). Im Gegensatz zu Kv4.2 konnten die Tailströme von Kv4.2 $\Delta$ 2-40 durch eine einfach-exponentielle Funktion beschrieben werden. Die Zeitkonstanten waren  $\tau = 14.3 \pm 3.5$  ms ( $n = 3$ ) nach einem kurzen depolarisierenden Vorpuls von 4 ms und  $\tau = 20.3 \pm 2.3$  ms ( $n = 3$ ) nach einem längeren depolarisierenden Vorpuls von 64 ms. Die Zeitkonstanten der Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Tailströme hingen nicht deutlich von der Dauer des vorausgegangenen depolarisierenden Puls ab (Abb. 16 B). Wie zuvor gezeigt wurde, ist die Deaktivierungskinetik



**Abb. 16:** Kinetische Analyse der Tailströme von Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Kanälen. Tailströme wurden mit dem gleichen Protokoll wie für Kv4.2 verwendet aufgenommen (Abb. 15 A). **A:** Normalisierte Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Tailströme nach depolarisierenden Vorpulsen von 4 bzw. 64 ms Dauer, zum Vergleich übereinandergelegt. Fits einfach-exponentieller Funktionen sind als durchgezogene Linien dargestellt. **B:** Die erhaltenen Zeitkonstanten wurden über der Dauer des depolarisierenden Vorpuls aufgetragen. Die Vorhersage eines Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Modells ist als durchbrochene Linie gekennzeichnet. Diesem Modell fehlt der offen-inaktivierter Zustand und die Rate des Schließens  $k_{OC}$  wurde 5-fach verringert.

von Kv4.2-Kanälen durch die Deletion der ersten 40 Aminosäuren insgesamt verlangsamt (Abb. 9 C). Um die Steuerung des Kv4.2 $\Delta$ 2-40 Kanals zu simulieren, wurde der  $I_O$ -Zustand aus dem allosterischen Kv4.2-Modell (Schema 4, S. 34) entfernt und die Rate des Schließens  $k_{OC}$  wurde 5-fach verringert. Die Ergebnisse für die simulierten Tail-Ströme sind in Abb. 16 B angegeben.

Die bisher beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass die Inaktivierung im offenen Zustand bei Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Kanälen nicht vorhanden war. Zudem erwies sich das N-terminale Peptid von Kv4.2 als wirksamer Inaktivierungspartikel für den Kv2.1-Kanal. Es sollte nun gezeigt werden, dass auch offene Kv4.2-Kanäle durch das N-terminale Peptid blockiert werden können. Dazu wurde das N-terminale Peptid von Kv4.2 auf die Innenseite eines Inside-Out-Patches mit Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Kanälen appliziert (Abb. 17). Unter Kontrollbedingungen konnten Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Ströme durch eine zweifach-exponentielle Funktion mit  $\tau_1 = 12 \pm 2$  ms ( $55 \pm 4$  %) und  $\tau_2 = 148 \pm 32$  ms ( $n = 8$ ) gefittet werden (Abb. 17 1). Während der Applikation des N-terminalen Kv4.2-Peptids in einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  war der Abfall des Stroms deutlich beschleunigt ( $\tau_1 = 4 \pm 1$  ms,  $71 \pm 5$  % und  $\tau_2 = 34 \pm 6$  ms;  $n = 8$ ; Abb. 17 2). Das mittlere  $\tau_1$  mit und ohne Peptid war signifikant unterschied-



**Abb. 17:** Die Applikation des N-Terminales Kv4.2-Peptids inaktiviert Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Kanäle. N-Terminales Kv4.2-Peptid wurde auf die cytoplasmatische Seite eines Inside-Out-Patch mit Kv4.2 $\Delta$ 2-40-Kanälen appliziert. Ströme wurden durch Spannungssprünge von -100 auf +50 mV aktiviert. 1: Kontrolle, 2: 100  $\mu$ M Kv4.2-Peptid, 3: nach dem Auswaschen.

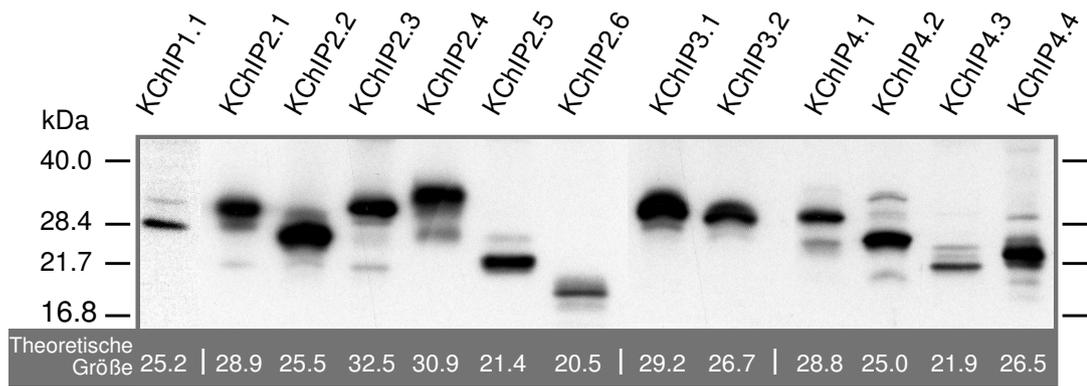
lich ( $p < 0.001$ , t-Test). Das Auswaschen des Peptids machte die Beschleunigung des Stromabfalls rückgängig und stellte den ursprünglichen, langsameren Abfall des Stromes wieder her (Abb. 17 3). Offensichtlich konnte die Inaktivierung des offenen Zustands von Kv4.2, die durch N-Terminale Deletion verloren geht, durch Applikation des N-terminalen Peptids nachgeahmt werden. Dieses Ergebnis legte nahe, dass am Kv4.2-Kanal eine Rezeptorstelle für das N-terminale Peptid existiert.

### 3.3 Effekte von KChIP-Varianten auf Kv4.2-Ströme

Die erste Publikation einer Modulation von Kv4-Strömen durch KChIP beschreibt die drei KChIP-Varianten KChIP1 bis 3, die jeweils einem eigenen Gen zugeordnet sind (An et al., 2000). Später wurde mit KChIP4 ein weiteres KChIP-Gen entdeckt (Holmqvist et al., 2002). Diese KChIPs besitzen eine konservierte Kernregion mit vier EF-Hand-Motiven und einen variablen N-Terminus (Abb. 18). Desweiteren zeigte sich, dass mehrere Isoformen der schon bekannten KChIP-Varianten existieren (Bähring et al., 2001b; Decher et al., 2001; Patel et al., 2002a; Wang et al., 2002; Boland et al., 2003). Diese Isoformen kommen durch alternatives Splicen der KChIP-mRNA zustande (Abb. 19). Für die Benennung werden hier die Isoformen nummeriert, so dass z. B. KChIP2.1 für die Isoform 1 von KChIP2 steht.

Angesichts der Vielfalt der KChIP-Varianten und der Beobachtung, dass KChIP-





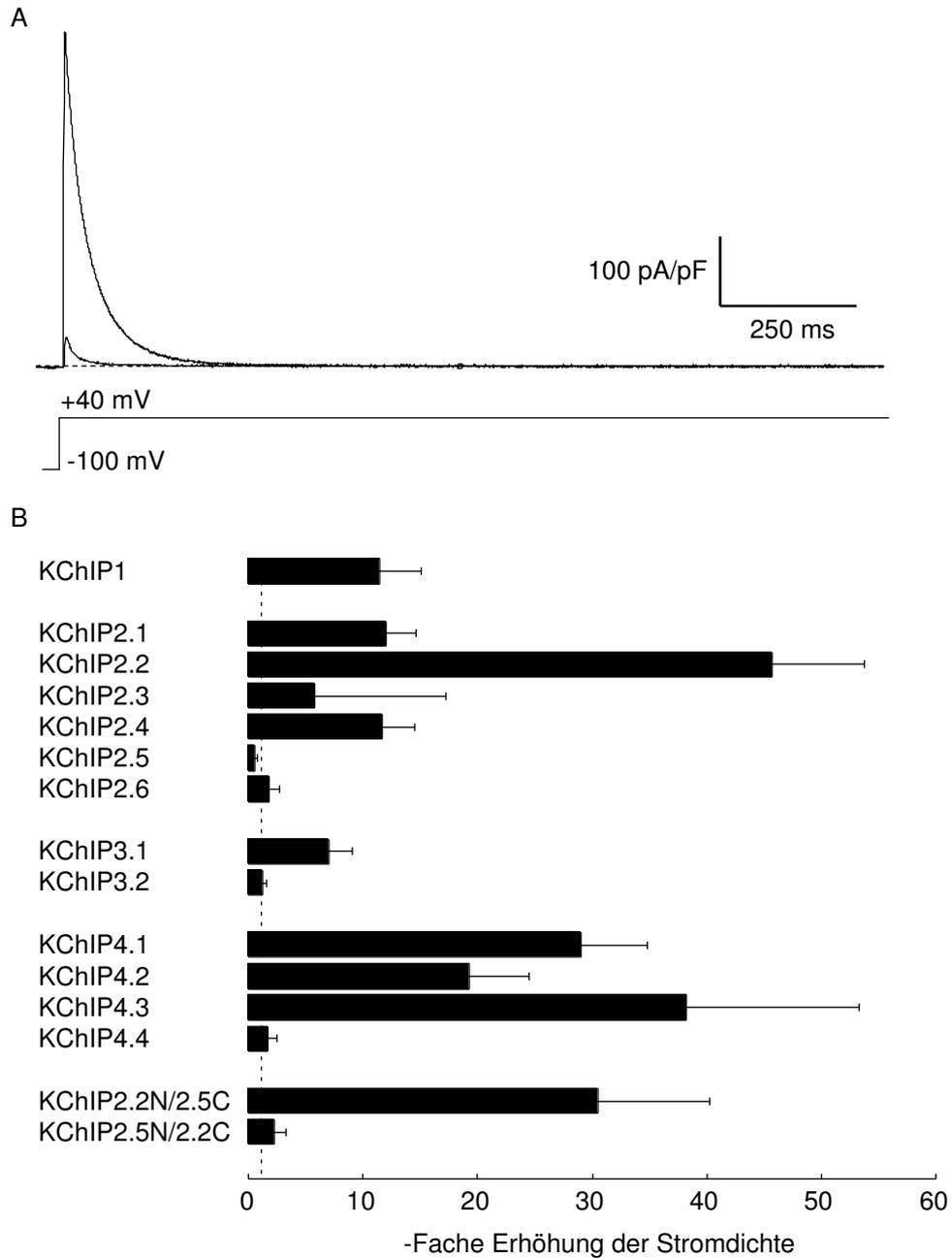
**Abb. 20:** Expression von KChIP-Proteinen nach Transfektion von CHO-Zellen. Westernblotanalyse nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Lysate. Die Detektion erfolgte mit einem Pan-KChIP-Antikörper. Links ist das Molekulargewicht des Markers angegeben, unten die theoretische Größe der entsprechenden Variante (in kDa).

Varianten spezifisch mit Kv4 $\alpha$ -Untereinheiten interagieren (An et al., 2000), stellte sich zunächst die Frage, ob die unterschiedlichen Varianten sich in ihren Effekten auf Kv4-Kanäle unterscheiden. Diese Frage sollte durch die Untersuchung von A-Typ-Strömen nach Koexpression von Kv4.2 mit den einzelnen KChIP-Varianten in heterologen Expressionssystemen beantwortet werden (siehe Methoden).

### 3.3.1 Verstärkung der funktionellen Expression durch KChIP

Ein auffälliger Effekt der Modulation von Kv4-Strömen durch KChIP ist, dass der Level des gemessenen Stroms durch die Koexpression von KChIP deutlich erhöht wird (An et al., 2000; Bähring et al., 2001b). Es liegt nahe anzunehmen, dass die erhöhte Stromdichte durch eine Verstärkung der Oberflächen-Expression der Kanäle verursacht wird (Bähring et al., 2001b). Es sollte daher untersucht werden, ob die Koexpression aller bekannten KChIP-Varianten zu einer erhöhten funktionellen Kanalexpression führt. Die Stimulation der Kv4.2-Expression durch KChIP war in CHO-Zellen besonders stark, weshalb für diese Untersuchungen CHO-Zellen als Expressionssystem gewählt wurden. Durch eine Western-Blot-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass alle zu untersuchenden KChIP-Varianten nach Transfektion von CHO-Zellen als Protein exprimiert wurden (Abb. 20).

Kv4.2-vermittelte Ströme in CHO-Zellen wurden durch Spannungssprünge von  $-100$  auf  $+40$  mV aktiviert und zeigten schnell inaktivierende Ströme (Abb. 21 A). Um der unterschiedlichen Größe von Zellen Rechnung zu tragen, wurde der Strom auf



**Abb. 21:** Effekt von KCHIP-Varianten und Konstrukten auf die funktionelle Expression von Kv4.2 in CHO Zellen. **A:** Beispielaufnahmen zur Bestimmung der Stromdichte von Kv4.2 und Kv4.2/KCHIP2.1 im Vergleich. Ströme wurden durch einen Spannungssprung von -100 auf +40 mV aktiviert und auf die Membrankapazität der Zelle normalisiert. **B:** Stromdichten bei Koexpression von Kv4.2 mit den KCHIP-Varianten im Vergleich. Horizontale Balken repräsentieren die -fache Änderung der Stromdichte und beschreiben die relative Zunahme der funktionellen Expression nach Koexpression der verschiedenen KCHIP-Varianten im Vergleich zu Kv4.2 alleine (senkrechte, gestrichelte Linie). Die absoluten Werte der Stromdichte sind in Tabelle 3 angeführt.

**Tabelle 3:** Effekte von KChIP-Varianten und Chimären-Konstrukten auf die Kv4.2-Stromdichte in CHO-Zellen bei Spannungssprüngen von -100 auf +40 mV. \* Nicht signifikant unterschiedlich von Kv4.2 ohne KChIP (t-test,  $p < 0.05$ ).

Variante	Stromdichte (pA/pF)	$n$
Kv4.2	$44 \pm 6$	(18)
+ KChIP1.1	$513 \pm 141$	(6) *
+ KChIP2.1	$536 \pm 89$	(6) *
+ KChIP2.2	$2045 \pm 207$	(10) *
+ KChIP2.3	$263 \pm 51$	(5) *
+ KChIP2.4	$521 \pm 101$	(6) *
+ KChIP2.5	$26 \pm 9$	(7)
+ KChIP2.6	$82 \pm 35$	(6)
+ KChIP3.1	$312 \pm 80$	(5) *
+ KChIP3.2	$57 \pm 10$	(5)
+ KChIP4.1	$1296 \pm 179$	(6) *
+ KChIP4.2	$861 \pm 201$	(8) *
+ KChIP4.3	$1708 \pm 627$	(6) *
+ KChIP4.4	$76 \pm 32$	(6)
+ KChIP2.2NT/2.5CT	$1362 \pm 392$	(6) *
+ KChIP2.5NT/2.2CT	$101 \pm 42$	(6)

die Membrankapazität normalisiert. Die resultierende Messgröße ist die Stromdichte (siehe Methoden 2.4). Die erhaltenen Kv4.2-Stromdichten in CHO-Zellen von  $44 \pm 6$  pA/pF ( $n = 18$ ) waren sehr niedrig (vgl. Tabelle 3) und daher gut geeignet, um eine Erhöhung durch Koexpression von KChIP zu untersuchen. In Gegenwart der meisten KChIP-Varianten wurden deutlich erhöhte Stromdichten gemessen. Durch KChIP erhöhte mittlere Stromdichten reichten von  $263 \pm 51$  pA/pF (KChIP2.3,  $n = 5$ ) bis  $2045 \pm 207$  pA/pF (KChIP2.2;  $n = 10$ , vgl. Tabelle 3). Das entspricht einer 6- bis 46-fachen Erhöhung im Vergleich zur Stromdichte, die bei Expression von Kv4.2 allein gemessen wurde (Abb. 21 B). Einige der untersuchten KChIP-Varianten (KChIP2.5, KChIP2.6, KChIP3.2 und KChIP4.4) führten nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Kv4.2-Stromdichte (Abb. 21 B, Tabelle 3) obwohl sie als Protein in transfizierten CHO-Zellen nachgewiesen werden konnten (Abb. 20). KChIP-Varianten, deren Koexpression mit Kv4.2 zu einer erhöhten Stromdichte in CHO-Zellen führte, erhöhten auch die Kv4.2-Stromdichte bei Koexpression in HEK 293-Zellen, allerdings in geringerem Maße (die Daten sind hier nicht gezeigt).

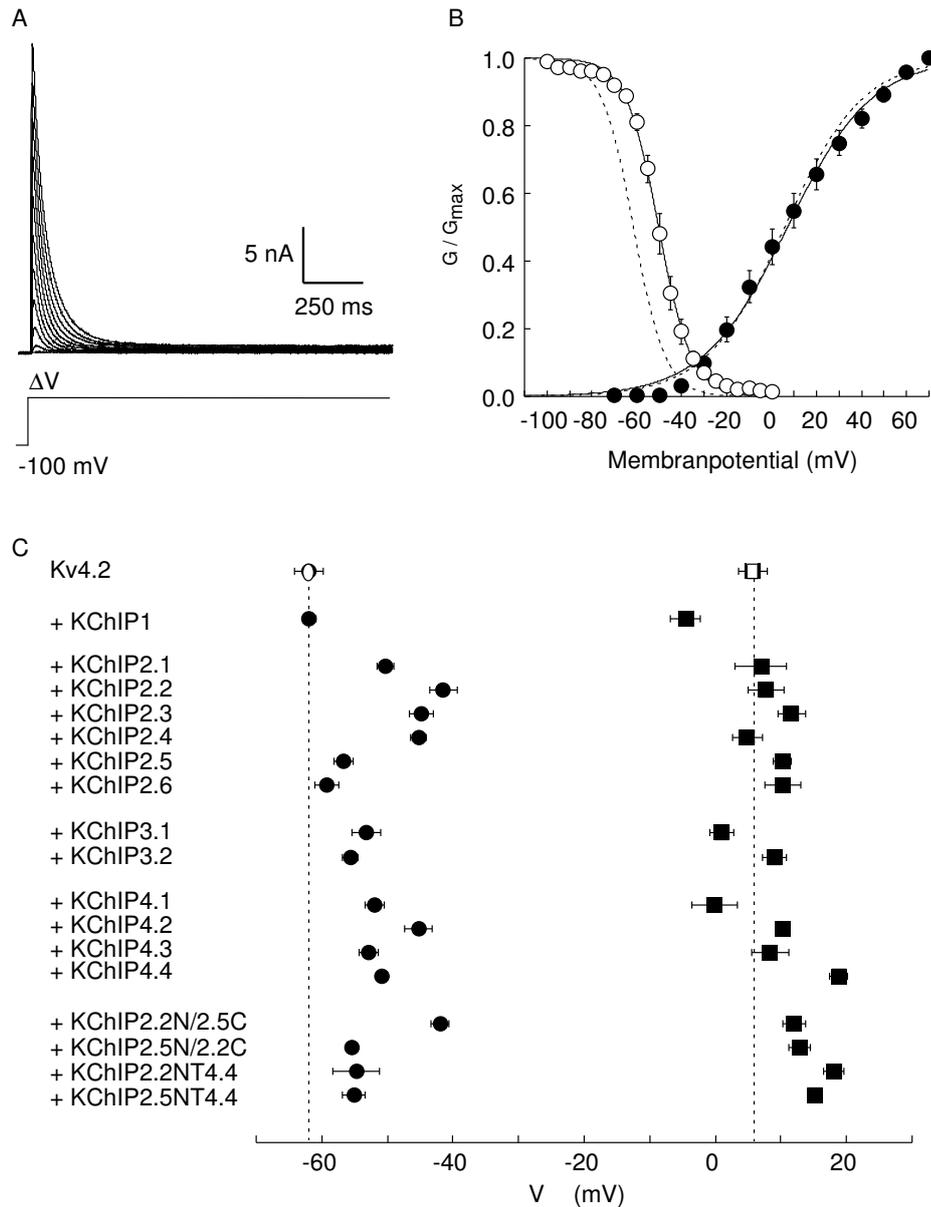
Unter den KChIP2-Varianten führte die Koexpression von Kv4.2 mit KChIP2.1 bis 2.4 zu einer Erhöhung der Stromdichte, nicht jedoch die Koexpression von Kv4.2 mit KChIP2.5 oder KChIP2.6. Bei KChIP2.5 fehlt zum einen ein Teil der Kernsequenz

und desweiteren führt eine Verschiebung des Leserahmens im distalen C-Terminus zu einer veränderten Aminosäuresequenz des Proteins (Abb. 19). Es stellte sich die Frage, ob einer dieser Unterschiede allein für den Funktionsausfall verantwortlich ist. Um dies zu testen, wurden geeignete Chimären zwischen KChIP2.5 und KChIP2.2 hergestellt. In KChIP2.2NT/2.5CT entsprach die N-Terminale Sequenz KChIP2.2, nur der distale Abschnitt mit der Verschiebung des Leserahmens entsprach KChIP2.5 (vgl. Abb.19). KChIP2.2NT/2.5CT führte bei Koexpression mit Kv4.2 zu einer erhöhten Stromdichte von  $1362 \pm 392$  pA/pF ( $n = 6$ , Abb. 21 B und Tabelle 3). In KChIP2.5NT/2.2CT entsprach die N-Terminale Sequenz KChIP2.5, nur der distale Abschnitt mit der Verschiebung des Leserahmens wurde gegen den C-Terminus von KChIP2.2 ausgetauscht. KChIP2.5NT/2.2CT führte bei Koexpression mit Kv4.2 mit  $101 \pm 42$  pA/pF ( $n = 6$ ) nicht zu einer signifikant erhöhten Stromdichte (Abb. 21 B und Tabelle 3). Dieses Ergebnis zeigt, dass der Funktionsausfall von KChIP2.5 durch die unvollständige Kerndomäne hervorgerufen wird. Die veränderte Sequenz des distalen C-Terminus alleine war dagegen nicht in der Lage den KChIP-Effekt auf die Stromdichte zu stören.

### 3.3.2 KChIP-Effekte auf die Kv4.2-Steuerung

KChIPs beeinflussen nicht nur die Expression, sondern auch die Steuerungseigenschaften von Kv4-Kanälen (An et al., 2000; Bähring et al., 2001b; Decher et al., 2001; Nakamura et al., 2001; Beck et al., 2002; Patel et al., 2002a; Wang et al., 2002). Ein Vergleich des Einflusses der unterschiedlichen KChIP-Varianten auf die Steuerung des Kv4.2-Kanals sollte zeigen, ob alle KChIP-Varianten qualitativ den gleichen Effekt haben oder ob es bemerkenswerte Ausnahmen gibt. Zudem stellte sich die Frage, ob ein Effekt auf die Stromdichte auch immer in Zusammenhang mit einer Modulation der Kanalsteuerung auftrat. Diese Untersuchung wurde mit transfizierten HEK 293-Zellen durchgeführt, da diese bereits als Expressionssystem für die Analyse der Kv4.2-Steuerung etabliert waren (siehe Abschnitt 3.1 und 3.2).

Abbildung 22 A zeigt eine Stromfamilie, die nach Koexpression von Kv4.2 mit KChIP2.1 abgeleitet wurde. Makroskopische Kv4.2/KChIP2.1-Ströme konnten durch Spannungssprünge von -100 auf -30 mV und positiver aktiviert werden. Weder die halbmaximale Aktivierung von Kv4.2/KChIP2.1 ( $V_{1/2} = 6.9 \pm 3.9$  mV) noch der Steigungsfaktor  $k = 17.8 \pm 0.3$  mV ( $n = 6$ ) war signifikant unterschiedlich von den entsprechenden Werten für Kv4.2 ohne KChIP (Abb. 22 B, vgl. Tabelle 4). Einen



**Abb. 22:** Effekte von KChIP-Varianten auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Steady-State-Inaktivierung von Kv4.2-Strömen in HEK 293-Zellen. **A:** Kv4.2/KChIP2.1-Stromfamilie, aktiviert durch Spannungssprünge von -100 mV auf Spannungen zwischen -30 und -70 mV. **B:** Aktivierungskurve (ausgefüllte Symbole) und Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung (offene Symbole). Fits von Boltzmannfunktionen sind als durchgezogene Linie dargestellt. Gestrichelte Linien zeigen Boltzmannfunktionen für die mittlere Aktivierung und Steady-State-Inaktivierung von Kv4.2 ohne KChIP (vgl. Abb. 3 B). **C:**  $V_{1/2}$ -Werte der Steady-State-Inaktivierung (Kreise) und der Aktivierung (Quadrate) für Kv4.2 allein und in Koexpression mit den Varianten und Konstrukten. Offene Symbole und gestrichelte, vertikale Linie: Kv4.2 ohne KChIP.

**Tabelle 4:** Effekte von KChIP-Varianten und Chimären-Konstrukten auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Steady-State-Inaktivierung von Kv4.2-Strömen in HEK 293-Zellen. Die Stichprobengröße  $n$  ist in Klammern angegeben. \* Signifikant unterschiedlich von Kv4.2 ohne KChIP (t-test,  $p < 0.05$ )

	Aktivierung		Steady-State-Inaktivierung	
	$V_{1/2}$ (mV)	$k$ (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	$k$ (mV)
Kv4.2	$5.7 \pm 2.2$	$16.9 \pm 0.7$ (10)	$-62.0 \pm 2.2$	$5.8 \pm 0.5$ (6)
+ KChIP1.1	$-4.5 \pm 2.3$ *	$18.4 \pm 0.7$ (6)	$-61.9 \pm 1.0$	$4.9 \pm 0.3$ (7)
+ KChIP2.1	$6.9 \pm 3.9$	$17.8 \pm 0.3$ (6)	$-50.3 \pm 1.2$ *	$6.9 \pm 0.6$ (6)
+ KChIP2.2	$7.7 \pm 2.7$	$16.3 \pm 0.8$ (4)	$-41.5 \pm 2.1$ *	$4.5 \pm 0.3$ (7)
+ KChIP2.3	$11.6 \pm 2.1$	$17.2 \pm 0.3$ (3)	$-44.7 \pm 1.8$ *	$6.9 \pm 0.2$ (6)
+ KChIP2.4	$4.9 \pm 2.3$	$17.4 \pm 0.2$ (9)	$-45.2 \pm 1.2$ *	$5.6 \pm 0.2$ (8)
+ KChIP2.5	$10.2 \pm 1.3$	$18.0 \pm 0.3$ (9)	$-56.8 \pm 1.5$	$5.9 \pm 0.4$ (7)
+ KChIP2.6	$10.2 \pm 2.7$	$18.0 \pm 0.3$ (6)	$-59.2 \pm 1.8$	$5.6 \pm 0.9$ (4)
+ KChIP3.1	$0.9 \pm 1.9$	$17.8 \pm 0.4$ (7)	$-53.2 \pm 2.2$ *	$5.2 \pm 0.4$ (5)
+ KChIP3.2	$9.1 \pm 1.8$	$18.7 \pm 0.5$ (6)	$-55.6 \pm 1.2$ *	$5.5 \pm 0.5$ (4)
+ KChIP4.1	$-0.1 \pm 3.4$	$15.8 \pm 0.7$ (5)	$-51.9 \pm 1.4$ *	$6.5 \pm 0.6$ (4)
+ KChIP4.2	$10.3 \pm 0.7$	$17.0 \pm 0.5$ (7)	$-45.2 \pm 2.1$ *	$5.9 \pm 0.5$ (6)
+ KChIP4.3	$8.3 \pm 2.8$	$17.3 \pm 0.4$ (7)	$-52.8 \pm 1.5$ *	$6.9 \pm 0.7$ (5)
+ KChIP4.4	$18.8 \pm 1.3$ *	$16.7 \pm 1.8$ (6)	$-50.9 \pm 0.5$ *	$11.0 \pm 0.2$ * (3)
+ KChIP2.2NT/2.5CT	$12.0 \pm 1.7$ *	$16.9 \pm 0.3$ (6)	$-42.0 \pm 1.3$ *	$4.7 \pm 0.1$ (6)
+ KChIP2.5NT/2.5CT	$12.9 \pm 1.7$ *	$18.7 \pm 0.6$ (6)	$-55.4 \pm 1.0$ *	$5.4 \pm 0.3$ (5)
+ KChIP2.2NT4.4	$18.1 \pm 1.5$ *	$16.9 \pm 0.4$ (6)	$-54.7 \pm 3.5$	$10.5 \pm 1.0$ * (4)
+ KChIP2.5NT4.4	$15.2 \pm 1.1$ *	$17.2 \pm 0.6$ (4)	$-55.1 \pm 1.7$ *	$8.5 \pm 1.3$ (4)

deutlichen Effekt zeigte die Koexpression von KChIP2.1 jedoch auf die Steady-State-Inaktivierung. Die entsprechende Kurve war im Vergleich zu Kv4.2 ohne KChIP zu depolarisierteren Spannungen verschoben (Abb. 22 B). Die halbmaximale Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.1 ( $V_{1/2} = -50.3 \pm 1.2$  mV) war signifikant unterschiedlich im Vergleich zu der von Kv4.2 ohne KChIP, während der Steigungsfaktor ( $k = 6.9 \pm 0.6$  mV,  $n = 6$ ) keinen Unterschied zeigte (Tabelle 4).

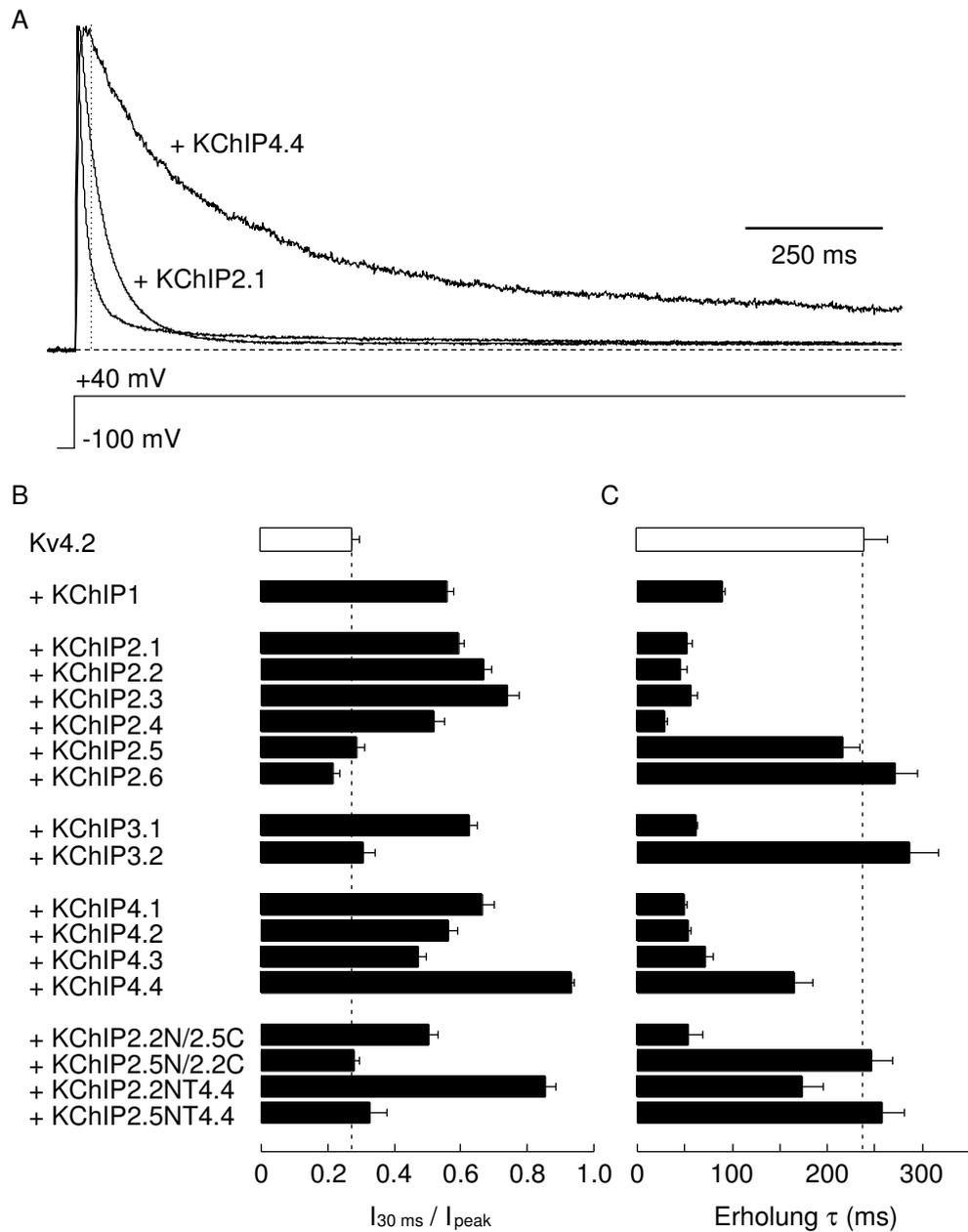
Wie am Beispiel von Kv4.2/KChIP2.1 gezeigt wurde die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Steady-State-Inaktivierung auch für die Koexpression von Kv4.2 mit den anderen KChIP-Varianten bestimmt. Die ermittelten  $V_{1/2}$ -Werte sind in Abb. 22 C dargestellt. Die meisten  $V_{1/2}$ -Werte der Aktivierung liegen im Bereich von etwa  $\pm 10$  mV um den für Kv4.2 als Kontrolle gemessenen Wert mit maximalen Abweichungen für KChIP1.1 ( $V_{1/2} = -4.5 \pm 2.3$  mV,  $n = 6$ ) und KChIP4.4 ( $V_{1/2} = 18.8 \pm 1.3$  mV,  $n = 6$ ). Der Einfluss von KChIP Varianten auf die Aktivierung ist demnach wenig dramatisch und zeigt keine einheitliche Tendenz. Die  $V_{1/2}$ -Werte der

Steady-State-Inaktivierung dagegen werden durch KChIP-Varianten tendenziell zu positiveren Werten verschoben, mit einer maximalen Differenz von etwa +20 mV für KChIP2.2 ( $V_{1/2} = -41.5 \pm 2.1$  mV,  $n = 7$ ).

Für die Untersuchung der Inaktivierungskinetik wurden Kv4.2/KChIP-Ströme durch depolarisierende Spannungssprünge von -100 auf +40 mV aktiviert. Wie für Kv4.2/KChIP2.1 und Kv4.2/KChIP4.4 als Beispiel in Abbildung 23 A gezeigt, konnten KChIP-Varianten die anfängliche Inaktivierung verlangsamen. Eine vollständige Beschreibung der Inaktivierungskinetik durch einen multiexponentiellen Fit (vgl. Abb. 4) hätte den Vergleich zwischen den KChIP-Varianten unnötig erschwert. Daher wurde als einfaches Maß für die Inaktivierungskinetik der Grad der Inaktivierung 30 ms nach Beginn des aktivierenden Spannungspuls gewählt ( $I_{30\text{ms}}/I_{\text{peak}}$ ). Für Kv4.2 allein betrug der Strom 30 ms nach Beginn des Pulses nur noch 27% der maximalen Amplitude ( $I_{30\text{ms}}/I_{\text{peak}} = 0.27 \pm 0.02$ ,  $n = 19$ ). Die Koexpression der meisten KChIP-Varianten mit Kv4.2 führte zu einer Verlangsamung der Inaktivierung. Für die in Abb. 23 A als Beispiel gezeigte Variante KChIP2.1 betrug  $I_{30\text{ms}}/I_{\text{peak}} = 0.59 \pm 0.02$  ( $n = 19$ ). Auf besonders auffällige Weise verlangsamt wurde die Inaktivierung durch KChIP4.4 ( $I_{30\text{ms}}/I_{\text{peak}} = 0.93 \pm 0.01$ ,  $n = 7$ , Abb. 23 A). Dieser Effekt von KChIP4.4 auf Kv4.2-Ströme steht in Übereinstimmung mit zuvor publizierten Daten für die Koexpression von KChIP4.4 mit Kv4.3 (Holmqvist et al., 2002).

Die Kinetik der Erholung aus der Inaktivierung wurde mit einem Doppelpulsprotokoll bei -80 mV untersucht (vgl. Abb. 6) und konnte wie für Kv4.2 allein auch in Gegenwart der KChIP-Varianten gut durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden. Kv4.2-Ströme erholten sich aus der Inaktivierung mit einer mittleren Zeitkonstante von  $236 \pm 26$  ms ( $n = 11$ , vgl. Abb. 6). Die Koexpression der meisten KChIP-Varianten führte zu einer Beschleunigung der Erholung aus der Inaktivierung mit Zeitkonstanten zwischen  $29 \pm 3$  ms (KChIP2.4,  $n = 9$ ) und  $89 \pm 4$  ms (KChIP1.1,  $n = 9$ , Abb. 23 C, Tabelle 5). KChIP4.4 beschleunigte die Erholung aus der Inaktivierung nur geringfügig ( $\tau = 165 \pm 19$  ms,  $n = 6$ ).

Die Koexpression von Kv4.2 mit den Varianten KChIP2.5, KChIP2.6 und KChIP3.2 führte weder zu einer Verlangsamung der Inaktivierung noch zu einer Beschleunigung der Erholung aus der Inaktivierung (Abb. 23 B und C, Tabelle 5). Allerdings ergab sich für KChIP2.5 eine signifikante Beschleunigung der Inaktivierung von Kv4.2-Strömen. Das Konstrukt KChIP2.2NT/2.5CT verlangsamte die Inakti-



**Abb. 23:** Effekte von KChIP-Varianten und Chimären-Konstrukten auf die Kinetik von Kv4.2-Strömen. **A:** Repräsentative Strom-Aufnahmen von Zellen, die entweder Kv4.2 allein, Kv4.2/KChIP2.1 oder Kv4.2/KChIP4.4 exprimierten. Die Ströme wurden durch Spannungssprünge von -100 auf +40 mV aktiviert und auf den Peakstrom normalisiert. Die gestrichelte, vertikale Linie markiert die Zeit von 30 ms nach Beginn des Puls, zu der der Grad der Inaktivierung ( $I_{30ms}/I_{peak}$ ) bestimmt wurde. **B, C:** Kinetik der Inaktivierung ( $I_{30ms}/I_{peak}$ ) und der Erholung aus der Inaktivierung bei -80 mV ( $\tau_{rec}$ ) von Kv4.2 allein (offene Balken und gestrichelte, vertikale Linie) und koexprimiert mit verschiedenen KChIP-Varianten und Konstrukten (ausgefüllte Balken). Die Messung der Inaktivierung erfolgte wie in A, die Messung der Erholung wie in Abb. 26 für Kv4.2 beschrieben.

**Tabelle 5:** Effekte von KChIP-Varianten und Chimären-Konstrukten auf die Kinetik der Inaktivierung und der Erholung aus der Inaktivierung von Kv4.2-Strömen in HEK 293-Zellen. Die Messung der Inaktivierung erfolgte wie in Abb. 23 A gezeigt. Die Kinetik der Erholung aus der Inaktivierung wurde bei -80 mV bestimmt wie in Abb. 6 für Kv4.2 beschrieben. Die Stichprobengröße  $n$  ist in Klammern angegeben. \* Signifikant unterschiedlich von Kv4.2 ohne KChIP (t-test,  $p < 0.05$ )

	Inaktivierung $I_{30\text{ ms}}/I_{peak}$	Erholung $\tau_{-80\text{ mV}}$ (ms)
Kv4.2	$0.27 \pm 0.02$ (19)	$236 \pm 26$ (11)
+ KChIP1.1	$0.56 \pm 0.02$ (15) *	$89 \pm 4$ (9) *
+ KChIP2.1	$0.59 \pm 0.02$ (19) *	$52 \pm 5$ (7) *
+ KChIP2.2	$0.67 \pm 0.02$ (10) *	$46 \pm 7$ (9) *
+ KChIP2.3	$0.74 \pm 0.04$ (15) *	$57 \pm 6$ (4) *
+ KChIP2.4	$0.52 \pm 0.03$ (10) *	$29 \pm 3$ (9) *
+ KChIP2.5	$0.29 \pm 0.02$ (17)	$216 \pm 17$ (8)
+ KChIP2.6	$0.21 \pm 0.02$ (5) *	$263 \pm 38$ (3)
+ KChIP3.1	$0.63 \pm 0.03$ (10) *	$62 \pm 2$ (7) *
+ KChIP3.2	$0.31 \pm 0.04$ (10)	$287 \pm 31$ (6)
+ KChIP4.1	$0.67 \pm 0.03$ (7) *	$49 \pm 3$ (4) *
+ KChIP4.2	$0.56 \pm 0.03$ (10) *	$54 \pm 3$ (7) *
+ KChIP4.3	$0.47 \pm 0.02$ (8) *	$71 \pm 8$ (6) *
+ KChIP4.4	$0.93 \pm 0.01$ (7) *	$165 \pm 19$ (6) *
+ KChIP2.2NT/2.5CT	$0.50 \pm 0.03$ (9) *	$54 \pm 16$ (6) *
+ KChIP2.5NT/2.5CT	$0.28 \pm 0.02$ (10)	$247 \pm 21$ (6)
+ KChIP2.2NT4.4	$0.86 \pm 0.03$ (13) *	$173 \pm 22$ (5)
+ KChIP2.5NT4.4	$0.33 \pm 0.05$ (7)	$258 \pm 23$ (4)

vierung und beschleunigte die Erholung aus der Inaktivierung von Kv4.2-Kanälen. KChIP2.5NT/2.2C dagegen hatte keinen Effekt auf die Inaktivierung und die Erholung (Abb. 23 B und C, Tabelle 5). Dies entspricht den Ergebnissen zum Effekt von KChIP2.5, KChIP2.2 und den beiden Chimären-Konstrukten auf die Stromdichte in CHO-Zellen (Abb. 21), insofern nur das Konstrukt KChIP2.2NT/2.5CT den Effekt von KChIP2.2 auf die Kinetik der Inaktivierung und Erholung aufweist.

Holmqvist et al. (2002) fanden, dass der starke Effekt von KChIP4.4 auf die Inaktivierung von Kv4.3-Kanälen mit einer N-Terminalen Domäne des KChIP4.4 zusammenhängt, die sie *K-channel inactivation suppressor* (KIS) nannten. Ein Chimären-Konstrukt mit dem Kernbereich von KChIP1 und dem N-Terminus von KChIP4.4 hatte ähnliche Effekte auf Kv4.3-Ströme wie KChIP4.4-Wildtyp (Holmqvist et al., 2002). Analog dazu wurde die KIS-Domäne von KChIP4.4 auf KChIP2.2 übertragen (KChIP2.2NT4.4). Die Koexpression von KChIP2.2NT4.4 mit Kv4.2 führte zu der von KChIP4.4 bekannten langsamen Inaktivierung und ebenfalls zu der nur mäßig beschleunigten Erholung aus der Inaktivierung von Kv4.2-Strömen (Abb. 23 B und C, Tabelle 5). Diese Beobachtung bestätigte, dass die besonderen Eigenschaften von KChIP4.4 mit der N-terminalen KIS-Domäne zusammenhängen. Das Übertragen der KIS-Domäne auf KChIP2.5 (KChIP2.5NT4.4) führte nicht zu einer Modulation der Kinetik der Inaktivierung und Erholung.

Zusammenfassend ließen sich die KChIP-Varianten nach ihren Effekten auf Kv4.2-Ströme in drei Gruppen einteilen. (1) Die Varianten KChIP2.5, KChIP2.6 und KChIP3.2 zeigten keine deutlichen Effekte auf Kv4.2-Ströme. Jede dieser Varianten zeigt Splicing innerhalb der Kernregion. (2) KChIP1.1, KChIP2.1 - 2.4, KChIP3.1 und KChIP4.1 - 4.3 modulierten Kv4.2-Ströme auf ähnliche Weise: Die anfängliche Inaktivierung war verlangsamt, die Erholung aus der Inaktivierung war deutlich beschleunigt und die Kurve der Steady-State Inaktivierung war tendenziell zu positiveren Spannungen hin verschoben. Die KChIP-Varianten dieser Gruppe führten auch alle zu einer erhöhten Expression von Kv4.2-Kanälen. (3) Die Variante KChIP4.4 bildete eine Ausnahme, indem sie einen besonders starken Effekt auf die Inaktivierung von Kv4.2-Strömen hatte und die Erholung aus der Inaktivierung nur geringfügig beschleunigte. KChIP4.4 hatte keinen Effekt auf die Stromdichte von Kv4.2.

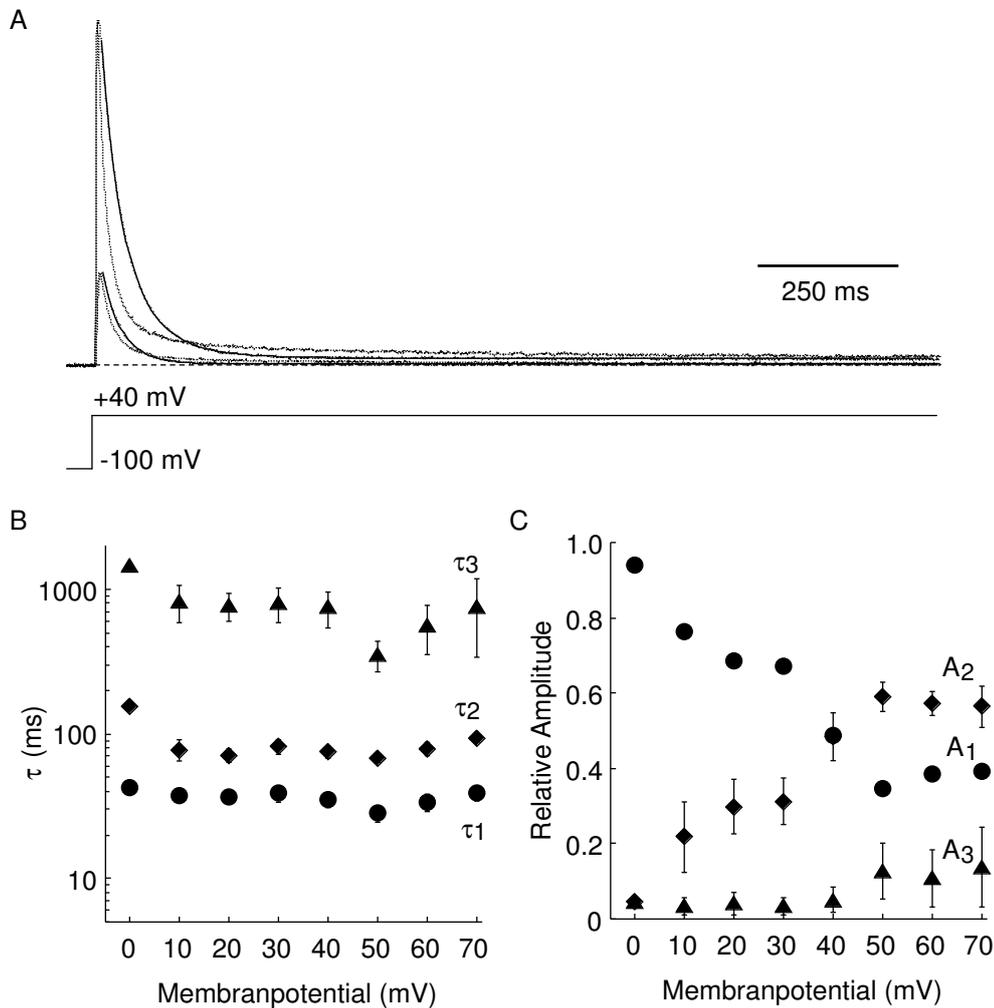
### 3.4 Analyse der KChIP-Effekte auf die Kv4.2-Inaktivierung

Die Untersuchung der KChIP-Varianten ergab, dass die typischen Effekte einer großen Gruppe funktioneller KChIP-Varianten vor allem Eigenschaften der Inaktivierung betraf. Diese Effekte sollten vor dem Hintergrund des für Kv4.2-Ströme entwickelten Zustandmodells genauer untersucht werden. Als typische Beispiele wurden die Varianten KChIP2.1 und KChIP2.2 für eine genauere Analyse ausgewählt.

#### 3.4.1 Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2-Kanälen

Kv4.2/KChIP2.1-Ströme wurden durch depolarisierende Pulse von -100 mV auf unterschiedliche Spannungen zwischen 0 und +70 mV aktiviert. Abb. 24 A zeigt Beispiele bei 0 und +40 mV. Die Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.1-Strömen wurde mit drei Zeitkonstanten beschrieben ( $\tau_1 = 35.0 \pm 3.9$  ms ( $49 \pm 7\%$ ),  $\tau_2 = 75.2 \pm 7.1$  ms ( $49 \pm 6\%$ ),  $\tau_3 = 750 \pm 210$  ms ( $2 \pm 1\%$ ),  $n = 7$ , in Standard-Testpulsen auf +40 mV). Die anfängliche Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.1-Strömen war im Vergleich zur Inaktivierung der Kv4.2-Ströme deutlich verlangsamt. Das spiegelt sich vor allem in dem im Vergleich zu Kv4.2 allein erhöhten  $\tau_1$  und in der größeren relativen Amplitude von  $\tau_2$  wieder. In einer späteren Phase verlief die Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.1 jedoch schneller als die von Kv4.2, was zu einem Kreuzen der normalisierten Stromspuren führt. In dieser Eigenschaft ähneln die Kv4.2/KChIP2.1-Ströme der N-terminalen Deletionsmutante Kv4.2 $\Delta$ 2-40 (vgl. Abb. 9), für die das Überkreuzen auf das Fehlen eines offen-inaktivierten Zustands zurückgeführt wurde. Dies weist auf eine Behinderung der Inaktivierung des offenen Zustands durch KChIP2.1 hin.

Die Kinetik der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.1-Kanälen erwies sich als abhängig von der Spannung des aktivierenden Puls. Bei zunehmend positiveren Spannungen wurde die Inaktivierung langsamer. Daher unterscheiden sich bei +40 mV aktivierte Kv4.2/KChIP2.1-Ströme stärker von Kv4.2-Strömen als bei 0 mV aktivierte (Abb. 24 A). Zwar zeigten die Zeitkonstanten der Inaktivierung keine deutliche Spannungsabhängigkeit (Abb. 24 B), aber die  $\tau_1$  und  $\tau_2$  zugeordneten relativen Amplituden änderten sich deutlich mit der Spannung (Abb. 24). Die Amplitude von  $\tau_1$  nahm mit zunehmend positiver Spannung ab, während die von  $\tau_2$  entsprechend zunahm. Koexpression der Varianten KChIP2.2, KChIP2.3 und KChIP2.4 mit Kv4.2 führte zu vergleichbaren Effekten auf die Inaktivierung (die Daten sind hier nicht



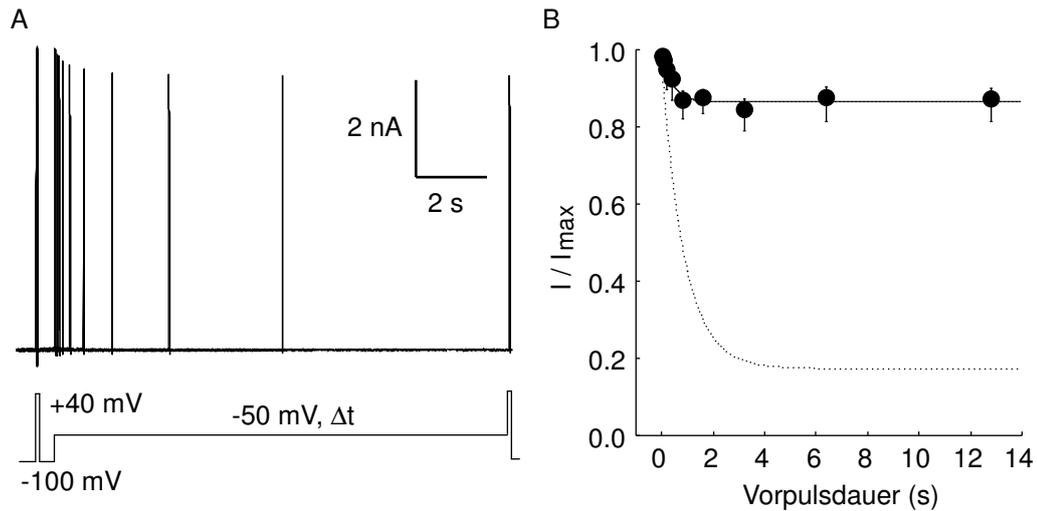
**Abb. 24:** Die Kinetik der Inaktivierung und ihre Spannungsabhängigkeit bei Koexpression von Kv4.2 und KChIP2.1. **A:** Beispielaufnahmen von Kv4.2/KChIP2.1-Strömen, die durch Spannungssprünge von -100 mV auf 0 und +40 mV aktiviert wurden. Zum Vergleich sind entsprechende Kv4.2-Ströme gezeigt, deren Peakstrom auf den von Kv4.2/KChIP2.1-Strömen normalisiert wurde. Der Fit einer dreifach-exponentiellen Funktion an die Kv4.2/KChIP2.1-Ströme ist als durchgezogene Linie dargestellt. **B:** Die Zeitkonstanten der Inaktivierung wurden für Spannungen zwischen 0 und +70 mV bestimmt und gegen die Spannung aufgetragen. **C:** Spannungsabhängigkeit der den Zeitkonstanten in B zugeordneten relativen Amplituden.

gezeigt). Ein ähnliches Ergebnis wurde auch schon zuvor für Kv4.1 bzw. Kv4.3 und KChIP1.1 publiziert (Beck et al., 2002). Offensichtlich schließen die Zustandsänderungen des Kanals während des Stromabfalls einen spannungsabhängigen Prozess mit ein, wenn KChIP koexprimiert ist.

Die Inaktivierung der Kv4.2-Kanäle von geschlossenen Zuständen konnte direkt durch ein Doppelpulsprotokoll untersucht werden (vgl. Abb. 5). Um zu testen, ob KChIP einen Effekt auf die Inaktivierung im geschlossenen Zustand hat, wurde die Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.2 mit dem gleichen Protokoll bei -50 mV untersucht (Abb. 25 A). Ähnlich wie Kv4.2-Ströme inaktivierten Kv4.2/KChIP2.2-Ströme während des konditionierenden Puls, ohne dass eine Aktivierung makroskopischer Ströme beobachtet werden konnte. Entsprechend der zu positiveren Potentialen verschobenen Steady-State-Inaktivierung war der Steady-State-Level der Inaktivierung bei Koexpression von KChIP2.2 deutlich höher als für Kv4.2 allein. Die Abhängigkeit der normalisierten Peakströme während der Testpulse von der Dauer des konditionierenden Vorpuls konnte wie für Kv4.2 mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden (Abb. 25 B). Die Zeitkonstante der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.2 im geschlossenen Zustand bei -50 mV betrug  $405 \pm 102$  ms ( $n = 4$ ), deutlich geringer als für Kv4.2 alleine ( $\tau = 960 \pm 190$  ms). Demnach war die Inaktivierung im geschlossenen Zustand durch die Koexpression von KChIP2.2 deutlich beschleunigt.

Der Vergleich der KChIP-Varianten hatte gezeigt, dass die Beschleunigung der Erholung aus der Inaktivierung ein typischer Effekt der Koexpression von Kv4.2 mit KChIP ist. Abbildung 26 zeigt die Erholung aus der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.2-Strömen bei -80 mV. Es wird deutlich, dass sich bereits nach etwa 200 ms die meisten Kanäle aus der Inaktivierung erholt hatten. Der Zeitverlauf der Erholung aus der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.2-Strömen konnte gut durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden (Abb. 26 B). Die Zeitkonstante der Erholung aus der Inaktivierung bei -80 mV betrug  $\tau = 46 \pm 7$  ms ( $n = 9$ ). Damit war die Erholung aus der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.2-Kanälen etwa 6-fach schneller als die von Kv4.2 ohne KChIP ( $\tau = 236 \pm 26$  ms,  $n = 11$ ).

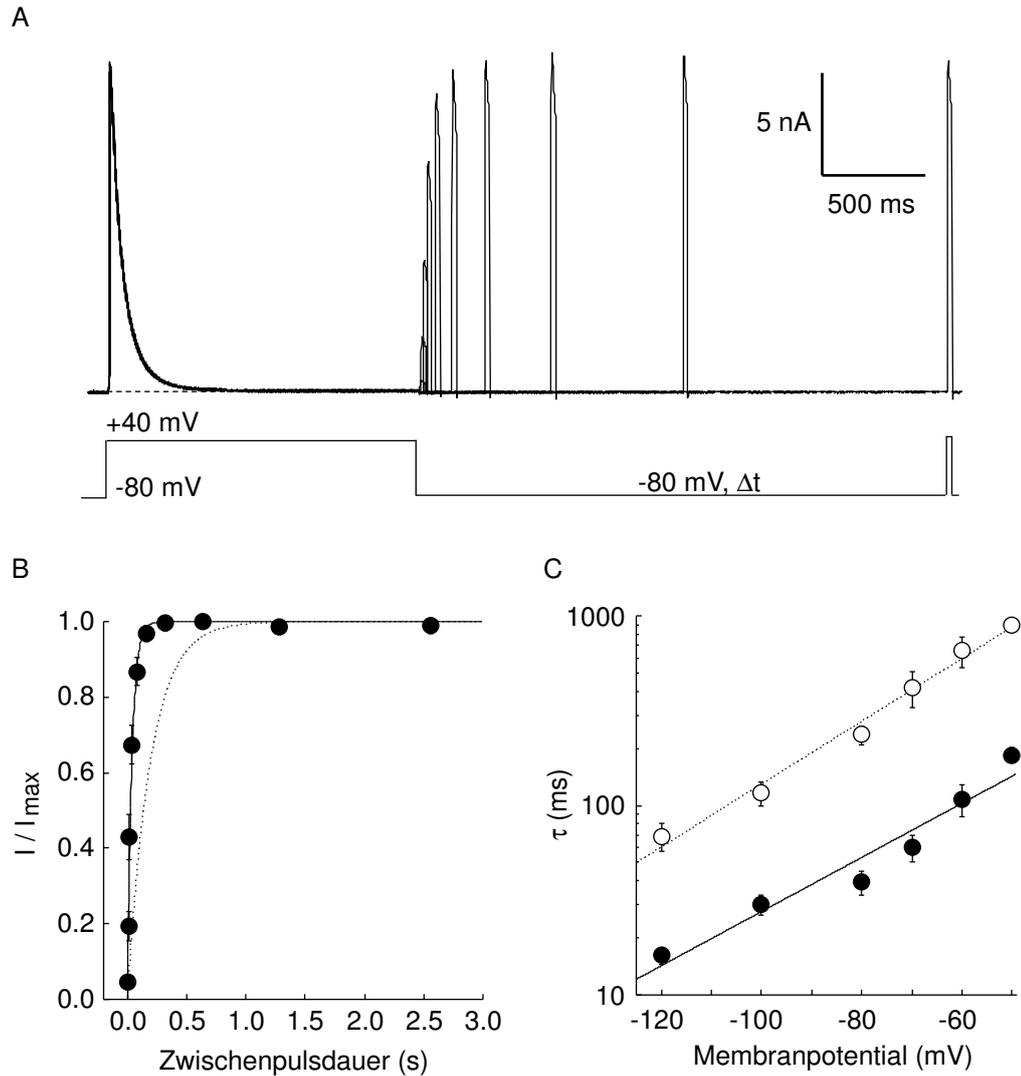
Wie für Kv4.2 alleine war auch die Erholung von Kv4.2/KChIP2.2-Kanälen stark spannungsabhängig. Bei negativeren Spannungen war die Erholung aus der Inaktivierung schneller als bei positiveren (Abb. 26 C). Bei -120 mV betrug die Zeitkonstante der Erholung von Kv4.2/KChIP2.2  $\tau = 16 \pm 2$  ms ( $n = 3$ ), bei -50 mV  $\tau = 185 \pm 16$  ms ( $n = 3$ ). Die Beschreibung der Spannungsabhängigkeit durch eine



**Abb. 25:** Messung der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.2 im geschlossenen Zustand **A:** Kv4.2/KChIP2.1-Ströme wurden mit einem Doppelpulsprotokoll aufgenommen wie in Abb. 5 für Kv4.2 gezeigt. Die Spannung während des konditionierenden Puls mit variabler Dauer betrug  $-50\text{ mV}$ . **B:** Peakströme während des Testpuls wurden auf die Peakströme während des Kontrollpuls normalisiert und gegen Dauer des konditionierenden Vorpuls aufgetragen. Der Fit einer monoexponentiellen Funktion ist als durchgezogene Linie dargestellt. Die punktierte Linie gibt die mittlere exponentielle Inaktivierung von Kv4.2 ohne KChIP unter gleichen Bedingungen wider (vgl. Abb. 5).

exponentielle Funktion ergab eine  $e$ -fache Beschleunigung pro  $30\text{ mV}$  Hyperpolarisation und liegt damit in einem ähnlichen Bereich wie die Spannungsabhängigkeit der Erholung von Kv4.2 (26-fach, Abb. 6). Die leichte Abweichung der Zeitkonstanten bei  $-120$  und  $-100\text{ mV}$  von der exponentiellen Abhängigkeit könnte damit zusammenhängen, dass die Aufhebung der Inaktivierung hier so schnell ist, dass die Deaktivierung in der Reaktionkette ( $I_{C_4} \rightarrow \dots \rightarrow I_{C_0} \rightarrow C_0$ ) Einfluss auf die Kinetik nimmt.

Die Beobachtung, dass KChIP sowohl die Inaktivierung im geschlossenen Zustand, als auch die Erholung aus der Inaktivierung beschleunigt, kann im allosterischen Modell der Kv4.2-Steuerung (Schema 4, S. 34) durch eine Erhöhung sowohl der Hin- als auch der Rückrate der Inaktivierung im geschlossenen Zustand ( $k_{CI}$  und  $k_{IC}$ ) beschrieben werden. Beck et al. (2002) erklären die gleiche Beobachtung für Kv4.1 bzw. Kv4.3 und KChIP1.1 in energetischen Begriffen, indem sie sagen, die Energieschwelle der Inaktivierung von Kv4.2 im geschlossen Zustand werde durch KChIP1.1 erniedrigt. Eine Erhöhung der Rate  $k_{CI}$  würde wegen des beschleunigten Übergangs von  $C_4$  nach  $I_{C_4}$  zu einer Beschleunigung des Stromabfalls von makro-



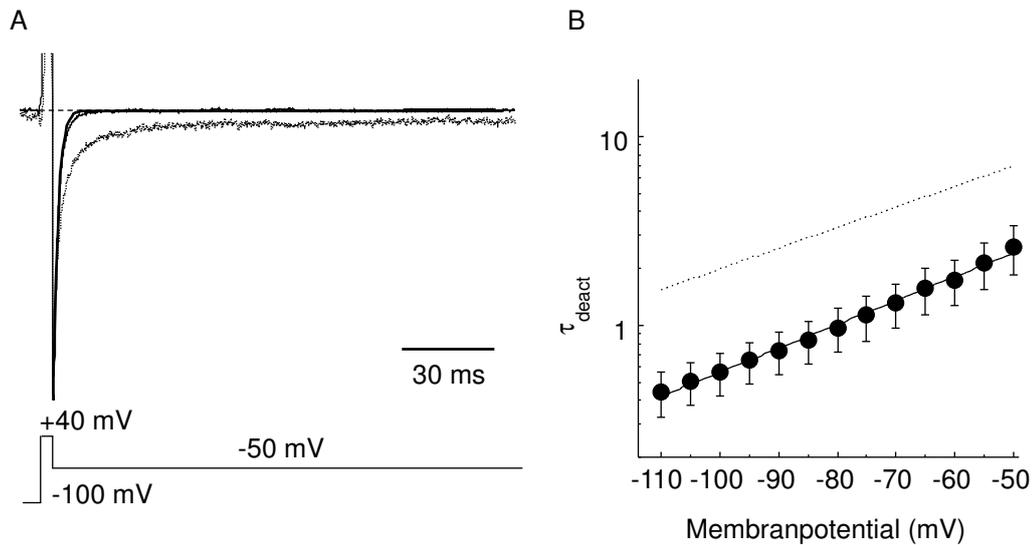
**Abb. 26:** Erholung aus der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.2. **A:** Die Erholung aus der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.2-Strömen wurde mit einem Doppelpulsprotokoll gemessen. Die Membranspannung vor dem ersten Puls und während des Zwischenpulsintervalls war -80 mV (vgl. Abb. 6 A). **B:** Die Peakströme während des Testpulses wurden auf die Peakströme während des Kontrollpulses normalisiert und gegen die Zwischenpulsdauer aufgetragen. Die Zeitkonstante der Erholung aus der Inaktivierung wurde durch einen monoexponentiellen Fit (durchgezogene Linie) bestimmt. Die mittlere exponentielle Erholung aus der Inaktivierung von Kv4.2 allein unter gleichen Bedingungen ist punktiert dargestellt (vgl. Abb. 6 C). **C:** Spannungsabhängigkeit der Erholung aus der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.2. Zeitkonstanten wurden, wie in A und B gezeigt, für unterschiedliche Spannungen des Zwischenpuls bestimmt und in Abhängigkeit von der Zwischenpuls-spannung auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Die durchgezogene Linie gibt den Fit einer exponentiellen Funktion an. Die mittlere exponentielle Spannungsabhängigkeit der entsprechenden Zeitkonstanten von Kv4.2 ohne KChIP ist punktiert dargestellt (vgl. Abb. 6 D).

spkopischen Strömen führen. Tatsächlich führt die Koexpression von KChIP aber typischer Weise zu einer anfänglichen Verlangsamung des Stromabfalls (Abb. 24). Dafür kommen zwei Erklärungsmöglichkeiten in betracht: (1) Der Stromabfall ist bei Koexpression von KChIP-Varianten verlangsamt, weil die Kanäle langsamer schließen oder (2) der Stromabfall ist verlangsamt, weil KChIP-Varianten die schnelle Inaktivierung im offenen Zustand behindern. Die Frage, ob das Schließen der Kanäle durch KChIP moduliert wird, konnte durch die Untersuchung der Deaktivierung beantwortet werden.

Tailströme von Kv4.2/KChIP2.1 wurden bei Membranspannungen zwischen  $-110$  und  $-50$  mV gemessen, nachdem die Kanäle durch einen kurzen depolarisierenden Puls aktiviert worden waren. Abbildung 27 A zeigt das Beispiel eines Kv4.2/KChIP2.1-Tailstroms bei  $-50$  mV. Die Deaktivierung von Kv4.2/KChIP2.1-Strömen wurde mit einer exponentiellen Funktion beschrieben. Die Zeitkonstante der Deaktivierung bei  $-50$  mV betrug  $\tau = 2.6 \pm 0.8$  ms ( $n = 5$ ). Das entspricht einer etwa 3-mal schnelleren Deaktivierung von Kv4.2/KChIP2.1 im Vergleich zu Kv4.2 alleine ( $\tau = 7.6 \pm 1.1$  ms, vgl. Abb. 9). Eine durch KChIP1.1 beschleunigte Deaktivierung von Kv4.1 bzw. Kv4.3 wurde zuvor schon von Beck et al. (2002) beschrieben. Die Beschreibung der Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung von Kv4.2/KChIP2.1 mit einer exponentiellen Funktion ergab eine  $e$ -fache Beschleunigung der Deaktivierung pro 34 mV Hyperpolarisation (Kv4.2 alleine: 40 mV). Da die Spannungsabhängigkeit von Zeitkonstanten der Deaktivierung für Kv4.2 und KChIP2.1 recht ähnlich ist, spricht die Beschleunigung der Deaktivierung durch KChIP2.1 für eine Erhöhung der Rate des Schließen. Sowohl die Beschleunigung der Inaktivierung des geschlossenen Zustands, als auch die Beschleunigung des Schließen der Kanäle müsste zu einer schnelleren Inaktivierung makroskopischer Ströme führen. Daher kommt als Erklärung für die anfängliche Verlangsamung der Inaktivierung makroskopischer Ströme durch KChIP-Varianten eine Behinderung der Inaktivierung im offenen Zustand durch KChIP in Frage. Dieser Effekt wurde bereits durch die Ähnlichkeit des Verlaufs der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.1 und der N-terminalen Deletionsmutante Kv4.2 $\Delta$ 2-40 nahe gelegt.

### 3.4.2 KChIP-Effekte auf die Inaktivierung im offenen Zustand

Die Untersuchung der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2-Strömen legte nahe, dass die Inaktivierung des offenen Zustands von Kv4.2-Kanälen durch KChIP-Varianten

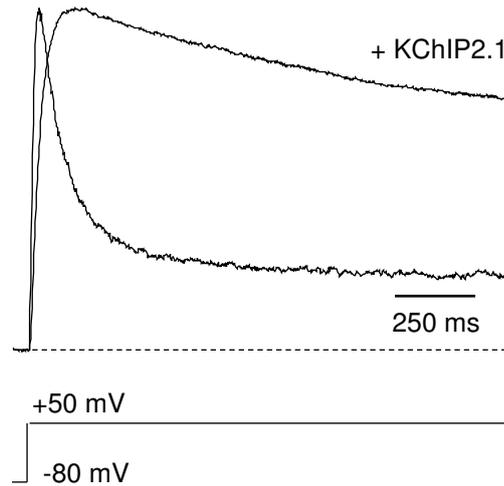


**Abb. 27:** Deaktivierung von Kv4.2/KChIP2.1-Strömen. **A:** Tailströme von Kv4.2/KChIP2.1 wurden 4 ms nach der Aktivierung durch Spannungssprünge von -100 auf +40 mV bei -50 mV in symmetrischer 130 mM  $K^+$ -Konzentration gemessen. Die durchgezogene Linie repräsentiert den Fit einer monoexponentiellen Funktion. Zum Vergleich ist eine Beispiel aufnahme der Deaktivierung von Kv4.2 ohne KChIP dargestellt, die unter gleichen Bedingungen gemessen wurde. Beide Stromspuren sind auf die maximale Auslenkung normalisiert. **B:** Die Deaktivierungskinetik von Kv4.2/KChIP2.1-Strömen (ausgefüllte Symbole) wurde für unterschiedliche Spannungen bestimmt. Die ermittelten Zeitkonstanten sind über der Spannung aufgetragen. Die Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten wurde mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben (durchgezogene Linie). Die mittlere exponentielle Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung von Kv4.2 allein ist punktiert dargestellt (vgl. Abb. 9).

beeinträchtigt werden kann. Wie in Abschnitt 3.2 gezeigt, beruht die Inaktivierung des offenen Zustands von Kv4.2 auf einem Block des Kanals durch eine inaktivierende Domäne des proximalen N-Terminus. Mehrere Ergebnisse weisen darauf hin, dass KChIP-Varianten mit dem proximalen N-Terminus des Kv4.2 interagieren: So konnte KChIP2.2 mit dem Kv4.2-N-Terminus (Aminosäuren 1 - 180) koimmunpräzipitiert werden und auf die N-terminale Deletionmutante Kv4.2 $\Delta$ 2-40 hatte KChIP2.2 keinen Effekt (Bähring et al., 2001b). Die mögliche Interaktion von KChIP-Varianten mit dem N-Terminus des Kv4.2 bietet die Möglichkeit, den Effekt von KChIP auf die Inaktivierung der Kanal-Chimäre Kv2.1(4.2NT) zu untersuchen. Da hier die schnelle Inaktivierung allein durch den proximalen Kv4.2-N-Terminus vermittelt wird, sollte die Koexpression der Chimäre mit KChIP zu einem besonders starken Effekt auf die Inaktivierung führen.

Die Kanal-Chimäre Kv2.1(4.2NT) wurde mit KChIP2.1 in HEK 293-Zellen koexprimiert. Ströme wurden durch Spannungssprünge von  $-80$  auf  $+50$  mV aktiviert. Die schnelle Inaktivierung von Kv2.1(4.2NT) wurde durch die Koexpression von KChIP2.1 vollständig aufgehoben (Abb. 28). Kv2.1(4.2NT)/KChIP2.1-Ströme fielen sogar langsamer ab ( $\tau = 4.9 \pm 0.4$  s;  $n = 10$ ) als Kv2.1-Wildtyp ( $\tau = 3.4 \pm 0.3$ ,  $n = 14$ , vgl. Abb. 10). Dieses Ergebnis legt nahe, dass KChIP2.1 die Inaktivierung von Kv2.1(4.2NT) durch eine Interaktion mit dem Kv4.2-N-Terminus behindert. Eine Interaktion von KChIP2.1 mit dem Kv2.1-Anteil der Chimäre ist unwahrscheinlich, da KChIP2.1 keinen Effekt auf Kv2.1 Ströme in *Xenopus*-Oocyten hatte und nicht mit Kv2.1 in Membranen neocortikaler Neuronen von Ratten koimmunpräzipitiert werden konnte (An et al., 2000).

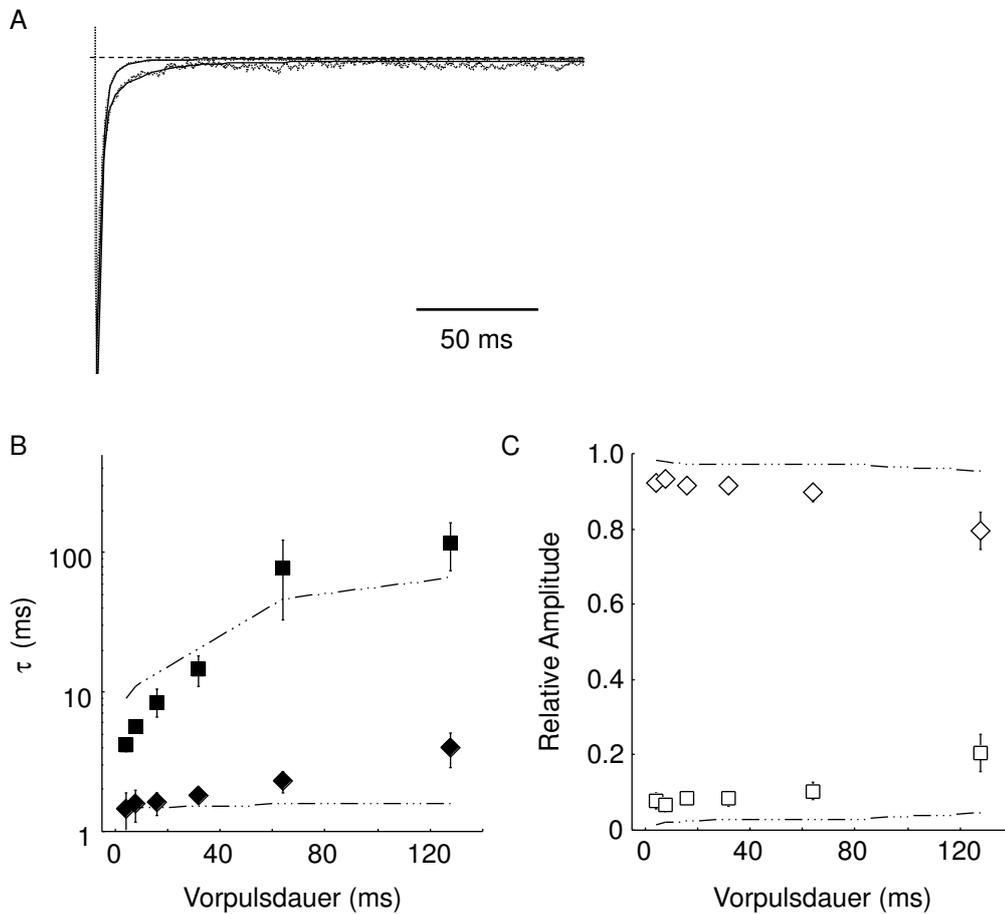
Wenn KChIP2.1 auch in Kv4.2 Kanälen die Inaktivierung des offenen Zustands unterdrückt, so sollten weniger Kanäle während der Erholung aus der Inaktivierung des offenen Zustands wieder öffnen, bevor sie deaktivieren. Die Tailströme wären dann vor allem durch eine schnelle Komponente bestimmt, die auf der Deaktivierung beruht. Desweiteren sollten die Tailströme nicht merklich durch die Dauer des vorausgehenden, depolarisierenden Puls beeinflusst werden. Um dies zu testen wurden Kv4.2/KChIP2.1-Tailströme mit dem gleichen Protokoll aufgenommen, wie es in Abb. 15 A für Kv4.2-Kanäle gezeigt ist. Die Kv4.2/KChIP2.1-Tailströme konnten durch eine zweifach-exponentielle Funktion beschrieben werden (Abb. 29 A). Bei einem Vorpuls von 4 ms betrug die schnelle Zeitkonstante  $\tau_1 = 1.4 \pm 0.4$  ms, nach einem 64 ms-Vorpuls  $\tau_1 = 2.3 \pm 0.4$  ms ( $n = 5$ , Abb. 29 A, B). Dabei zeigte  $\tau_2$  eine



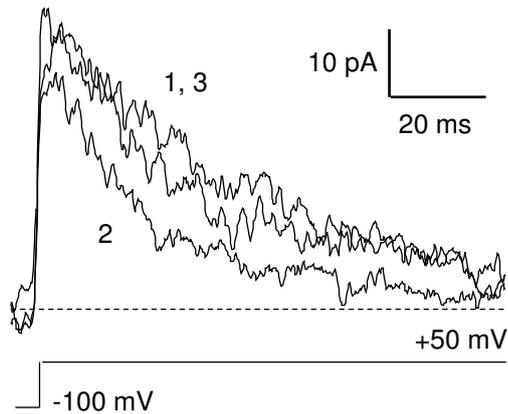
**Abb. 28:** KChIP2.1-Modulation der Kanal-Chimäre Kv2.1(4.2NT). Beispielaufnahme eines Kv2.1(4.2NT)/KChIP2.1-Ströms, der durch einen Spannungssprung von -80 auf +50 mV aktiviert wurde. Zum Vergleich ist die Aufnahme eines Kv2.1(4.2NT)-Stroms gezeigt. Die Ströme wurden auf das Maximum normalisiert.

deutliche Abhängigkeit von der Dauer des Vorpulses, was auf das Wieder-Öffnen offen-inaktivierter Kanäle hinweist. Unabhängig von der Dauer des inaktivierenden Vorpuls betragen die relativen Amplituden von  $\tau_1$  mehr als 80 % ( $n = 5$ , Abb. 29 C). Eine Modellierung der Kv4.2/KChIP2.1-Ströme wurde im Prinzip durch die Veränderung des existierenden allosterischen Kv4.2-Modells (Schema 4, S. 34) entsprechend eines Kv4.1/KChIP1.1-Modells von Beck et al. (2002) erreicht. Die Hin- und Rückrate der Inaktivierung im geschlossenen Zustand  $k_{ci}$  und  $k_{ic}$  wurden beide verdoppelt. Die Rate des Schließens  $k_{oc}$  wurde verdoppelt. Die Inaktivierung im offenen Zustand wurde durch eine 6-fache Reduktion der Hinrate  $k_{OI}$  angepasst. Zusätzlich war es nötig die Rate der Deaktivierung  $\beta_0$  2.5-fach zu erhöhen, um die experimentell gemessene Kinetik von Kv4.2/KChIP2.1-Tailströmen zu simulieren.

Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass KChIP2.1 auch im Kv4.2-Wildtyp die Inaktivierung des offenen Zustands behindert. Eine Behinderung der Inaktivierung des offenen Zustands wurde auch schon zuvor in einer Untersuchung des Einflusses von KChIP1.1 auf die Steuerung von Kv4.1 und Kv4.3 beschrieben (Beck et al., 2002). Als möglicher Mechanismus dieses Effekts kommt in Frage, dass KChIP2.1 den proximalen N-Terminus des Kv4.2 durch direkte Interaktion daran hindert, die Kanalinnenseite zu erreichen. Es stellte sich die Frage, ob die Behinderung der Inaktivierung des offenen Zustands in Kv4.2/KChIP2.1-Komplexen durch Applikation



**Abb. 29:** Analyse von Kv4.2/KChIP2.1-vermittelten Tailströmen. **A:** Tailströme von Kv4.2/KChIP2.1 wurden mit einem Protokoll wie in Abb. 15 A für Kv4.2 gezeigt aufgenommen. Gezeigt sind Tailströme nach depolarisierenden Vorpulsen von 4 ms bzw. 64 ms, die zum besseren Vergleich auf die maximale Auslenkung normalisiert und übereinandergelegt wurden. An den Abfall der Tailströme wurde eine zweifach-exponentielle Funktion angepasst (durchgezogene Linien). **B:** Schnelle (ausgefüllte Rauten) und langsame (ausgefüllte Quadrate) Zeitkonstanten des Tailstrom-Abfalls wurden wie in A gezeigt durch einen zweifach-exponentiellen Fit bestimmt gegen die Dauer des Vorpuls aufgetragen. **C** Relative Amplituden der in B dargestellten Zeitkonstanten (entsprechende offene Symbole). Durchbrochene Linien sind Ergebnisse einer Simulation mit einem für die Kv4.2/KChIP2.1-Steuerung angepassten allosterischen Modell (siehe Text).



**Abb. 30:** Applikation N-Terminalen Peptids zeigt einen Effekt auf Kv4.2/KChIP2.1-Kanäle. N-Terminales Kv4.2-Peptid wurde auf die cytoplasmatische Seite eines Inside-Out-Patches mit Kv4.2/KChIP2.1-Kanälen appliziert. Ströme wurden durch Spannungssprünge von -100 auf +50 mV aktiviert. 1: Kontrolle, 2: 100  $\mu$ M Kv4-Peptid, 3: Nach dem Auswaschen.

des N-terminalen Peptids wiederhergestellt werden konnte, wie es für Kv4.2 $\Delta$ 2-40 der Fall war (vgl. Abb. 17).

Im Inside-Out-Patch wurden Kv4.2/KChIP2.1 Ströme durch Spannungssprünge von -100 auf +50 mV aktiviert (Abb. 30). Die Ströme konnten mit einer zweifach-exponentiellen Funktion beschrieben werden ( $\tau_1 = 28 \pm 7$  ms,  $63 \pm 8\%$  und  $\tau_2 = 100 \pm 24$  ms,  $n = 4$ ). Durch Applikation des Kv4.2-Peptids (vgl. Abb. 11) in einer Konzentration von 100  $\mu$ M auf die Innenseite des Patches konnte die Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.1 beschleunigt werden ( $\tau_1 = 11 \pm 3$   $\mu$ s,  $58 \pm 16\%$ ,  $\tau_2 = 69 \pm 17$  ms,  $n = 4$ ,  $p = 0.078$  für  $\tau_1$  mit und ohne Peptid). Ähnlich wie bei Kv4.2 $\Delta$ 2-40 führte demnach die Applikation von N-terminalem Kv4.2-Peptid auf Kv4.2/KChIP2.1 zu einer Beschleunigung der Inaktivierung.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Kv4.2-Inaktivierung zwei Prozesse zugrunde liegen: eine Inaktivierung vom geschlossenen Zustand und eine Inaktivierung vom offenen Zustand. Beide Prozesse tragen zum schnellen Abfall der Ströme während der Inaktivierung bei. Zum Ende eines depolarisierenden Puls akkumulieren die Kanäle jedoch in dem geschlossen-inaktivierten Zustand. Der Mechanismus der Inaktivierung des offenen Zustands ist auf einen Kanalblock durch eine N-terminale Inaktivierungsdomäne zurückzuführen. Es wurde der Effekt von dreizehn Varianten der vier bekannten KChIPs auf Kv4.2-Ströme untersucht. Die Varianten konnten in drei Gruppen eingeteilt werden: (1) Varianten ohne deutliche Effekte auf Kv4.2-Ströme, (2) eine große Gruppe von KChIPs, die sowohl die Kanal-Expression erhöhten, als auch die Inaktivierung des Kv4.2-Kanals modulierten und (3) eine einzelne Variante mit einem besonders auffälligen Effekt auf die Inaktivierung. Die genauere Analyse der Effekte in Gruppe 2 zeigte, dass sowohl die Inaktivierung im geschlossenen Zustand, als auch die Inaktivierung im offenen Zustand durch KChIP verändert wird.

### 4.1 Inaktivierungsprozesse der Kv4.2-Steuerung

Mehrere Ergebnisse zeigten, dass Kv4.2-Kanäle im geschlossenen Zustand inaktivieren können. Zunächst konnten Kv4.2-Kanäle durch Vorpulse auf Spannungen, bei denen keine makroskopischen Ströme aktiviert wurden, in die Inaktivierung getrieben werden ( $C \rightarrow I_C$ , Abb. 5). Dieses Experiment schloss nicht die prinzipielle Möglichkeit aus, dass bei diesen Spannungen einzelne Kanäle öffneten und sehr schnell in einen offen-inaktivierten Zustand übergangen, ohne dass deutliche makroskopische Ströme sichtbar wurden. Die Existenz eines geschlossen-inaktivierten Zustands wurde jedoch durch die Tatsache belegt, dass während der Repolarisation nach einer vollständigen Inaktivierung keine Tailströme gemessen werden konnten, die auf einen offen-inaktivierten Zustand hingewiesen hätten (Abb. 7). Die experimentellen Bedingungen (stark negative Spannung von -120 mV, hohe extrazelluläre

$K^+$ -Konzentration von 130 mM) waren so gewählt, dass Tailströme besonders gut hätten sichtbar sein müssen. Damit ist die Existenz eines geschlossen-inaktivierten Zustands belegt, aus dem heraus die Erholung stattfindet ( $I_C \rightarrow C$ ). Das genannte Experiment zeigt nicht nur, dass ein geschlossen-inaktivierter Zustand existiert, sondern mehr noch, dass die Kanäle nach genügender Zeit der Inaktivierung dort akkumulieren. D. h. unabhängig davon, ob Kanäle direkt im geschlossenen Zustand inaktivieren ( $C \rightarrow I_C$ ), oder ob sie zunächst öffnen ( $O \rightarrow C \rightarrow I_C$ ) oder ob sie einen transienten, offen-inaktivierten Zustand einnehmen ( $I_O \rightarrow O \rightarrow C \rightarrow I_C$ ) müssen sie letztendlich in den geschlossen-inaktivierten Zustand übergehen. Der geschlossen-inaktivierte Zustand ist demzufolge sehr stabil.

Da offene Kanäle zunächst schließen müssen, um den geschlossen-inaktivierten Zustand zu erreichen, nimmt der Schritt des Schließens Einfluss auf die Geschwindigkeit der Inaktivierung makroskopischer Ströme. Kv4.1-Mutanten, in denen das Schließen verlangsamt war, zeigten auch einen verlangsamteten Stromabfall während der Inaktivierung (Jerng et al., 1999). Experimente mit  $Rb^+$ , das wegen seiner höheren Aufenthaltsdauer in der Pore das Schließen der Kv-Kanäle verlangsamt (Sala und Matteson, 1991) verlangsamt die Inaktivierung von Kv4-Kanälen (Bähring et al., 2001a; Shahidullah und Covarrubias, 2003). Die N-terminale Deletion, die in Kv4.2 $\Delta$ 2-40 zu einem langsameren Schließen führte (Abb. 9 C, D), hatte auch eine Verlangsamung der Inaktivierung zu Folge (Abb. 9 A).

Um die letztendliche Akkumulation im geschlossen-inaktivierten Zustand zu ermöglichen, muss der Schritt des Öffnens Umkehr-betont (*reverse biased*, vgl. Jerng et al., 1999) sein ( $k_{OC} > k_{CO}$ ). Zudem musste die Hinrate der Inaktivierung im geschlossenen Zustand deutlich größer sein als die Rückrate ( $k_{CI} \gg k_{IC}$ ). Dies schafft jedoch zunächst ein theoretisches Problem für die Erholung aus der Inaktivierung. Solange die Rückrate der Inaktivierung des geschlossenen Kanals sehr viel kleiner als die Hinrate ist ( $k_{CI} \gg k_{IC}$ ) kann keine schnelle Erholung aus der Inaktivierung stattfinden, wie sie experimentell gefunden wurde (Abb. 6). In dem zunächst von (Jerng et al., 1999) vorgeschlagenen Modell (Schema 3, S. 33) trat diese Schwierigkeit besonders deutlich zu Tage, wo ein zweiter geschlossen-inaktivierter Zustand  $I_D$  die Stabilität der geschlossen-Kanal-Inaktivierung garantierte. Eine Lösung fand sich durch die Annahme, dass die Inaktivierung an die geschlossenen Zustände der Aktivierungskette gekoppelt ist (Schema 4, S. 34). Durch die Kopplung kann bei negativen Spannungen die Rückrate der Inaktivierung im geschlossenen Zustand größer

werden als die Hinrate ( $k_{IC}/f^4 \gg k_{CI} * f^4$ ,  $f = 0.3$ ) wodurch eine schnelle und vollständige Erholung aus der Inaktivierung gewährleistet ist. Ähnlich wie  $\text{Na}^+$ -Kanäle (Kuo und Bean, 1994) müssen Kv4.2-Kanäle also zunächst deaktivieren, bevor sie sich aus der Inaktivierung erholen können. Durch die Kopplung an die geschlossenen Zustände der Aktivierungskette findet auch die starke Spannungsabhängigkeit der Erholung aus der Inaktivierung eine logische Erklärung (Abb. 6 C).

Welche Bereiche der Kv4.2- $\alpha$ -Untereinheit die Inaktivierung im geschlossenen Zustand verursachen ist unbekannt. Als ein möglicher Mechanismus für eine Geschlossenkanal-Inaktivierung wurde vorgeschlagen, dass eine Inaktivierungsdomäne bereits vor dem Öffnen des Kanals, in einem präinaktivierten Zustand (Zhou et al., 2001), direkt vor dem Tor plaziert ist. Dieser Mechanismus ist nicht mit der Vorstellung vereinbar, dass die Inaktivierung an die geschlossenen Zustände der Inaktivierungskette gekoppelt ist, da hier das Aktivierungstor geschlossen ist. Zudem scheidet der N-Terminus als präinaktivierende Domäne aus, da in Kv4.2 $\Delta$ 2-40 die Inaktivierung vom geschlossenen Zustand nicht beeinträchtigt war. Als weiterer Mechanismus wäre eine Konformationsänderung im Aktivierungstor selbst denkbar, die ein Öffnen verhindert. Das Aktivierungstor wird vermutlich durch den distalen Bereich des S6-Segment gebildet (Yifrach und MacKinnon, 2002). Mutationen in diesem Bereich führten in Kv4.1 zu einer Verlangsamung der Inaktivierung bei negativen Spannungen (Jerng et al., 1999).

Die Anwesenheit eines offen-inaktivierten Zustands äußert sich zunächst in der komplexen Inaktivierungskinetik von Kv4.2-Strömen, die durch einen einzelnen geschlossen-inaktivierten Zustand nicht erklärt werden kann (Abb. 4). Desweiteren weist eine deutliche zweite Komponente in Tailströmen auf Kanäle hin, die zunächst den offenen Zustand durchlaufen, wenn sie einen offen-inaktivierten Zustand verlassen ( $I_O \rightarrow O \rightarrow C$ , Abb. 15). Eine solche Komponente wurde auch für Kv4.1-Kanäle beschrieben Jerng et al. (1999). Es scheint demnach keinen direkten Übergang von einem offen-inaktivierten Zustand zu einem geschlossen-inaktivierten Zustand  $I_{C4}$  zu geben, wie er in anderen Modellen vorgeschlagen wurde (Solc und Aldrich, 1990; Campbell et al., 1993; Greenstein et al., 2000).

Welche Mechanismus unterliegt der Inaktivierung des offenen Zustands von Kv4.2-kanälen? Befunde, die auf eine N-Typ-Mechanismus der Inaktivierung wie in *Shaker* vorhanden hinweisen sind der Effekt von intrazellulärem TEA auf die Inaktivierungskinetik (Choi et al., 1991) und die Beschleunigung der Erholung aus der Inaktivie-

rung durch eine erhöhte extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration (Demo und Yellen, 1991). Intrazelluläres TEA (1 mM) hatte jedoch keinen Effekt auf Kv4.1-Kanäle (Jerng und Covarrubias, 1997). Der TEA-Effekt auf die Inaktivierungskinetik durch Kompetition um eine Bindungsstelle in der Pore setzt voraus, dass der offen-inaktivierte Zustand  $I_O$  sehr stabil ist und dass eine Rückreaktion zu vernachlässigen ist (Choi et al., 1991). Im Kv4-Kanälen ist der offen-inaktivierte Zustand  $I_O$  offensichtlich nur transient besetzt. Die schnelle Akkumulation von Kanälen in einem geschlossen-inaktivierten Zustand könnte erklären, warum intrazelluläres TEA keinen Effekt auf die Inaktivierung von Kv4.1 hatte. Es ist nicht auszuschließen, dass die Inaktivierung im offenen Zustand des Kv4 trotzdem dem N-Typ Mechanismus folgt. Die Erholung aus der Inaktivierung war für Kv4.2, Kv4.2 $\Delta$ 2-40 (Daten nicht gezeigt) und Kv4.1 (Jerng und Covarrubias, 1997) durch eine erhöhte extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration sogar verlangsamt. Die Erholung aus der Inaktivierung findet jedoch in Kv4.2-Kanälen aus dem geschlossen-Inaktivierten Zustand heraus statt. Sie hat daher keine Relevanz für die Untersuchung des Mechanismus der Inaktivierung des offenen Zustands.

Die Untersuchung der Inaktivierung von Kv4.2 im offenen Zustand wird offensichtlich durch das Vorhandensein einer Inaktivierung im geschlossenen Zustand erschwert. Eine Strategie diese Schwierigkeit zu umgehen war, die N-terminale inaktivierende Domäne des Kv4.2 auf den Kv2.1 Kanal zu übertragen, wo die Untersuchung der Inaktivierung des offenen Zustands nicht durch eine schnelle Akkumulation der Kanäle in einem geschlossen-inaktivierten Zustand behindert war. Chimäre Kv2.1(4.2NT) zeigte eine schnelle Inaktivierung mit für die N-Typ-Inaktivierung von *Shaker* typischen Eigenschaften (Hoshi et al., 1990; Zagotta et al., 1990; Choi et al., 1991; Demo und Yellen, 1991): Verlangsamung des Stromabfalls in linearer Abhängigkeit von der Konzentration intrazellulären TEAs, zeitweiliges Wieder-Öffnen während der Erholung aus der Inaktivierung, Beschleunigung der Erholung aus der Inaktivierung durch erhöhte extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration und eine zeitabhängige Blockierung durch das N-terminale Kv4- und *ShB*-Peptid.

Die Inaktivierung der Chimäre Kv2.1(4.2NT) durch den Kv4.2-N-Terminus zeigte demnach Eigenschaften der N-Typ-Inaktivierung. In wie weit sind diese Ergebnisse auf die Inaktivierung des Kv4.2-Wildtyp-Kanals übertragbar? Zwei Ergebnisse sprechen für einen Block des offenen Kv4.2-Kanals durch den N-Terminus: Zum einen war nach der Deletion des N-Terminus in Kv4.2 $\Delta$ 2-40 die Inaktivierung ver-

langsam (Abb. 9 A). Dieser Effekt konnte zwar teilweise durch das ebenfalls verlangsamte Schließen hervorgerufen worden sein (Abb. 9 C), es war aber kein Effekt einer Inaktivierung im offenen Zustand auf die Tailströme zu beobachten (Abb. 16). Dies deutet auf ein Fehlen des offen-inaktivierten Zustands hin Kv4.2 $\Delta$ 2-40 hin. Während in *Shaker*-Kanälen die schnelle Inaktivierung durch das Entfernen der N-terminalen, inaktivierenden Domäne unterbunden wird (Hoshi et al., 1990), führt die N-Terminale Deletion im Kv4.2 zu einer Demaskierung der schnellen Inaktivierung im geschlossenen Zustand. Damit vereinbar ist die Beobachtung, dass in Kv4.2 $\Delta$ 2-40 die Kinetik der Inaktivierung des geschlossenen Zustands (Erholung und Vorpuls-Protokolle) nicht verändert ist (Tabelle 2).

Als zweites Ergebnis spricht für einen Block des offenen Kv4.2-Kanals durch den N-Terminus, dass die Applikation des N-terminalen Kv4.2-Peptids zu Inaktivierung von Kv4.2 $\Delta$ 2-40 führte (Abb. 17). Die Spezifität dieser Reaktion sollte noch durch die Applikation eines Peptids mit zufälliger Anordnung der Aminosäuren (*scrambled peptide*) überprüft werden.

Für die N-Typ-Inaktivierung des Kv1.4-Kanals durch Kv $\beta$ 1 konnten Zhou et al. (2001) eine Interaktion von zwei Aminosäuren der N-terminalen Inaktivierungsdomäne und drei Aminosäuren in der Kanalpore nachweisen. Die Untersuchung einer solchen Interaktion in Kv4.2 wird wiederum durch die zugrunde liegende Inaktivierung im geschlossenen Zustand erschwert. Als Alternative bot sich die Mutante Kv4.2C320S an, in der die Inaktivierung im geschlossenen Zustand durch ein sehr langsames Schließen teilweise unterdrückt war. Zwar führten Mutationen im N-Terminus und in dem durch Zhou et al. (2001) festgelegten Rezeptorbereich zu Veränderungen in der Inaktivierung von Kv4.2C320S. In einer Analyse des Mutantenzklus (vgl. Hidalgo und MacKinnon, 1995; Zhou et al., 2001) für eine mögliche Interaktion der Aminosäuren A3 und V5 im N-Terminus mit V402 und V406A in der Pore konnte jedoch keine direkte Wechselwirkung nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Möglicherweise befindet sich der Rezeptor für eine N-terminale Inaktivierungsdomäne im Kv4.2-Kanal an einer anderen Stelle.

C-Typ-Inaktivierung als möglicher Mechanismus für die Inaktivierung des offenen Zustands des Kv4.2-Kanals lässt sich ausschließen. Extrazelluläres TEA, das mit der C-Typ-Inaktivierung in *Shaker* interferiert, hatte keinen Effekt auf die Inaktivierungskinetik von Kv4.1-Kanälen (Jerng und Covarrubias, 1997). Die von *Shaker* bekannte C-Typ Inaktivierung ist relativ langsam und von der extrazellulären

$K^+$ -Konzentration abhängig (Lopez-Barneo et al., 1993). Die langsame Komponente der Inaktivierung von Kv4.2 ist, anders als die C-Typ-Inaktivierung von *Shaker*, jedoch nicht durch eine Erhöhung der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration zu beeinflussen (Bähring et al., 2001a). Zudem lässt sich die langsame Komponente der Kv4.2-Inaktivierung gut durch das Umschichten der im offenen Zustand inaktivierten Kanäle ( $I_O$ ) in den stabileren geschlossen-inaktivierten Zustand ( $I_{C4}$ ) erklären. Eghbali et al. (2002) beschreiben allerdings eine C-Typ-Inaktivierung in Kv4.3. Diese hat jedoch nur in  $K^+$ -freien Lösungen deutliche Effekte und ist zudem zu langsam, um die hier untersuchten schnellen Inaktivierungsprozesse des Kv4.2-Kanals zu erklären. Insbesondere die schnelle und vollständige Erholung aus der Inaktivierung von Kv4.2-Kanälen steht in Widerspruch zu einem signifikanten Beitrag der C-Typ-Inaktivierung.

## 4.2 Mechanismen der Modulation durch KChIP

Die Varianten der Gruppe 1 ohne deutliche Effekte auf Kv4.2-Ströme (KChIP2.5, KChIP2.6 und KChIP3.2) zeigten alle alternatives Splicing innerhalb der Kernregion, das zu einem Fehlen von Teilen dieser Region oder zu Verschiebungen des offenen Leserahmens in dieser Region führte (Abb. 19). Keine der funktionellen Varianten in den Gruppen 2 und 3 wies eine derart veränderte Kernregion. Da die Proteine aller untersuchten Varianten in CHO-Zellen nachgewiesen werden konnten (Abb. 20), liegt es nahe anzunehmen, dass eine intakte Kernregion für die Modulation von Kv4.2-Kanälen oder für die Bindung benötigt wird. Damit stimmt überein, dass zwar KChIP2.2/NT4.4 einen KChIP4.4 vergleichbaren Effekt auf die Inaktivierung ausübte, nicht jedoch KChIP2.5/NT4.4. Eine Interaktion könnte gestört sein, weil für die Interaktion wichtige Teile der Kernregion fehlen, oder durch eine veränderte Konformation des Proteins unzugänglich werden. Eine veränderte Konformation könnte bei KChIP2.6 die Interaktion mit Kv4.2 behindern, da KChIP2.6 einen vollständigen Sequenzabschnitt enthält, der bei einer minimalen KChIP2-Isoform für typische KChIP-Effekte (verlangsamte Inaktivierung, und beschleunigte Erholung) auf Kv4.3-Kanäle ausreichend war (Patel et al., 2002b). Eine fehlende direkte Interaktion mit Kv4.2-Kanälen schließt nicht aus, dass diese Varianten andere physiologische Aufgaben erfüllen. Dass KChIPs nicht nur eine Funktion als Untereinheiten von Kv4-Kanälen haben wird durch KChIP3.1 (= Calsenilin, DREAM, vgl. Sprea-

fico et al. (2001)) gezeigt, das mit Presenilin interagiert (Buxbaum et al., 1998) und als Transkriptionsmodulator dient (Carrion et al., 1999).

Die Varianten der Gruppe 2 (KChIP1.1, KChIP2.1 bis 2.4, KChIP3.1 und KChIP4.1 bis 4.3) modulierten Kv4.2-Ströme auf ähnliche Weise: Die anfängliche Inaktivierung war verlangsamt, die Erholung aus der Inaktivierung war deutlich beschleunigt (Abb. 23) und die Kurve der Steady-State Inaktivierung war tendenziell zu positiveren Spannungen hin verschoben (Abb. 22). Die KChIP-Varianten dieser Gruppe führten auch alle zu einer erhöhten Expression (Abb. 21).

Die meisten der beobachteten Effekte von KChIP auf die Steuerung von Kv4-Kanälen sind in Übereinstimmung mit bereits publizierten Ergebnissen in unterschiedlichen Expressionssystemen (An et al., 2000; Bähring et al., 2001b; Decher et al., 2001; Nakamura et al., 2001; Patel et al., 2002a; Beck et al., 2002; Wang et al., 2002). Interessanterweise konnten die typischen Effekte einer anfänglich verlangsamten Inaktivierung und einer beschleunigten Erholung aus der Inaktivierung auch mit einer minimalen Isoform beobachtet werden, die nur aus den C-terminalen 70 Aminosäuren der Kernsequenz bestand (Patel et al., 2002b).

Die genauere Analyse der KChIP-Effekte auf die Inaktivierung von Kv4.2-Kanälen am Beispiel der Varianten KChIP2.1 und KChIP2.2 zeigte, dass sowohl die Inaktivierung im geschlossenen Zustand, als auch die Inaktivierung im offenen Zustand durch KChIP verändert werden konnte, wobei es sich wie oben gezeigt wurde, um unterschiedliche Inaktivierungsprozesse handelt. Die Beschleunigung der Inaktivierung im geschlossenen Zustand durch KChIP2.2 (Abb. 25) könnte auch auf einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu negativeren Spannungen beruhen, da diese Inaktivierung an die Zustände der Aktivierungskette ( $C_0$  bis  $C_4$ ) gekoppelt ist. Der  $V_{1/2}$ -Wert der Aktivierung für KChIP2.2 ist jedoch zu positiveren Spannungen hin verschoben (Tabelle 4), so dass eine solche Erklärung ausscheidet. Auch die Beschleunigung der Erholung aus der Inaktivierung von geschlossenen Zuständen ( $I_{C4} \rightarrow I_{C0} \rightarrow C_0$ ) durch KChIP2.2 ist nicht auf eine Modulation der Übergänge in der Deaktivierungskette zurückzuführen, denn die Spannungsabhängigkeit der Erholung aus der Inaktivierung ist für Kv4.2 und Kv4.2/KChIP2.2 ähnlich (Abb. 6 und 26). Offensichtlich beeinflusst KChIP2.2 also direkt die Raten  $k_{ci}$  und  $k_{ic}$  des Übergangs von  $C$  nach  $I_C$ . Das entspricht einer Verringerung der Energieschwelle für die Inaktivierungsreaktion im geschlossenen Zustand durch

KChIP2.2, wie es auch für die Koexpression von Kv4.1 bzw. Kv4.3 mit KChIP1.1 gezeigt wurde (Beck et al., 2002).

Da Kv4.2-Kanäle im geschlossen-inaktivierten Zustand akkumulieren bestimmen die Raten  $k_{CI}$  und  $k_{IC}$  den Steady-State der Inaktivierung. Wenn sich  $k_{CI}$  weniger erhöht (z. B. 2-fach) als  $k_{IC}$  (z. B. 5-fach) verschiebt sich die Kurve der Steady-State-Inaktivierung zu positiveren Spannungen, wie es experimentell für KChIP2.2 und andere Varianten der Gruppe 2 der Fall war (Abb. 22 C). Eine Ausnahme von dieser Regel ist KChIP1.1, das in Übereinstimmung mit Nakamura et al. (2001) die Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung von Kv4.2-Strömen nicht signifikant verschob. Da KChIP1.1 aus der Gruppe 2 die Erholung aus der Inaktivierung am geringfügigsten beschleunigte (nur etwa 2.7-fach), bleiben die Raten  $k_{CI}$  und  $k_{IC}$  für KChIP1.1 vermutlich ausgeglichen, so dass sich kein Effekt auf die Steady-State-Inaktivierung ergibt.

Die Analyse des Stromabfalls makroskopischer Kv4.2/KChIP2.1-Ströme ergab, dass KChIP2.1 die anfängliche Inaktivierung zwar verlangsamt, aber zu einer schnelleren Akkumulation im geschlossen-inaktivierten Zustand führt (Abb. 24 A). Wie oben gezeigt wurde, ist die Inaktivierungskinetik der makroskopischen Ströme sowohl durch den Übergang in den offen-inaktivierten Zustand ( $O \rightarrow I_O$ ) als auch durch das Schließen ( $O \rightarrow C_4$ ) und den Übergang in den geschlossen-inaktivierten Zustand bestimmt  $C_4 \rightarrow I_{C4}$ . KChIP-Varianten konnten sowohl das Schließen von Kv4.2 (KChIP2.1, Abb. 27), als auch die Inaktivierung im geschlossenen Zustand (KChIP2.2, Abb. 25) beschleunigen. Beides sollte eigentlich zu einer Beschleunigung des Stromabfalls während der Inaktivierung führen. Die anfängliche Verlangsamung der Inaktivierung könnte also stattdessen durch eine stark verlangsamte Inaktivierung des offenen Zustands ( $O \rightarrow I_O$ ) verursacht werden. Eine starke Verringerung der Rate  $k_{oi}$  führt zu einer geringen Aufenthaltswahrscheinlichkeit für  $I_O$ . Dadurch gibt es weniger Kanäle, die aus  $I_O$  kommend zunächst wieder öffnen bevor sie in  $I_{C4}$  akkumulieren. Dies entspricht der Beobachtung, dass die langsame Komponente von Kv4.2/KChIP2.1-Tailströmen, die durch das Wieder-Öffnen offen-inaktivierter Kanäle hervorgerufen wird, nur eine sehr geringe Amplitude hat (Abb. 29). Demnach reflektiert die Inaktivierung von Kv4.2/KChIP-Strömen vor allem die Akkumulation im geschlossen-inaktivierten Zustand, wie es auch bei der N-terminalen Deletionsmutante Kv4.2 $\Delta$ 2-40 der Fall ist.

Dass KChIP die Inaktivierung des offenen Zustands stört, wird deutlich in der Chi-

märe Kv2.1(4.2NT), deren schnelle Inaktivierung allein auf einem Kanalblock durch den N-Terminus beruht. Hier wird die schnelle Inaktivierung durch Koexpression von KChIP2.1 fast vollständig aufgehoben (Abb. 28). Ein ähnlicher Effekt ergibt sich bei Koexpression von KChIP mit der Mutante Kv4.3 V309I V401I, in der durch eine starke Verlangsamung des Schließens die Inaktivierung des offenen Zustands betont ist (Wang et al., 2002).

Überraschend war zunächst die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung von Kv4.2/KChIP2.1-Strömen (Abb. 24 C), da die für die Inaktivierung makroskopischer Ströme verantwortlichen Zustandsübergänge als spannungsunabhängige Reaktionen definiert wurden (Schema 4, S. 34). Beck et al. (2002) dagegen nehmen an, dass der Schritt des Öffnens und Schließens ( $C \rightleftharpoons O$ ) schwach spannungsabhängig sei ( $z_{CO} = 0.25$ ,  $z_{OC} = 0.05$ ). Diese Annahme würde die Verlangsamung der Inaktivierung mit KChIP bei positiveren Spannungen erklären, da der offene Zustand durch positivere Spannungen stabilisiert wird. Eine schwache Spannungsabhängigkeit des Öffnens von *Shaker* wird von Hoshi et al. (1994) und Zagotta et al. (1994) angenommen, die eine Modellierung der *Shaker*-Aktivierung nach Einzelkanalableitungen vornehmen (vgl. Bezanilla, 2000). Die Spannungsabhängigkeit des Öffnens könnte z. B. mit einer letzten, konzertierten Bewegung der sonst unabhängigen Spannungssensoren zusammenhängen, ein Schritt der in dem bisherigen Kv4.2-Modell (Schema 4, S. 34) nicht berücksichtigt wurde.

Alle KChIP-Varianten der Gruppe 2 zeigten neben den typischen Effekten auf die Steuerung von Kv4.2 auch eine erhöhte Stromdichte in CHO-Zellen. Dies wirft die Frage auf, ob die erhöhte Stromdichte mit veränderten Steuerungseigenschaften des Kv4.2-Kanals zusammenhängt. Bei gleicher Anzahl von Kanälen könnte die Stromdichte auch durch eine erhöhte Einzelkanalleitfähigkeit oder eine Erhöhte Offenwahrscheinlichkeit während des Strompeaks zusammenhängen. Beck et al. (2002) fanden jedoch, dass die Einzelkanalleitfähigkeit von Kv4.1 durch KChIP1.1 nicht erhöht wird. Die Offenwahrscheinlichkeit während des Peakstroms von Kv4.2 beträgt in der Simulation durch das allosterischen Modell etwa 0.2 (Abb. 8 B). Das gibt einen maximalen Spielraum für eine 5-fache Erhöhung. Die Stromdichte wurde jedoch durch viele KChIP-Varianten stärker stimuliert als 5-fach (Abb. 21). Zudem entspricht das für Kv4.2/KChIP2.1 beobachtete schnellere Schließen (Abb. 27) einer Destabilisierung des offenen Zustands und damit einer eher geringeren Offenwahrscheinlichkeit während des Peakstroms in Gegenwart von KChIP. Die Variante KChIP4.4 dage-

gen, welche die Inaktivierung von Kv4.2 besonders stark verlangsamte (Abb. 23), zeigte mit Kv4.3 eine Stabilisierung des offenen Zustands (Holmqvist et al., 2002). Gerade diese Variante führte jedoch nicht zu einer höheren Kv4.2-Stromdichte in CHO-Zellen (Abb. 21). Es ist daher auszuschließen, dass die durch KChIP-Varianten erhöhte Stromdichte durch eine Änderung der Steuerungseigenschaften des Kv4.2-Kanals verursacht wird. Vielmehr ist anzunehmen, daß sie auf einer erhöhten Anzahl funktioneller Kanäle beruht. Die Untersuchung der subzellulären Verteilung von Kv4.2-Kanälen und KChIP2.2 durch Techniken der Immunocytochemie und konfokalen Mikroskopie zeigte zudem, dass Kv4.2-Kanäle durch Koexpression von KChIP2.2 im Bereich der Membran konzentriert werden (Bähring et al., 2001b). Diese Befunde zeigen, dass KChIP die Anzahl funktioneller Kv4.2-Kanäle in der Zellmembran erhöht.

Wie könnten die molekularen Interaktionen aussehen, die zu den KChIP-Effekten führen? Da KChIP2.2 mit dem Kv4.2-N-Terminus (Aminosäuren 1 -180) koimmunpräzipitiert werden konnte (Bähring et al., 2001b) ist es vorstellbar, dass dieser Bereich die Hauptbindestelle für KChIP darstellt und KChIP so den Block des Kanals durch die N-terminale Inaktivierungsdomäne behindert. Dies könnte auf unterschiedliche Weise geschehen: (1) KChIP blockiert den Weg zur Pore, so dass zwar ein Ionenfluss möglich ist, aber die N-terminale Inaktivierungsdomäne die Pore nicht erreichen kann. Dies ist unwahrscheinlich, da in Kv4.2/KChIP2.1 das N-terminale Peptid in der Lage war, die Pore zu erreichen und einen Block herbeizuführen (Abb. 30). (2) KChIP bindet ausschließlich an den proximalen N-Terminus. Wegen der Größe von KChIP wird die N-terminale Inaktivierungsdomäne davon abgehalten, die Pore zu erreichen. Diese Situation entspräche etwa der bei einer N-terminalen Fusion mit GFP. Die Ströme eines solchen Konstrukts inaktivierten langsamer als Kv4.2-Wildtyp (Hatano et al., 2002) mit Zeitkonstanten die etwa Kv4.2 $\Delta$ 2-40 entsprechen. Diese Vorstellung würde jedoch implizieren, dass nicht alle N-Termini der  $\alpha$ -Untereinheiten abgesättigt sind, da eine schwache Inaktivierung des offenen Zustands auch in Kv4.2/KChIP2.1 weiterbesteht (Abb. 29). (3) KChIP bindet sehr stabil an einer anderen Stelle des Kanals, z. B. im Bereich der T1-Domäne. Eine zusätzliche Affinität für den proximalen N-Terminus führt dazu, dass der proximale N-Terminus durch KChIP festgehalten werden kann, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit reduziert, dass er die Kanalmündung erreicht. Vereinbar mit dieser Vorstellung ist die Idee, dass KChIP den proximalen N-Terminus an einer Stelle fixiert, wo er das Schließen des Kanals beschleunigt, wie es für KChIP2.1 der Fall war (Abb. 27).

Für Kv4.2-Kanäle ohne KChIP ist diese Stelle u. U. mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit durch den N-Terminus besetzt und das Schließen ist langsamer. In der N-terminalen Deletionsmutante ist die Stelle gar nicht besetzt und das Schließen ist noch stärker verlangsamt (Abb. 9 C).

Über einen Mechanismus für die Modulation der Inaktivierung im geschlossenen Zustand lassen sich kaum Vermutungen anstellen, da über den molekularen Hintergrund dieser Inaktivierungsreaktion nichts bekannt ist. Wenn KChIP tatsächlich mit der T1-Region interagiert, könnte es sein, dass eine Konformationsänderung der T1-Region auf membranständige Bereiche des Kanals übertragen wird, wie es von Yi et al. (2001) vorgeschlagen wird. Eine Elektronenmikroskopische Untersuchung der Struktur des Kv4/KChIP-Komplexes deutet darauf hin, dass KChIP möglicherweise seitlich an die T1-Region bindet (Kim et al., Biophysical Society Annual Meeting Abstracts, 2003).

### 4.3 Funktionelle Relevanz der KChIP-Effekte

Die meisten der beobachteten KChIP-Effekte erhöhen die Verfügbarkeit von Kv4.2-Strömen: Verlangsamte Inaktivierung, Beschleunigte Erholung aus der Inaktivierung (Abb. 23), positive Verschiebungen der Spannungsabhängigkeit der Steady-State-Inaktivierung (Abb. 22) und erhöhte Expression (Abb. 21). Dies legt nahe, dass KChIPs dazu dienen, Kv4.2-Ströme zu verstärken. Ein Fehlen von KChIP kann zu einem fast vollständigen Verlust der Kv4-Ströme führen, wie der Defekt eines KChIP2-Gens in einer Knock-out-Maus zeigt, der zu einem vollständigen Verlust des transienten Auswärtsstroms  $I_{to}$  in ventrikulären Herzmuskelzellen führt dadurch zu einer Neigung zu Tachykardie (Kuo et al., 2001). Dass die Regelung der Verfügbarkeit von Kv4 durch KChIP einen starken Effekt auf physiologischen Prozesse hat lässt sich leicht einsehen. Einige Überlegungen zu subtileren KChIP-Effekten auf die Steuerung von Kv4-Kanälen sollen zeigen, dass auch hier physiologische Prozesse betroffen sein können.

Die physiologischen Funktionen von Kv4-Kanälen lassen sich in drei Gruppen zusammenfassen: (1) Kv4-Kanäle tragen zur Form und Dauer von APs in Neuronen und in Herzmuskelzellen (Barry et al., 1998; Greenstein et al., 2000; Kuo et al., 2001) bei, (2) Kv4-Kanäle tragen zur postsynaptischen Integration von In- und Output bei

(Hoffman et al., 1997; Ramakers und Storm, 2002) und (3) Kv4-Kanäle sind wichtig für die Frequenzregulation in repetitiv feuernenden Neuronen (Liss et al., 2001).

Das Aktionspotential eines Neurons hat typischerweise eine sehr kurze Dauer von 0.5 bis 2 ms (vgl. Mitterdorfer und Bean, 2002). Während eines APs erreichen Kv4-Ströme noch nicht ihre maximale Amplitude, bevor die Repolarisation eine Deaktivierung der Kanäle bewirkt, so dass für Inaktivierung nicht viel Zeit bleibt. Daher sind die entscheidenden Steuerungsparameter bei der Aktivierung von Kv4-Strömen während des kurzen neuronalen Aktionspotentials die der Aktivierung und Deaktivierung. Bei -60 mV, dem typischen Ruhepotential eines Neurons, beträgt die Zeitkonstante der Deaktivierung von Kv4.2-Kanälen etwa 5 ms, mit KChIP2.1 nur etwa 2 ms. D. h. nach etwa 15 bzw. 6 ms wären Kv4-Kanäle wieder nahezu vollständig deaktiviert. Unter der Annahme, dass das Neuron nicht feuern kann, solange Kv4-Kanäle nicht vollständig deaktiviert sind, und unter Vernachlässigung der Inaktivierung, dürfte ein Neuron also maximal mit 66 bzw. 166 Hz feuern. Diese Überschlagsrechnung illustriert, wie Kv4-Ströme durch KChIP für Frequenzpräferenzen von Neuronen optimieren werden könnten.

Das Aktionspotential einer Herzmuskelzelle dauert wesentlich länger, so dass man davon ausgehen kann, dass Kv4-Kanäle zum großen Teil inaktiviert werden. Die Raten der Erholung aus der Inaktivierung von Kv4-Kanälen sind bei -70 mV ohne KChIP 300 ms, bzw. 50 ms mit KChIP. D. h. nach etwa 900 bzw. 150 ms hätten sich die Kanäle fast vollständig aus der Inaktivierung erholt. APs dürften also mit einer Frequenz von etwa 1 bzw. 6 Hz aufeinanderfolgen, ohne auf inaktivierte Kv4-Kanäle zu treffen. Diese Beispielrechnung illustriert, wie die Modulation der Erholung aus der Inaktivierung durch KChIP die Verfügbarkeit von Kv4-Kanälen in Herzmuskelzellen optimieren könnte.

Bei der Integration postsynaptischer Signale werden Kv4-Kanäle durch EPSPs inaktiviert, so dass retrograd laufende APs nicht mehr unterdrückt werden und durch die starke Depolarisation des postsynaptischen Bereichs LTP-Prozesse in Gang gesetzt werden können (Johnston et al., 2000). Bei diesem Mechanismus der Koinzidenzdetektion ist das Zeitfenster zwischen Beginn des EPSP und dem Eintreffen des retrograd laufenden Aktionspotentials entscheidend. Es liegt bei 15 bis 20 ms (Johnston et al., 2000) und wird durch die Kinetik der Inaktivierung bei relativ positiven Spannungen bestimmt. Nach 30 ms Depolarisation auf +40 mV war mehr als 30 % des Kv4.2-Stroms inaktiviert aber nur etwa 60 % des Kv4.2/KChIP2.1-Stroms

(Abb. 23). Demnach sorgt KChIP2.1 für ein längeres Zeitfenster bei der Koinzidenzdetektion. Für die Koinzidenzdetektion spielt die Fortleitungsgeschwindigkeit des Dendriten eine Rolle, denn je weiter die Synapse vom Soma entfernt ist, desto länger benötigt das retrograd wandernde AP um sie zu erreichen. Um für eine distal gelegende Synapse eine Synchronisation von Output (Erregung des Neurons) und Input (EPSP) zu erreichen, gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder wird die Fortleitungsgeschwindigkeit erhöht, oder das Zeitfenster der Koinzidenzdetektion wird verlängert. Die Erhöhung der Fortleitungsgeschwindigkeit im Dendriten würde jedoch zu einer Desynchronisation für mehr proximal liegende Synapsen führen. Das Zeitfenster der Koinzidenzdetektion kann jedoch für jede Synapse unabhängig eingestellt werden, z. B. durch eine höhere Dichte von Kv4.2/KChIP in mehr distal liegenden Synapsen. Damit wäre das Fine-Tuning des Zeitfensters eine Funktion von KChIP.

Für die Frequenzregulierende Funktion in Pacemaker-Zellen (Liss et al., 2001) spielt die Aktivierung und Inaktivierung von Kv4-Kanälen im Bereich knapp unterschwelliger Spannungen eine wichtige Rolle. Während einer langsamen Spannungsrampe im Intervall zwischen den APs würden Kv4.2-Kanäle langsam inaktivieren. Bei einer Pacemaker-Frequenz von 1 Hz ist das Zwischenintervall 1 s. Die Zeitkonstante der Inaktivierung von Kv4.2-Kanälen bei einer unterschwelligen Spannung von  $-50$  mV ist etwa 1 s, mit KChIP2.2 500 ms. Unter der vereinfachenden Annahme, dass das gesamte Zwischenintervall für die Inaktivierung zur Verfügung steht sind nach 1 s erst 63 % der Kv4.2-Kanäle inaktiviert, aber schon 86 % der Kv4/KChIP2.2-Kanäle. Wenn die Verfügbarkeit von Kv4-Kanälen mitentscheidend dafür ist, dass ein neues AP entsteht, hätte Kv4 mit KChIP eine Präferenz für höhere Pacemaker-Frequenzen. Diese Beispielrechnung zeigt, wie KChIP2.2 durch die Modulation der Inaktivierung im geschlossenen Zustand Kv4.2-Kanäle für Pacemaker-Frequenzen optimieren könnte.

## Literaturverzeichnis

- [An et al. 2000] AN, W. F. ; BOWLBY, M. R. ; BETTY, M. ; CAO, J. ; LING, H. P. ; MENDOZA, G. ; HINSON, J. W. ; MATTSSON, K. I. ; STRASSLE, B. W. ; TRIMMER, J. S. ; RHODES, K. J.: Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. In: *Nature* 403 (2000), S. 553 – 556
- [Bähring et al. 2001a] BÄHRING, R. ; BOLAND, L. M. ; VARGHESE, A. ; GEBAUER, M. ; PONGS, O.: Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels. In: *J. Physiol.* 535 (2001), S. 65 – 81
- [Bähring et al. 2001b] BÄHRING, R. ; DANNENBERG, J. ; PETERS, H. C. ; PONGS, T. Leicherand O. ; ISBRANDT, D.: Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. In: *J. Biol. Chem.* 276 (2001), S. 23888 – 23894
- [Baldwin et al. 1991] BALDWIN, T. J. ; TSAUR, M. L. ; LOPEZ, G. A. ; JAN, Y. N. ; JAN, L. Y.: Characterization of a mammalian cDNA for an inactivating voltage-sensitive K<sup>+</sup> channel. In: *Neuron* (1991), S. 471 – 483
- [Barry et al. 1998] BARRY, D. M. ; XU, H. ; SCHUESSLER, R. B. ; NERBONNE, J. M.: Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4 alpha subunit. In: *Circ. Res.* 83 (1998), S. 560 – 567
- [Baukrowitz und Yellen 1995] BAUKROWITZ, T. ; YELLEN, G.: Modulation of K<sup>+</sup> current by frequency and external [K<sup>+</sup>]: a tale of two inactivation mechanisms. In: *Neuron* 15 (1995), S. 951 – 960
- [Beck et al. 2002] BECK, E. J. ; BOWLBY, M. ; AN, W. F. ; RHODES, K. J. ; COVARRUBIAS, M.: Remodelling inactivation gating of Kv4 channels by KChIP1,

- a small-molecular-weight calcium-binding protein. In: *J. Physiol.* 538 (2002), S. 691 – 706
- [Bevington und Robinson 1992] BEVINGTON, P. R. ; ROBINSON, D. K.: *Data reduction and error analysis for the physical sciences.* 2. Boston, Massachusetts u. a. : WCB/MacGraw-Hill, 1992
- [Bezaniilla 2000] BEZANILLA, F.: The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. In: *Physiol. Rev.* 80 (2000), S. 555 – 592
- [Boland et al. 2003] BOLAND, J. M. ; JIANG, M. ; LEE, S. Y. ; FAHRENKRUG, S. C. ; HARNETT, M. T. ; O'GRADY, S. M.: Functional properties of a brain-specific N-terminally spliced modulator of Kv4 channels. In: *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* (2003). – Elektronische Publikation vor dem Druck
- [Buxbaum et al. 1998] BUXBAUM, J. D. ; CHOI, E. K. ; LUO, Y. ; LILLIEHOOK, C. ; CROWLEY, A. C. ; MERRIAM, D. E. ; WASCO, W.: Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. In: *Nat. Med.* (1998), S. 1177 – 1181
- [Campbell et al. 1993] CAMPBELL, D. L. ; RASMUSSEN, R. L. ; QU, Y. ; STRAUSS, H. C.: The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. I. Basic characterization and kinetic analysis. In: *J. Gen. Physiol.* 101 (1993), S. 571 – 601
- [Carrion et al. 1999] CARRION, A. M. ; LEDO, W. A. Link F. ; MELLSTROM, B. ; NARANJO, J. R.: DREAM is a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcriptional repressor. In: *Nature* 398 (1999), S. 80 – 84
- [Choi et al. 1991] CHOI, K. L. ; ALDRICH, R. W. ; YELLEN, G.: Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991), S. 5092 – 5095
- [Colquhoun und Hawks 1995] COLQUHOUN, D. ; HAWKS, A. G.: A Q-Matrix cookbook. How to write only one program to calculate the single-channel and macroscopic predictions for any kinetic mechanism. In: SAKMANN, B. (Hrsg.) ; NEHER, E. (Hrsg.): *Single Channel Recording.* 2. New York : Plenum Press, 1995, S. 589 – 633

- [Connor und Stevens 1971a] CONNOR, J. A. ; STEVENS, C. F.: Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under voltage clamp. In: *J. Physiol.* 213 (1971), S. 1 – 19
- [Connor und Stevens 1971b] CONNOR, J. A. ; STEVENS, C. F.: Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. In: *J. Physiol.* 213 (1971), S. 21 – 30
- [Decher et al. 2001] DECHER, N. ; UYGUNER, O. ; SCHERER, C. R. ; KARAMAN, B. ; YUKSEL-APAK, M. ; BUSCH, A. E. ; STEINMEYER, K. ; WOLLNIK, B.: hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. In: *Cardiovasc. Res.* 52 (2001), S. 255 – 264
- [Demo und Yellen 1991] DEMO, S. D. ; YELLEN, G.: The inactivation gate of the Shaker K<sup>+</sup> channel behaves like an open-channel blocker. In: *Neuron* 7 (1991), S. 743 – 753
- [Dixon et al. 1996] DIXON, J. E. ; SHI, W. ; WANG, H. S. ; McDONALD, C. ; YU, H. ; WYMORE, R. S. ; COHEN, I. S. ; MCKINNON, D.: Role of the Kv4.3 K<sup>+</sup> channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. In: *Circ. Res.* 79 (1996), S. 659 – 668
- [Doyle et al. 1998] DOYLE, D. A. ; CABRAL, J. M. ; PFUETZNER, R. A. ; KUO, A. ; GULBIS, J. M. ; COHEN, S. L. ; CHAIT, B. T. ; MACKINNON, R.: The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. In: *Science* 280 (1998), S. 69 – 77
- [Eghbali et al. 2002] EGHBALI, M. ; OLCESE, R. ; ZAREI, M. M. ; TORO, L. ; STEFANI, E.: External pore collapse as an inactivation mechanism for Kv4.3 K<sup>+</sup> channels. In: *J. Membr. Biol.* 188 (2002), S. 73 – 86
- [England et al. 1995] ENGLAND, S. K. ; UEBELE, V. N. ; SHEAR, H. ; KODALI, J. ; BENNETT, P. B. ; TAMKUN, M. M.: Characterization of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel beta subunit expressed in human heart. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 92 (1995), S. 6309 – 6313
- [Greenstein et al. 2000] GREENSTEIN, J. L. ; WU, R. ; PO, S. ; TOMASELLI, G. F. ; WINSLOW, R. L.: Role of the calcium-independent transient outward current

- I(to1) in shaping action potential morphology and duration. In: *Circ. Res.* 87 (2000), S. 1026 – 1033
- [Hamill et al. 1981] HAMILL, O. P. ; MARTY, A. ; NEHER, E. ; SAKMANN, B. ; SIGWORTH, F. J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. In: *Pflügers Arch.* 391 (1981), S. 85 – 100
- [Hatano et al. 2002] HATANO, N. ; OHYA, S. ; IMAIZUMI, Y.: Functional interaction between KChIP1 and GFP-fused Kv4.3L co-expressed in HEK293 cells. In: *Pflugers Arch.* 444 (2002), S. 80 – 88
- [Heinemann et al. 1996] HEINEMANN, S. H. ; RETTIG, J. ; GRAACK, H. R. ; O, O. P.: Functional characterization of Kv channel beta-subunits from rat brain. In: *J. Physiol.* 493 (1996), S. 625 – 633
- [Hidalgo und MacKinnon 1995] HIDALGO, P. ; MACKINNON, R.: Revealing the architecture of a K<sup>+</sup> channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. In: *Science* 268 (1995), S. 307 – 310
- [Hille 2001] HILLE, B.: *Ion channels of excitable membranes*. 3. Sunderland, MA : Sinauer Associates, 2001
- [Hoffman et al. 1997] HOFFMAN, D. A. ; MAGEE, J. C. ; COLBERT, C. M. ; JOHNSTON, D.: K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. In: *Nature* 387 (1997), S. 869 – 875
- [Holmgren et al. 1996] HOLMGREN, M. ; JURMAN, M. E. ; YELLEN, G.: N-type inactivation and the S4-S5 region of the Shaker K<sup>+</sup> channel. In: *J. Gen. Physiol.* 108 (1996), S. 195 – 206
- [Holmqvist et al. 2002] HOLMQVIST, M. H. ; J. CAO, R. Hernandez-Pineda ; JACOBSON, M. D. ; CARROLL, K. I. ; SUNG, M. A. ; BETTY, M. ; GE, P. ; GILBRIDE, K. J. ; BROWN, M. E. ; JURMAN, M. E. ; LAWSON, D. ; SILOS-SANTIAGO, I. ; XIE, Y. ; COVARRUBIAS, M. ; RHODES, K. J. ; DISTEFANO, P. S. ; AN, W. F.: Elimination of fast inactivation in Kv4 A-type potassium channels by an auxiliary subunit domain. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002), S. 1035 – 1040

- [Hoshi et al. 1990] HOSHI, T. ; ZAGOTTA, W. N. ; ALDRICH, R. W.: Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. In: *Science* 250 (1990), S. 533 – 538
- [Hoshi et al. 1991] HOSHI, T. ; ZAGOTTA, W. N. ; ALDRICH, R. W.: Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. In: *Neuron* 7 (1991), S. 547 – 556
- [Hoshi et al. 1994] HOSHI, T. ; ZAGOTTA, W. N. ; ALDRICH, R. W.: Shaker potassium channel gating. I: Transitions near the open state. In: *J. Gen. Physiol.* 103 (1994), S. 249 – 278
- [Isacoff et al. 1991] ISACOFF, E. Y. ; JAN, Y. N. ; JAN, L. Y.: Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K<sup>+</sup> channel. In: *Nature* 353 (1991), S. 86 – 90
- [Jerng und Covarrubias 1997] JERNG, H. H. ; COVARRUBIAS, M.: K<sup>+</sup> channel inactivation mediated by the concerted action of the cytoplasmic N- and C-terminal domains. In: *Biophys. J.* 72 (1997), S. 163 – 174
- [Jerng et al. 1999] JERNG, H. H. ; SHAHIDULLAH, M. ; COVARRUBIAS, M.: Inactivation gating of Kv4 potassium channels: molecular interactions involving the inner vestibule of the pore. In: *J. Gen. Physiol.* 113 (1999), S. 641 – 660
- [Jiang et al. 2002] JIANG, Y. ; LEE, A. ; CHEN, J. ; CADENE, M. ; CHAIT, B. T. ; R, R. M.: The open pore conformation of potassium channels. In: *Nature* 417 (2002), S. 523 – 526
- [Johnston et al. 2000] JOHNSTON, D. ; HOFFMAN, D. A. ; MAGEE, J. C. ; POOLOS, N. P. ; WATANABE, S. ; COLBERT, C. M. ; MIGLIORE, M.: Dendritic potassium channels in hippocampal pyramidal neurons. In: *J. Physiol.* 525 (2000), S. 75 – 81
- [Kamb et al. 1988] KAMB, A. ; TSENG-CRANK, J. ; TANOUYE, M. A.: Multiple products of the *Drosophila* Shaker gene may contribute to potassium channel diversity. In: *Neuron* 1 (1988), S. 421 – 430
- [Klemic et al. 1998] KLEMIC, K. G. ; SHIEH, C. C. ; KIRSCH, G. E. ; JONES, S. W.: Inactivation of Kv2.1 potassium channels. In: *Biophys. J.* 74 (1998), S. 1779 – 1789

- [Kobertz et al. 2000] KOBERTZ, W. R. ; WILLIAMS, C. ; MILLER, C.: Hanging gondola structure of the T1 domain in a voltage-gated K(+) channel. In: *Biochemistry* 39 (2000), S. 10347 – 10352
- [Kuo und Bean 1994] KUO, C. C. ; BEAN, B. P.: Na<sup>+</sup> channels must deactivate to recover from inactivation. In: *Neuron* 12 (1994), S. 819 – 829
- [Kuo et al. 2001] KUO, H. C. ; CHENG, C. F. ; CLARK, R. B. ; LIN, J. J. ; LIN, J. L. ; HOSHIJIMA, M. ; NGUYEN-TRAN, V. T. ; GU, Y. ; IKEDA, Y. ; CHU, P. H. ; ROSS, J. ; GILES, W. R. ; CHIEN, K. R.: A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I(to) and confers susceptibility to ventricular tachycardia. In: *Cell* 107 (2001), S. 801 – 813
- [Li et al. 1992] LI, M. ; JAN, Y. N. ; JAN, L. Y.: Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. In: *Science* 257 (1992), S. 1225 – 1230
- [Liss et al. 2001] LISS, B. ; FRANZ, O. ; SEWING, S. ; BRUNS, R. ; NEUHOFFAND, H. ; ROEPER, J.: Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. In: *EMBO J.* 20 (2001), S. 5715 – 5724
- [Lopez-Barneo et al. 1993] LOPEZ-BARNEO, J. ; HOSHI, T. ; HEINEMANN, S. H. ; ALDRICH, R. W.: Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. In: *Receptors Channels* 1 (1993), S. 61 – 71
- [MacKinnon 1991] MACKINNON, R.: Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. In: *Nature* 350 (1991), S. 232 – 235
- [Magee und Johnston 1997] MAGEE, J. C. ; JOHNSTON, D.: A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. In: *Science* 275 (1997), S. 209 – 213
- [Melman et al. 2002] MELMAN, Y. F. ; KRUMMERMAN, A. ; MCDONALD, T. V.: KCNE regulation of KvLQT1 channels: structure-function correlates. In: *Trends. Cardiovasc. Med.* 12 (2002), S. 182 – 187
- [Mitterdorfer und Bean 2002] MITTERDORFER, J. ; BEAN, B. P.: Potassium currents during the action potential of hippocampal CA3 neurons. In: *J. Neurosci.* 22 (2002), S. 10106 – 10115

- [Monod et al. 1965] MONOD, J. ; WYMAN, J. ; CHANGEAUX, P.: On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. In: *J. Mol. Biol.* 12 (1965), S. 88 – 118
- [Murrell-Lagnado und Aldrich 1993] MURRELL-LAGNADO, R. D. ; ALDRICH, R. W.: Interactions of amino terminal domains of Shaker K channels with a pore blocking site studied with synthetic peptides. In: *J. Gen. Physiol.* 102 (1993), S. 949 – 975
- [Nakamura et al. 2001] NAKAMURA, T. Y. ; NANDI, S. ; RUDY, D. J. Pountney M. Artman B. ; COETZEE, W. A.: Different effects of the Ca(2+)-binding protein, KChIP1, on two Kv4 subfamily members, Kv4.1 and Kv4.2. In: *FEBS Lett.* 499 (2001), S. 205 – 209
- [Pak et al. 1991] PAK, M. D. ; BAKER, K. ; COVARRUBIAS, M. ; BUTLER, A. ; RATCLIFFE, A. ; SALKOFF, L.: mShal, a subfamily of A-type K<sup>+</sup> channel cloned from mammalian brain. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1991), S. 4386 – 4390
- [Patel et al. 2002a] PATEL, S. P. ; CAMPBELL, D. L. ; MORALES, M. J. ; STRAUSS, H. C.: Heterogeneous expression of KChIP2 isoforms in the ferret heart. In: *J. Physiol.* 539 (2002), S. 649 – 656
- [Patel et al. 2002b] PATEL, S. P. ; CAMPBELL, D. L. ; STRAUSS, H. C.: Elucidating KChIP effects on Kv4.3 inactivation and recovery kinetics with a minimal KChIP2 isoform. In: *J. Physiol.* 545 (2002), S. 5 – 11
- [Pongs 1999] PONGS, O.: Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. In: *FEBS Lett.* 452 (1999), S. 31 – 35
- [Pongs et al. 1988] PONGS, O. ; KECSKEMETHY, N. ; MULLER, R. ; KRAHJENTGENS, I. ; BAUMANN, A. ; KILTZ, H. H. ; CANAL, I. ; LLAMAZARES, S. ; A, A. F.: Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of Drosophila. In: *EMBO J.* 7 (1988), S. 1087 – 1096
- [Ramakers und Storm 2002] RAMAKERS, G. M. ; STORM, J. F.: A postsynaptic transient K(+) current modulated by arachidonic acid regulates synaptic integration and threshold for LTP induction in hippocampal pyramidal cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002), S. 10144 – 10149

- [Rettig et al. 1994] RETTIG, J. ; HEINEMANN, S. H. ; WUNDER, F. ; LORRA, C. ; PARCEJ, D. N. ; DOLLY, J. O. ; PONGS, O.: Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of beta-subunit. In: *Nature* 369 (1994), S. 289 – 294
- [Ruppersberg et al. 1991] RUPPERSBERG, J. P. ; FRANK, R. ; PONGS, O. ; STOCKER, M.: Cloned neuronal IK(A) channels reopen during recovery from inactivation. In: *Nature* 353 (1991), S. 657 – 660
- [Sala und Matteson 1991] SALA, S. ; MATTESON, D. R.: Voltage-dependent slowing of K channel closing kinetics by Rb<sup>+</sup>. In: *J. Gen. Physiol.* 98 (1991), S. 535
- [Schoppa und Westbrook 1999] SCHOPPA, N. E. ; WESTBROOK, G. L.: Regulation of synaptic timing in the olfactory bulb by an A-type potassium current. In: *Nat. Neurosci.* 2 (1999), S. 1106 – 1113
- [Scott et al. 1994] SCOTT, V. E. ; RETTIG, J. ; PARCEJ, D. N. ; KEEN, J. N. ; FINDLAY, J. B. ; PONGS, O. ; DOLLY, J. O.: Primary structure of a beta subunit of alpha-dendrotoxin-sensitive K<sup>+</sup> channels from bovine brain. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994), S. 1637 – 1641
- [Serodio et al. 1994] SERODIO, P. ; KENTROS, C. ; RUDY, B.: Identification of molecular components of A-type channels activating at subthreshold potentials. In: *J. Neurophysiol.* 72 (1994), S. 1516 – 1529
- [Serodio et al. 1996] SERODIO, P. ; VEGA-SAENZ DE MIERA, E. ; RUDY, B.: Cloning of a novel component of A-type K<sup>+</sup> channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. In: *J. Neurophysiol.* 75 (1996), S. 2174 – 2179
- [Shahidullah und Covarrubias 2003] SHAHIDULLAH, M. ; COVARRUBIAS, M.: The Link between Ion Permeation and Inactivation Gating of Kv4 Potassium Channels. In: *Biophys. J.* 84 (2003), S. 928
- [Shen und Pfaffinger 1995] SHEN, N. V. ; PFAFFINGER, P. J.: Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K<sup>+</sup> channel subunit proteins. In: *Neuron* (1995), S. 625 – 633
- [Sigworth 1994] SIGWORTH, F. J.: Voltage gating of ion channels. In: *Q. Rev. Biophys.* 27 (1994), S. 1 – 40

- [Solc und Aldrich 1990] SOLC, C. K. ; ALDRICH, R. W.: Gating of single non-Shaker A-type potassium channels in larval *Drosophila* neurons. In: *J. Gen. Physiol.* 96 (1990), S. 135 – 165
- [Spreatico et al. 2001] SPREAFICO, F. ; BARSKI, J. J. ; FARINA, C. ; MEYER, M.: Mouse DREAM/calsenilin/KChIP3: gene structure, coding potential, and expression. In: *Mol. Cell. Neurosci.* 17 (2001), S. 1 – 16
- [Steffan 1998] STEFFAN, R.: *Modellierung und Simulation nichtstationärer Stromantworten spannungsabhängiger Ionenkanäle*. Aachen : Shaker, 1998
- [Tempel et al. 1987] TEMPEL, B. L. ; PAPAIZIAN, D. M. ; SCHWARZ, T. L. ; JAN, Y. N. ; JAN, L. Y.: Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. In: *Science* 237 (1987), S. 770 – 775
- [Wang et al. 2002] WANG, S. ; PATEL, S. P. ; QU, Y. ; HUA, P. ; STRAUSS, H. C. ; MORALES, M. J.: Kinetic properties of Kv4.3 and their modulation by KChIP2b. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295 (2002), S. 223 – 229
- [Yellen 1998] YELLEN, G.: The moving parts of voltage-gated ion channels. In: *Q. Rev. Biophys.* 31 (1998), S. 239 – 295
- [Yi et al. 2001] YI, B. A. ; MINOR, D. L. Jr. ; LIN, Y. F. ; JAN, Y. N. ; JAN, L. Y.: Controlling potassium channel activities: Interplay between the membrane and intracellular factors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001), S. 11016 – 11023
- [Yifrach und MacKinnon 2002] YIFRACH, O. ; MACKINNON, R.: Energetics of pore opening in a voltage-gated K(+) channel. In: *Cell* 111 (2002), S. 231 – 239
- [Zagotta et al. 1990] ZAGOTTA, W. N. ; HOSHI, T. ; ALDRICH, R. W.: Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. In: *Science* 250 (1990), S. 568 – 571
- [Zagotta et al. 1994] ZAGOTTA, W. N. ; HOSHI, T. ; DITTMAN, J. ; RW, R. W. A.: Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway. In: *J. Gen. Physiol.* 103 (1994), S. 279 – 319
- [Zhou et al. 2001] ZHOU, M. ; MORAIS-CABRAL, J. H. ; MANN, S. ; MACKINNON, R.: Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. In: *Nature* 411 (2001), S. 657 – 61

[Zhu et al. 1999] ZHU, X. R. ; WULF, A. ; SCHWARZ, M. ; ISBRANDT, D. ; PONGS, O.: Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K<sup>+</sup> current. In: *Receptors Channels* 6 (1999), S. 387 – 400

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde bereits zuvor publiziert:

Bähring, R. ; Boland, L. M. ; Varghese, A. ; Gebauer, M. ; Pongs, O.: Kinetic analysis of open- and closed-state inactivation transitions in human Kv4.2 A-type potassium channels. In: *J. Physiol.* 535, S. 65 - 81

## **Wissenschaftlicher Werdegang**

Grundstudium der Biologie an der Universität Wien mit Schwerpunkt Zoologie von 1993 bis 1996.

Hauptstudium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum mit Schwerpunkt Neurobiologie von 1996 bis 2000. Mitarbeit als studentische Hilfskraft an Forschungsprojekten zur Erregungsphysiologie von Ciliaten in der Arbeitsgruppe für Zelluläre Erregungsphysiologie. Diplomarbeit bei Prof. Hans Machemer über „Bedingungen für den Nachweis von Gravirezeptorpotentialen bei *Paramecium caudatum*“.

Seit Juli 2000 Doktorand am Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg, Institut für Neurale Signalverarbeitung. Promotionsprojekt zur Steuerung von Kv4.2-Kanälen und deren Modulation durch KChIPs bei Prof. Olaf Pongs.

## **Danksagung**

Prof. Olaf Pongs danke ich für die Gelegenheit, in einem technisch optimal ausgestatteten Labor arbeiten zu dürfen. Ich danke auch für manchen hilfreichen Hinweis.

Dr. Robert Bähring danke ich für eine freundliche Aufnahme in seine elektrophysiologische Arbeitsgruppe, für seine beständige Bereitschaft zu immer sehr hilfreichen Gesprächen und für seine engagierte Betreuung meiner Arbeit.

Die untersuchten Klone verdanke ich fast alle Dr. Dirk Isbrandt und Katrin Sauter. Ihre großzügige Unterstützung bildet daher die Basis dieser Arbeit.

Für die Arbeit mit der Klonierung, Präparation und RNA-Synthese von einigen Konstrukten, die nicht in diese Arbeit aufgenommen wurden bin ich Andreas Nolting, Iris Meier und Sabine Wehrmann trotzdem sehr dankbar.

Vielen weiteren Kollegen am Institut für Neurale Signalverarbeitung bin ich dankbar für oft sehr hilfreiche Diskussionen und nicht zuletzt auch für ihre Gesellschaft beim Mittagessen und Kaffee trinken. Insbesondere Britta Callsen, Andreas Nolting, Dr. Mark Punke, Dr. Nicole Schmidt und Vitya Vardanyan danke ich für kompetente und ermutigende Hinweise. Britta Callsen und Andreas Nolting danke ich auch, dass sie einen Teil ihrer Arbeitszeit opferten, um mich in molekularbiologische Arbeitstechniken einzuführen.

Anne Schneider-Darlison und Andrea Zeiser danke ich für ihre Arbeit in der Zellkultur.

Besonderer Dank gebührt meiner Frau Constanze für ihr Verständnis und die Geduld, die sie allen mit meiner Arbeit im Labor verbundenen Schwierigkeiten entgegengebracht hat. Ohne ihre zuverlässige Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.