



Universität Hamburg

Inhibition
spannungsabhängiger Kaliumkanäle
aus *Rattus norvegicus* (John Berkenhout, 1769)
durch einen allosterischen Effektor

Dissertation

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

vorgelegt von

Sönke Hornig

Hamburg, Oktober 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. Olaf Pongs
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr PD Dr. Hartwig Lüthen
Tag der Disputation: 28. August 2009

Hamburg, den 11. August 2009



J. Ganzhorn

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Die Verwendung von biogenen und synthetischen Substanzen in der Strukturanalyse und Entwicklung von pharmakologischen Wirkstoffen.....	1
1.2 Der Kaliumkanal Kv1.3 als potentiell Ziel bei der Behandlung von bestimmten Erkrankungen.....	3
1.3 Struktur und Funktion von spannungsabhängigen Kaliumkanälen.....	4
1.4 Die Funktionsweise des Spannungssensors.....	7
1.5 Aktivierungskinetik, Deaktivierungskinetik und Strom-Spannungs-Beziehung von Kv-Kanälen.....	9
1.6 Bedeutung der Membranlipide für die Kanalaktivität.....	11
1.7 Peptidtoxine als Porenblocker und <i>Gating</i> -Modifizierer.....	12
1.8 Metallionen können sowohl als Porenblocker als auch als <i>Gating</i> -Modifizierer wirken.....	14
1.9 Der Porenblocker Porphyrin-Derivat #3.....	14
1.10 Zielsetzung.....	15
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Die Kaliumkanalblocker Porphyrin-Derivat #3, Antidot, EL1 und EL2.....	16
2.2 Verwendete Klone für die Synthese von cRNA.....	18
2.3 Einfügen einer Punktmutation mit <i>Overlap-PCR</i> und <i>Quick change</i> -PCR.....	19
2.4 Transformation von cDNA in Bakterien des Stammes <i>E. coli</i> XL1-blue.....	20
2.5 Isolierung und Reinigung von cDNA aus <i>E. coli</i> -Kulturen.....	20
2.6 Isolierung und Reinigung von cDNA aus Agarosegelen.....	20
2.7 Sequenzierung der Klone.....	21
2.8 <i>In vitro</i> Transkription für die Synthese von cRNA.....	21
2.9 Gewinnung von <i>Xenopus</i> -Oozyten und cRNA-Injektion.....	22
2.10 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme zum Messen von Ionenströmen in <i>Xenopus</i> -Oozyten.....	23
2.11 Verwendung der <i>Patch-Clamp</i> -Technik für die Applikation von der Membraninnen- (<i>Inside-out</i>) und Membranaußenseite (<i>Outside-out</i>).....	27

3 Ergebnisse.....	30
3.1 Kv1.3-Ströme in <i>Xenopus</i> -Oozyten.....	30
3.2 Applikation von Porphyrin #3 auf Kv1.3-Kaliumkanäle.....	31
3.3 Spannungsabhängigkeit der Kv1.3-Inhibition.....	33
3.4 Konzentrationsabhängigkeit der Kv1.3-Inhibition.....	36
3.5 Untersuchung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.3 vor und nach Applikation von Porphyrin #3.....	40
3.6 Inhibition des <i>Gating</i> stroms von Kv1.3.....	46
3.7 Bindung an den geschlossenen und den geöffneten Kv1.3-Kanal.....	50
3.8 Applikation von Porphyrin von der intrazellulären und extrazellulären Membranseite von Kv1.3 in <i>Inside-out</i> - und <i>Outside-out</i> - <i>Patch-Clamp</i> -Experimenten.....	55
3.9 Beeinflusst die extrazelluläre K^+ -Konzentration die Inhibition des Kv1.3-Stroms?.....	57
3.10 Beeinflusst der Austausch einer einzelnen Aminosäure in der <i>Turret</i> -Region die Inhibition des Kv1.3-Stroms?.....	59
3.11 Wirkung von Porphyrin #3 auf weitere Vertreter der <i>Shaker</i> -Kaliumkanalfamilie.....	60
3.12 Wirkung von Porphyrin #3 auf Mitglieder anderer Kaliumkanalfamilien.....	65
3.13 Beeinflussung der C-Typ-Inaktivierung von Kv1.3 durch Porphyrin #3.....	68
3.14 Beeinflussung der Auswaschgeschwindigkeit von Porphyrin #3 durch Zugabe des Porphyrin-Derivats Antidot.....	72
3.15 Inhibition von Kv1.1 bzw. Kv1.3 durch EL1 bzw. EL2.....	75
3.16 Doppelblockexperimente mit Porphyrin #3 und den Porenblockern TEA ⁺ und KTX.....	78
3.17 Interaktion von Porphyrin #3 mit Membranlipiden: Strukturuntersuchungen.....	80
4 Diskussion.....	85
4.1 Inhibition von Kv1.3 durch Porphyrin #3 im Vergleich mit Porenblockern.....	85
4.2 Inhibition von Kv1.3 durch Porphyrin #3 im Vergleich mit <i>Gating</i> -Modifizierern.....	91

4.3	Inhibition von Kv1.3 durch Porphyrin #3 im Vergleich mit dem Effekt von zwei- und dreiwertigen Metallionen.....	95
4.4	Beeinflussung der Membranlipide durch Interaktion mit Porphyrin #3.....	96
4.5	Beeinflussung der C-Typ-Inaktivierung von Kv1-Kanälen.....	100
4.6	Entwicklung eines Modells für die Interaktion zwischen Porphyrin #3 und spannungsabhängigen Kaliumkanälen.....	101
4.7	Das Antidot bildet einen Komplex mit Porphyrin #3.....	109
4.8	Liefern Porphyrin #3 und Abkömmlinge des Porphyrins Ansätze zur Entwicklung von selektiven Kaliumkanalblockern?.....	110
5 Zusammenfassung.....		114
6 Literaturverzeichnis.....		116
7 Anhang.....		123
7.1	Fachliche Abkürzungen.....	123
7.2	Aminosäurenliste.....	127
7.3	EC ₅₀ -Werte von Blockern der Kv1-Familie.....	128
7.4	Klonkarten.....	129
7.5	Primärsequenz des rKv1.3-Kanals.....	132
8 Danksagung.....		133

1 Einleitung

Spannungsabhängige Ionenkanäle öffnen und schließen als Reaktion auf Änderungen der Membranspannung. Die Eigenschaft ist essentiell für die Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen im Nervensystem (Hille, 2001). Für das Verständnis der Funktionsweise dieser Kanäle und für die Entwicklung von Medikamenten werden Kanalblocker eingesetzt, die z. T. sehr spezifisch und mit hoher Affinität an die Kanäle binden und diese inhibieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion des synthetischen Kaliumkanalblockers Tetraphenylporphyrin #3 mit dem Kaliumkanal Kv1.3 untersucht. Die Experimente sollten Aufschluss über den genauen Inhibitionsmechanismus geben und eine Abschätzung ermöglichen, ob der Blocker bzw. Abkömmlinge des Blockers therapeutisches Potential für die Behandlung von Krankheiten des Nerven- bzw. Immunsystems aufweisen.

1.1 Die Verwendung von biogenen und synthetischen Substanzen in der Strukturanalyse und Entwicklung von pharmakologischen Wirkstoffen

In der Grundlagenforschung besitzen viele Substanzen mit spezifischen Wirkorten wie z. B. biogene Toxine, die aus Giften unterschiedlicher Tier- und Pflanzengruppen isoliert werden, ein großes Potential für die molekularbiologische Strukturanalyse. Das gleiche gilt für synthetische Substanzen, die z. T. gezielt als Liganden für die spezifische Interaktion mit Rezeptormolekülen hergestellt und in großen *Screening*-Verfahren auf ihre Wirksamkeit geprüft werden (McKinney *et al.*, 2000). Ein Ziel der Untersuchungen ist es, Hinweise auf die Funktionsweise von Rezeptormolekülen, wie z.B. von Ionenkanälen, zu erhalten, um deren biophysikalische Eigenschaften zu verstehen (Ahern und Kobertz, 2008). Trotz der Aufklärung der Kristallstrukturen von zahlreichen prokaryotischen und eukaryotischen Ionenkanälen sind die Konformationsänderungen, die beim Übergang vom geschlossenen zum offenen Zustand und umgekehrt durchlaufen werden, weitgehend unbekannt. Liganden können helfen, bestimmte Konformationszustände zu induzieren bzw. einen nativen Übergangszustand des Kanals „einzufrieren“, an den der Ligand präferentiell bindet (Lange *et al.*, 2006; Ader *et al.*, 2008). Neben den Informationen, die hierbei aus den strukturellen Untersuchungen vor allem mit der Röntgenstrukturanalyse und der Kernspin-Magnetresonanz (NMR) gewonnen werden, spielt die funktionelle Analyse mit elektrophysiologischen Methoden bei der Charakterisierung der Interaktion von Ligand und Ionenkanal eine besondere Rolle.

Biogene Toxine haben in der Natur als Verteidigungs- bzw. Beutefangwerkzeug weite Verbreitung gefunden und bieten für die pharmakologische Wirkstoffentwicklung ein nahezu unbegrenztes Forschungspotential (Estrada *et al.*, 2006). Das Spinnengift einer einzelnen Spinnenart kann beispielsweise bis zu 500 verschiedene Peptide enthalten (Escoubas, 2006 und Escoubas *et al.*, 2006). Bei einer geschätzten Anzahl von bis zu 40000 Spinnenarten (Platnick, 2008) ergibt sich eine potentielle Quelle von mehreren Millionen Peptiden mit biologisch aktiver Wirkung. Die Komponenten, die in tierischen und pflanzlichen Giften enthalten sind, haben verschiedene zelluläre Mechanismen als Ziele. So enthalten vor allem Schlangen- und Spinnengifte Enzyme (z.B. Hyaluronidase, Phospholipase, Protease) die ausschließlich abbauende Reaktionen katalysieren (Übersicht bei Mebs, 2000). Neurotoxine aus Schlangengiften greifen das periphere Nervensystem an und blockieren die Erregungsleitung. Zu den Toxinen, die an der postsynaptischen Membran angreifen und beispielsweise den nikotinischen Azetylcholinrezeptor blockieren (Curare-ähnliche Toxine) zählt das Schlangentoxin α -Bungarotoxin, mit dessen Hilfe der Azetylcholinrezeptor identifiziert und charakterisiert wurde (Changeux *et al.*, 1970). Toxine, die an die präsynaptische Membran binden und Ionenkanäle blockieren sind z.B. die Dendrotoxine, die als Teil einer Affinitätschromatographie dafür genutzt wurden, den Kv1.1-Kaliumkanal zu isolieren (Rehm und Lazdunski, 1988). Peptidtoxine vereinen in Bezug auf Nebenwirkungen günstige pharmakologische Eigenschaften zu denen neben der hohen Spezifität, vor allem die hohe Aktivität und die geringe Tendenz sich in Organen anzureichern, zählt (Bogin, 2006). Potentielle therapeutische Anwendungen von Peptidtoxinen finden sich zum Beispiel in der Schmerzbehandlung, in der Behandlung von Herzerkrankungen, neurologischen sowie Autoimmunerkrankungen und Tumorerkrankungen. (Lewis und Garcia, 2003). Es werden sogenannte quantitative Struktur-Aktivitätsbeziehungen (*Quantitative Structure-Activity Relationships* = QSAR) angestellt, so dass über die chemische Synthese von Analoga die pharmakologischen Eigenschaften von Wirkstoffen verbessert und die Anforderungen für die Herstellung eines Medikaments erfüllt werden (Pennington *et al.*, 2009). Prominentes Beispiel für die Herstellung eines Medikaments, das auf die Wirkweise eines Schlangenpeptides zurückzuführen ist, ist Captopril, eine Substanz, die bei der Blutdruckbehandlung zum Einsatz kommt (Ondetti *et al.*, 1977).

1.2 Der Kaliumkanal Kv1.3 als potentiell Ziel bei der Behandlung von bestimmten Erkrankungen

Kaliumkanäle bilden eine große und mannigfaltige Familie von Transmembranproteinen, die an einer Vielzahl von physiologischen Vorgängen beteiligt sind (Coetzee *et al.*, 1999). Sie sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung und Regulierung des Ruhemembranpotentials und spielen durch die Kontrolle der Repolarisationsphase des Aktionspotentials eine Schlüsselrolle für die Erregbarkeit der Zellen (Hille, 2001). Dadurch kommt den Kaliumkanälen eine große pathophysiologische Bedeutung zu, die sich in der therapeutischen Anwendung von Kaliumkanalblockern widerspiegelt. So wird z.B. bei der Behandlung von Typ 2 Diabetes ein ATP-abhängiger Kaliumkanal der pankreatischen β -Zellen mit Sulphonylharnstoff inhibiert (Inagaki *et al.*, 1995). Dofetilid ist ein Wirkstoff, der den Kaliumkanal Kv11.1 inhibiert, bei Vorhofflimmern eingesetzt und als Klasse-III-Antiarrhythmikum eingestuft wird (Wickenden, 2002). Im zentralen Nervensystem werden viele neuronale Prozesse durch Kaliumkanäle reguliert und stellen dadurch für ihre pharmakologische Modulation bei Fehlfunktionen wie z.B. Epilepsie, Demenz, chronischem Schmerz, Depression und Schlaganfall ein potentiell Ziel der Behandlung dar. Der spannungsabhängige Kv1.3-Kanal spielt bei der Proliferation und Interleukin-2 Produktion von aktivierten T-Lymphozyten eine Rolle (Chandy *et al.*, 2004) und wird daher als möglicher therapeutischer Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Immunsuppressiva gehandelt (Koo *et al.*, 1997). Die Applikation des relativ selektiven Kv1.3-Blockers Kalitoxin führte in *in vivo* Experimenten bei der Maus zur Abschwächung der Symptome einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE = Gehirn-, Rückenmarksentzündung), die als Mausmodell für Multiple Sklerose (MS) verwendet wird (Wickenden, 2002). Die unspezifischen Kaliumkanalblocker 4-Aminopyridin (4-AP) und 3,4-Diaminopyridin (3,4-DAP) werden zur Linderung von Symptomen bei MS verwendet, sind aber aufgrund von auftretenden Nebenwirkungen nur begrenzt einsetzbar (Judge und Bever, 2006). Selektive Kv1.3-Blocker stellen nicht nur bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose einen geeigneten Therapieansatz dar, sondern möglicherweise auch bei Type I-Diabetes, Psoriasis und rheumatoider Arthritis (Lewis und Garcia, 2003). Ein selektiver Kv1.3-Blocker mit therapeutischem Potential ist z.B. das pflanzliche PAP-1, das den Kanal mit einem EC_{50} von 2 nM inhibiert und mit dem gute Erfolge im Tierexperiment bei der Behandlung von Psoriasis erzielt wurden (Azam *et al.*, 2007).

1.3 Struktur und Funktion von spannungsabhängigen Kaliumkanälen

Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv) bestehen aus vier zumeist identischen α -Untereinheiten (Homotetramer) (MacKinnon, 1991), die sich aus sechs membrandurchspannenden α -helikalen Segmenten (S1-S6) zusammensetzen (Abb. 1.1 und 1.2). Die Segmente sind über intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. Das Segment drei besteht aus zwei kleinen α -Helices (S3a und S3b). Das Segment vier besitzt besonders viele positiv geladene Aminosäuren (Arg, Lys). Der N-Terminus und der C-Terminus befinden sich intrazellulär. Viele Kaliumkanäle besitzen akzessorische β -Untereinheiten, die die Funktion des Kanals modulieren können, indem sie auf dessen Expression oder Steuerung Einfluss nehmen. Es handelt sich entweder um membranständige oder um zytosolische Proteine, die z. T. Bindungsstellen für Kalziumionen besitzen.

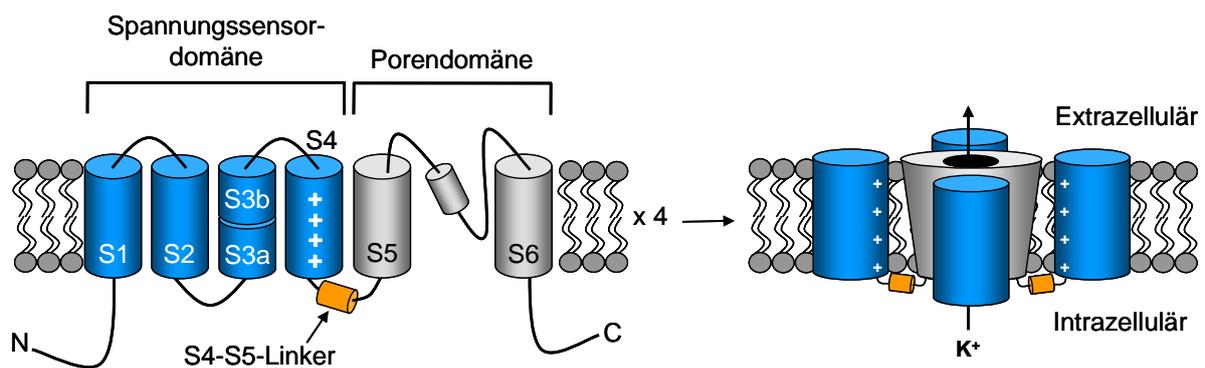


Abb. 1.1: Topologisches Modell und Aufbau von Kv-Kanälen.

α -Untereinheiten von spannungsabhängigen Kaliumkanälen bestehen aus sechs Transmembransegmenten (S1-S6), die über intra- und extrazelluläre Schleifen (S4-S5-Linke in orange) miteinander verbunden sind. Sie bilden Tetramere, die sich funktionell in Spannungssensordomäne (blau) und zentrale Porendomäne (grau) unterteilen lassen. Die Pluszeichen symbolisieren die positiven Ladungen im Spannungssensor.

Funktionell lassen sich die α -Untereinheiten in zwei Domänen gliedern. Die Segmente S1-S4 bilden den Spannungssensor, der auf Änderungen der Spannung innerhalb des elektrischen Feldes reagiert, während die Segmente S5 (äußere Helix) und S6 (innere Helix) die zentrale Pore mit der Porenhelix und dem Selektivitätsfilter bilden (Abb. 1.1 und 1.2 A). Der Selektivitätsfilter (Abb. 1.2 B und C) weist eine für alle Kaliumkanäle charakteristische Signatursequenz auf (Thr-X-Gly-Tyr/Phe-Gly; X steht für eine beliebige Aminosäure), in der die hohe Selektivität für Kaliumionen (selektive Permeabilität $P_{K^+}/P_{Na^+}=10000$) begründet liegt (Doyle *et al.*, 1998).

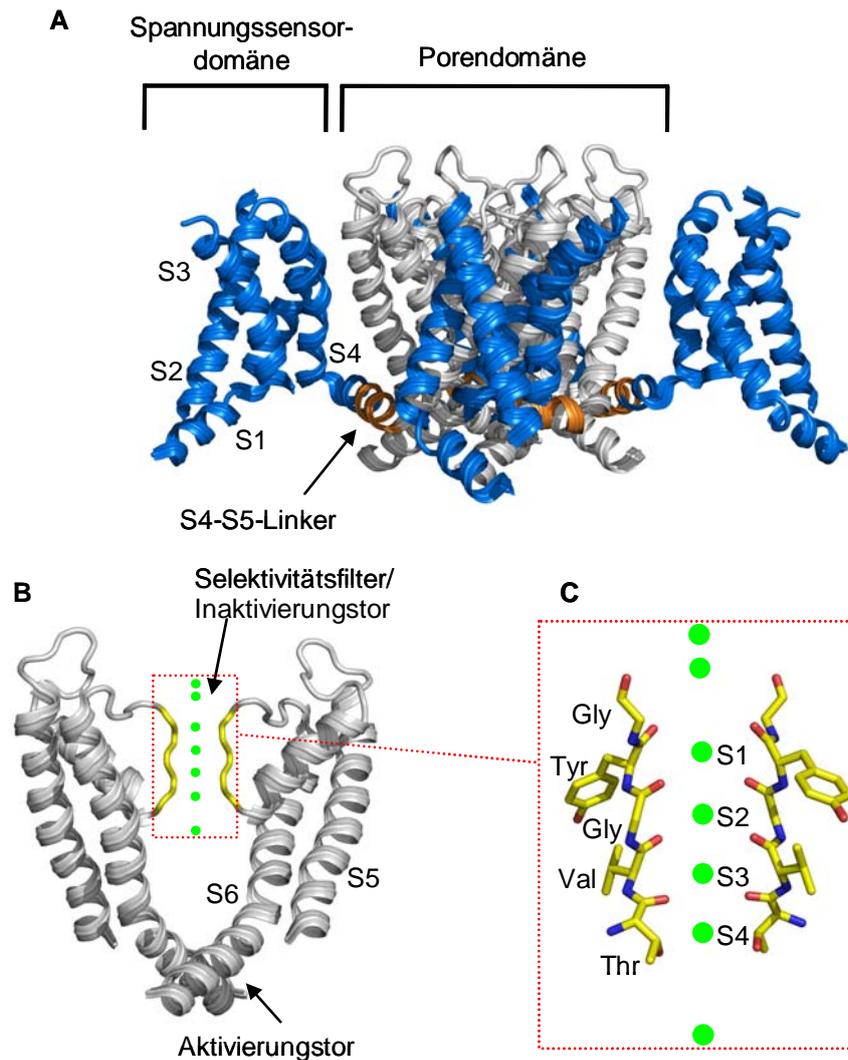


Abb. 1.2: Kristallstruktur-Modell vom Kv1.2-Kanal (Long et al., 2005).

A. Darstellung der α -helikalen Anteile und der Turret-Region von Kv1.2 in Seitenansicht. Die intra- und extrazellulären Verbindungsschleifen sind bis auf den S4-S5-Linker (orange) nicht abgebildet. Die Porendomäne (S5, S6) ist in grau und die Spannungssensordomäne (S1-S4) ist in blau dargestellt.

B. Gleiche Ansicht wie in A. Die vordere und die hintere α -Untereinheit sowie die Spannungssensordomänen der beiden übrigen α -Untereinheiten sind entfernt worden. Der Selektivitätsfilter ist in gelb hervorgehoben und die K^+ -Bindungsstellen sind als grüne Punkte dargestellt.

C. Detaillierte Ansicht des Selektivitätsfilters. Die K^+ -Bindungsstellen sind als grüne Punkte, die Kohlenstoffatome sind in gelb, Stickstoffatome in blau und Sauerstoffatome in rot dargestellt.

Die Porenregion ist über eine intrazelluläre Schleife (S4-S5-Linker) mit dem Spannungssensor verbunden, so dass die aus der Änderung der Membranspannung resultierende Bewegung innerhalb des Spannungssensors zu einem Öffnen (Aktivierung) bzw. Schließen (Deaktivierung) eines Tores führt (*Gate*; alle Vorgänge, die das Öffnen und das Schließen der Tore umfassen, werden als „*Gating*“ bezeichnet), das sich in der intrazellulär gelegenen Hälfte des Kanals innerhalb des sechsten Segmentes befindet. Das Tor entsteht durch Überkreuzen der zytosolischen Enden der Transmembranhelices (*helix bundle crossing*) und wird als Aktivierungstor bezeichnet. Geöffnet wird es über ein Scharnier

(*gating hinge*), das durch das konservierte Sequenzmotiv Pro-X-Pro gebildet wird und oberhalb des *bundle crossings* liegt. Ein zweites Tor, es wird als Inaktivierungstor bezeichnet, befindet sich innerhalb des Selektivitätsfilters, der die schmalste Stelle innerhalb des Kaliumkanals bildet. Hier befinden sich vier Kaliumbindungsstellen (S1-S4), die durch die elektronegativen Karbonylsauerstoffatome der Peptidbindung gebildet werden. Die Bindungsstellen werden präferentiell in den Positionen 1/3 und 2/4 besetzt, wobei Wassermoleküle die jeweils anderen Positionen ausfüllen (Morais-Cabral *et al.*, 2001). Zwei weitere Bindungsstellen für K^+ -Ionen befinden sich oberhalb des Selektivitätsfilters und eine befindet sich in der Höhlung unterhalb des Selektivitätsfilters. Konformationsänderungen innerhalb des Selektivitätsfilters und extrazellulären Regionen (*Turret*) des Kanals führen nach Aktivierung des inneren Tores von einem leitenden Zustand zu einem nicht leitenden Zustand. Dieser Vorgang, der oft mit einem Kollabieren der Pore gleichgesetzt wird, wird als langsame Inaktivierung oder C-Typ-Inaktivierung (Hoshi *et al.*, 1991) bezeichnet. Charakteristisch für diesen Prozess ist, dass er durch hohe extrazelluläre K^+ -Konzentration (Pardo *et al.*, 1992) und den Porenblocker Tetraethylammonium (TEA^+) inhibiert wird (Choi *et al.*, 1991; López-Barneo *et al.*, 1993) und durch permeierende Ionen wie z. B. Rubidiumionen (Rb^+) moduliert werden kann. Die C-Typ-Inaktivierung lässt sich mechanistisch von der schnelleren N-Typ-Inaktivierung unterscheiden, bei der eine N-terminale Inaktivierungsdomäne (*Ball and Chain-Modell*) die Pore von der intrazellulären Seite aus blockiert. Das Aktivierungs- und Inaktivierungstor der Kv-Kanäle und des bakteriellen Kaliumkanals KcsA sind negativ miteinander gekoppelt. So führt die Öffnung des Aktivierungstores zu einem Schließen des Inaktivierungstores (Baukrowitz und Yellen, 1995) und das Schließen des Inaktivierungstores zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des Aktivierungstores (Panyi und Deutsch, 2006). Liganden, die die Pore von außen blockieren, können eine bestimmte Konformation des Inaktivierungstores induzieren bzw. einen Zustand stabilisieren, an dem der Ligand präferentiell bindet. Die leitende Konformation des Selektivitätsfilters in der KcsA-Kv1.3-Chimäre wird durch das Skorpiontoxin Kaliotoxin stabilisiert (Lange *et al.*, 2006), während der synthetische Porenblocker Tetraphenylporphyrin #3 einen Zustand induziert bzw. stabilisiert, der dem des inaktivierten Selektivitätsfilters gleicht (Ader *et al.*, 2008; Zachariae *et al.*, 2008).

Durch die Existenz zweier Tore lassen sich mindestens vier verschiedene Grundzustände annehmen, in denen sich der Kanal befinden kann (Abb. 1.3). Nur einer der vier Zustände ist leitend, während die übrigen drei Zustände keinen Ionenfluss zulassen.

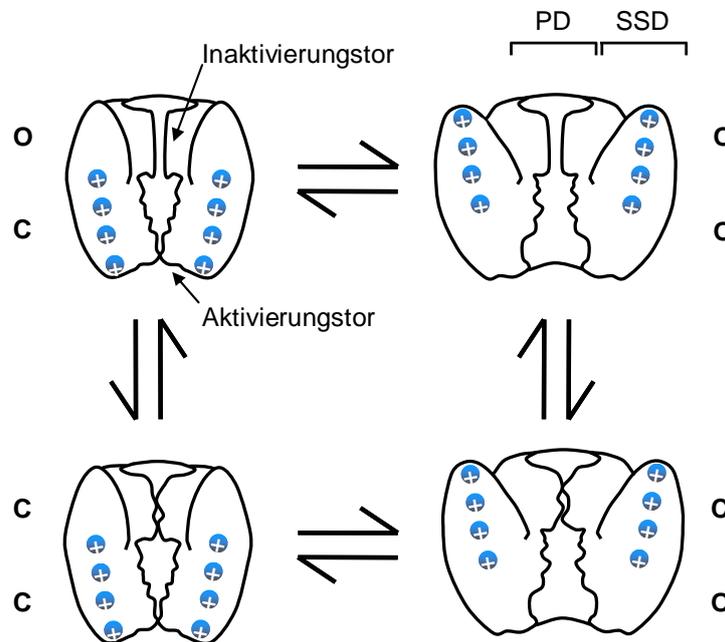


Abb. 1.3: Modell zur Veranschaulichung der Offen- und Geschlossenzustände eines Kv-Kanals. Der Kanal kann bei einem Aktivierungstor und einem Inaktivierungstor mindestens vier unterschiedliche Grundzustände annehmen. Dadurch, dass beide Tore offen (O = *open*) und beide Tore geschlossen (C = *closed*) sein können sowie jeweils eins offen und eins geschlossen, ergibt sich, dass nur einer der vier angenommenen Zustände leitend für K^+ -Ionen ist. (PD = Porendomäne, SSD = Spannungssensordomäne). Die Pluszeichen symbolisieren die positiven Ladungen innerhalb des Spannungssensors. Kanaldarstellung entlehnt aus Judge und Bever (2006).

1.4 Die Funktionsweise des Spannungssensors

Die hydrophoben Anteile der Zellmembran wirken aufgrund ihrer isolierenden Eigenschaften wie das Dielektrikum eines Kondensators, der elektrische Potentiale voneinander trennt und eine Spannung aufrechterhält. Zwischen Membraninnen- und Membranaußenseite entsteht ein elektrisches Feld, das vom Spannungssensor registriert wird. Unterschiede im Membranpotential führen zu Konformationsänderungen innerhalb des Sensors, die über den *S4-S5-Linker* an die Porenregion weitergegeben werden, so dass sich der Kanal öffnet bzw. schließt (Long *et al.*, 2005a und 2005b; Ferrer *et al.*, 2006). Bei einer Veränderung der Membranspannung von negativeren zu positiveren Potentialen spricht man von Depolarisation, bei einer Änderung von positiveren zu negativeren Potentialen von Hyperpolarisation.

Beim Spannungssensor handelt es sich um eine weitgehend unabhängige Domäne, die außer in Ionenkanälen als Homolog in einer spannungsabhängigen Phosphatase (Ci-VSP, Murata *et al.*, 2005) und in einem spannungsabhängigen Protonenkanal (Hv-Kanal, Sasaki *et al.*, 2006; Ramsey *et al.*, 2006) vorkommt. Obgleich die Kristallstruktur von drei spannungsabhängigen Kaliumkanälen (KvAP aus *Aeropyrum pernix*, Archaea, Kv1.2 aus *Rattus norvegicus*, Eucaryota und einer Chimäre aus Kv1.2 und Kv2.1) gelöst wurde und computerbasierte Modelle von Kv-Kanälen (Yarov-Yarovoy *et al.*, 2006) existieren, wird die Funktionsweise des Spannungssensors in der Literatur weiterhin kontrovers diskutiert (Abb. 1.4).

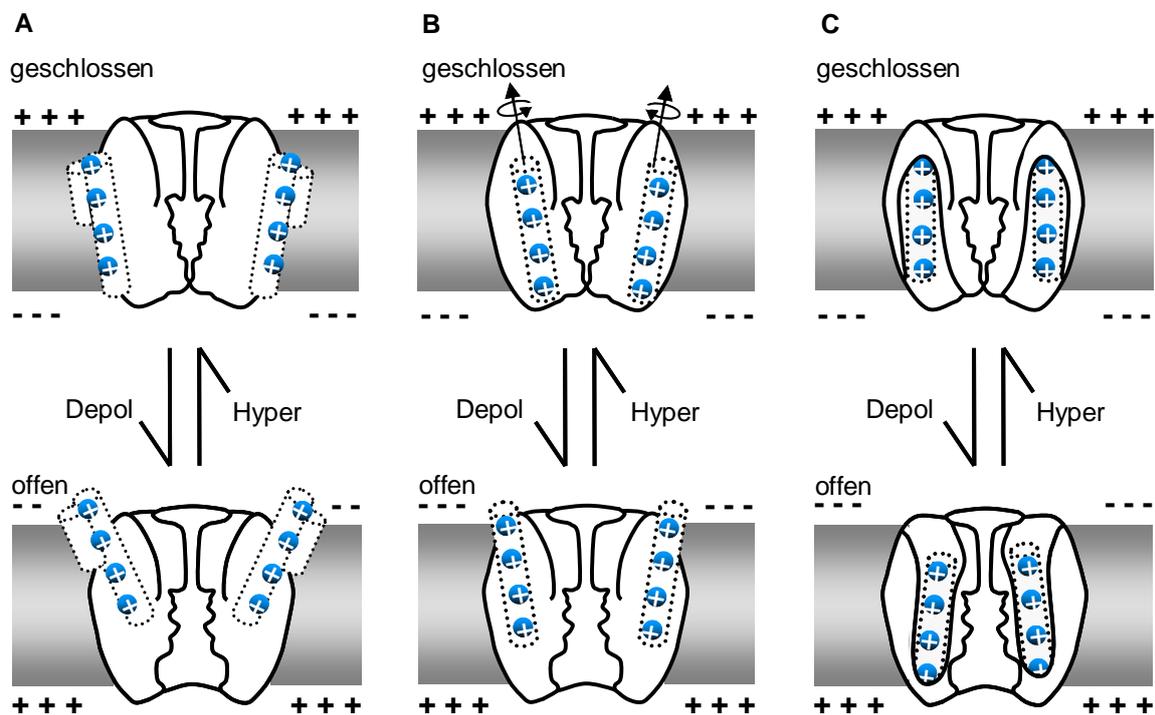


Abb. 1.4: Modelle zur Funktionsweise des Spannungssensors (verändert nach Tombola, 2006).
 A. *Paddel-Modell*: Die positiven Ladungen in S4 befinden sich in der Peripherie des Kanals und sind den Lipiden der Membran exponiert. S4 macht zusammen mit Teilen von S3 bei Depolarisation bzw. Hyperpolarisation eine große Bewegung.
 B. *Helical Screw-Modell*: Positive Ladungen in S4 werden nach Depolarisation (Depol) in schraubenförmiger Bewegung nach außen transportiert. Nach Hyperpolarisation (Hyper) bewegt sich S4 wieder in die Ausgangsposition zurück.
 C. *Transporter-Modell*: In der geschlossenen Position sind die positiven Ladungen in Wasser gefüllten Spalten mit dem Zytosol verbunden. In der offenen Position sind die positiven Ladungen durch Konformationsänderungen über andere Spalten mit dem extrazellulären Medium verbunden. Es gibt nur eine geringe Rotation und Positionsveränderung von S4.

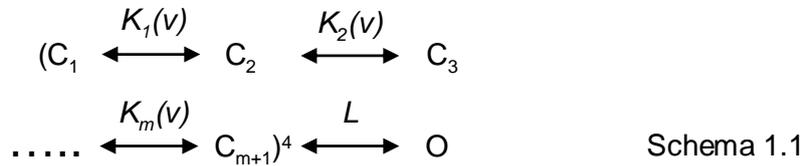
Nach einem von Roderick MacKinnon (Jiang *et al.*, 2003a; Jiang *et al.*, 2003b; Long *et al.*, 2007; Tao und MacKinnon, 2008) vorgeschlagenen Modell, das vor allem aus den Kristallstrukturen abgeleitet wurde, findet die Bewegung des Spannungssensors hauptsächlich innerhalb der den Kanal umgebenden Phospholipide statt (*Paddel-Modell*). Dagegen spielen sich die Sensorbewegungen in dem *Helical Screw-Modell* (Caterall *et al.*, 1986; Durell und

Guy, 1992; Durell *et al.*, 2004, Broomand und Elinder, 2008) und in dem *Transporter*-Modell (Bezanilla, 2002; Starace and Bezanilla, 2004; Chanda *et al.*, 2005) in einer von Membranlipiden getrennten Proteinumgebung ab (Übersicht bei Tombola *et al.*, 2006; Börjesson und Elinder, 2008; Swartz, 2008). In allen Modellen ist das Transmembransegment vier an den Konformationsänderungen des Spannungssensors wesentlich beteiligt. Im *Paddel*-Modell ist zusätzlich ein Teil von Segment drei (S3b) an die Bewegungen von S4 gebunden. Durch die Konformationsänderungen innerhalb des Sensors kommt es zur Verlagerung der positiven Ladungen im elektrischen Feld, die als schwacher elektrischer Strom erkennbar wird. Dieser transiente Strom wird als *Gating*strom bezeichnet und geht dem eigentlichen Ionenstrom voraus (*On-Gating* = Verlagerung der Ladungen nach außen, Depolarisation) bzw. folgt diesem (*Off-Gating* = Verlagerung der Ladungen nach innen, Hyperpolarisation). Die *Gating*ströme sind ein wichtiger Parameter bei der Analyse der Bewegungen des Spannungssensors und haben eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Modellen zur Aktivierungskinetik gespielt. So lassen Messungen des Ionenstroms ausschließlich eine Betrachtung des offenen Kanals zu, während die *Gating*ströme auch Einblicke in die Übergänge zwischen verschiedenen Geschlossenzuständen ermöglichen. Es gilt heute als gesichert, dass die Aktivierung eine Vielzahl von Sensorbewegungen (drei Zustände für jede der vier Untereinheiten) beinhaltet. Bei den ersten, stark spannungsabhängigen Bewegungen agieren die Untereinheiten unabhängig voneinander und tragen zu einer großen Ladungsverschiebung bei. Die späteren Schritte sind durch kleine Ladungsverschiebungen, eine geringere Spannungsabhängigkeit und eine hohe Kooperativität zwischen den Untereinheiten gekennzeichnet (Zagotta *et al.*, 1994).

1.5 Aktivierungskinetik, Deaktivierungskinetik und Strom-Spannungs-Beziehung von Kv-Kanälen

Beim Ruhemembranpotential (ca. -70 mV) befinden sich die meisten spannungsabhängigen Kaliumkanäle in einem geschlossenen Zustand. Eine Veränderung der Membranspannung zu positiveren Potentialen führt nach Erreichen einer Schwelle zur Aktivierung der Kanäle, die sich bei stärkeren Spannungssprüngen beschleunigt. Die Aktivierungskinetik des Ionenflusses zeigt zu Beginn eine kleine Verzögerung, die sich in einem sigmoiden Kurvenverlauf (Abb. 1.5 A, kleines Fenster) widerspiegelt. Die Verzögerung wird auf das Durchlaufen von mehreren geschlossenen Zuständen vor einem finalen Öffnungsschritt erklärt (Zagotta *et al.*, 1994). Bei den ersten, stark spannungsabhängigen Konformationsänderungen bewegen sich

die vier Untereinheiten unabhängig voneinander bis sie einen Zustand erreichen, der als geschlossen-aktiviert bezeichnet wird. Aus diesem geschlossen-aktivierten Zustand folgt ein schwach spannungsabhängiger Öffnungsschritt, der durch eine hohe Kooperativität der Untereinheiten gekennzeichnet ist (Schema 1.1; aus Yifrach und MacKinnon, 2002).



Der spannungsabhängige Übergang von C_1 nach C_{m+1} wird durch die Gleichgewichtskonstanten $K_1(V)$ bis $K_m(V)$ beschrieben und der konzertierte Öffnungsschritt, der mit den Bewegungen des Aktivierungstores in S6 verbunden ist, durch die Gleichgewichtskonstante L .

Nach Rückkehr zum Ruhemembranpotential schließen die Kanäle wieder. Unter geeigneten Messbedingungen lässt sich die Deaktivierung als sogenannter *Tailstrom* (*tail* = Schweif) messen, der einem einfach exponentiellen Kurvenverlauf folgt (Abb. 1.5 A).

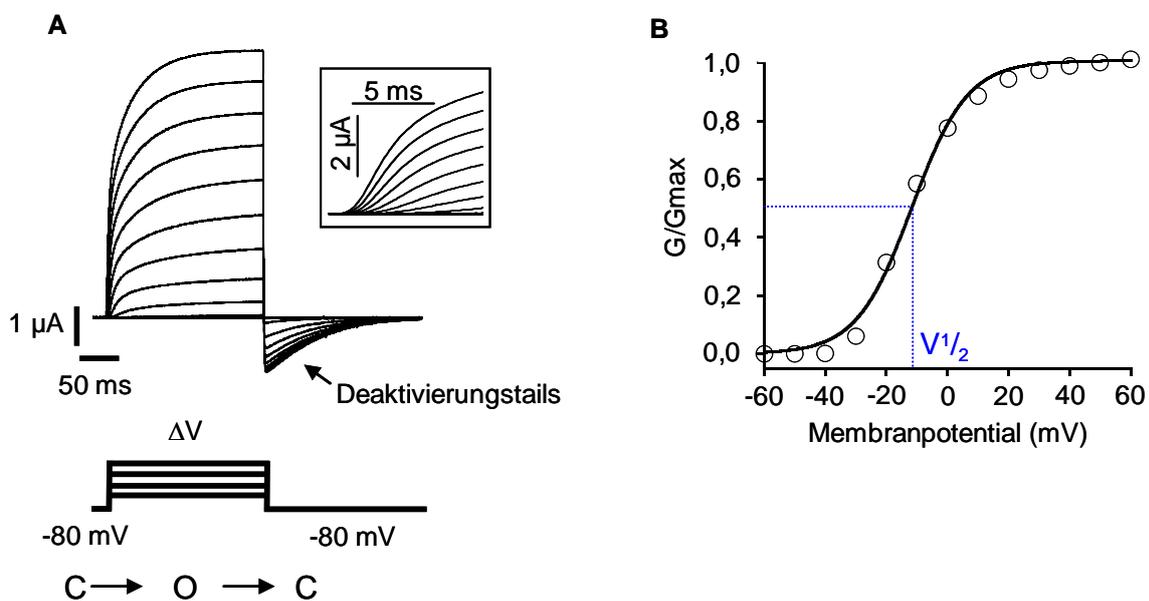


Abb. 1.5: Exemplarische Stromspuren mit Aktivierungs- und Deaktivierungsphase und Darstellung der spannungsabhängigen Leitfähigkeit in einer GV-Kurve.

A. Nach Depolarisation von einem Haltepotential von -80 mV öffnen (O = *open*) die Kanäle in Abhängigkeit der Depolarisationsstärke und schließen (C = *closed*) nach Rückkehr zu -80 mV wieder. Der Schließvorgang kann als Deaktivierungstails mit einem einfach exponentiellen Kurvenverlauf beschrieben werden. Die Aktivierungskinetik zeigt einen sigmoiden Kurvenverlauf, der erst bei genauerer Betrachtung des Aktivierungsbeginns deutlich wird (kleines Fenster).

B. Darstellung der normalisierten Leitfähigkeit in einer GV-Kurve. Die *Tail*stromamplituden wurden als Funktion des vorhergehenden Testpotentials aufgetragen und normalisiert. $V_{1/2}$ ist die Spannung der halbmaximalen Aktivierung. Die durchgezogene Linie zeigt einen Fit mit der Boltzmann-Gleichung.

Die *Tail*ströme repräsentieren die Anzahl der geöffneten Kanäle bei einer bestimmten Depolarisationsstärke und können für die Erstellung einer Strom-Spannungskurve (IV-Kurve) herangezogen werden. Durch Normalisierung der Ströme erhält man den Anteil der offenen Kanäle, der die spannungsabhängige Leitfähigkeit widerspiegelt (GV, Abb. 1.5 B). Zwei grundlegende Parameter können aus der spannungsabhängigen Leitfähigkeit unter Zuhilfenahme der Boltzmann-Gleichung (Gleichung 1.2) ermittelt werden: Die Spannung der halbmaximalen Aktivierung ($V_{1/2}$) und die Steilheit der halbmaximalen Aktivierung (z-Wert), die durch die Anzahl der im elektrischen Feld verschobenen Ladungen bestimmt wird.

$$\frac{O}{O+C} = P_O = \frac{1}{1 + \exp[-zF(V-V_{1/2})/RT]} \quad \text{Gleichung 1.1}$$

$O/O+C$ ist der Anteil der offenen Kanäle, P_O ist die relative Offenwahrscheinlichkeit, z die Anzahl der bewegten Ladungen in der spannungssensitiven Region, F die Faraday-Konstante, V die Spannung, $V_{1/2}$ die Spannung bei der halbmaximalen Aktivierung, R die Gas-Konstante, T die Temperatur in Kelvin. Die Boltzmann-Gleichung zeigt in einem linearen Plot der relativen Offenwahrscheinlichkeit gegen die Spannung einen sigmoiden Kurvenverlauf, wobei die Steilheit des P_O/V -Verhältnisses mit höheren z -Werten zunimmt (Übersicht bei Hille, 2001).

1.6 Bedeutung der Membranlipide für die Kanalaktivität

Bei der Betrachtung der Bedeutung von Membranlipiden für die Aktivität von Kaliumkanälen muss zwischen einer generellen und einer spezifischen Interaktion unterschieden werden (Popot und Engelman, 2000). Bei der generellen Interaktion handelt es sich um eine Wechselwirkung, die aus der membranös-wässrigen Umgebung resultiert. Sie kommt dadurch zustande, dass die amphiphilen Phospholipide eine Doppelmembran bilden, bei der die hydrophilen Kopfgruppen nach außen weisen und die hydrophoben Seitenketten einen hydrophoben Kern bilden. Die Transmembranhelices der integralen Kanäle bestehen dementsprechend hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren. Die generelle Interaktion ist notwendig für die Stabilität der meisten integralen Membranproteine und übernimmt eine Gerüstfunktion. Die spezifische Interaktion bezieht sich auf die enge Verbindung von bestimmten Lipiden, die an das Membranprotein binden wie der Kofaktor an das Enzym. Das wurde vor allem für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat gezeigt, das sich auf der inneren Membranseite befindet und für die Aktivität vieler Ionenkanäle eine wichtige Rolle spielt

(Übersicht bei Suh und Hille, 2008). Der erste Kaliumkanal, für den eine spezifische Interaktion mit Lipiden in der Kristallstruktur gezeigt werden konnte, ist der einfach gebaute Kaliumkanal KcsA, der keine Spannungssensordomäne aufweist (Valiyaveetil *et al.*, 2002). Long *et al.* (2007) präsentierten zum ersten Mal die Kristallstruktur eines spannungsabhängigen Ionenkanals in einer Lipidzusammensetzung, die der Membranumgebung gleicht. Sie zeigten an welchen Stellen des Kanals Phospholipide binden und wie diese zur Stabilität des Proteins beitragen. Schmidt *et al.* (2006) zeigten, dass die spannungsabhängige Aktivität von KvAP (Jiang *et al.*, 2003a) abhängig von der Ladung der Kopfgruppe der umgebenen Phospholipide ist. Sie folgerten aus Aktivitätsänderungen des Kanals nach Wechsel der Phospholipidzusammensetzung, dass die positiven Ladungen im Spannungssensor (*Paddel*-Modell) eine Wechselwirkung mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Lipide eingehen, die die Sensorbewegungen begünstigt. Die Bedeutung der Kopfgruppen bestätigten elektrophysiologische Experimente von Ramu *et al.* (2006) und Xu *et al.* (2008), die nach Applikation von Sphingomyelinase C bzw. D (SMase C, D) auf Kv2.1 die Aktivierung des Kanals (SMase D) bzw. Inhibition des Kanals (SMase C) beobachteten. Die beiden Enzyme spalten Sphingomyelin auf die Weise, dass bei SMase D das negativ geladene Ceramid-1-Phosphat in der Membran verbleibt, während das bei SMase C nicht der Fall ist. Die Applikation von SMase C führt neben der Inhibition des Ionenstroms auch zu einer Inhibition des *Gating*stroms von Kv2.1. Xu und Kollegen (2008) schlossen daraus, dass nach der Entfernung der negativen Ladungen die Interaktion mit den positiven Ladungen des Spannungssensors unterbunden wird und der Sensor die zur Öffnung des Kanals notwendigen Konformationsänderungen nicht mehr durchführen kann.

1.7 Peptidtoxine als Porenblocker und *Gating*-Modifizierer

Neben zahlreichen synthetischen Verbindungen wie z. B. 4-Aminopyridin sind Peptidtoxine aus Gifttieren, quaternäre Ammoniumionen (TEA^+ , TBA^+) und bivalente Ionen (z.B. Mg^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+}) auf unterschiedlichste Art und Weise in der Lage, den Kaliumfluss durch Kaliumkanäle zu inhibieren. Von einer Vielzahl von Peptidtoxinen, die aus den Giften von Schlangen und Wirbellosen wie Skorpionen, Spinnen, Kegelschnecken und Seeanemonen isoliert wurden, ist bekannt, dass sie spannungsabhängige Kaliumkanäle mit einer sehr hohen Affinität blockieren können. Die Toxine bestehen aus 22-60 Aminosäuren, besitzen eine kompakte, kugelige Gestalt und werden durch zwei bis fünf Disulfidbrücken stabilisiert

(Übersicht bei Mouhat *et al.*, 2004). Peptidtoxine, die Ionenkanäle inhibieren, können aufgrund ihres Wirkmechanismus in zwei Gruppen eingeteilt werden.

Die Mitglieder der ersten Gruppe binden an externe Porenregionen, behindern direkt den Durchfluss der Ionen durch den Kanal und werden als Porenblocker bezeichnet. Sie inhibieren den Kanal mit einer Stöchiometrie von 1:1. Gut untersuchte Beispiele für die bimolekulare Interaktion sind die Skorpiontoxine Agitoxin (ATX), Hongotoxin (HgTX) und Kaliotoxin (KTX), die mit picomolarer Affinität an ihren Rezeptor binden (Garcia *et al.*, 1994; Grissmer *et al.* 1994; Koschak *et al.*, 1998). Die Bindung der genannten Toxine ist in der Regel spannungsunabhängig und die Toxine zeigen zumeist keine Bindungspräferenz für den geöffneten oder geschlossenen Kanal (Lange *et al.*, 2006). Dass aber für bestimmte Porenblocker die Spannung und/ oder die intrazelluläre Konzentration an K^+ -Ionen Einfluss auf die Bindung nehmen kann, wurde für einige Toxine gezeigt. Eine Spannungsabhängigkeit zeigt sich besonders dann, wenn der Blocker in das elektrische Feld eindringt (Woodhull, 1973), oder wenn, wie im Fall von Charybdotoxin (CTX) K^+ -Ionen die Bindung des Toxins an die Pore destabilisieren (MacKinnon und Miller, 1988; Goldstein und Miller, 1993). Terlau *et al.* (1999) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Bindung des Kegelschneckentoxins κ -Conotoxin PVIIA (κ -PVIIA) im großen Maße vom Zustand des Kanals (leitend oder nicht leitend) abhängt. Bis auf wenige Ausnahmen (Srinivasan *et al.*, 2002) beeinflussen Poren blockierende Toxine die Aktivierungs- und Deaktivierungseigenschaften nicht.

Bei der zweiten Gruppe der Kanal inhibierenden Peptidtoxine handelt es sich um die *Gating*-Modifizierer. Sie blockieren nicht den Porenausgang, sondern inhibieren den Kanal, indem sie an den Spannungssensor binden und Einfluss auf dessen Bewegungen beim Öffnen und beim Schließen nehmen. Zu diesen Toxinen zählen vor allem die Vogelspinnentoxine *Voltage sensing toxin 1* (VsTX1) und Hanatoxin (HaTX). Für Hanatoxin konnten Swartz und MacKinnon (1997) über die Analyse der Deaktivierungskinetik zeigen, dass der inhibierte Kanal trotz gebundenen Toxins öffnen kann. Die erforderliche Energie, die zum Öffnen benötigt wird, ist allerdings größer, so dass sich die Aktivierungsschwelle des Kanals in Richtung positiverer Potentiale verschiebt. Hanatoxin stabilisiert durch Bindung an den Kanal einen der Geschlossenzustände, was zu einer Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik führt. Während sich die Öffnungskinetik nach Zugabe des Toxins verlangsamt, zeigt der Schließvorgang des Kanals nach Toxinapplikation eine Beschleunigung. Im Gegensatz zu den Poren bindenden Toxinen, binden *Gating*-Modifizierer mit einer Stöchiometrie von 4:1, ein Toxinmolekül an jeden Spannungssensor.

1.8 Metallionen können sowohl als Porenblocker als auch als Gating-Modifizierer wirken

Von einer ganzen Reihe ein-, zwei- und dreiwertiger Metallionen (Cs^+ , Li^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} sowie La^{3+} und Gd^{3+}) ist bekannt, dass sie spannungsabhängige Ionenkanäle inhibieren können (Übersicht bei Elinder und Århem, 2004). Zur Erklärung des Mechanismus sind mehrere Modelle entwickelt worden, die sowohl die Blockade der Pore als auch die Inhibierung des Spannungssensors einbeziehen. Der Porenblock durch Metallionen ist für Ba^{2+} , Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen beschrieben worden. Intrazelluläres Mg^{2+} beispielsweise inhibiert den ATP-abhängigen Kaliumkanal dadurch, dass es die Offenwahrscheinlichkeit reduziert und den Kanal von der intrazellulären Seite spannungsabhängig inhibiert (Davies *et al.*, 1996). Neben dem Porenblock inhibieren Metallionen Ionenkanäle, indem sie sich von außen an den Kanal anlagern, die Oberflächenladungen und das elektrische Feld verändern (*Surface Charge-Modell*). Hierbei werden geladene Aminosäuren des Kanals oder die Kopfgruppen der Membranlipide, die normalerweise an der Öffnung des Kanals mit Aminosäuren des Spannungssensors beteiligt sind, durch die Metallionen abgeschirmt. Dieser elektrostatische Effekt führt zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve in Richtung positiverer Potentiale und die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals ändert sich. Für bestimmte Metallionen (La^{3+} und Gd^{3+}) wird ein Inhibitionsmechanismus postuliert, ähnlich dem, der für die Vogelspinnentoxine beschrieben wurde: Die Metallionen binden an den Spannungssensor und führen zu einer mechanischen Inhibierung dessen Bewegungen.

1.9 Der Porenblocker Porphyrin-Derivat #3

Porphyrene (nach griech. *porphyra* = purpur) sind organische Farbstoffe, die aus vier Pyrrol-Ringen (Tetrapyrrol) bestehen und durch vier Methin-Gruppen zyklisch miteinander verbunden sind. Der einfachste Vertreter ist Porphin. Durch das Anfügen von unterschiedlich langen und verschieden geladenen chemischen Gruppen lassen sich die Eigenschaften der Porphyrene verändern. Gradl *et al.* (2003) konnten in Bindungsstudien zeigen, dass das Tetraphenylporphyrin-Derivat #3 (Porphyrin #3, Porphyrin) den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3 inhibiert und mit dem Porenblocker Hongotoxin um die Bindung kompetiert. Hinweise über die Funktionsweise der Inhibition durch Porphyrin #3 lieferten Ader *et al.* (2008), die in Strukturuntersuchungen an Porphyrin #3 und der Kaliumkanal-Chimäre KcsA-Kv1.3 in Proteoliposomen mittels Festkörper-NMR zeigten, dass das vierfach-

symmetrische Molekül mit einem der Seitenarme tief in den Selektivitätsfilter eindringt (Abb. 1.6). Die strukturellen Veränderungen, die nach Porphyrinbindung für den Selektivitätsfilter zu beobachten sind, gleichen den Veränderungen, wie sie auch nach Übergang in den inaktivierten Zustand zu beobachten sind.

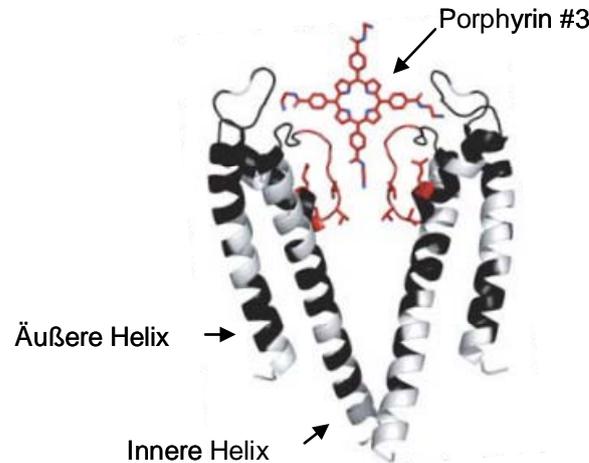


Abb. 1.6: NMR-Struktur-Modell der Interaktion von KcsA-Kv1.3 mit dem Tetraphenylporphyrin-Derivat #3 (Ader *et al.*, 2008).

Bei der Bindung von Porphyrin #3 dringt einer der vier Seitenarme tief in den Selektivitätsfilter ein. Der beobachtete Konformationszustand nach der Bindung ähnelt dem Zustand der Pore nach Übergang in den inaktivierten Zustand. Die vordere und hintere Untereinheit des Tetramers sind in der Darstellung entfernt worden.

1.10 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion des synthetischen Kaliumkanalblockers Tetraphenylporphyrin-Derivat #3 (Gradl *et al.*, 2003) mit dem spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3 (Kv1-Familie) mit elektrophysiologischen Methoden zu untersuchen. Unter Einbeziehung der NMR-Strukturdaten, die bei der Untersuchung der KcsA-Kv1.3-Chimäre gewonnen wurden und durch Vergleiche mit den Inhibitionseigenschaften anderer Kaliumkanalblocker, sollte der Mechanismus aufgeklärt werden, mit dem Porphyrin #3 spannungsabhängige Kaliumkanäle blockiert. Zudem sollten Porphyrin #3 und chemische Abkömmlinge des Porphyrins auf ihre Selektivität untersucht werden. Die Ergebnisse sollten zu einer Abschätzung führen, ob sich Porphyrin #3 oder seine chemischen Abkömmlinge für die Entwicklung von therapeutischen Wirkstoffen eignen.

2 Material und Methoden

Alle in der Arbeit genannten Chemikalien, mit Ausnahme der verwendeten Kanalblocker Kaliotoxin, Porphyrin #3, Antidot, EL1 und EL2, wurden bei der Firma Sigma-Aldrich (St. Luis, USA) in der Qualität *pro analysi* bezogen. Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) geliefert. Die DNA-Oligonukleotide stammten von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg). Das Skorpionotoxin Kaliotoxin wurde von Karin Giller im Labor von Stefan Becker am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie der Universität Göttingen synthetisiert.

2.1 Die Kaliumkanalblocker Porphyrin-Derivat #3, Antidot, EL1 und EL2

Das kationische Porphyrin-Derivat #3 (Abb. 2.1) wurde von Stefan Gradl an der Universität von Californien (Berkeley, USA) im Labor von Dirk Trauner synthetisiert. Als Basis für die Synthese diente ein Tetraphenylporphyrin-Gerüst, an dessen vier Seitenarme je ein Ethylendiamin (Ethan-1,2-diamin) angefügt wurde. Dadurch weist Porphyrin #3 partielle positive Ladungen an den Seitenketten auf.

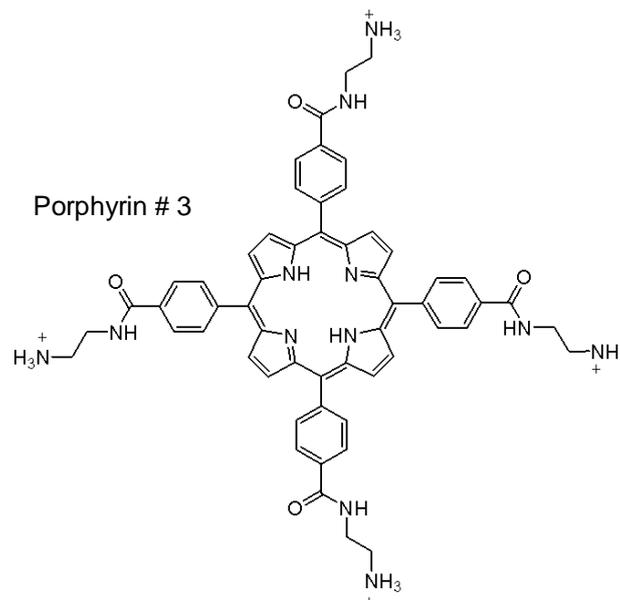


Abb. 2.1: Strukturformel des Porphyrin-Derivats #3.

Porphyrin #3 ist ein Mitglied innerhalb einer Gruppe von vielen weiteren synthetischen Porphyrin-Derivaten, die sich aufgrund der Seitenketten unterscheiden lassen (Gradl *et al.*, 2003). Es handelt sich um starre aromatische Moleküle, die einen stark hydrophoben Kern

aufweisen. Porphyrin #3 hat einen Gesamtdurchmesser von ca. 25 Å, ein Molekulargewicht von 1178 Da und ist schlecht wasserlöslich. Die Stocklösungen (100 µL) von 1 mM wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt und bei -80 °C gefroren. Das dunkelgrüne Pulver veränderte beim Lösen die Farbe und erschien dann dunkelrot. Es zeichnet sich durch eine starke Eigenfluoreszenz aus und ist lichtempfindlich. Für die Experimente wurden Konzentrationen zwischen 0,01 µM und 1 µM eingesetzt. In Konkurrenzexperimenten mit dem radioaktiv markiertem Porenblocker Hongotoxin und in elektrophysiologischen Experimenten mit *Xenopus*-Oozyten konnte gezeigt werden, dass Porphyrin #3 an den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3 bindet und diesen inhibiert (Gradl *et al.*, 2003). Ader *et al.* (2008) zeigten in der NMR-Strukturanalyse, dass Porphyrin #3 an der KcsA-Kv1.3-Chimäre bindet, indem es mit einem der Seitenarme tief in die Pore eindringt. Ein weiteres Porphyrin-Derivat ist das anionische Antidot, bei dem eine Aminogruppe des Ethylendiamin durch eine Karboxylgruppe ersetzt wurde. Dadurch weist es im Gegensatz zu Porphyrin #3 keine positive Ladung an den Seitenketten auf, sondern ist partiell negativ geladen.

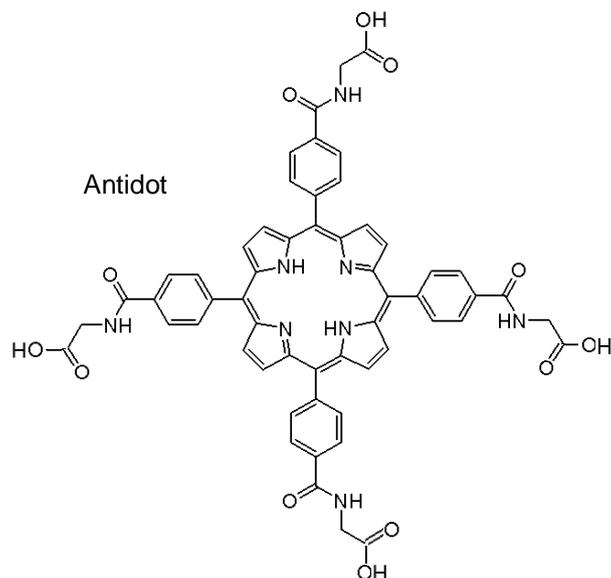


Abb. 2.2: Strukturformel des Porphyrin-Derivats Antidot.

Das Antidot hat ein Molekulargewicht von 1060 Da und ist schlecht wasserlöslich. Es wurden Stocklösungen (100 µL) von 1 mM in DMSO angesetzt, die bei -80 °C eingefroren wurden. Die Konzentrationen, die für die Experimente eingesetzt wurden, lagen zwischen 0,01 µM und 0,8 µM. Im Gegensatz zu Porphyrin #3 hat es keinen inhibitorischen Effekt auf Kv1.3 (Gradl *et al.*, 2003).

Abgeleitet von den Seitenketten des Porphyrins #3 wurden von Erica Lauterwasser (Berkeley, USA) weitere Verbindungen synthetisiert (Abb. 2.3), die in Inhibitionsexperimenten eingesetzt wurden. Sie wurden als EL1 und EL2 bezeichnet, weisen eine T-förmige Gestalt auf und besitzen im Gegensatz zu Porphyrin #3 nur noch eine putative Bindungsstelle.

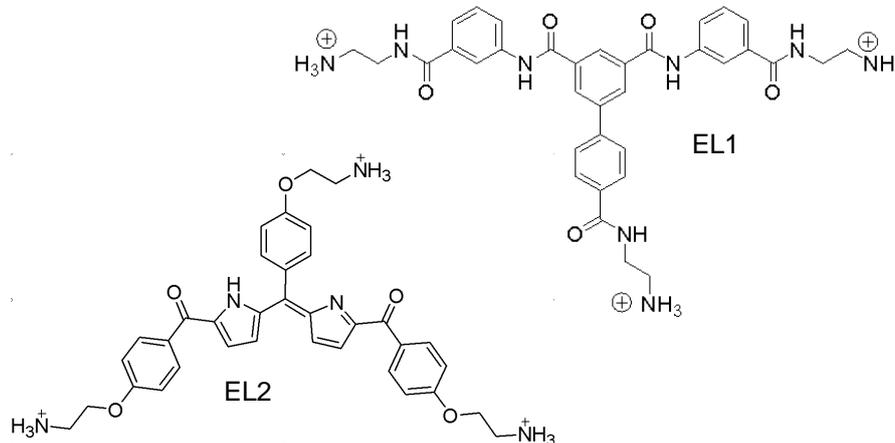


Abb. 2.3: Strukturformeln von EL1 und EL2.

EL 1 hat ein Molekulargewicht von 760 Da, ist schlecht wasserlöslich und wurde in einer Konzentration von 5 μM eingesetzt. Es wurden Stocklösungen (100 μL) von 1 mM in DMSO angesetzt und bei -80 °C eingefroren. EL2 hat ein Molekulargewicht von 715 Da, ist gut wasserlöslich und wurde in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt. Es wurden Stocklösungen von 1 mM in H₂O angesetzt und bei -80 °C eingefroren.

2.2 Verwendete Klone für die Synthese von cRNA

Bei den verwendeten Klonen handelte es sich um Plasmid-cDNA, die in der institutsinternen Klonsammlung in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ gelagert wurde. Die cRNA von hKv4.1 und hKv11.1 wurde von Kathrin Sauter (ZMNH), die cRNA von mKv7.1 von Martin Kruse (ZMNH) zur Verfügung gestellt. Bei dem Transkriptionsvektor handelte es sich um pGem-He Juel (Liman *et al.*, 1992), der von Arnd Baumann (Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Vektor enthält neben dem Polylinker (*Multiple Cloning Site* = MCS), eine Bindungsstelle für die T7-Polymerase, ein Resistenzgen für Ampicillin, eine Poly-A-Sequenz und eine 5' und 3'-untranslatierte DNA des β -Globin-Gens von *Xenopus laevis*. In Tab. 2.1 sind die verwendeten Kanäle mit der internen Klonsammlungsnummer, der *Pubmed*-Kennnummer und der aktuellen Kanalnomenklatur für das entsprechende Gen aufgelistet. Die

Klonkarten (im Anhang) wurden mithilfe der Software VectorNTI (Invitrogen, Carlsbad, USA) erstellt.

Tab. 2.1: Auflistung der in der Arbeit untersuchten Kanäle.

Neben den internen Klonsammlungsnummern, soweit vorhanden, sind auch die *Pubmed* Kennnummern (*Accession number*) und die jeweilige Bezeichnung des Gens in der Kanalnomenklatur angegeben. Es wurden Klone zur Synthese von cRNA verwendet, die aus Mensch (h), Ratte (r) bzw. Maus (m) stammten. Bei rKv1.4 wurde nicht der Wildtyp für die Experimente verwendet, sondern einen Deletionsmutante ($\Delta 110$), bei der der verlängerte N-Terminus zur N-Typ-Inaktivierung fehlt (*IR = inactivation removed*).

Kanalname	Interne Bezeichnung des Klons	Pubmed Kennnummer	Name des Gens
rKv1.1	A1-03	NP 775118	rKCNA1
rKv1.2	A2-04	NP 037102	rKCNA2
rKv1.3	A3-03	NP 062143	rKCNA3
rKv1.3 G377F	A3-16	---	---
rKv1.3 V430W	A3-15	---	---
rKv1.4 ($\Delta 110$, IR)	A4-15	Wt: NP 037103	WT: rKCNA4
hKv1.5	A5-06	NP 002225	hKCNA5
hKv1.5 (R487Y)	A5-34	---	---
hKv1.6	A6-05	NP 002226	hKCNA6
hKv2.1	B1-01	NP 004966	hKCNB1
hKv4.1	---	NP 004970	hKCND1
mKv7.1	---	P 97414	mKCNQ1
hKv11.1	H2-04	AA 283910	hKCNH2

2.3 Einfügen einer Punktmutation mit *Overlap-PCR* und *Quick change-PCR*

Für das gezielte Einfügen einer Punktmutation wurde entweder die *Overlap-PCR* (Higuchi *et al.*, 1988) oder die *Quick change-PCR* (Hemsley *et al.*, 1989) verwendet. Beide Techniken beruhen auf dem Einsatz von Mutagenese-Oligonukleotiden, die im Vergleich zur Wildtyp-DNA an der gewünschten Position eine oder mehrere gezielte Basenaustausche aufweisen.

Durch die Verwendung von zwei Oligonukleotid-Paaren werden bei der *Overlap-PCR* zwei überlappende PCR-Produkte in getrennten PCR-Reaktionen synthetisiert, die die Punktmutation beinhalten. Sie weisen ansonsten eine mit dem Wildtyp (Wt) identische DNA-Sequenz auf und werden in einer zweiten PCR-Reaktion zusammen als Vorlage für ein

weiteres PCR-Produkt eingesetzt. Dieses PCR-Produkt enthält die Mutation und kann ebenso wie die Wildtyp-DNA mithilfe geeigneter Restriktionsenzyme geschnitten werden und anschließend in einer Ligationsreaktion mit dem Expressionsvektor zusammengefügt werden. Bei der *Quick change*-PCR (Stratagene, La Jolla, USA) werden zwei komplementäre Oligonukleotide verwendet, die beide die gewünschte Mutation aufweisen. Die Oligonukleotide werden in einer PCR-Reaktion über die gesamte Länge des Expressionsvektors verlängert, so dass *genickte*, zirkuläre DNA entsteht, die die Mutation enthält. Mithilfe des Restriktionsenzym DpnI, das ausschließlich die methylierten Schnittstellen der Wildtyp-DNA erkennt, wird diese im Gegensatz zur unmethylierten *in vitro*-DNA verdaut. Durch Transformation der *genickten* DNA in einen geeigneten Bakterienstamm (hier: *E. coli* XL1-blue) mit anschließender Isolierung und Reinigung der DNA erhält man Plasmid-DNA, die die gewünschte Punktmutation enthält.

Eine ausführliche Beschreibung der Methoden findet sich in dem Handbuch „*Molecular Cloning – A Laboratory Manual*“ von David W Russell und Joseph Sambrook.

2.4 Transformation von cDNA in Bakterien des Stammes *E. coli* XL1-blue

Eine ausführliche Beschreibung der Transformation von DNA in Bakterien findet sich in dem Handbuch „*Molecular Cloning – A Laboratory Manual*“ von David W Russell und Joseph Sambrook.

2.5 Isolierung und Reinigung von cDNA aus *E. coli*-Kulturen

Die Isolierung und Reinigung der cDNA erfolgte entweder aus 2 mL-Kulturen (*Mini-Prep.*) oder 50 mL-Kulturen (*Midi-Prep.*) mit den Aufreinigungskits Nucleospin Plasmid Quickpure (*Mini*) bzw. Nucleobond PC 100 (*Midi*) der Firma Macherey-Nagel (Düren). Eine ausführliche Beschreibung der Methode findet sich in den Handbuch des Kits.

2.6 Isolierung und Reinigung von cDNA aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten z.B. aus PCR-Reaktionen und Restriktionsansätzen wurde das Gfx PCR DNA and Gel Band Purification Kit der Firma GE Healthcare (München) verwendet. Nach einer Gelelektrophorese in einem 1,5 %igen, Ethidiumbromid haltigen (0,5 µg/mL) Agarosegel wurden die DNA-Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus

dem Gel ausgeschnitten und mit dem genannten Kit aufgereinigt. Eine ausführliche Beschreibung der Methode findet sich in den Handbuch des Kits.

2.7 Sequenzierung der Klone

Die Überprüfung der verwendeten Klone (Wt und Mutanten) wurde durch Sequenzierung im ZMNH in der Service-Abteilung von Sabine Hoffmeister-Ullerich durchgeführt. Es wurde die Kettenabbruch-Synthese nach Sanger *et al.* (1977) mit dem Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) in Verbindung mit dem ABI Prism 377 DNA Sequencer verwendet. Eine ausführliche Beschreibung der Methoden findet sich in dem Handbuch „*Molecular Cloning – A Laboratory Manual*“ von David W Russell und Joseph Sambrook. Die ermittelten Sequenzen wurden mithilfe der Software SeqMan (DNASTAR, Madison, USA) ausgewertet.

2.8 *In vitro* Transkription für die Synthese von cRNA

Für die *in vitro* Synthese von cRNA (*copy* RNA) wurde das Kit mMessage mMachine der Firma Ambion verwendet. Es ermöglicht eine hohe Ausbeute an cRNA mit Kappenstruktur (*Capping*). Dies erhöht sowohl die Stabilität der cRNA als auch die Translationseffizienz des Ionenkanals in der Oozyte.

Für die Synthese wurde 1 µg linearisierte cDNA eingesetzt. Die Reaktion wurde nach Zugabe von 2 µL Transkriptionspuffer, 2 µL T7-Polymerase-Enzyme-Mix und 10 µL dNTPs/Cap mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µL eingestellt. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C in einem Heizblock wurde nach Zugabe von DNase für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Synthesereaktion wurde durch Zugabe von 30 µL Nuklease-freiem Wasser und 30 µL Lithiumchlorid gestoppt. Nach einer Inkubation von mindestens 30 min bei -20 °C wurde die präzipitierte RNA zentrifugiert und das Pellet mit 1 mL 70 %igen Alkohol für 1 min gewaschen. Nach Lufttrocknung des RNA-Pellets unter dem Abzug wurde die RNA in Nuklease-freies Wasser aufgenommen. Die Überprüfung der Qualität und die Konzentrationsbestimmung der cRNA erfolgte mit dem „RNA 6000 Nano Assay“ der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, USA), das in Verbindung mit dem Agilent Bioanalyser benutzt wurde und auf eine elektrophoretische Größentrennung von RNA-Fragmenten in einem mit Mikrokapillaren versehenen Chip basiert. Die cRNA wurde auf eine Konzentration von 1 µg/µL eingestellt und als 3 µL Aliquots bei -80 °C eingefroren.

2.9 Gewinnung von *Xenopus*-Oozyten und cRNA-Injektion

Als heterologes Expressionssystem für die untersuchten Kaliumkanäle wurden die Eizellen (Oozyten) des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* verwendet. Die Frösche stammten von der Firma NASCO (Fort Atkinson, Wiskonsin, USA; www.enasco.com/xenopus/) und wurden in der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Eppendorf gehalten. Vor Entnahme der Oozyten wurden die Frösche für die spätere Identifizierung, die durch die individuelle Pigmentierung des Rückens ermöglicht wurde, fotografiert. Jedem Frosch konnten in einem Abstand von ca. jeweils drei Monaten bis zu fünf Mal Oozyten entnommen werden.

Die Frösche wurden durch ein 15- bis 20-minütiges Tricain-Bad vor Entnahme der Oozyten narkotisiert (Tricain = 3-Aminobenzoessäure-Ethylester-Methansulfonat). Nach Öffnen der Bauchhaut wurden Teile des Ovars mit einer Schere abgeschnitten und mehrfach in Oozyten-Ringerlösung (OR2) gespült. Die Operationswunde des Frosches wurde mit chirurgischem, resorbierbarem Nahtmaterial (Ethicon, Norderstedt) versorgt, die Oozyten nach einer mechanischen Voraufftrennung des Ovars mit feinen Pinzetten 2-3 h in Kollagenaselösung (2-3 mg/mL) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Oozyten mehrfach mit OR2-Lösung gespült und eine Selektion nach Qualität und Reifegrad vorgenommen. Für die Experimente wurden Oozyten des Reifestadiums V und VI verwendet, die bis zur Injektion in Gentamycinlösung gelagert wurden. In Tab. 2.2 sind die verwendeten Lösungen für die Oozytenpräparation gelistet.

Tab. 2.2: Lösungen für die Oozytenpräparation.

OR2-Lösung	82,5 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 5 mM HEPES, pH 7,5	
Tricain-Lösung	2-3 mg/mL	Tricain (Sigma)
Kollagenase-Lösung	2-3 mg/mL	Kollagenase (Roche)
Gentamycin-Lösung	75 mM NaCl 2 mM KCl 2 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 5 mM Na-Pyruvat 5 mM HEPES, pH 7,5 50 µg/mL Gentamycin	Gentamycin (Sigma)

Die Injektion der cRNA erfolgte am Tag der Oozytenentnahme bzw. an den darauffolgenden Tagen in OR2-Lösung. Die Oozyten wurden für die Injektion in eine spezielle Kammer überführt, die die Aufreihung der Eizellen in mehreren Rillen ermöglichte. Die cRNA-Stocklösung (1 µg/mL) wurde zunächst verdünnt (1:100 oder 1:200) und mithilfe eines Mikroinjektor Nanoliter 2000 (WPI, Sarasota, USA) in einem Volumen von 25 bis 50 nL (0,1-0,5 ng/Oozyte) injiziert, so dass an den Messtagen eine Stromamplitude von 5 bis 15 µA erreicht wurde. Für die Injektion wurden Glaskapillaren (#4879, WPI) verwendet, die mit einem PB-7 *Puller* (Narishige, East Meadow, USA) gezogen wurden. Die dünn ausgezogenen Spitzen wurden mithilfe einer *Mikroforge* (Narishige) auf einen Durchmesser von ca. 10 µM gebrochen und die Kapillaren anschließend zur Sterilisation für mind. 2 h bei 180 °C ausgebacken. Nach der Injektion der cRNA wurden die Oozyten in einem Inkubator bei 18 °C in Gentamycin-Lösung gelagert.

2.10 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme zum Messen von Ionenströmen in *Xenopus*-Oozyten

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ist eine Technik, die es ermöglicht, Ionenströme, die durch integrale Membranproteine (z.B. Ionenkanäle) vermittelt werden, bei einer definierten Spannung zu messen und zu analysieren (Miledi *et al.*, 1982). Als Expressionssystem für die Membranproteine dienen häufig *Xenopus*-Oozyten, die aufgrund der Größe ($\varnothing \sim 1,2$ mm) und guten Zugänglichkeit weite Verbreitung bei der Untersuchung von Ionenkanälen gefunden haben. Die Oozyten besitzen eine dünne hyaline Hülle, die als Vitellinmembran bezeichnet wird und der Stabilität der Eizelle dient. Diese wurde vor den Experimenten mit feinen Pinzetten entfernt, um eine mögliche Beeinflussung der Ligandenbindung an den Kanal zu vermeiden.

In der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Abb. 2.4) wird eine intrazelluläre Elektrode (Spannungselektrode, V) und ein Vorverstärker (Vers. 1) mit einem hochohmigen Eingangswiderstand verwendet, um das aktuelle intrazelluläre Potential (V_M) zu messen und eine zweite intrazelluläre Elektrode (Stromelektrode, I) und ein Klemmverstärker (Vers. 2), um durch Strominjektion das gewünschte Potential (Kommandopotential, V_C) aufrecht zu erhalten.

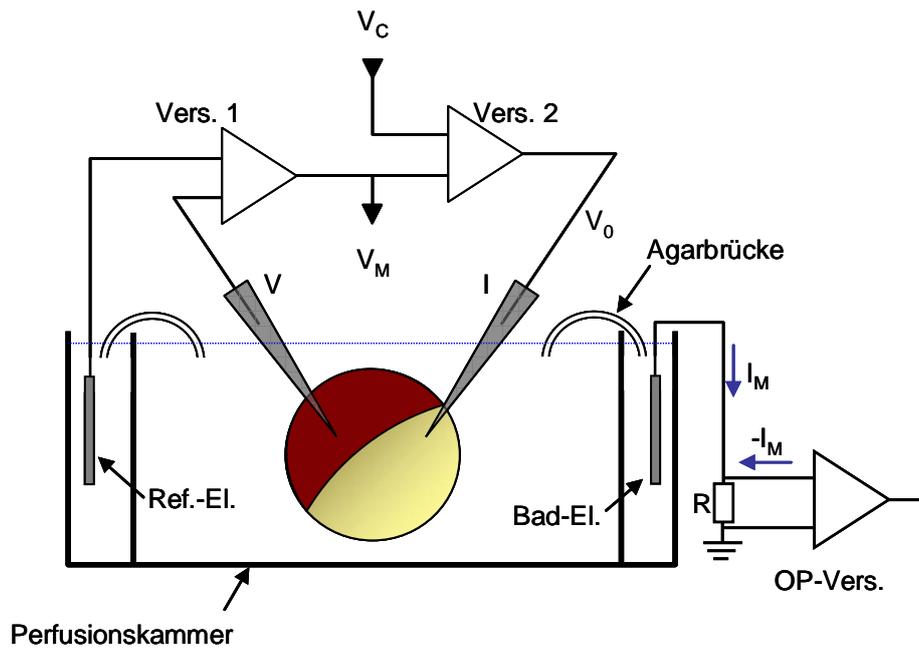


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Hauptkomponenten einer Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (verändert nach Stühmer, 1992).

Die Oozyte befand sich in einer Kammer, die über eine Einstrom- und eine Ausstromöffnung verfügte. Über einen Dreiwegehahn konnte zwischen Kontrolllösung und Lösung mit Antagonist gewechselt werden.

Zur Aufrechterhaltung des Kommandopotentials wird das gemessene Membranpotential mit dem Sollpotential verglichen und die Differenz beider Potentiale durch Strominjektion über die Stromelektrode ausgeglichen (V_0): Verursacht das Kommandopotential ein Öffnen von spannungsabhängigen Ionenkanälen, ändert sich der Membranwiderstand und damit auch das Membranpotential. Die Strommenge I_M , die zur Wiederherstellung des Kommandopotentials benötigt wird, ist die eigentliche Messgröße und wird von der Badelektrode, die an einen operativen Verstärker (OP-Vers.) angeschlossen ist, registriert. Bei der zweiten Badelektrode handelt es sich um eine Referenzelektrode für die intrazelluläre Spannungselektrode (virtuelle Erde). Es handelt sich bei der Strommenge nicht ausschließlich um den Ionenstrom (I_I), sondern auch um Kapazitätsströme, die beim Umladen der Oozytenmembran entstehen, und um unspezifische Leckströme (I_L), die dann verstärkt auftreten, wenn die Membran geschädigt wird und der Membranwiderstand abnimmt (Gleichung 2.1).

$$I_M = I_I + C \frac{dV}{dt} + I_L \quad \text{Gleichung 2.1}$$

Die Kapazitätsströme treten als transiente Ströme zu Beginn und am Ende einer Depolarisation auf bis zu dem Zeitpunkt, zu dem das gewünschte Potential eingestellt ist ($dV/dt = 0$). Die Leckströme können mit der computergesteuerten Leckstromkompensation P/4 herausgerechnet werden. Weiterführende Literatur findet sich u. a. bei Stühmer (1992).

Bei dem Verstärker, der für die Oozyten-Experimente verwendet wurde, handelte es sich um den OC-725C (Warner Instruments, Hamden, USA). Weiterer Bestandteil des Messstandes war ein erschütterungsgedämpfter Tisch mit aufliegender Stahlplatte, die zur Fixierung und zur Erdung der aufstehenden Teile diente. Dazu gehörten ein Binokular (Wild M3C, Herbrugg, Schweiz), zwei Mikromanipulatoren (MM33, Märzhäuser, Wetzlar) zur Befestigung der Strom- und Spannungselektrode und eine Messkammer, in die die Oozyten für die Experimente gelegt wurden und die eine über Schwerkraft getriebene Perfusion von mehreren Flüssigkeiten ermöglichte. Für die Experimente, die nicht bei RT sondern bei 16 °C durchgeführt wurden, wurde ein Kühlsystem (Colora WK14, Lörrach) verwendet. Die zur Perfusionskammer führenden Schläuche wurden zur Isolation und zur Abdunklung des lichtempfindlichen Porphyrins mit Aluminiumfolie umwickelt und die Temperatur regelmäßig mit einem Drahtthermometer (GTH 1170, Greisinger Electronic, Regenstauf) überprüft. Über ein Oszilloskop (Tektronix TDS 210, Köln) konnten der Spannungsverlauf und der Stromverlauf verfolgt werden. Als Elektroden wurden Silberdrähte verwendet, die entweder mit Klorix-Reiniger oder über einen Elektrolyseautomat (ACL-01, NPI Electronics, Tamm) chloriert wurden. Die eigentliche elektrische Verbindung wurde über Mikroelektroden aus Borsilikatglas (TW150F-4, WPI) hergestellt, die mit 3 M KCl gefüllt wurden. Badelektrode und Referenzelektrode befanden sich in Extrabehältnissen, gefüllt mit 3 M KCl und wurden über Agarbrücken mit der Messkammer verbunden. Die Messdaten wurden vom Verstärker über einen AD/DA-Wandler (ITC-16, Instrutech Corporation, Great Neck, USA) auf einen Computer (Dell, Optiplex GX620) übertragen und gespeichert. Der analoge Datenstrom wurde bei einer Auflösung von 16 bit mit Abtastfrequenzen (*Sampling rate*) zwischen 1 und 10 kHz (Sample-Intervalle zwischen 10 µs und 1 ms) digitalisiert. Die Stromspuren wurden mit 200 Hz gefiltert. Als Software für die Programmierung der Pulsprotokolle, die Steuerung des Verstärkers und die Aufnahme der Daten diente das Programm PULSEV8.79 der Firma HEKA (Lambrech). Die Daten wurden anschließend auf einen anderen Computer (Dell, Optiplex GX620) übertragen, an dem die Auswertung der Experimente und die Erstellung der Graphen mit den Programmen PULSEFIT (HEKA), KALEIDAGRAPH 4.0 (Synergy Software, Reading, USA) und MATHCAD 13.0 (PTC, Neeham, USA) erfolgte. Alle Abbildungen wurden in POWERPOINT (Microsoft, Redmont, USA) bearbeitet und als EMF-Grafiken gespeichert.

Die Messprotokolle für die einzelnen Experimente sowie verwendete mathematischen Funktionen und Gleichungen werden in der Einleitung bzw. im Ergebnisteil beschrieben. Die Signifikanzanalyse wurde in KALEIDAGRAPH mit der Grundstatistik *Student`s t-test*

durchgeführt. Bei diesen Analysen legt ein Grenzniveau, das auch als *P*-Wert (*Probability*) bezeichnet wird, die kritische Wahrscheinlichkeit fest, ob ein eingetretenes Ereignis zufällig ist oder nicht, und dient als Maß der Aussagekraft von Daten. Diese kritische Wahrscheinlichkeit wird in den meisten naturwissenschaftlichen Gebieten durch Konvention auf 5 % festgelegt (Stahel, 2000). Von signifikant spricht man in dem Fall, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unterhalb dieser 5 % bzw. einem *P*-Wert von 0,05 liegt. In den Abbildungen in der vorliegenden Arbeit wurden signifikante Aussagen mit einem Stern (*) versehen und der entsprechende *P*-Wert angegeben. Alle Mittelwerte wurden mit dem Standardfehler angegeben.

Die Lösungen die in Experimenten verwendet wurden, setzten sich wie in Tabelle 2.3 gezeigt zusammen. Sie basieren auf der Standardlösung ND96 (Goldin und Sumikawa, 1992).

Tab. 2.3: Lösungen, die in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme verwendet wurden.

20 mM KCl	20 mM KCl 78 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 5 mM HEPES (pH 7,4)	Verwendung bei RT
2 mM KCl (ND96)	2 mM KCl 96 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 5 mM HEPES (pH 7,4)	Verwendung bei RT
100 mM KCl	100 mM KCl 0 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 5 mM HEPES (pH 7,4)	Verwendung bei RT
20 mM RbCl	20 mM KCl 78 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 5 mM HEPES (pH 7,4)	Verwendung bei 16 °C

2.11 Verwendung der *Patch-Clamp*-Technik für die Applikation von der Membraninnen- (*Inside-out*) und Membranaußenseite (*Outside-out*)

Die *Inside-out*- und *Outside-out*-Messungen wurden mit der standardisierten *Patch-Clamp*-Technik nach Hamill *et al.* (1981) durchgeführt. Sie baut auf die Technik der Spannungsklemme auf und besteht aus einer Elektrode, die zugleich zur Vorgabe von Kommandospannungen und zur Messung von Ionenströmen dient. Ähnlich wie bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme wird der über die Membran fließende Strom (I_M) über einen Rückkopplungsmechanismus bestimmt. Der Spannungsabfall der Kommandospannung an der Membran (V_M), der durch Öffnung der Kanäle verursacht wird, wird am Differenzverstärker registriert und durch Strominjektion auf den Sollwert (V_C) gebracht. Die Strommenge, die zur Aufrechterhaltung des Kommandopotentials benötigt wird ($V_M = V_C$), ist identisch mit der über die Membran fließenden Strommenge (Abb. 2.5).

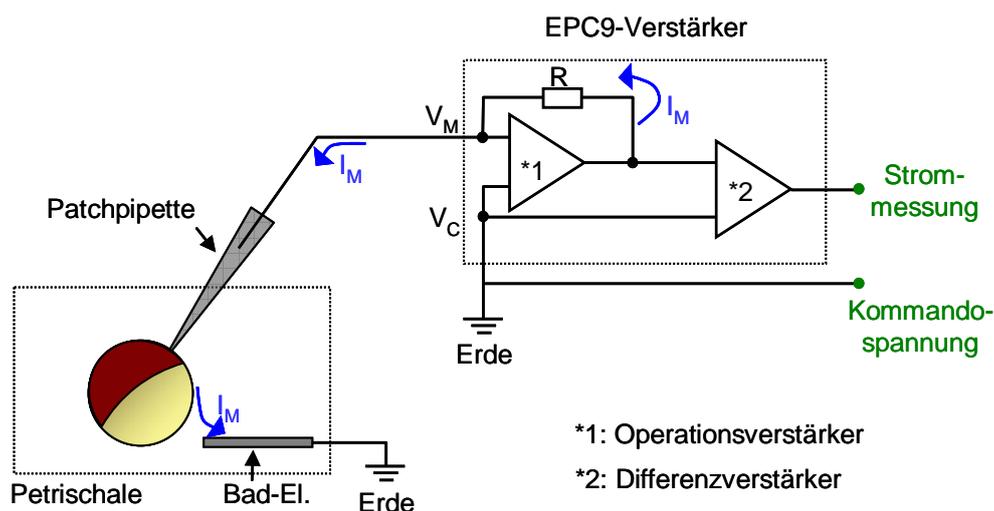


Abb.2.5: Vereinfachtes Schema eines *Patch-Clamp*-Schaltkreises.

Nach Entfernung der Vitellinmembran wurde die Oozyte in eine Petrischale mit extrazellulärer Lösung überführt. Die Antagonisten wurden über ein Perfusionssystem, das die lokale Applikationen über dem *Patch* ermöglichte, herangeführt.

An den relativ großen Oozyten lassen sich mit der *Patch-Clamp*-Technik keine Ganzzelleableitungen, aber Anwendungen die nur einen kleinen, separierten Membranabschnitt betreffen, durchführen (Abb. 2.6). Über diese Membranabschnitte, die eine gewisse Zahl an Kanälen beinhalten, können mithilfe einer lokalen Perfusion Antagonisten appliziert werden. Durch die verwendete Methode kann entweder die Membraninnenseite (*Inside-out*) oder die Membranaußenseite (*Outside-out*) perfundiert werden.

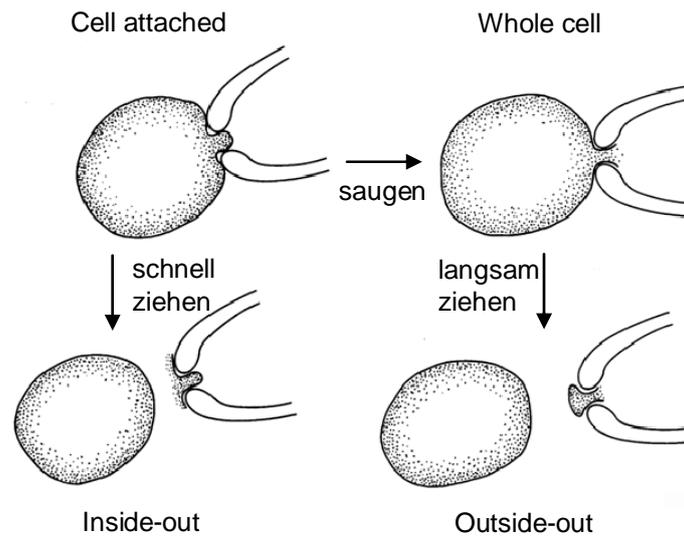


Abb.2.6: Patch Clamp-Konfigurationen.

Um *Inside-out*-Messungen durchführen zu können, muss zunächst ein *Gigaseal* in der *On cell*- oder *Cell attached*-Konfiguration erreicht werden. Durch ruckartiges Zurückziehen der Pipette wird ein Stück der Membran herausgerissen, so dass die Membraninnenseite nach Außen exponiert wird. Bei der *Outside-out*-Konfiguration wird nach der *Cell attached*-Konfiguration zunächst die *Whole cell*-Konfiguration hergestellt. Das geschieht durch Erzeugen eines Unterdrucks. Durch langsames Zurückziehen der Pipette gelangt man dann in die *Outside-out*-Konfiguration, so dass die Membranoußenseite nach Außen exponiert wird. Modifiziert nach Hille (2001).

Im Gegensatz zu der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme, bei der Ströme im Mikroamperebereich gemessen werden, werden bei der *Patch-Clamp*-Technik Ströme im Nano- bis Picoamperebereich gemessen, was eine zusätzliche Abschirmung des Messstandes notwendig macht. Die elektrische Abschirmung wurde durch einen Faradaykäfig, der den Messstand umgab, gewährleistet. Ein schwingungsgedämpfter Tisch mit Druckluftfederung (TMC, Peabody, USA) diente dem erschütterungsfreien Arbeiten. Auf dem Tisch befand sich ein inverses Mikroskop (Axiovert 35, Zeiss), mit dem man von unten durch den Boden der Petrischale, in dem sich die Oozyte befand, blickte. Der Vorverstärker mit der chlorierten Silberdrahtelektrode war an einem hydraulisch betriebenen Mikromanipulator der Firma Narishige (MHW3) befestigt. Der Pipettenhalter besaß einen Anschluss zur Erzeugung eines Unterdrucks, der für die Ausbildung des Dichtungswiderstandes im Gigaohmbereich (*Gigaseal*) zwischen Pipettenspitze und Oozytenmembran genutzt wurde. Der Schlauch, der an diesen Anschluss angebracht wurde, endete an einem Dreiwegehahn, an dem sich ein Mundstück zum Saugen anschließen ließ. Als Verstärker diente ein EPC9 (HEKA). Für die Protokollprogrammierung, Datenspeicherung, Auswertung und Analyse wurde die gleiche Software wie bei der Spannungsklemme beschrieben, verwendet. Ein Oszilloskop der Firma HAMEG (HM407-2, Mainhausen) wurden der analoge Spannungs- und Stromverlauf beobachtet. Für die gezielte lokale Superfusion der exponierten Membranstücke in den

entsprechenden Konfigurationen mit Kontroll- bzw. Porphyrinlösung diente das Applikationssystem Valvebank (Automate Scientific, Berkeley, USA). Eine an das Perfusionssystem angeschlossene Pumpe (BVP, Ismatec, Wertheim-Mondfeld) gewährleistete eine kontinuierliche Flüssigkeitszufuhr. In Tab. 2.4 sind die verwendeten Lösungen für die *Inside-out*- und *Outside-out*-Messungen aufgelistet.

Tab. 2.4: Lösungen, die für die *Inside-out*- und *Outside-out*-Messungen verwendet wurden.

Outside out Patch		
100 mM KCl	100 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 5 mM HEPES (pH 7,4)	Pipettenlösung, interne Lösung
2 mM KCl	2 mM KCl 96 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 5 mM HEPES (pH 7,4)	Perfusionslösung, externe Lösung
Inside out Patch		
2 mM KCl	2 mM KCl 172 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 5 mM HEPES (pH 7,4)	Pipettenlösung, externe Lösung
100 mM KCl	100 mM KCl 70 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 10 mM HEPES (pH 7,4)	Perfusionslösung, interne Lösung Kontrolle
100 mM KCl, 70 mM TEA ⁺	100 mM KCl 70 mM TEACl 1 mM MgCl ₂ 10 mM HEPES (pH 7,4)	Perfusionslösung, interne Lösung

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des Kaliumkanalinhibitors Tetraphenylporphyrin-Derivat #3 (Porphyrin #3, Porphyrin) auf den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3, der zu der Kv1-Familie (*Shaker*-verwandte Kanäle) gehört, mit elektrophysiologischen Methoden untersucht. Als heterologes Expressionssystem dienten *Xenopus laevis*-Oozyten, die vor Durchführung der Experimente von ihrer Vitellinmembran, einer dünnen durchsichtigen Hülle, befreit wurden. Zur Analyse dienten vor allem die Änderungen von Aktivierungs-, Deaktivierungs- und Inaktivierungsverhalten des Kanals nach Applikation von Porphyrin #3 sowie Assoziations- und Dissoziationskinetik für die Inhibierung des Kanals durch Porphyrin #3. Die Experimente wurden in verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen $[K^+]_a$ sowie Rubidiumchlorid $[Rb^+]_a$ bei Raumtemperatur (RT) oder 16 °C durchgeführt. Einige Versuchprotokolle, die bei den Experimenten verwendet wurden, entstammen aus Veröffentlichungen, in denen die Funktionsweisen anderer Kanalblocker (Porenblocker: KTX und Conotoxin, *Gating*-Modifizierer: Hanatoxin) untersucht wurden. An gegebener Stelle wird auf die Unterschiede oder Gemeinsamkeiten im Vergleich mit Porphyrin #3 hingewiesen.

3.1 Kv1.3-Ströme in *Xenopus*-Oozyten

Ratten-Kv1.3-Kanäle wurden in *Xenopus*-Oozyten nach Injektion von Kv1.3 cRNA wie zuvor beschrieben (Stühmer *et al.*, 1989) exprimiert. Die Messungen wurden ab dem ersten Tag nach der Injektion durchgeführt. Die Experimente wurden mit Oozyten durchgeführt, die bei einer Depolarisation auf +60 mV eine Amplitude des Auswärtsstroms zwischen 5 und 15 μA zeigten. Mithilfe einer Strom-Spannungskurve (Abb. 3.1) ließen sich die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals darstellen. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV, bei dem die Kanäle geschlossen sind, wurde stufenweise beginnend bei -60 mV in 10 mV-Schritten bis +100 mV depolarisiert. Zwischen den einzelnen Depolarisationen lag ein Interpulsintervall von 10 s. Der Schwellenwert der Aktivierung der Kv1.3-Kanäle lag in Übereinstimmung mit der Literatur bei ca. -30 mV. Die größte Offenwahrscheinlichkeit bzw. maximale Leitfähigkeit (G_{max}) wurde bei ca. +50 mV erreicht. Durch die Verwendung von 20 mM Kaliumchlorid (KCl) bzw. Rubidiumchlorid (RbCl) in der extrazellulären Lösung folgte auf den K^+ -Auswärtsstrom nach Repolarisation auf -80 mV ein K^+ - bzw. Rb^+ -Einwärtsstrom (Abb. 3.1 A).

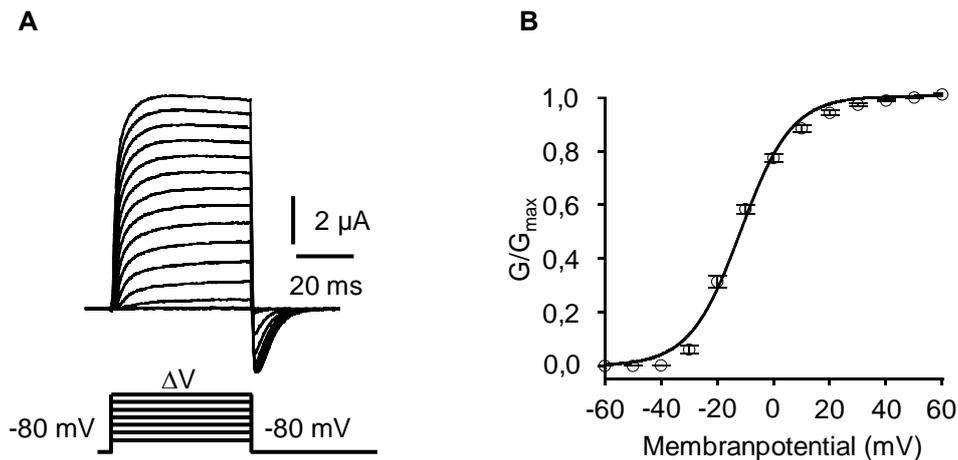


Abb. 3.1: Spannungsabhängige Aktivierung und Deaktivierung von Kv1.3 in *Xenopus*-Oozyten, $[K^+]_a = 20$ mM, RT.

A. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch unterschiedlich starke Depolarisationsschritte für 50 ms geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Durch Verwendung von 20 mM KCl in der externen Lösung erhielt man einen K^+ -Einstrom (= *Tailstrom*). Dargestellt sind die Stromspuren von -60 mV bis +100 mV.

B. Normierte *Tailstrom*amplituden bei -80 mV aufgetragen als Funktion des vorhergehenden Testpotentials. Bei der durchgezogenen Linie handelt es sich um einen Fit mit der Boltzmann-Funktion. ($V_{1/2} = -12$ mV; $n = 5$). Dargestellt sind die Leitfähigkeiten von -60 mV bis +60 mV.

Dieser als *Tailstrom* bezeichnete Einwärtsstrom beschreibt die Deaktivierung der Kanäle und zeigte nach Erreichen einer *Peak*amplitude einen exponentiellen Abfall. Durch Auftragen der *Tailstrom*amplitude gegen die Spannung der vorangegangenen Depolarisation erhielt man die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, die sich in einer Strom-Spannungskurve darstellen ließ. In Abb. 3.1 B ist die normierte Strom-Spannungskurve für drei durchgeführte Experimente dargestellt. Die halbmaximale Aktivierung ($V_{1/2}$), die mithilfe der Boltzmann-Funktion ermittelt wurde, lag bei -12 mV und der z-Wert bei 2,6.

3.2 Applikation von Porphyrin #3 auf Kv1.3-Kaliumkanäle

Die Experimente mit Porphyrin #3 wurden zunächst bei einer Spannung von +60 mV durchgeführt. Hierzu wurden kurze Depolarisationsschritte (100 ms), ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV in einem Abstand von 10 s durchgeführt. Nach Erreichen einer gleichbleibenden Stromamplitude bzw. *Tailstrom*amplitude (*Steady state*) wurde Porphyrin #3 in einer Konzentration von 0,5 μ M eingewaschen. Als Folge der Zugabe kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme der Stromamplitude (Abb. 3.2).

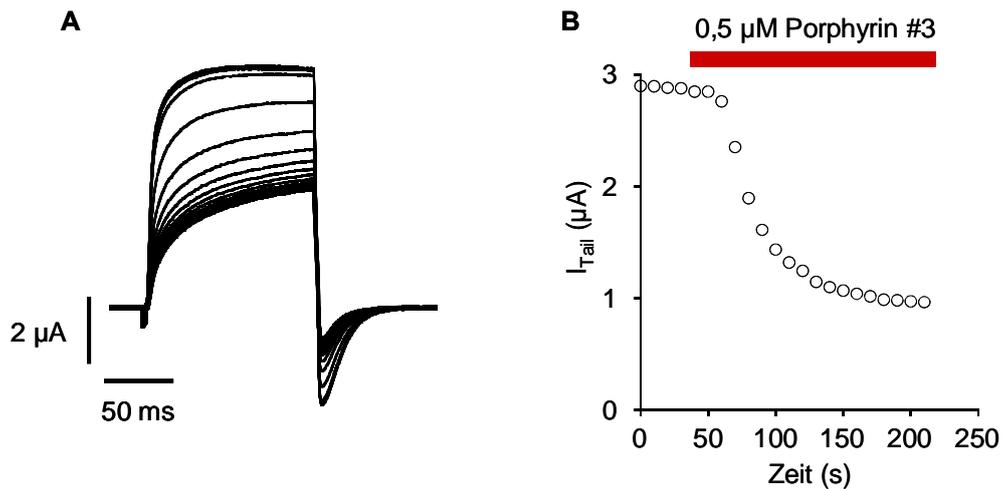


Abb. 3.2: Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 auf Kv1.3: Einwasch, $[\text{K}^+]_a = 20 \text{ mM}$, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch wiederholte Depolarisation auf $+60 \text{ mV}$ für 100 ms bei einem Interpulsintervall von 10 s geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Nach Erreichen eines *Steady states* wurden $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin #3 eingewaschen.

A. Repräsentative Stromspuren, die die Abnahme der Amplitude nach Porphyrinapplikation verdeutlichen.

B. Darstellung der *Tail*stromamplitude nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin aufgetragen gegen die Zeit.

Nach Reduktion des Stroms um ca. 60-70 % wurde ein Gleichgewichtszustand erreicht und es wurde mit dem Auswaschen des Porphyrins begonnen. Es zeigte sich, dass im Gegensatz zum Einwaschen der Auswaschvorgang stark von der Vorbehandlung der Oozyten abhing: Bei Nicht-Entfernen der Vitellinmembran ließ sich der durch Porphyrin #3 erzielte Effekt nicht auswaschen. Bei den Oozyten, bei denen die Membran entfernt wurde, kam es nach dem Wechsel von Porphyrin #3 auf die Kontrolllösung zu einer Zunahme der Amplitude, die zwischen 80-90 % der Ausgangsamplitude erreichte (Abb. 3.3).

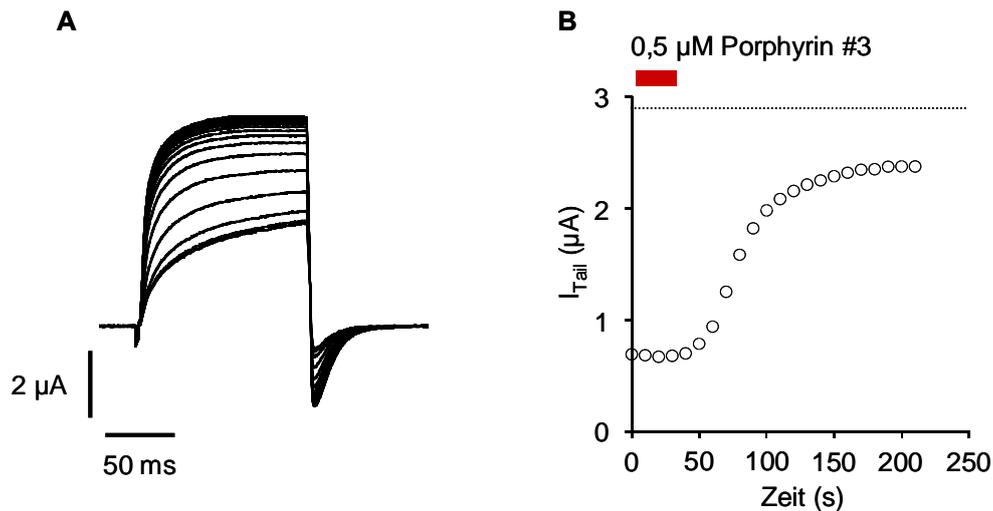


Abb. 3.3: Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 auf Kv1.3: Auswasch, $[K^+]_a = 20$ mM, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch wiederholte Depolarisation auf +60 mV für 100 ms bei einem Interpulsintervall von 10 s geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Nach Erreichen eines *Steady states* wurde Porphyrin #3 wieder ausgewaschen.

A. Repräsentative Stromspuren, die die Zunahme der Amplitude nach Porphyrinapplikation verdeutlichen.

B. Darstellung der *Tail*stromamplitude nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 aufgetragen gegen die Zeit. Die Ausgangsamplitude ist als gestrichelte Linie angedeutet.

3.3 Spannungsabhängigkeit der Kv1.3-Inhibition

Vor und nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 wurden Strom-Spannungs-Protokolle ausgeführt, die zeigen sollten, ob der Kv1.3-Strom bei allen Spannungen gleich stark inhibiert wurde. Die normierten Strom-Spannungskurven der Kontrolle und nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 sind in Abb. 3.4 A dargestellt. Die Fits der Kontrollwerte und der Werte nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 zeigten, dass es zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit kam. Während die Spannung der halbmaximalen Aktivierung in der Kontrolle bei -12 mV lag, verschob sich dieser Wert nach Applikation von Porphyrin #3 zu positiven Potentialen und lag bei +12 mV. Aus Abb. 3.4 B wird ersichtlich, dass die Inhibition des Kv1.3-Stroms mit zunehmender Depolarisation abnahm. Nach einem nahezu vollständigen Block bei -20 mV wurde der Kanal bei +80 mV nur noch zu 75 % inhibiert.

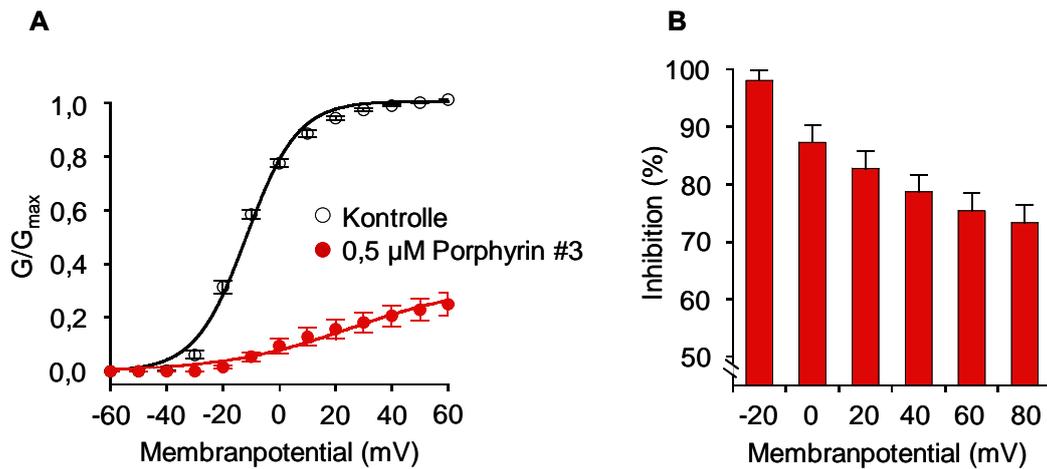


Abb. 3.4: Spannungsabhängigkeit der Kv1.3-Inhibition durch Porphyrin #3, $[K^+]_a = 20$ mM, RT.

A. Normierte *Tail*stromamplituden bei -80 mV aufgetragen als Funktion des vorhergehenden Testpotentials vor (schwarze Kreise) und nach Applikation (rote Punkte) von 0,5 μM Porphyrin #3. Bei den durchgezogenen Linien handelt es sich um Fits mit der Boltzmann-Funktion (Kontrolle: $V_{1/2} = -16$ mV; $n = 5$; Porphyrin #3: $V_{1/2} = +12$ mV, $n = 5$).

B. Inhibition des Strom in Prozent in Abhängigkeit des Membranpotentials.

Die Spannungsabhängigkeit des Blocks zeigte sich besonders bei der Durchführung eines Doppelpulsprotokolls, in dem zwei Pulse unterschiedlich starker Depolarisation kurz aufeinander folgten (500 ms). In Abb. 3.5 ist das Doppelpulsprotokoll mit den dazugehörigen Stromspuren dargestellt.

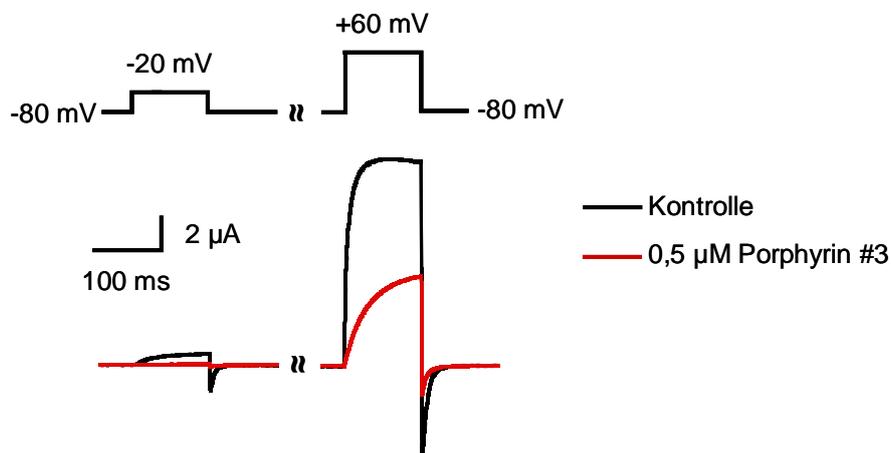


Abb. 3.5: Durchführung eines Doppelpulsprotokolls vor und nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 auf Kv1.3, $[K^+]_a = 20$ mM, RT.

Gezeigt sind repräsentative Stromspuren vor und nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 mit dem dazugehörigen Pulsprotokoll. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch unterschiedlich starke Depolarisation (-20 mV und +60 mV, Interpulsintervall = 500 ms) für 100 ms geöffnet und durch Repolarisation auf -80 mV wieder geschlossen.

Die Doppelpulse wurden in einem Interpulsintervall von 10 s durchgeführt. Nach Erreichen eines *Steady states* wurden 0,5 μM Porphyrin #3 appliziert. Die Ausgangsamplituden der Ströme vor Applikation von Porphyrin #3 unterschieden sich erwartungsgemäß in

Abhängigkeit der Depolarisationsstärke. Die Spannungsabhängigkeit des Blocks zeigte sich sowohl in dem unterschiedlichen Ausmaß der Inhibition als auch in einer unterschiedlichen Einwaschkinetik. Während der *Tail*strom bei +60 mV zu ca. 70 % inhibiert wurde, kam es bei -20 mV zu einer vollständigen Inhibition (Abb. 3.6 A). In Abb. 3.6 B ist die Kinetik des Einwaschens, die sich mit einer einfach exponentiellen Funktion (Gleichung 3.1) beschreiben lässt, anhand der normalisierten *Tail*stromamplituden beider Depolarisationsstärken dargestellt.

$$\frac{I}{I_{\max}} = A_0 e^{-(t/\tau)} + A_1 \quad \text{Gleichung 3.1}$$

I ist die maximale Stromamplitude in Anwesenheit des Liganden, I_{\max} die maximale Stromamplitude der Kontrolle, A_0 die relative Amplitude vor Applikation des Liganden, t die Zeit, τ die Zeitkonstante und A_1 die Amplitude nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes.

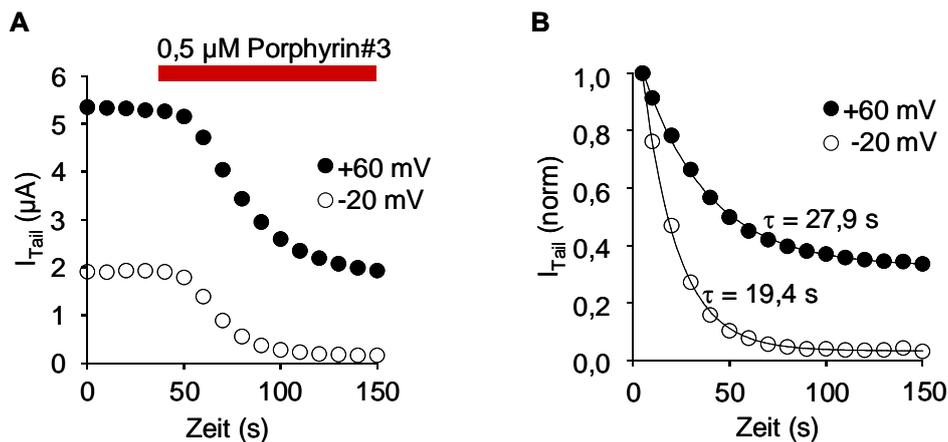


Abb. 3.6: Einwaschkinetik von 0,5 μM Porphyrin #3 bei unterschiedlich starker Depolarisation, $[\text{K}^+]_a = 20 \text{ mM}$, RT.

A. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch unterschiedlich starke Depolarisationsschritte für 100 ms geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Der zweite Puls des Doppelpulses erfolgte nach einem 500 ms-Interpulsintervall. Gezeigt sind die *Tail*stromamplituden bei -80 mV nach Depolarisationen auf -20 mV und +60 mV.

B. Normierte *Tail*stromamplituden bei -80 mV aufgetragen als Funktion des vorhergehenden Testpotentials. Bei den durchgezogenen Linien handelt es sich um Fits mit einer einfach exponentiellen Funktion.

Die ermittelten τ -Werte waren $\tau = 19,4 \pm 2 \text{ s}$ ($n = 7$) bei -20 mV und $\tau = 27,9 \pm 2 \text{ s}$ ($n = 7$) bei +60 mV. Es zeigte sich, dass die Geschwindigkeit, mit der Porphyrin #3 den Kv1.3-Strom inhibierte, stark von der Stärke der Depolarisation abhing: Je stärker die Depolarisation, desto langsamer war die Zeitkonstante für die Einwaschkinetik. Im Gegensatz zur Einwaschkinetik zeigte die Auswaschkinetik keine Spannungsabhängigkeit (Abb. 3.7 A und B). Die ermittelten τ -Werte waren $\tau = 48,2 \pm 2 \text{ s}$ ($n = 7$) bei -20 mV und $\tau = 48,3 \pm 2 \text{ s}$ ($n = 7$) bei +60 mV. Die

Auswaschkinetiken ließen sich ebenfalls mit einer einfach exponentiellen Funktion (Gleichung 3.2) beschreiben:

$$\frac{I}{I_{\max}} = 1 - A_0 e^{-(t/\tau)} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

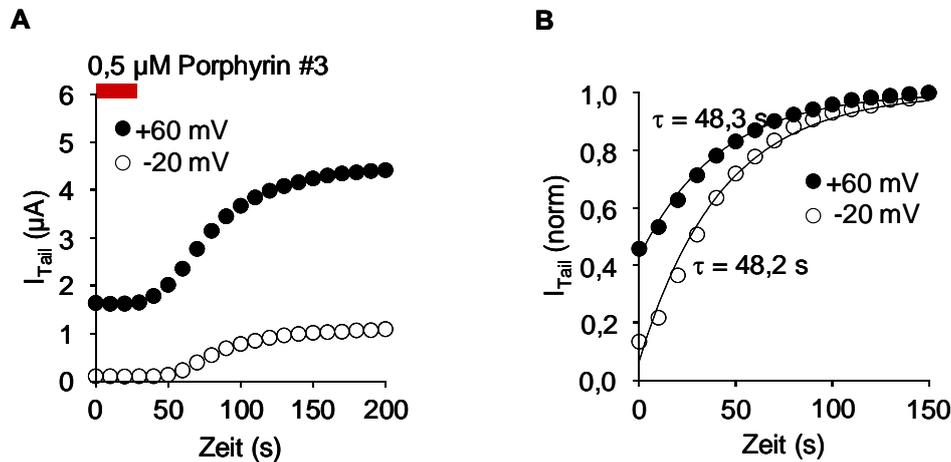


Abb. 3.7: Auswaschkinetik von 0,5 μM Porphyrin #3 bei unterschiedlich starker Depolarisation, $[\text{K}^+]_a = 20$ mM, RT.

A. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch unterschiedlich starke Depolarisationsschritte für 100 ms geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Die einzelnen Pulse des Doppelpulses erfolgten nach einem 500 ms-Interpulsintervall. Gezeigt sind die *Tail*stromamplituden bei -80 mV nach Depolarisationen auf -20 mV und +60 mV.

B. Normierte *Tail*stromamplituden bei -80 mV aufgetragen als Funktion des vorhergehenden Testpotentials. Bei den durchgezogenen Linien handelt es sich um Fits mit einer einfach exponentiellen Funktion.

3.4 Konzentrationsabhängigkeit der Kv1.3-Inhibition

Bei der Durchführung der Experimente zeigte sich, dass die Applikation von Porphyrin #3 konzentrations- und zeitabhängig zu einem erhöhten Leckstrom führte. Leckströme sind unspezifische Ströme, die dann verstärkt auftreten, wenn der elektrische Widerstand der Zellmembran abnimmt. Der basale Leckstrom beträgt in Oozyten bei der Haltespannung von -80 mV ca. 0,1 – 0,2 μA und ändert sich, dem Ohmschen Gesetz folgend, mit Änderung des Membranpotentials. Während sich mit Porphyrinkonzentrationen $\leq 0,5$ μM die Experimente ohne wesentliche Zunahme des Leckstroms durchführen ließen, waren höhere Konzentrationen in der Regel mit einer deutlichen Zunahme des Leckstroms verbunden. Bei der Benutzung von Oozyten, die eine überdurchschnittliche Qualität aufwiesen, konnten vereinzelt auch Experimente mit 1 μM Porphyrin #3 durchgeführt werden. Es zeigte sich jedoch, dass die höheren Konzentrationen zu keiner wesentlichen Zunahme der Inhibition bei positiven Potentialen führten. Um die Gleichgewichtskonstante von Porphyrin #3 bestimmen

zu können, wurde eine Konzentrationsreihe bei einer Spannung von -20 mV durchgeführt. In den vorausgehenden Experimenten (Abb. 3.6 und 3.7) konnte gezeigt werden, dass bei dieser Spannung im Gegensatz zu stärkeren Depolarisationen eine vollständige Inhibition möglich war.

Im Folgenden soll in vereinfachter Weise (vergleiche Bisswanger, 2000) die Berechnung der Bindungskonstanten dargestellt werden, die ein Maß für die Bindungsstärke zwischen einem Liganden (L) und einem Rezeptor (R) sind. Um die Stärke der Bindung zu messen, wird die Konzentrationsänderung des Komplexes RL beobachtet, während die Konzentrationen von L oder R variiert werden. Im vorliegenden Fall wurde die Porphyrinkonzentration variiert, wobei das Ausmaß der Bindung an dem Kanal über die Inhibition des Ionenstromes beobachtet wurde. In einem allgemeinen Bindungsgleichgewicht (Gleichung 3.3) wird die Hinreaktion als Assoziation und die Rückreaktion als Dissoziation bezeichnet:



k_{+1} und k_{-1} beschreiben die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion bzw. der Rückreaktion, $[R]$ und $[L]$ die Konzentrationen von Rezeptor und Ligand und $[R:L]$ den Komplex aus Rezeptor und Ligand der sich nach Applikation von Porphyrin #3 bildet. Die Bindung von Porphyrin #3 an den Kaliumkanal lässt sich nach dem Massenwirkungsgesetz durch die Assoziationskonstante (K_A) oder deren Kehrwert die Dissoziationskonstante (K_D) beschreiben (Gleichung 3.4):

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[R:L]} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

Aus dem Massenwirkungsgesetz lässt sich durch mathematische Umformungen die Langmuir-Gleichung (Langmuir, 1916; Gleichung 3.5) herleiten, die die Bindung des Liganden an einen Rezeptor mit nur einer Bindungsstelle annimmt.

$$[RL] = \frac{[R] \cdot [L]}{K_D + [L]} = \frac{[R]}{1 + \frac{K_D}{[L]}} \quad \text{Gleichung 3.5}$$

Es ist nicht notwendig, die Konzentration des Rezeptors zu kennen, solange man ein messbares Signal hat, das auf den Rezeptor-Liganden-Komplex beschränkt ist. Dieses Signal (Y) erhält man durch Messen von $[RL]$. So ergibt sich Gleichung 3.6:

$$Y = \frac{Y_{\max}}{1 + \frac{K_D}{[L]}} = B = \frac{1}{1 + \left(\frac{K_D}{[L]} \right)} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

Das Symbol B (engl. *bound receptor*) wird auch als fraktionelle Rezeptorbesetzung bezeichnet und beschreibt das Verhältnis von Rezeptor:Liganden-Komplex [R:L] und Rezeptorkonzentration [R]. Y_{\max} beschreibt den maximalen Effekt, der durch Bindung des Liganden erzielt werden kann. Bei der Langmuir-Gleichung handelt es sich um eine Funktion, mit der sich nach Auftragen der Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition gegen die Porphyrinkonzentration ein Fit der Messdaten zur Bestimmung der halbmaximalen effektiven Konzentration ($EC_{50} = K_D$) durchführen lässt. Dabei wird angenommen, dass der EC_{50} -Wert identisch mit der Konzentration an Porphyrin #3 ist, die 50 % der Kanäle inhibiert. Bei der graphischen Darstellung der Datenpunkte in einem halblogarithmischen Plot erhält man einen S-förmigen Kurvenverlauf. Charakteristisch für einen bimolekularen Rezeptor-Liganden-Komplex ohne kooperative Bindung (z.B. Kv1.3 und KTX, Lange *et al.*, 2006) ist, dass mit einer Ligandenkonzentration, die eine dezimale Größenordnung unterhalb des K_D -Wertes liegt, ca. 10 % des Effektes und mit einer Ligandenkonzentration, die eine dezimale Größenordnung oberhalb des K_D -Wertes liegt, ca. 90 % des Effektes erzielt werden.

Bei Makromolekülen mit mehreren, sich beeinflussenden Bindungsstellen spricht man von positiver Kooperativität, wenn die Bindung eines Liganden die erleichterte Bindung weiterer Liganden nach sich zieht. Archibald Hill formulierte in der nach ihm benannten Hill-Gleichung (Hill, 1910):



Das Massenwirkungsgesetz für diese Reaktionsgleichung (Gleichung 3.8) lautet:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]^n}{[R:L_n]} \quad \text{Gleichung 3.8}$$

Eine Bindungsgleichung kann in analoger Weise, wie für Gleichung 3.6 gezeigt, hergeleitet werden:

$$B = \frac{1}{1 + \left(\frac{K_D}{[L]} \right)^n} \quad \text{Gleichung 3.9}$$

Die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition der Kv1.3-Ströme durch Porphyrin #3 ließ sich mit der Langmuir-Gleichung (gestrichelte Linie, Abb. 3.8) nicht stimmig fitten. Die Bindungskurve zeigte bei der halblogarithmischen Darstellung mit einem Fit nach der Hill-Gleichung einen unerwartet steilen Kurvenverlauf.

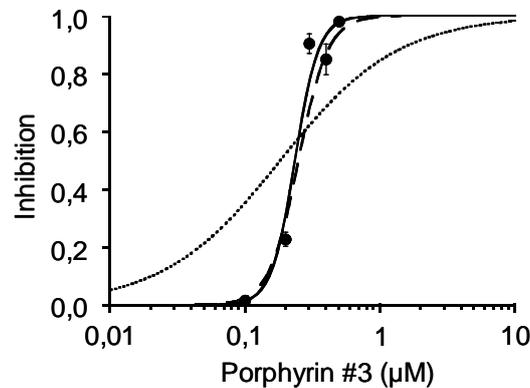


Abb. 3.8: Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition von Kv1.3-Strömen durch Porphyrin #3, $[K^+]_a = 20 \text{ mM}$, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch wiederholte Depolarisation auf -20 mV für 100 ms bei einem Interpulsintervall von 10 s geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Aufgetragen ist die Porphyrinkonzentration gegen die Inhibition des Kv1.3-*Tailstroms* ($n = 4$). Die durchgezogene Linie zeigt einen Fit mit der Hill-Gleichung. Diese erbrachte einen Hill-Koeffizienten von $5,3$. Die gestrichelte Linie zeigt einen Fit mit der Hill-Gleichung mit einem Exponenten von 4 und die gepunktete Linie zeigt einen Fit mit der Langmuir-Gleichung.

Innerhalb eines kleinen Konzentrationsbereichs ($0,1\text{-}0,5 \text{ }\mu\text{M}$) war der maximale Effekt der Inhibierung zu beobachten. Bei einer Konzentration von $0,2 \text{ }\mu\text{M}$ wurde der Strom nur zu etwa 20% inhibiert und zwischen $0,3$ und $0,5 \text{ }\mu\text{M}$ zu nahezu 100% . Der freilaufende Fit mit der Hill-Gleichung ergab einen Hill-Koeffizienten von $5,3$ (durchgezogene Linie) und einen ermittelten EC_{50} -Wert von $0,25 \text{ }\mu\text{M}$. Die gestrichelte Linie zeigt einen Fit mit der Hill-Gleichung und einem eingesetzten Exponenten von 4 . Aus der Beschreibung der Konzentrations-Wirkungskurve folgte, dass sich das Bindungsgleichgewicht zwischen Porphyrin #3 und dem Kv1.3-Kanal nicht mit einer einfachen Stöchiometrie von $1:1$ beschreiben ließ. Der ermittelte Hill-Koeffizient von $5,3$ bedeutet, dass die Bindung von Porphyrin #3 an den Kanal mit hoher Kooperativität erfolgte. Er gibt möglicherweise schon einen Hinweis auf die Anzahl der Bindungsstellen, denn eine Inhibition des Kanals, alleine durch Blockierung der Pore, ist aufgrund der steilen Bindungskurve von Porphyrin #3 auszuschließen. Neben der Pore könnten weitere Bindungsstellen am Spannungssensor liegen, dessen Beeinflussung durch Porphyrin #3 in den folgenden Experimenten eingehend untersucht wurde. Neben den *Gating*strömen sind es vor allem Änderungen in der

Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik, die Aufschluss auf eine Inhibition des Spannungssensors geben.

3.5 Untersuchung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von Kv1.3 vor und nach Applikation von Porphyrin #3

Neben *Gating*-Modifizierern wie z.B. Hanatoxin, die nicht den Porenausgang des K⁺-Kanals blockieren, sondern an den Spannungssensor binden und die Aktivierungsschwelle des Kanals zu positiveren Potentialen verschieben, ist auch von einigen Porenblockern (z. B. κ -Hefutoxin 1) bekannt, dass sie das *Gating* beeinflussen können (Srinivasan *et al.*, 2002). Um die mögliche Wirkung von Porphyrin #3 auf das *Gating* von Kv1.3 zu untersuchen, wurden zunächst die Aktivierungs- und die Deaktivierungskinetik des Kanals untersucht. Durch die sehr schnelle Deaktivierungskinetik ($5,3 \pm 0,1$ ms ($n = 5$)) der Kv1.3-Kanäle bei Raumtemperatur wurde die Analyse der *Tailströme* sehr erschwert. Die Verwendung von RbCl anstelle von KCl in der extrazellulären Lösung sowie die Herabsetzung der Temperatur auf 15 °C bis 17 °C in der Messapparatur, führten zu einer Verlangsamung der Deaktivierungskinetik ($58,6 \pm 1,9$ ms ($n = 5$)) (Abb. 3.9). Dies ermöglichte einen qualitativen Vergleich der Deaktivierungskinetik vor und nach Applikation von Porphyrin #3.

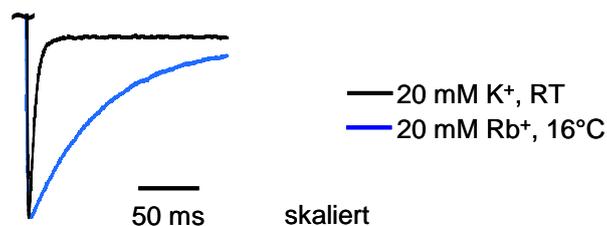


Abb. 3.9: Vergleich der Deaktivierungskinetik von Kv1.3 in 20 mM K⁺, RT und 20 mM Rb⁺, 16 °C. Die Verwendung von RbCl anstelle von KCl in der extrazellulären Lösung sowie die Herabsetzung der Temperatur in der Messapparatur führten zu einer Verlangsamung der Deaktivierungskinetik.

Um sicherzustellen, dass die veränderten Messbedingungen keinen Effekt auf die Bindung von Porphyrin #3 an die Kv1.3-Kanäle hatten, wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition mit dem gleichen Messprotokoll bestimmt, wie zuvor mit 20 mM KCl unter Raumtemperatur (Abb. 3.10 A und B). Als Folge der Temperaturabsenkung kam es zu einer leichten Verschiebung der GV-Kurve ($V_{1/2}$) zu positiveren Potentialen und die Steilheit der

Kurve (z) nahm etwas ab. Der z-Wert wurde durch die Applikation von Porphyrin #3 nicht verändert.

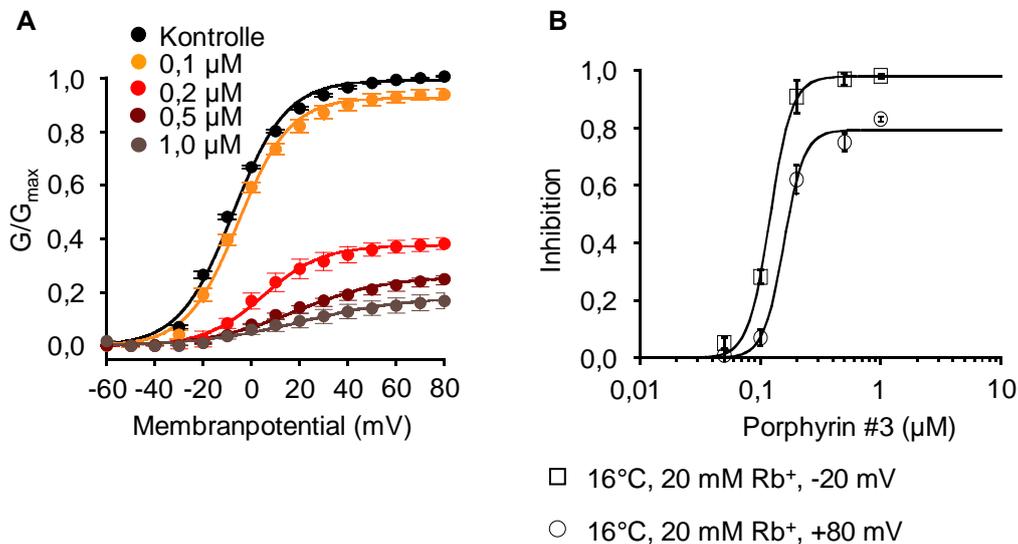


Abb. 3.10: Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition von Kv1.3-Tailströmen durch Porphyrin #3, $[\text{Rb}^+]_a = 20 \text{ mM}$, 16 °C.

A. Normierte Tailstromamplituden bei -80 mV aufgetragen als Funktion des vorhergehenden Testpotentials vor und nach Applikation von verschiedenen Porphyrinkonzentrationen. Bei den durchgezogenen Linien handelt es sich um Fits mit der Boltzmann-Funktion ($n = 4$).

B. Konzentrations-Wirkungskurve. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch wiederholte Depolarisation auf -20 mV bzw. +80 mV für 100 ms bei einem Interpulsintervall von 10 s geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Aufgetragen ist die Porphyrinkonzentration gegen die Inhibition des Kv1.3-Tailstroms ($n = 4$). Bei den durchgezogenen Linien handelt es sich um Fits mit der Hill-Gleichung. Der Hill-Koeffizient betrug 4,7.

In Tab. 3.1 sind die mit der Boltzmann-Funktion ermittelten Parameter für die Kontrolle und die applizierten Porphyrinkonzentrationen zusammengefasst.

Tab. 3.1: Mit der Boltzmann-Funktion ermittelte Werte für $V_{1/2}$ und z der Kontrolle und verschiedenen Porphyrinkonzentrationen. *1: Porphyrinkonzentration, *2: Gemessene Parameter

*2 \ *1	Kontrolle	0,1 μM	0,2 μM	0,5 μM	1,0 μM
$V_{1/2}$	-7 mV	-7 mV	+5 mV	+10 mV	+ 10 mV
z	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1

Der mit der Hill-Gleichung ermittelte K_D -Wert bei -20 mV lag bei 0,12 μM und somit etwas niedriger als zuvor für 20 mM KCl bei RT ermittelt wurde. Während mit extrazellulärem K^+ bei RT 0,2 μM mit ca. 20 % einen relativ geringen inhibitorischen Effekt hatte, wurde mit

extrazellulärem Rb^+ bei 16 °C ein relativ starker Block erzielt. Der Fit mit der Hill-Gleichung erbrachte einen Hill-Koeffizienten von 4,7. Neben der Konzentrations-Wirkungskurve bei -20 mV ist eine weitere bei +80 mV dargestellt, die noch einmal verdeutlicht, dass bei positiven Potentialen keine vollständige Inhibition möglich war. Die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition war aber nahezu ebenso steil wie bei -20 mV. Die Analyse der Aktivierungskinetik (Abb. 3.11) zeigte, dass sich die Öffnungsgeschwindigkeit nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 deutlich verlangsamte (Abb. 3.11 A). Die Deaktivierungskinetik war nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 stark beschleunigt (Abb. 3.11 B).

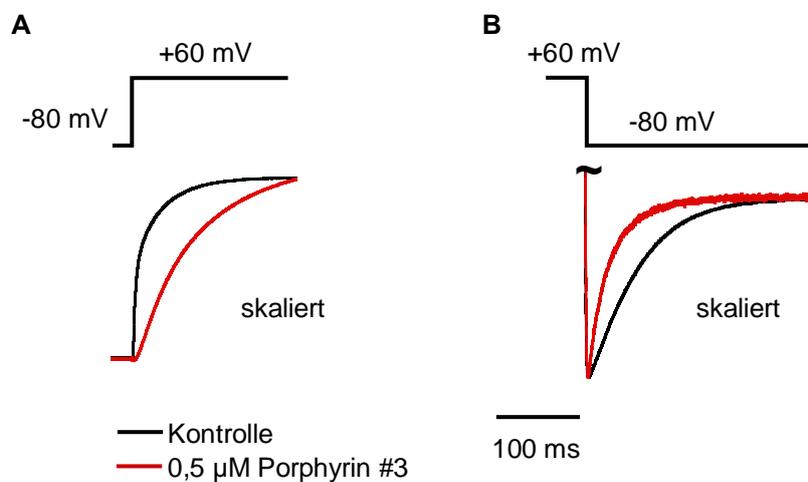


Abb. 3.11: Porphyrin #3 verlangsamt die Aktivierungskinetik und beschleunigt die Deaktivierungskinetik von Kv1.3, $[\text{Rb}^+]_a = 20 \text{ mM}$, 16 °C.

A. Skalierte Stromspuren bei einer Depolarisation auf +60 mV vor und nach Zugabe von 0,5 μM Porphyrin #3 ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV.

B. Skalierte Stromspuren bei -80 mV nach einem vorhergehenden Testpuls von +60 mV vor und nach Zugabe von 0,5 μM Porphyrin #3.

Für die Analyse der Aktivierungskinetik wurde die Dauer für die halbmaximale Öffnung der Kanäle von 0 mV bis 100 mV vor und nach Applikation von vier verschiedenen Konzentrationen Porphyrin #3 gemessen. In Abb. 3.12 A sind exemplarische Stromspuren der Kontrolle vor und nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 bei einem Membranpotential von +60 mV dargestellt. Die maximale Stromamplitude betrug bei dem gezeigten Beispiel in der Kontrolle 6,8 μA und nach Applikation des Porphyrins 3,5 μA . Die halbmaximale Aktivierung war in der Kontrolle nach $14,1 \pm 2 \text{ ms}$ ($n = 4$) (schwarze, gestrichelte Linie) erreicht, während die halbmaximale Aktivierung nach Porphyrinapplikation nach $44,3 \pm 6 \text{ ms}$ (rote, gestrichelte Linie) erreicht wurde.

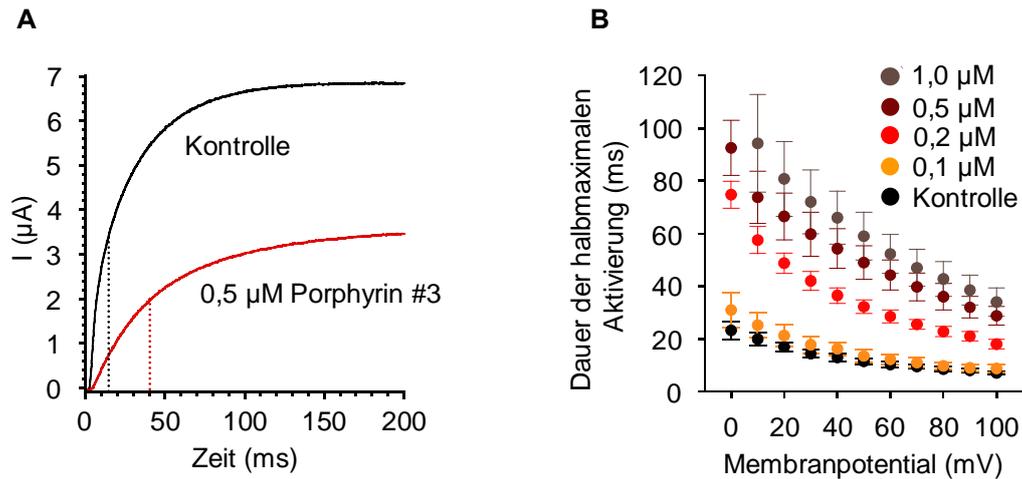


Abb. 3.12: Verlangsamung der Aktivierungskinetik von Kv1.3 durch 0,5 μM Porphyrin #3, $[\text{Rb}^+]_a = 20 \text{ mM}$, $16 \text{ }^\circ\text{C}$.

A. Exemplarische Stromspuren vor und nach Applikation von 0,5 μM bei +60 mV. Die gestrichelten Linien markieren die Werte für die halbmaximale Öffnung der Kanäle.

B. Dauer der halbmaximalen Aktivierung der Kanäle der Kontrollmessungen ($n = 4$) und der Messungen nach Zugabe von 0,1 μM , 0,2 μM , 0,5 μM und 1,0 μM Porphyrin #3 ($n = 4$) aufgetragen gegen das Membranpotential.

In der Abbildung 3.12 B ist die Dauer der halbmaximalen Aktivierung der Kontrolle und bei vier verschiedenen Porphyrinkonzentrationen (0,1 μM , 0,2 μM , 0,5 μM und 1,0 μM) gegen das angelegte Membranpotential aufgetragen. Aus der Abbildung wird deutlich, dass sich die Aktivierung mit zunehmender Porphyrinkonzentration immer weiter verlangsamt. Aufgrund des zunehmenden Leckstroms bei höheren Porphyrinkonzentrationen als 1 μM , konnte nicht geklärt werden, ob mit 1 μM schon ein maximaler Effekt erzielt wurde, oder höhere Konzentrationen zu einer weiteren Verlangsamung der Aktivierung führen würden.

Die *Tail*ströme, die das Schließen der Kanäle widerspiegeln, wurden für die Analyse der Deaktivierungskinetik herangezogen. Bei der Entschlüsselung der Wirkweise von Hanatoxin konnten Swartz und MacKinnon (1997) mithilfe der *Tail*stromanalyse zeigen, dass es sich nicht, wie zunächst vermutet, um einen Porenblocker handelt (Swartz und MacKinnon, 1995), sondern um einen *Gating*-Modifizierer, der mit einer Stöchiometrie von 4:1 an den Kanal bindet (Swartz und MacKinnon, 1997). Abb. 3.13 A zeigt exemplarische Stromspuren von *Tail*strömen, die bei unterschiedlich starken Depolarisationen gemessen wurden, vor und nach Applikation von 0,2 μM bzw. 1,0 μM Porphyrin #3. Die *Tail*ströme ließen sich gut mit einer einfach exponentiellen Funktion fitten ($58,6 \pm 1,9 \text{ ms}$) und waren in der Kontrolle bei allen Depolarisationsschritten gleich. Durch Zugabe von Porphyrin #3 wurde die Deaktivierung konzentrationsabhängig beschleunigt, wie die Skalierung in Abb. 3.13 A verdeutlicht. Aus Abb. 3.13 B und C wird deutlich, dass sich die Beschleunigung der *Tail*ströme sowohl bei der

eingesetzten Konzentration von Porphyrin #3 als auch bei zunehmender Depolarisationsstärke einem asymptotischen Wert annähert.

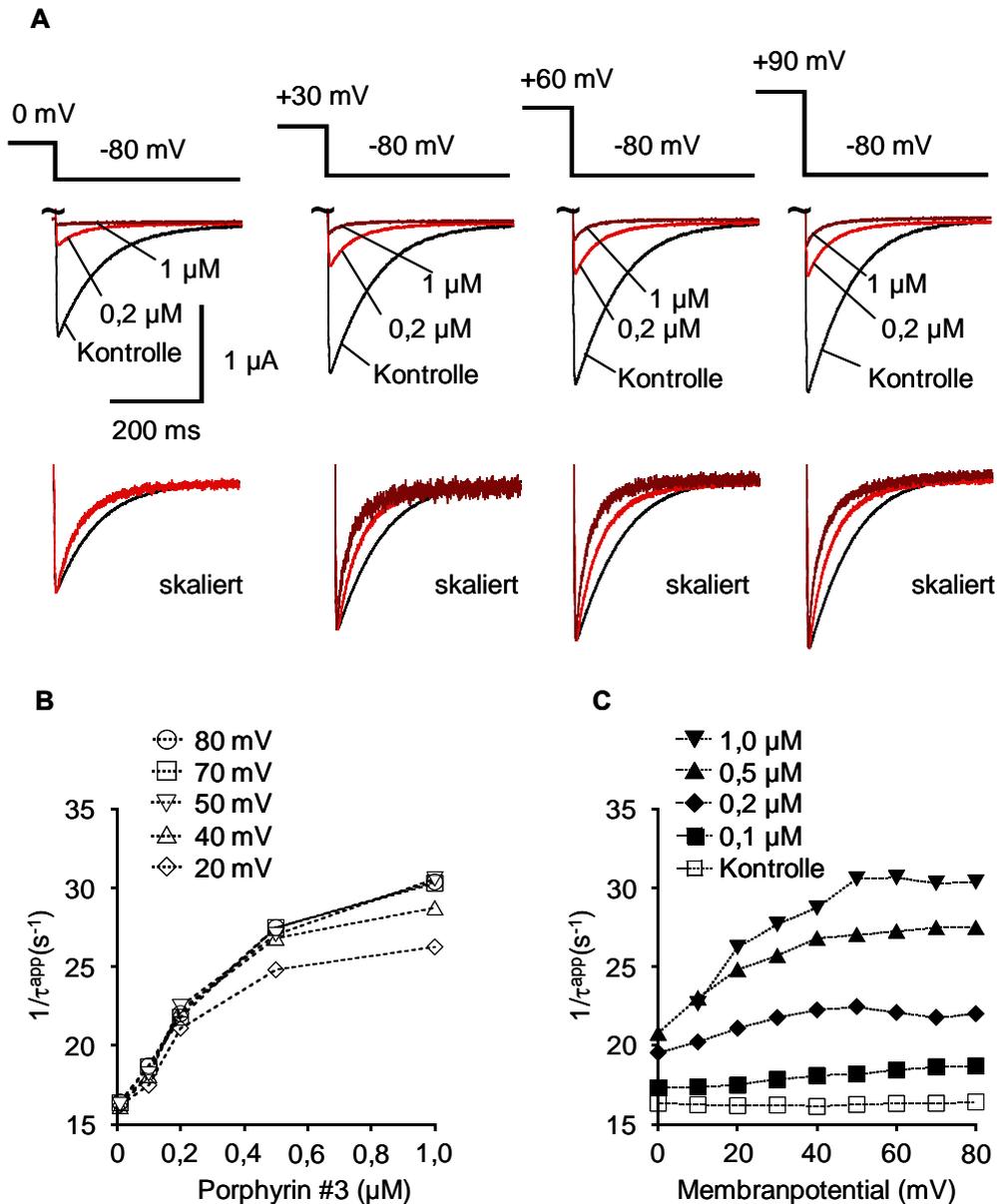


Abb. 3.13: Tailströme von Kv1.3 nach unterschiedlich starker Depolarisation vor und nach Zugabe unterschiedlicher Porphyrinkonzentrationen, $[Rb^+]_a = 20 \text{ mM}$, 16°C .

A. Tailströme bei -80 mV nach vorhergehende Depolarisationen auf verschiedene Testpulse vor und nach Zugabe von 0,2 bzw. 1 μM Porphyrin #3. Die untere Reihe zeigt die skalierten Tailströme für beide Porphyrinkonzentrationen nach Depolarisation auf 0 mV, +30 mV, +60 mV und +90 mV. Für 0 mV ist nur 0,2 μM Porphyrin #3 gezeigt, weil 1 μM zu einem vollständigen Block führte.

B. Plot des reziproken τ -Wertes ($1/\tau$ in s^{-1}) gegen die Konzentration von Porphyrin #3 bei unterschiedlichen Spannungen.

C. Plot des reziproken τ -Wertes ($1/\tau$ in s^{-1}) gegen die Konzentration von Porphyrin #3 bei unterschiedlichen Testpotentialen.

In Abb. 3.13 B ist die eingesetzte Porphyrinkonzentration gegen den reziproken Wert der Deaktivierungszeitkonstante bei verschiedenen Spannungen aufgetragen. Ab einer Spannung von ca. +50 mV des vorhergehenden Pulses war die Zeitkonstante aller Konzentrationen konstant. In Abb. 3.13 C ist das Membranpotential der vorhergehenden Depolarisation gegen

den reziproken Wert der Deaktivierungszeitkonstante von Kontrollmessungen und Messungen nach Porphyrinapplikation aufgetragen. Während die Zeitkonstanten in der Kontrolle bei verschiedenen Potentialen immer gleich waren, nahm die Deaktivierungsgeschwindigkeit nach Zugabe von Porphyrin #3 mit stärkerer Depolarisation und höherer Konzentration zu. Es stellte sich bei den vier applizierten Konzentrationen ab einer Spannung von ca. +50 mV ein Gleichgewicht ein. Während sich die Kinetik der konzentrations- und spannungsabhängigen Beschleunigung zwischen Hanatoxin (Swartz und MacKinnon, 1997) und Porphyrin #3 glich, war das Ausmaß der Beschleunigung unterschiedlich. Im Fall von Hanatoxin beschleunigten sich die *Tail*ströme um einen Faktor von 5-6 und im Fall von Porphyrin #3 um einen Faktor von 2-3.

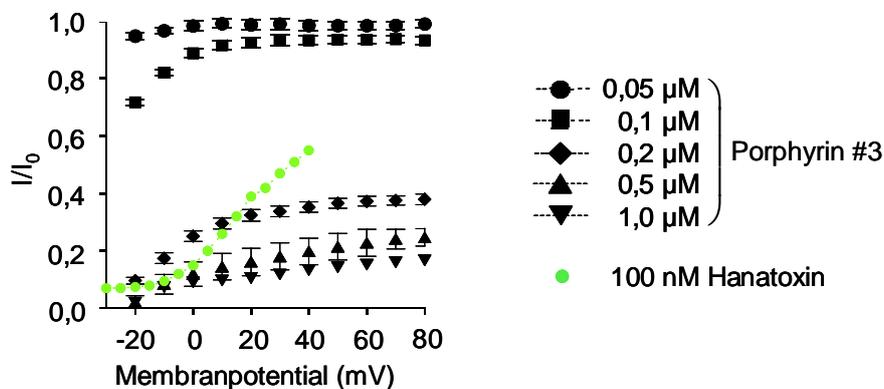


Abb. 3.14: Konzentrationsabhängigkeit der fraktionellen Inhibition des Kv1.3-*Tail*stroms bei unterschiedlichen Depolarisationsstärken, $[Rb^+]_a = 20 \text{ mM}$, $16 \text{ }^\circ\text{C}$.

Bei I handelt es sich um die *Tail*stromamplitude in Anwesenheit von Porphyrin #3. I_0 ist die *Tail*stromamplitude in Abwesenheit von Porphyrin #3. Die grünen Punkte zeigen die fraktionelle Inhibition von Kv2.1 durch 100 nM Hanatoxin (ergänzt nach Swartz und MacKinnon, 1997). In den Spannungsbereich von -30 bis 15 mV zeigen die nicht inhibierten *Tail*ströme ein Plateau.

In Abb. 3.14 ist die Konzentrationsabhängigkeit der fraktionellen Inhibition des Kv1.3-*Tail*stroms in Abhängigkeit der Depolarisationsstärke dargestellt. Bei einer Konzentration von 0,05 μM Porphyrin #3 wurden die *Tail*ströme bei -20 mV nur zu einem sehr geringen Teil inhibiert und erreichten bereits bei 0 mV die Amplitude des Kontrollstroms. Die Applikation von 0,5 und 1 μM führte bei -20 mV zu einer 100 %igen Inhibition, die ebenso wie bei der Inhibition von 0,1 und 0,2 μM mit stärkerer Depolarisation bis +20 mV abnahm und dann einen konstanten Wert erreichte. Eine davon abweichende Beobachtung machten Swartz und MacKinnon (1997) mit Hanatoxin und Kv2.1. Dort erreichte die Fraktion aus nicht inhibierten *Tail*strömen bei negativen Spannungen bei allen untersuchten Konzentrationen eine Plateauphase, die die Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung widerspiegelte. In Abb. 3.14 ist dies aus Swartz und MacKinnon (1997) für 100 nM Hanatoxin beispielhaft

ergänzt (grüne Punkte). Sie schlossen aus ihren Beobachtungen, dass die Bindung eines einzelnen Hanatoxinmoleküls ausreicht, um die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals signifikant zu positiven Potentialen zu verschieben. Bei Porphyrin #3 ist dies nicht der Fall.

Eine Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik weist darauf hin, dass die elektromechanische Kopplung zwischen Spannungssensor und Aktivierungstor beim Öffnungs- und Schließvorgang durch Porphyrin #3 beeinträchtigt wird. Sind die *Gating*ströme inhibiert, wie beispielsweise bei Hanatoxin (Lee *et al.*, 2003) gezeigt, deutet das auf eine eingeschränkte Bewegung des Spannungssensors hin. Das lässt sich über die direkte Messung der *Gating*ströme feststellen.

3.6 Inhibition des *Gating*stroms von Kv1.3

Die gezielte Mutation einer einzelnen Aminosäure im Bereich unterhalb des konservierten PVP-Motifs (Position 430), das vermutlich die Funktion eines Scharniers beim Öffnen des Aktivierungstores ausübt, führte zu einem Kanal, der nicht mehr in der Lage ist, K^+ -Ionen zu leiten. Es ist nicht bekannt, auf welche Art und Weise der Aminosäureaustausch, der von Valin (Val) nach Tryptophan (Trp) erfolgt, die „Fehlfunktion“ des Kanals bewirkt. Durch starke Überexpression der Mutante in Oozyten konnte der ansonsten sehr kleine *Gating*strom, der die Bewegung der positiven Ladungen innerhalb des Spannungssensors veranschaulicht und normalerweise dem Ionenstrom vorausgeht, gut gemessen werden. Wie bei der Analyse der Ionenströme, bei der der Schließvorgang im Vordergrund stand, wurde auch bei der Analyse der *Gating*ströme der Schwerpunkt auf die Rückkehr des Spannungssensors in den Ruhezustand (*Off-Gating*: Q_{off}) gesetzt. Abb. 3.15 A und B zeigt ein Kontrollexperiment ohne Applikation von Porphyrin #3.

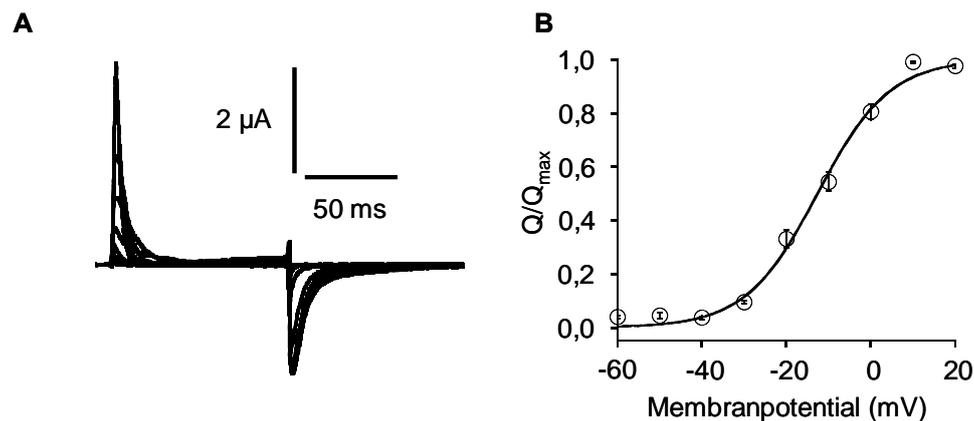


Abb. 3.15: Repräsentative Gatingströme der Kv1.3-Mutante Val430Trp, $[K^+]_a = 20$ mM, RT.

A. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde die Membran durch unterschiedlich starke Spannungsschritte für 100 ms depolarisiert und anschließend wieder repolarisiert. Dargestellt sind die Gatingströme von -60 mV bis +20 mV.

B. Normierte Ladungs-Spannungs-Beziehung (QV), die durch Integration der Off-Gating-Komponente gewonnen wurde. Bei der durchgezogenen Linie handelt es sich um einen Fit mit der Boltzmann-Funktion. ($V_{1/2} = -14$ mV; $n = 4$). Dargestellt sind die Leitfähigkeiten von -60 mV bis +20 mV.

Der Gatingstrom bestand aus zwei Komponenten. Zuerst wurde der *On-Gating*strom sichtbar, der nach Depolarisation auftrat und die spannungsabhängige Verlagerung der positiven Ladungen des S4-Segmentes nach außen darstellte (aktivierter Zustand). Er zeigte einen transienten Kurvenverlauf. Durch Repolarisation auf das Haltepotential bewegten sich die positiven Ladungen wieder in den Ruhezustand zurück und verursachten den *Off-Gating*strom. Der ebenfalls transiente Kurvenverlauf hatte eine geringere Amplitude, besaß aber eine breitere Basis, so dass die Gesamtladung von *On-Gating* und *Off-Gating* identisch war. Bei der Analyse von Gatingströmen wird nicht die Stromamplitude gemessen, sondern die Fläche unterhalb der Kurven, so dass man die Ladung Q erhält. Die Spannungsabhängigkeit der Ladungsverschiebung wurde in einer QV-Kurve mittels Boltzmann-Funktion analysiert (Abb. 3.15 B). Die Applikation von Porphyrin #3 führte zu Reduktion des *On-Gating*- und *Off-Gating*stroms (Abb. 3.16 A). In Abb. 3.16 B ist die Abnahme des *Off-Gating*stroms nach Applikation von 0,5 μ M Porphyrin #3 bei -20 mV dargestellt.

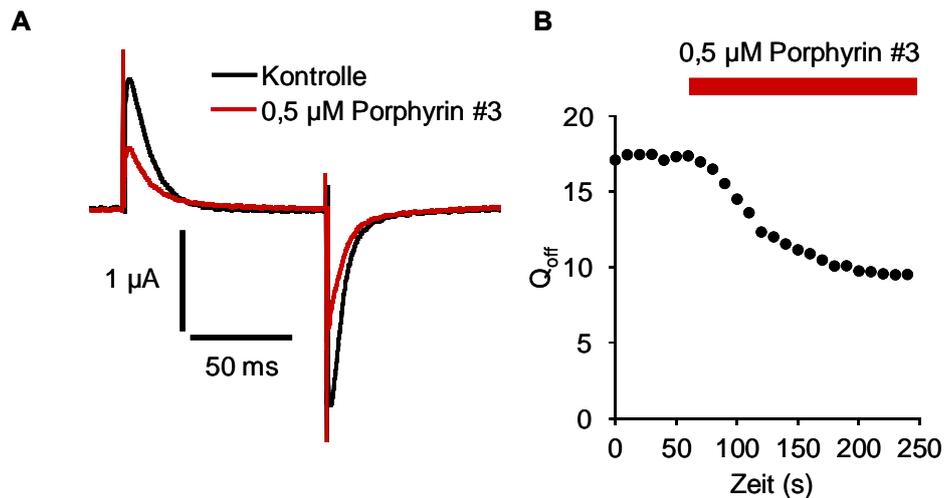


Abb. 3.16: Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 auf die Kv1.3-Mutante Val430Trp, $[\text{K}^+]_a = 20 \text{ mM}$, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde die Membran durch einen Spannungsschritt auf -20 mV für 100 ms depolarisiert und anschließend wieder repolarisiert. Nach Erreichen eines *Steady states* wurden $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin #3 eingewaschen.

A. Repräsentative Stromspuren, die die Abnahme des *Gatingstroms* nach Porphyrinapplikation verdeutlichen.

B. Darstellung der Ladung der *Off-Gatingströme* vor und nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin #3 aufgetragen gegen die Zeit.

Die Applikation führte zu einer deutlichen Reduktion des *Gatingstroms*. Das Erstellen von QV-Kurven vor und nach Applikation von verschiedenen Konzentrationen Porphyrin #3 ($0,1 \mu\text{M}$, $0,2 \mu\text{M}$ und $0,5 \mu\text{M}$) zeigte, dass die Inhibition des *Off-Gatingstroms* sowohl konzentrationsabhängig als auch spannungsabhängig war (Abb. 3.17 A und B).

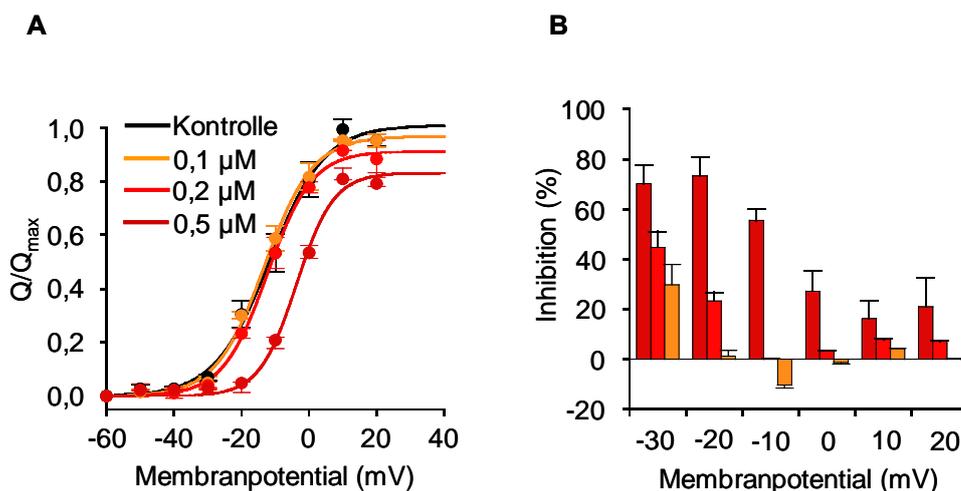


Abb. 3.17: Spannungsabhängige Inhibition der Kv1.3-Mutante Val430Trp, $[\text{K}^+]_a = 20 \text{ mM}$, RT.

A. Normierte Ladung-Spannung-Beziehung (QV), die durch Integration der *Off-Gating* Komponente gewonnen wurde. Bei den durchgezogenen Linien handelt es sich um Fits mit der Boltzmann-Funktion. (Kontrolle: $V_{1/2} = -12 \text{ mV}$, $n = 4$; $0,1 \mu\text{M}$: $V_{1/2} = -13 \text{ mV}$, $n = 4$; $0,2 \mu\text{M}$: $V_{1/2} = -12 \text{ mV}$, $n = 4$; $0,5 \mu\text{M}$: $V_{1/2} = -4 \text{ mV}$, $n = 4$). Dargestellt sind die Leitfähigkeiten von -60 mV bis $+20 \text{ mV}$.

B. Darstellung der Ladung der *Off-Gatingströme* vor und nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin #3 aufgetragen gegen die Zeit (Farben wie in A).

Bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ war ein deutlicher inhibitorischer Effekt nur bei -30 mV sichtbar. Bei positiveren Spannungen wurde mit dieser Konzentration kein Effekt beobachtet. $0,2 \mu\text{M}$ Porphyrin #3 blockierte den *Off-Gating*strom bei -30 mV fast zu 50% , bei -20 mV zu etwa 25% und pendelte sich zwischen 0 mV und $+20 \text{ mV}$ bei einer Inhibition von etwa 10% ein. Auch bei $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin #3 wurde der größte Effekt bei negativen Spannungen erzielt. Aus den Ergebnissen lässt sich ablesen, dass Porphyrin #3 besonders bei negativen Potentialen einen großen Effekt auf den *Gating*strom hatte. Bei positiven Potentialen nahm die Wirkung des Porphyrins stark ab. Die Ergebnisse zeigen, dass die Bewegungen des Spannungssensors durch Porphyrin #3 eingeschränkt wurden. Die Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 3.18) für die Inhibition der *Gating*ströme bei einem Potential von -20 mV verlief ähnlich steil wie die Konzentrations-Wirkungskurve für den Block des Ionenstroms. Das deutet darauf hin, dass bereits der Block des Spannungssensors mit hoher Kooperativität erfolgte. Die besten Fits wurden mit einem Exponenten zwischen 3 und 4 erzielt.

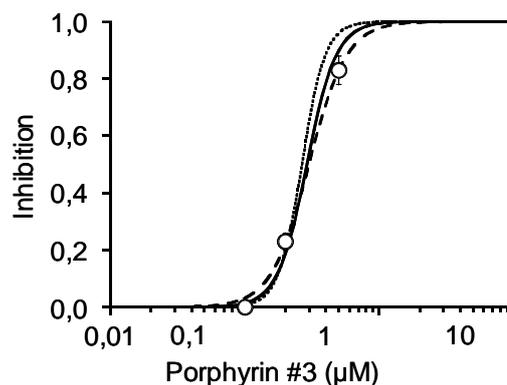


Abb. 3.18: Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition von Kv1.3-Gatingströmen durch Porphyrin #3, $[\text{K}^+]_a = 20 \text{ mM}$, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde die Membran durch einen Spannungsschritt auf -20 mV für 100 ms depolarisiert und anschließend wieder repolarisiert. Aufgetragen ist die Porphyrinkonzentration gegen die Inhibition des Kv1.3-Gatingstroms ($n = 3$). Die durchgezogene Linie zeigt einen Fit mit der Hill-Gleichung. Diese erbrachte einen Hill-Koeffizienten von $3,1$. Die gestrichelte Linie zeigt einen Fit mit der Hill-Gleichung mit einem Exponenten von 4 und die gepunktete Linie mit 5 .

Da die Inhibition des *Gating*stroms einen direkten Einfluss auf die Öffnung des Kanals hat, lässt sich aus den Ergebnissen schlussfolgern, dass dies einen gewissen Anteil am Gesamtblock des Ionenstroms ausmacht. Dieser scheint jedoch besonders bei positiven Spannungen recht gering zu sein. Um abzuschätzen, wie groß der Anteil des *Gating*stromblocks bei der Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ an der Gesamteinhibition des Ionenstroms war, wurde dieser für alle Spannungen wie folgt abgeleitet (Abb. 3.19 A und B):

$$\text{Inhibition}_{\text{Ionenstrom}} (\%) - \text{Inhibition}_{\text{Gatingstrom}} (\%).$$

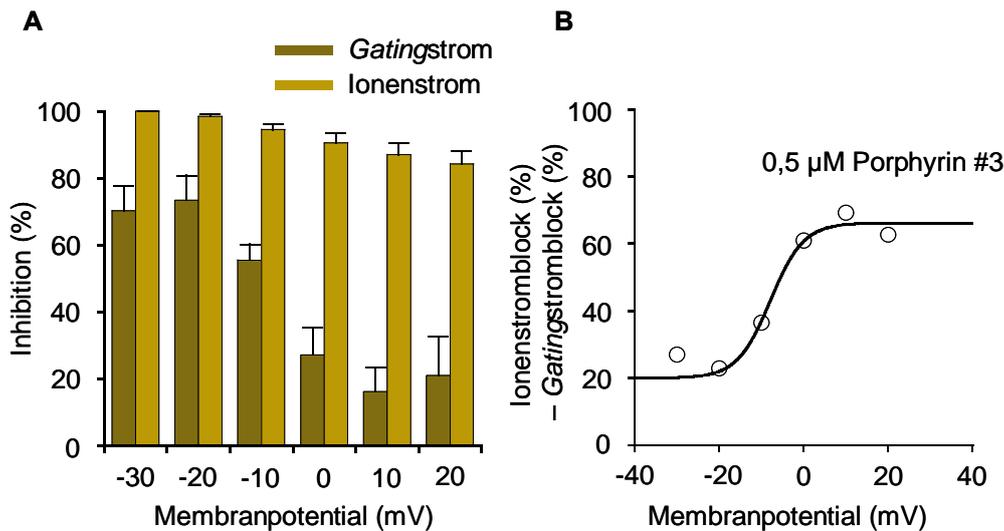


Abb. 3.19: Anteil des Gatingstromblocks am Gesamtblock des Ionenstroms bei 0,5 μM Porphyrin #3, $[\text{K}^+]_a = 20 \text{ mM}$, RT.

Die prozentuale Inhibition des Gatingstroms wurde von der Inhibition des Ionenstroms bei den gemessenen Potentialen abgezogen.

A. Inhibition des Ionenstroms bzw. Gatingstroms bei unterschiedlichen Spannungen nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3.

B. Auftragung der Differenz aus Ionenstromblock und Gatingstromblock nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3. Bei der durchgezogenen Linie handelt es sich um einen Fit mit der Boltzmann-Funktion. Der halbmaximale Effekt lag bei einer Spannung von -8 mV.

Es zeigte sich, dass die Abnahme des Gatingstromblocks über die untersuchte Spannung stärker war als der oben beschriebene spannungsabhängige Block des Ionenstroms (Abb.3.4 A und B). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein wesentlicher Teil der Inhibition nicht auf den Block des Gatingstroms zurückzuführen ist, sondern auf dem Block der Pore beruht.

3.7 Bindung an den geschlossenen und den geöffneten Kv1.3-Kanal

Terlau *et al.* (1999) zeigten mit dem Shaker-Kanal aus *Drosophila melanogaster*, dass der Porenblocker κ -Conotoxin PVIIA während der Depolarisation zu einer starken Inhibition der ersten Phase der Aktivierung und zu einer geringeren Inhibition am Ende des Pulses führt. Sie führten dies auf eine veränderte Affinität des Toxins nach Öffnen des Kanals zurück: Im Geschlossenenzustand bindet Conotoxin in einem Gleichgewicht mit einer hohen Affinität und erreicht nach dem Öffnen ein neues Gleichgewicht mit einer niedrigeren Affinität. Als zugrunde liegender Mechanismus wird die Interaktion des Conotoxins mit permeierenden K^+ -Ionen angenommen, ähnlich wie es bereits für Charybdotoxin beschrieben wurde (MacKinnon und Miller, 1988). Der Übergang von einem Gleichgewichtszustand in einen anderen Gleichgewichtszustand wird als Relaxation bezeichnet und die Dauer, die dieser Vorgang in Anspruch nimmt, als Relaxationszeit. Ein ähnlicher Effekt war auch nach

Applikation von Porphyrin #3 zu beobachten. Wie bereits in Abb. 3.12 gezeigt wurde, verlangsamte Porphyrin #3 die Aktivierungskinetik von Kv1.3. In Abb. 3.20 A und B sind repräsentative Stromspuren vor und nach Applikation von 0,2 μM Porphyrin #3 gezeigt. Der Blocker bewirkte eine stärkere Reduktion des frühen Stroms und hatte einen geringeren Effekt auf die Amplitude am Ende des Pulses.

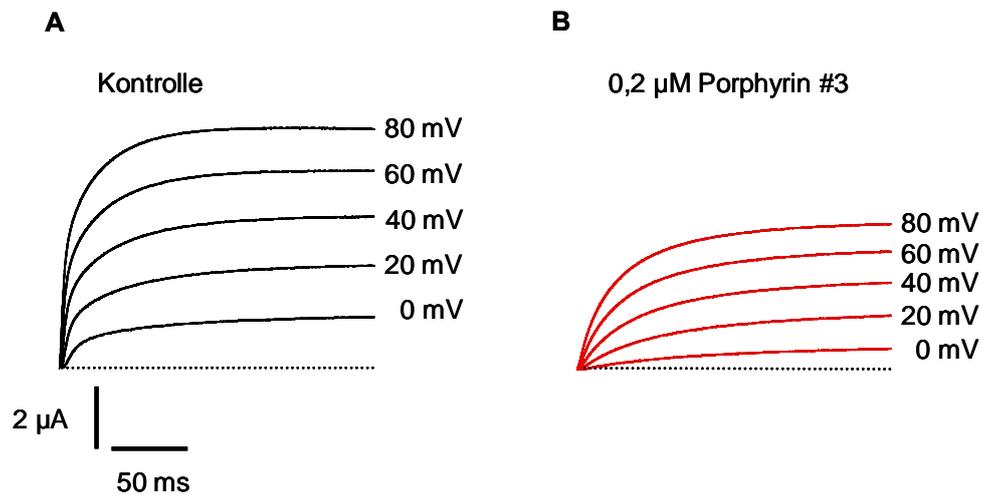


Abb. 3.20: Verlangsamung der Aktivierungskinetik des Kv1.3-Tailstroms bei unterschiedlichen Depolarisationsstärken, $[\text{Rb}^+]_a = 20 \text{ mM}$, $16 \text{ }^\circ\text{C}$.

A. Repräsentative Stromspuren in Kontrolllösung, die auf unterschiedliche starke Depolarisation folgten.

B. Repräsentative Stromspuren nach Applikation von 0,2 μM Porphyrin #3, die auf unterschiedliche starke Depolarisation folgten.

Der Zeitverlauf der abnehmenden Inhibition über die Dauer der Depolarisation wurde ermittelt, indem die Stromspuren nach Porphyrinapplikation durch die Stromspuren, die in Kontrolllösung aufgezeichnet wurden, dividiert wurden (Abb. 3.21 A). Das Ergebnis waren Kurven, die Auskunft darüber geben, zu welchen Anteilen die Kanäle zu Beginn und am Ende der Depolarisation geblockt wurden bzw. sie geben die Wahrscheinlichkeit an, dass diese nicht geblockt wurden. Es wurde deutlich, dass das Verhältnis U (Wahrscheinlichkeit für nicht geblockte Kanäle = *unblocked channels*) von durch Porphyrin #3 beeinflusste Stromantworten und Kontrollantworten während der Depolarisation zunahm und sich am Ende des Pulses asymptotischen Werten näherte. So lag bei allen untersuchten Spannungen die Wahrscheinlichkeit, dass die Kanäle zu Beginn der Depolarisation nicht geblockt wurden bei 0,06 ($= U^{(C)}$, für nicht geblockte, geschlossene Kanäle = *closed channels*). Am Ende der Depolarisation lag die Wahrscheinlichkeit ($= U^{(O)}$, für ungeblockte, offene Kanäle, *open channels*) in Abhängigkeit der Spannung bei 0,4 (0 mV) bis 0,6 (80 mV). Im Gegensatz zu den Conotoxin-Messungen von Terlau *et al.* (1999) konnten die Kurven nicht mit einer

einfach exponentiellen Funktion gefittet werden, sondern mit einer Funktion, die zwei Zeitkonstanten beinhaltet (Gleichung 3.10).

$$\frac{I}{I_{\max}} = 1 - A_0 e^{-(t/\tau_1)} - A_1 e^{-(t/\tau_2)} \quad \text{Gleichung 3.10}$$

Die Fits sind als blaue Punkte in Abb. 3.21 A erkennbar. Die Zeitkonstanten, die mit zunehmender Spannung kleiner wurden, wurden als Relaxationszeitkonstanten bezeichnet und sind in Tab.3.2 aufgelistet.

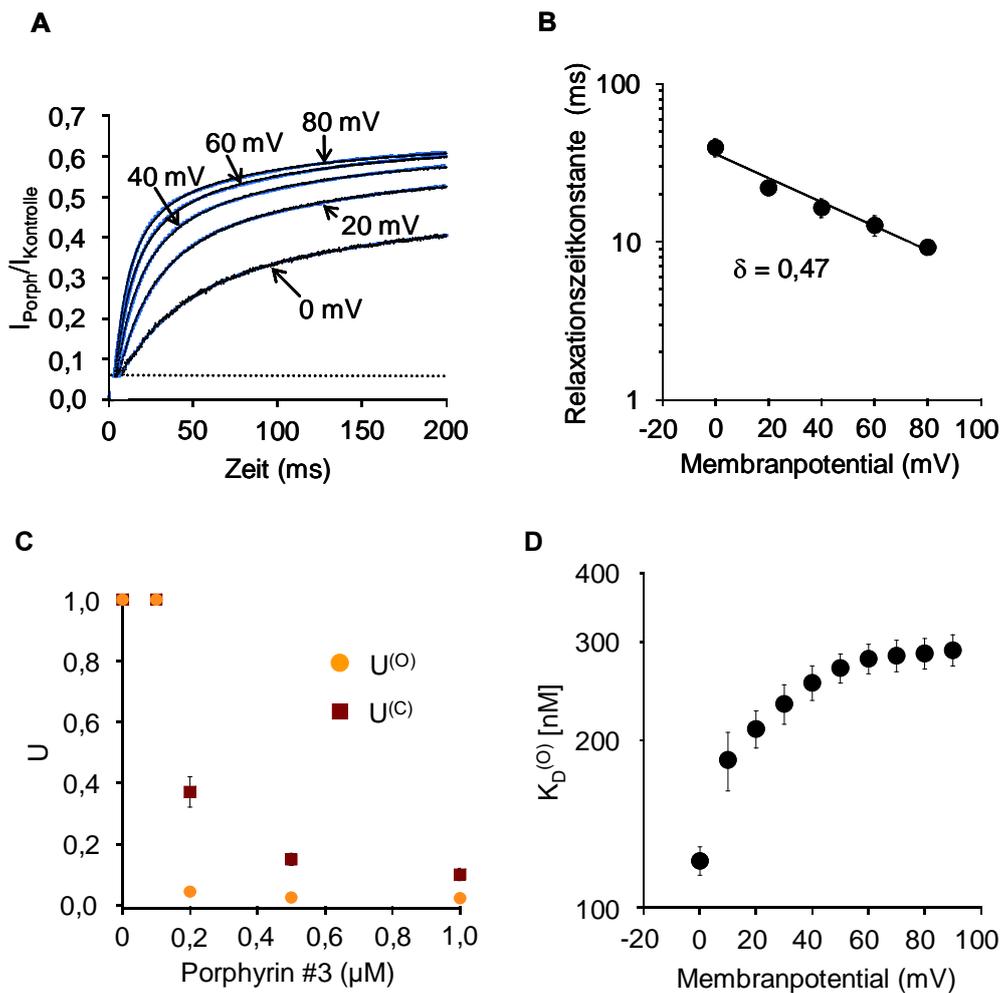


Abb. 3.21: Konzentrationsabhängigkeit der fraktionellen Inhibition des Kv1.3-Tailstroms bei unterschiedlichen Depolarisationsstärken, $[\text{Rb}^+]_a = 20 \text{ mM}$, $16 \text{ }^\circ\text{C}$.

A. Die Stromspuren in Anwesenheit von $0,2 \mu\text{M}$ Porphyrin #3 (Abb. 3.20 A) wurden durch die Stromspuren der Kontrolle (Abb. 3.20 B) dividiert. Die blauen Punkte repräsentieren Fits mit einer zweifach exponentiellen Funktion. Die gestrichelte Linie deutet den Punkt an, an dem die Fits zusammenlaufen.

B. Spannungsabhängigkeit der Relaxationszeitkonstante, abgeleitet aus A.

C. Wahrscheinlichkeit U , dass die Kanäle im geschlossenen und geöffneten Zustand nicht geblockt sind, gegen die Porphyrinkonzentration aufgetragen, abgeleitet aus A.

D. Spannungsabhängigkeit der Dissoziationskonstante für den offenen Kanal, abgeleitet aus A.

Eine kleinere Zeitkonstante (τ_1) beschreibt den ersten Teil der Kurve, während eine größere Zeitkonstante (τ_2) den zweiten Teil beschreibt.

Tab. 3.2: Relaxationszeitkonstanten τ_1 und τ_2 für unterschiedliche Spannungen aus Abb. 3.21 A. *1: Spannung, *2: Zeitkonstante.

*2 \ *1	0 mV	20 mV	40 mV	60 mV	80 mV
τ_1 (ms)	40 ± 5	22 ± 1	17 ± 2	13 ± 2	10 ± 1
τ_2 (ms)	293 ± 31	165 ± 15	123 ± 15	103 ± 12	72 ± 8

Aus der Beobachtung heraus, dass die Inhibition des Kanals besonders bei positiven Potentialen vor allem aus einem Porenblock resultiert (siehe Abb. 3.19), lässt sich mit den Relaxationszeitkonstanten unter Zuhilfenahme der Woodhull-Gleichung (Woodhull, 1973; Gleichung 3.11) beschreiben, wie tief Porphyrin #3 in das elektrische Feld eindringt. Das elektrische Feld wird durch die Membranspannung erzeugt und übt auf alle darin befindlichen Ladungen eine anziehende oder abstoßende Kraft aus.

$$K_D(V) = K_D(0)e^{(z\delta FV/RT)} \quad \text{Gleichung 3.11}$$

wobei K_D die Gleichgewichtskonstante ist, V das Membranpotential, $K_D(0)$ die Gleichgewichtskonstante bei einer Spannung von 0 mV, z die Valenz des Porenblockers und δ der Teil des elektrischen Feldes, der von dem Blocker durchquert werden muss, um die Bindungsstelle im Kanal von der extrazellulären Membranseite zu erreichen. F , R und T sind die Faradaykonstante, die Gaskonstante und die absolute Temperatur. Das Woodhull-Modell (1973) findet sehr häufig bei der Analyse und die Interpretation von Inhibitionsmechanismen unterschiedlichster Kanaltypen und Blockern Anwendung (Tikhonov und Magazanik, 1997) und wurde ursprünglich für die Beschreibung von Porenblockern, die den offenen Kanal inhibieren, benutzt. In Abb. 3.21 B ist die Spannungsabhängigkeit der ersten, kleineren Relaxationszeitkonstante (τ_1) gegen die Membranspannung in einem halblogarithmischen Plot aufgetragen. Die durchgezogene Linie durch die Messpunkte wurde mit der Woodhull-Gleichung berechnet und beschreibt die Distanz (δ), die Porphyrin #3 innerhalb des elektrischen Feldes bis zur Bindungsstelle zurücklegen muss. Der Wert lag bei $\delta = 0,47$. Das bedeutet, dass Porphyrin #3, unter der Annahme, dass die Spannungsabhängigkeit der Inhibition sich weitestgehend aus einem Porenblock ableiten lässt, etwa 50 % in das elektrische Feld eindringt, um die Bindungsstelle zu erreichen. Bei Verwendung der zweiten, größeren Relaxationszeitkonstante (τ_2) wurde ein geringerer Wert ermittelt ($\delta = 0,37$).

In Abb. 3.21 C ist die Wahrscheinlichkeit U , dass die Kanäle nicht geblockt sind gegen vier verschiedene Porphyrinkonzentrationen und die Kontrolle aufgetragen. Es wird deutlich, dass sich das Verhältnis nicht wie beispielsweise für Conotoxin (Terlau *et al.*, 1999) mit einer einfachen Hill-Gleichung beschreiben ließ. Ebenso wie bereits für die Konzentrations-Wirkungskurve (siehe Abb. 3.10 B) liegt die Ursache in der steilen Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition. Aus der Wahrscheinlichkeit für ungeblockte Kanäle zu Beginn der Depolarisation $U^{(C)}$ und am Ende des Pulses $U^{(O)}$ ließ sich über die Gleichung 3.12 die apparenten Gleichgewichtskonstanten für den geschlossenen und für den offenen Kanal bei verschiedenen Spannungen abschätzen. Sie geben einen Anhaltspunkt für die unterschiedlich starke Affinität für geschlossenen und offenen Kanal. Für den offenen Kanal galt:

$$K_{Dapp}^{(O)} = \frac{[\text{Porph}] \cdot U^{(O)}}{1 - U^{(O)}} \quad \text{Gleichung 3.12}$$

Für den geschlossenen Kanal gab es keine Spannungsabhängigkeit. Bei allen untersuchten Spannungen betrug die Wahrscheinlichkeit für ungeblockte Kanäle bei einer eingesetzten Konzentration von $0,2 \mu\text{M}$ $0,06$. Mit Gleichung 3.12 ergab sich $K_{Dapp}^{(C)} = 13 \text{ nM}$ und ist damit vergleichbar mit der Dissoziationskonstanten, die in Konkurrenzexperimenten von Gradl *et al.* (2003) gewonnen wurde (20 nM). Für die offenen Kanäle wurde in Abhängigkeit der Spannung ein unterschiedlicher K_D ermittelt, der bei einer Spannung von ca. $+50 \text{ mV}$ nicht weiter zunahm (Abb. 3.21 D). In Tab. 3.3 sind die K_{DS} für die unterschiedlichen Spannungen zusammengestellt.

Tab. 3.3: Apparente K_D -Werte für den offenen Kanal bei unterschiedlichen Spannungen aus Abb. 3.21 D.

Spannung (mV)	$K_{Dapp}^{(O)}$ (nM)
0	122 ± 7
10	185 ± 22
20	210 ± 16
30	233 ± 19
40	254 ± 18
50	270 ± 16
60	281 ± 17
70	284 ± 19
80	287 ± 18
90	291 ± 19

Bei den analogen Conotoxin-Auswertungen von Terlau *et al.* (1999) zeigte sich, dass sich der apparente K_D für den offenen Kanal nicht bei einer Spannung stabilisierte, sondern in dem untersuchten Bereich (-30 mV bis +80 mV) stetig anstieg. Das war bei den Experimenten mit Porphyrin #3 nicht der Fall. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der für das Conotoxin postulierte Mechanismus, nämlich die Konkurrenz von Conotoxin mit permeierenden K^+ -Ionen um dieselbe Bindungsstelle, in der die Ursache für die Destabilisierung der Bindung beim Öffnen des *Shaker*-Kanals gesehen wird, für Porphyrin #3 nicht angenommen werden kann.

3.8 Applikation von Porphyrin #3 von der intrazellulären und extrazellulären Membranseite von Kv1.3 in *Inside-out*- und *Outside-out*-Patch-Clamp-Experimenten

Von einigen Porenblockern ist bekannt, dass sie Bindungsstellen auf der extrazellulären und auf der intrazellulären Kanalseite besetzen und den Stromfluss durch die Pore inhibieren können (z. B. TEA^+). Die Applikation des Kaliumkanalblockers 4-Aminopyridin (4-AP) führt sowohl von der Membraninnen- als auch von der Membranaußenseite zur Inhibition des Ionenflusses, obwohl die Bindungsstelle auf der Membraninnenseite liegt. Von außen appliziertes 4-AP erreicht die Bindungsstelle, indem es die Membran durchquert. In der NMR-Strukturanalyse von Ader *et al.* (2008) konnte gezeigt werden, dass Porphyrin #3 den Kanal von der extrazellulären Seite blockiert. Mithilfe von *Inside-out*- und *Outside-out*-Patch-Clamp-Messungen sollte überprüft werden, ob die Applikation von der Innenseite ebenfalls zu einer Inhibition des Ionenflusses führt. In Abb. 3.22 A und B sind repräsentative Experimente der *Inside-out*- und der *Outside-out*-Messungen von *Xenopus*-Oozyten gezeigt.

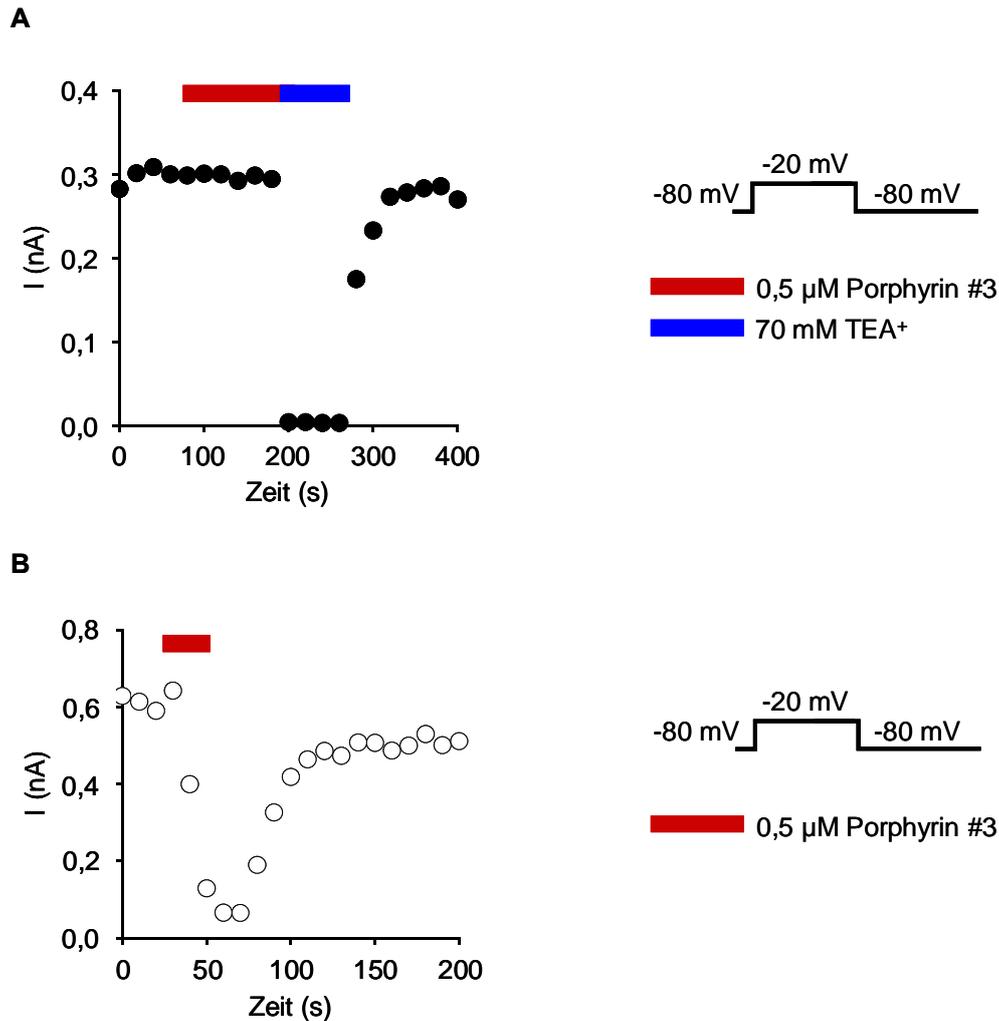


Abb. 3.22: Applikation von 0,5 μM Porphyrin auf die Kanalinnen- bzw. Kanalaußenseite von Kv1.3 in *Patch-Clamp*-Messungen, $[\text{K}^+]_a = 2 \text{ mM}$, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch wiederholte Depolarisation auf -20 mV für 100 ms bei einem Interpulsintervall von 10 s geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Dargestellt sind die Stromamplituden bei -20 mV .

A. Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin auf die Membraninnenseite (*Inside-out*). 70 mM TEA^+ wurde als Positivkontrolle verwendet.

B. Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin auf die Membranaußenseite (*Outside-out*).

Bei der Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin #3 auf die Membraninnenseite kam es zu keiner Reduktion der Stromamplitude (Abb. 3.22 A). 70 mM TEA^+ dienten als Positivkontrolle und inhibierten den Strom reversibel. Bei der Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin #3 auf die Membranaußenseite (Abb. 3.22 B) kam es zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Stromamplitude. Die Resultate der *Patch-Clamp*-Experimente zeigten, dass Kv1.3 ausschließlich von der Kanalaußenseite blockiert wird und nicht von der Kanalinnenseite.

3.9 Beeinflusst die extrazelluläre K^+ -Konzentration die Inhibition des Kv1.3-Stroms?

Von einigen Peptidtoxinen wie z. B. CTX (Anderson *et al.*, 1988), ATX2 (Ranganathan *et al.*, 1996) und KTX (Legros *et al.*, 2000), die den Kanal über einen Porenblock inhibieren, ist bekannt, dass erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentrationen die Affinität zum Rezeptor stark herabsetzen. Dies ist damit zu erklären, dass die Toxine über die positiv geladene Aminosäure Lysin (Lys27 bei KTX) dieselbe Bindungsstelle an der Pore besetzen wie die K^+ -Ionen. In Konkurrenzexperimenten mit radioaktiv markiertem KTX (^{125}I -KTX) und der Kaliumkanal-Chimäre KcsA-Kv1.3 konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Porphyrin #3 hingegen *unabhängig* von der externen K^+ -Konzentration war. Die Messungen wurden von Olaf Pongs und Marie-France Martin-Eauclaire am Institut Jean Roche der Universität Marseille durchgeführt. Abb. 3.23 stellt die K_D -Werte von ^{125}I -KTX und Porphyrin #3 zu KcsA-Kv1.3 in Abhängigkeit der externen K^+ -Konzentration dar.

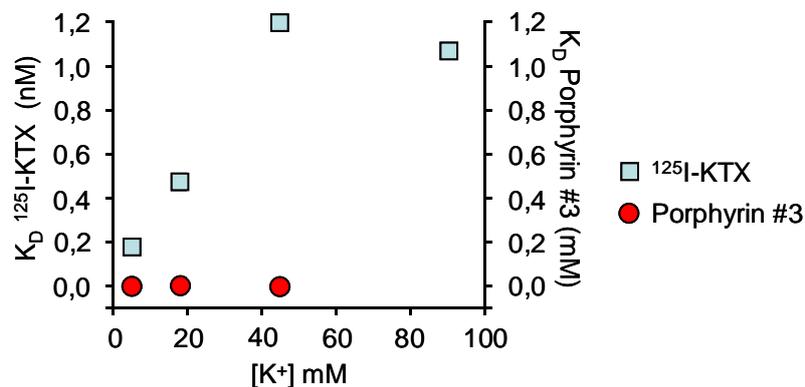


Abb. 3.23: Beeinflussung der Affinität von ^{125}I -KTX und Porphyrin #3 durch externe K^+ -Konzentrationen in Konkurrenz-Experimenten.

Während die Porphyrinbindung (rote Punkte) unabhängig von der Kaliumkonzentration war, nahm der K_D von ^{125}I -KTX (blaue Quadrate) mit zunehmender Kaliumkonzentration ab.

Die Abbildung wurde freundlicherweise von Olaf Pongs zur Verfügung gestellt.

In elektrophysiologischen Messungen sollte untersucht werden, ob die Bindung von Porphyrin #3 zu Kv1.3 ebenfalls von der externen K^+ -Konzentration abhängig war. Es wurden Experimente mit unterschiedlichen K^+ -Konzentrationen (2 mM und 100 mM K^+) zusätzlich zu der bereits bekannten Konzentration von 20 mM durchgeführt. In Abbildung 3.24 A und B ist die Einwasch- und Auswaschkinetik von 0,5 μM Porphyrin bei einer extrazellulären K^+ -Konzentration von 2 mM dargestellt.

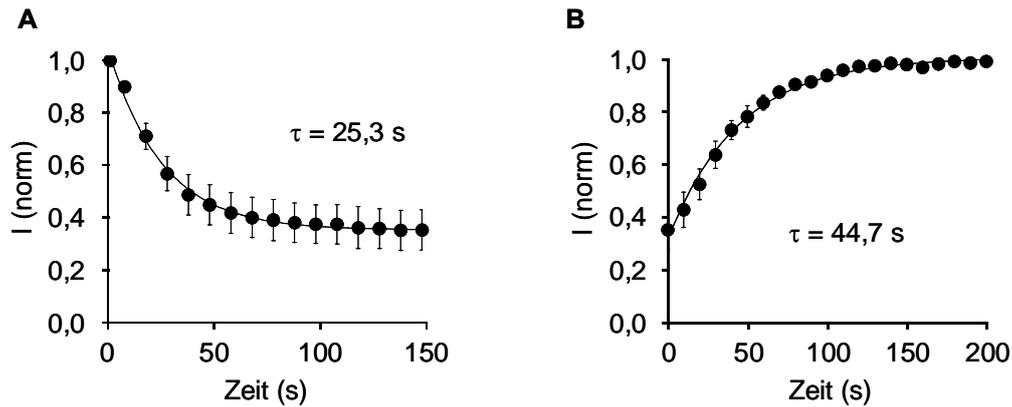


Abb. 3.24: Einwasch- und Auswaschkinetik von 0,5 μM Porphyrin #3 bei +60 mV, $[\text{K}^+]_a = 2 \text{ mM}$, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch wiederholte Depolarisation auf +60 mV für 100 ms bei einem Interpulsintervall von 10 s geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Die Auswärtstails wurden bei -40 mV aufgezeichnet.

A. Einwaschkinetik: Normierte Tailstromamplituden bei -40 mV aufgetragen als Funktion der Zeit. Bei der durchgezogenen Linie handelt es sich um einen einfach exponentiellen Fit ($n = 5$).

B. Auswaschkinetik: Normierte Tailstromamplituden bei -40 mV aufgetragen als Funktion der Zeit. Bei der durchgezogenen Linie handelt es sich um einen einfach exponentiellen Fit ($n = 5$).

Die ermittelten Werte für die Einwasch- ($\tau = 25,3 \pm 1,3 \text{ s}$ ($n = 5$)) und die Auswaschkinetik ($\tau = 44,7 \pm 2,5 \text{ s}$ ($n = 5$)) sowie das Ausmaß der Inhibition (60 %) bei 2 mM K^+ unterschieden sich nicht wesentlich von den Werten, die zuvor bei einer externen K^+ -Konzentration von 20 mM gemessen wurden. In Abbildung 3.25 A und B ist die Einwasch- und Auswaschkinetik von 0,5 μM Porphyrin #3 bei einer extrazellulären K^+ -Konzentration von 100 mM dargestellt.

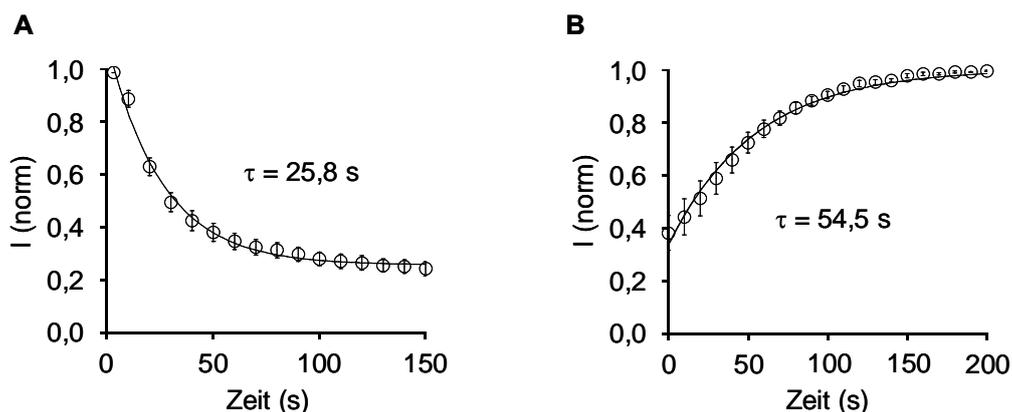


Abb. 3.25: Einwasch- und Auswaschkinetik von 0,5 μM Porphyrin #3 bei +60 mV, $[\text{K}^+]_a = 100 \text{ mM}$, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch wiederholte Depolarisation auf +60 mV für 100 ms bei einem Interpulsintervall von 10 s geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Die Einwärtstails wurden bei -80 mV aufgezeichnet.

A. Einwaschkinetik: Normierte Tailstromamplituden bei -40 mV aufgetragen als Funktion der Zeit. Bei der durchgezogenen Linie handelt es sich um einen einfach exponentiellen Fit ($n = 5$).

B. Auswaschkinetik: Normierte Tailstromamplituden bei -40 mV aufgetragen als Funktion der Zeit. Bei der durchgezogenen Linie handelt es sich um einen einfach exponentiellen Fit ($n = 5$).

Die ermittelten Werte für die Einwasch- ($\tau = 25,8 \pm 0,8$ s ($n = 5$)) und die Auswaschkinetik ($\tau = 54,5 \pm 1,5$ s ($n = 5$)) sowie die erreichte Inhibition bei 100 mM K^+ (ca. 70 %) unterschieden sich nicht wesentlich von den Werten, die zuvor bei einer externen K^+ -Konzentration von 20 mM gemessen wurden. Die Experimente mit 2 mM und 100 mM extrazellulären K^+ zeigten, dass die K^+ -Konzentration, wie bereits für die Bindung an KcsA-Kv1.3 beschrieben, keinen Einfluss auf die Bindung von Porphyrin #3 hatte.

3.10 Beeinflusst der Austausch einer einzelnen Aminosäure in der *Turret*-Region die Inhibition des Kv1.3-Stroms?

In Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem KTX konnte gezeigt werden, dass bestimmte Aminosäuren in den äußeren Porenregionen (*Turret*) von KcsA-Kv1.3 die Bindung des Blockers beeinflussen können (Lange *et al.*, 2006). Durch gezielten Austausch der sterisch kleinen Aminosäure Glyzin (Gly) an Position 58 gegen die relativ große Aminosäure Phenylalanin (Phe), nahm die Affinität von KTX stark ab. Der Aminosäureaustausch hatte hingegen auf die Bindung von Porphyrin #3 keinen Einfluss (Ader *et al.*, 2008).

In elektrophysiologischen Experimenten wurde die analoge Punktmutante in Kv1.3 (Gly377Phe) ebenfalls mit Porphyrin #3 und Kalitoxin verwendet, um zu überprüfen, ob es hier ebenfalls zu unterschiedlichen Effekten kommt, wie sie bei der Chimäre beobachtet wurden. In Abb. 3.26 A ist ein repräsentatives Experiment mit der Mutante Gly377Phe vor und nach Applikation von 0,5 μ M Porphyrin #3 dargestellt. Es zeigte sich, dass der Aminosäureaustausch von Glyzin nach Phenylalanin innerhalb der *Turret*-Region keinen Einfluss auf die Affinität von Porphyrin #3 hatte. Sowohl Einwasch- ($\tau = 22,5 \pm 0,7$ s ($n = 3$)) und Auswaschkinetiken ($\tau = 51,4 \pm 2,2$ s ($n = 3$)) als auch der erzielte Block waren ähnlich zu den Werten, die beim Wt erzielt wurden. In Abb. 3.25 B sind repräsentative Experimente mit dem Kv1.3-Kanal und der Punktmutante Gly377Phe und verschiedenen Konzentrationen Kalitoxin dargestellt. Bei dem Wt-Kanal waren 1 nM KTX ausreichend, um eine vollständige Inhibition zu erreichen, während bei der Punktmutante eine Konzentration von 100 nM lediglich zu einer Inhibition von ca. 20 % führte.

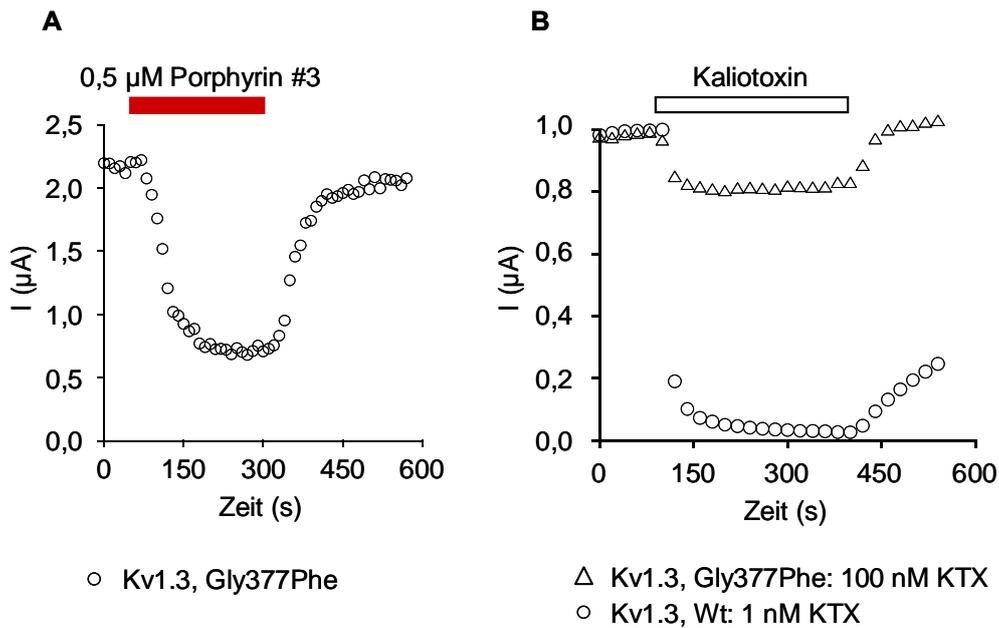


Abb. 3.26: Applikation von Porphyrin #3 bzw. Kaliotoxin auf die Kv1.3 Punktmutante Gly377Phe und den Wt-Kanal.

A. Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 auf die Kv1.3 *Turret*mutante (Gly377Phe). Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch wiederholte Depolarisation auf +60 mV für 100 ms bei einem Interpulsintervall von 10 s geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Dargestellt sind die *Tail*stromamplituden bei -80 mV, $[\text{K}^+]_a = 20$ mM, RT.

B. Applikation von 100 nM Kaliotoxin auf die Kv1.3 *Turret*mutante bzw. 1 nM Kaliotoxin auf den Kv1.3 Wt-Kanal. Das Auswaschen beim Wt-Kanal ist nicht bis zum Ende dargestellt. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch wiederholte Depolarisation auf +60 mV für 100 ms bei einem Interpulsintervall von 20 s geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Dargestellt sind die normierten Stromamplituden bei +60 mV, $[\text{K}^+]_a = 2$ mM, RT.

3.11 Wirkung von Porphyrin #3 auf weitere Vertreter der *Shaker*-Kaliumkanalfamilie

Von allen bisher bekannten Kaliumkanalblockern ist gezeigt worden, dass sie eine unterschiedliche Affinität für die Mitglieder innerhalb derselben oder einer verwandten Kaliumkanalfamilie aufweisen. Die Ursache hierfür ist darin zu sehen, dass die Aminosäuresequenz der an der Bindung beteiligten Strukturen zwar ähnlich, aber nicht identisch ist. Oftmals reicht eine einzelne Aminosäure an einer exponierten Stelle der Porenregion oder des Spannungssensors aus, um die Affinität eines Inhibitors entweder herabzusetzen oder zu erhöhen. Die *Shaker*-Kaliumkanalfamilie (Kv1) hat sieben Mitglieder (Coetzee *et al.*, 1999), die eine hohe Sequenzhomologie besonders im Bereich der Porendomäne aufweisen. Durch Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 sollte über das Ausmaß der Inhibition die Affinität für sechs der Mitglieder (Kv1.1-Kv1.6) ermittelt werden. In der Abb. 3.27 A-F sind die normierten Strom-Spannungskurven von Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5 und Kv1.6 vor und nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 dargestellt. Die

Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 auf die Mitglieder der Kv1-Kaliumkanalfamilie hatte unterschiedlich starke Inhibitionseffekte zur Folge. Während 0,5 μM den Strom von Kv1.2 bei +60 mV ähnlich wie bei Kv1.3 zu etwa 70 % inhibierte, wurde der Strom von Kv1.4 (*IR*) zu etwa 50 % inhibiert.

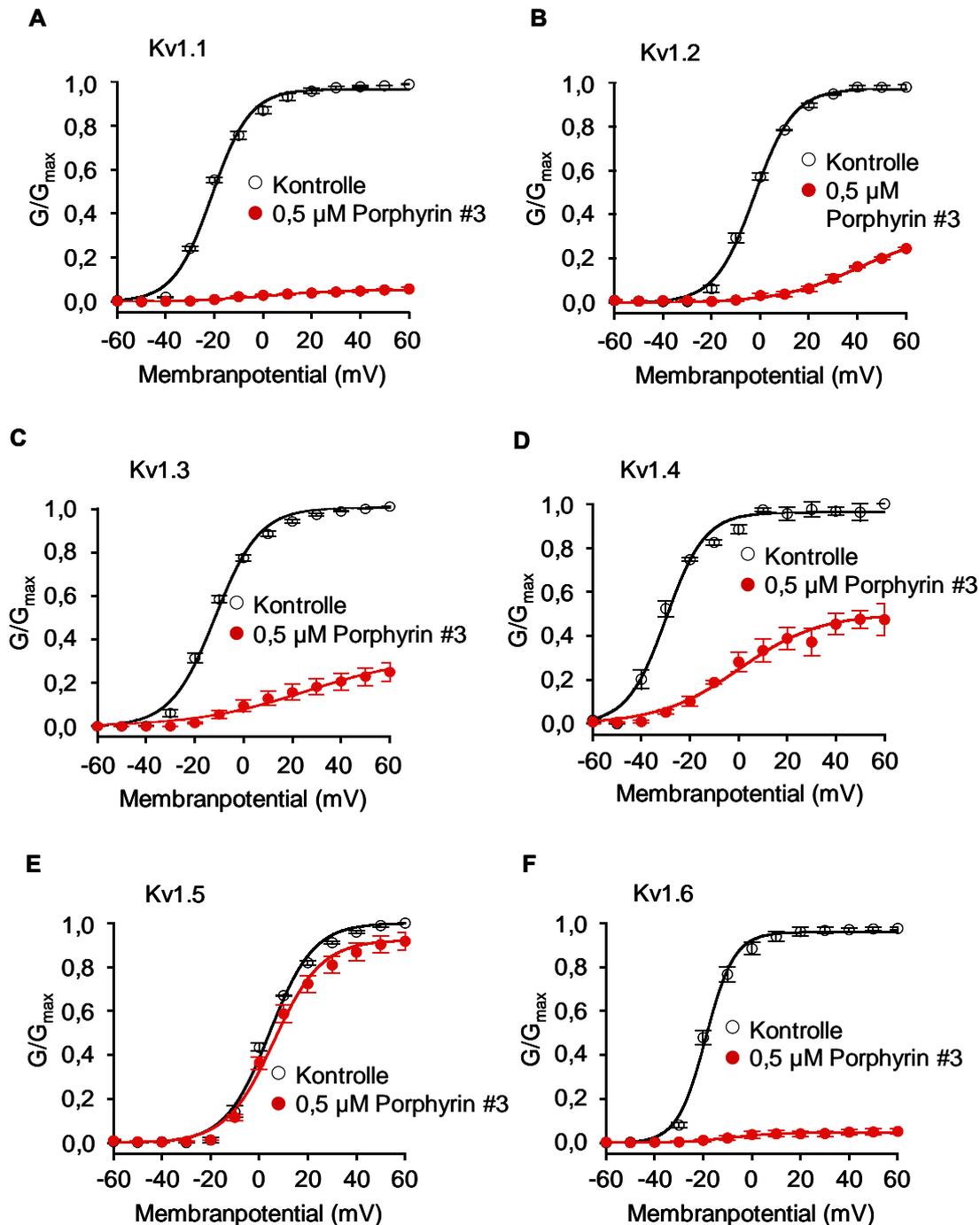


Abb. 3.27: Normierte Strom-Spannungskurven vor (schwarze Kreise) und nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 (rote Punkte) auf Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4 (*IR*), Kv1.5 und Kv1.6, $[\text{K}^+]_a = 20 \text{ mM}$, RT.

Normierte *Tail*stromamplituden bei -80 mV aufgetragen als Funktion des vorhergehenden Testpotentials vor und nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin. Bei den durchgezogenen Linien handelt es sich um Fits mit der Boltzmann-Funktion.

Der Reststrom von Kv1.5 betrug nach der Applikation noch etwa 90 %, während der Strom von Kv1.1 und Kv1.6 bei +60 mV nahezu vollständig inhibiert wurde. In Abb. 3.28 ist die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition für Kv1.1 dargestellt. Es zeigte sich, dass der Kurvenverlauf ähnlich steil verlief, wie bereits für Kv1.3 (Abb. 3.8 und 3.10) gezeigt. Der aus dem Fit mit der Hill-Gleichung ermittelte EC_{50} -Wert lag bei 0,15. Der Hill-Koeffizient betrug 4,9.

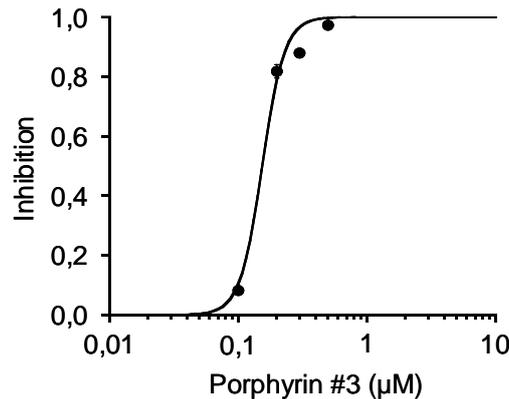


Abb. 3.28: Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition von Kv1.1-Strömen durch Porphyrin, $[K^+]_a = 20$ mM, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch wiederholte Depolarisation auf -20 mV für 100 ms bei einem Interpulsintervall von 10 s geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Aufgetragen ist die Porphyrinkonzentration gegen die Inhibition des Kv1.3-Stroms ($n = 4$).

Die unterschiedliche Affinität der Kv1-Kanäle zu Porphyrin #3 ähnelte im relativen Verhältnis den Affinitätsunterschieden zu TEA^+ . Dieser Porenblocker, der neben den Kv1-Kanälen auch alle weiteren Kanäle inhibiert, bindet im millimolaren Bereich. Kv1.1 und Kv1.6 sind relativ sensitiv gegenüber TEA^+ und haben einen $K_D < 1$ mM. Kv1.5 ist relativ insensitiv gegenüber TEA^+ und hat einen K_D von 330 mM (MacKinnon und Yellen, 1990; Grissmer *et al.*, 1994). In Abb. 3.29 ist ein Sequenzvergleich zwischen den Vertretern der Kv1-Familie, dem *Shaker*-Kanal, der KcsA-Kv1.3-Chimäre und KcsA Wt für den Bereich der Porendomäne (innere und äußere Helix, *Turret* (T), Porenhelix (PH) und Selektivitätsfilter (SF) dargestellt. Von besonderer Bedeutung für die Bindung von TEA^+ ist eine einzelne Aminosäure, die am Porenausgang unweit des Selektivitätsfilters liegt und sich innerhalb der Kv1-Familie teilweise unterscheidet. Sie ist mit einem roten Rechteck markiert. Es handelt sich um die Aminosäure Tyrosin (Y) die man z.B. bei Kv1.1, Kv1.6 und KcsA (Wt und Chimäre) findet bzw. Valin (V, bei Kv1.2), Histidin (H, bei Kv1.3), Lysin (K, bei Kv1.4), Arginin (R, bei Kv1.5) und Threonin (T, bei *Shaker*).

	S5 (Äußere Helix)	T	PH
rKv1.1	TLKASMRELGLLIFFLFIGVILFSSAVYFAEAEAAESHFSSIPDAF		
rKv1.2	TLKASMRELGLLIFFLFIGVILFSSAVYFAEADERDSQFPSIPDAF		
rKv1.3	TLKASMRELGLLIFFLFIGVILFSSAVYFAEADDPSSGFNSIPDAF		
rKv1.4	TLRASMRELGLLIFFLFIGVILFSSAVYFAEAEDEPTTHFQSIPDAF		
hKv1.5	TLQASMRELGLLIFFLFIGVILFSSAVYFAEADNQGTHFSSIPDAF		
hKv1.6	TLQASMRELGLLIFFLFIGVILFSSAVYFAEADDDSLFPSIPDAF		
<i>Shaker</i>	TLKASMRELGLLIFFLFIGVVLVSSAVYFAEAGSENSFFKSIPDAF		
KcsA-Kv1.3	GSALHWRAAGAATVLLVIVLLAGSYLAVLAEADDPSTSGFSSIPDAF		
KcsA Wt	GSALHWRAAGAATVLLVIVLLAGSYLAVLAERGAPGAQLITYPRAL		

	PH	SF	T	S6 (Innere Helix)
rKv1.1				WWAVVSMTTVGYGDMYPVTIGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVS
rKv1.2				WWAVVSMTTVGYGDMYPTTIGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVS
rKv1.3				WWAVVTMTTVGYGDMHPVTIGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVS
rKv1.4				WWAVVTMTTVGYGDMKPIITVGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVS
hKv1.5				WWAVVTMTTVGYGDMRPITVGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVS
hKv1.6				WWAVVTMTTVGYGDMYPMTVGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVS
<i>Shaker</i>				WWAVVTMTTVGYGDMTPVGVWGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVS
KcsA-Kv1.3				WWSVETATTVGYGDLYPVTLWGRCVAVVVMVAGITSFGLVTAALAT
KcsA Wt				WWSVETATTVGYGDLYPVTLWGRVLAVVVMVAGITSFGLVTAALAT

Abb. 3.29: Sequenzvergleich der Porendomäne von Mitgliedern der Kv1-Familie, von *Shaker*, der KcsA-Kv1.3-Chimäre und von KcsA Wt.

Aufgrund der analogen Affinitätsunterschiede zwischen Porphyrin #3 und TEA⁺ zu den untersuchten Kv-Kanälen, wurde vermutet, dass die Aminosäure Tyrosin, die sich am Porenausgang befindet, auch für die Affinität von Porphyrin #3 eine wichtige Rolle spielt. Die NMR-Strukturanalyse von Ader *et al.* (2008) lieferte aufgrund fehlender Signale für diese Aminosäure keine Hinweise auf eine Interaktion mit Porphyrin #3 und der Chimäre KcsA-Kv1.3. Um die Bedeutung des Tyrosins für die Bindung von Porphyrin #3 zu untersuchen, wurde die Aminosäure Arginin in Kv1.5 (geringe Affinität des Porphyrins) an Position 487 gegen Tyrosin, wie es in Kv1.1 und Kv1.6 (hohe Affinität des Porphyrins) vorkommt, ausgetauscht. In der Abbildung 3.30 A und B sind die normierten Strom-Spannungskurven von Kv1.5 Wt und Kv1.5 Arg487Tyr vor und nach Applikation von 0,5 µM Porphyrin #3 dargestellt.

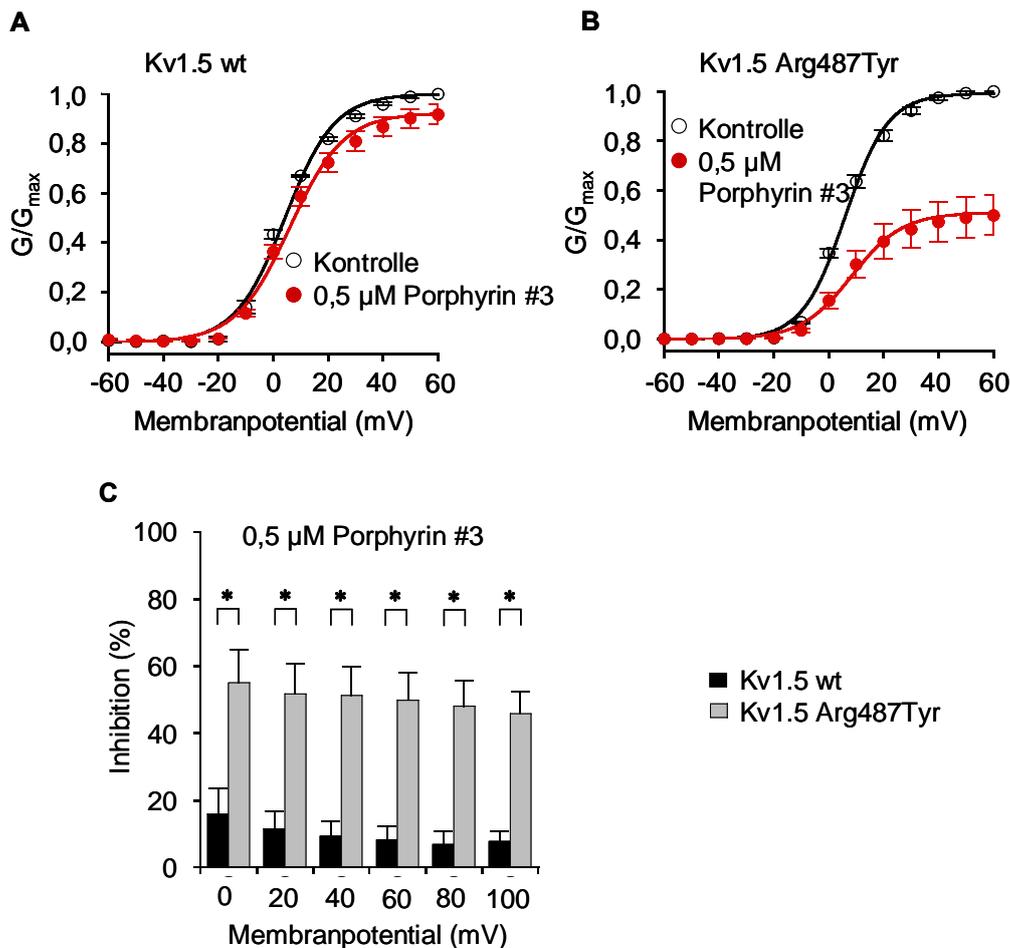


Abb. 3.30: Vergleich der Inhibition von Kv1.5 Wt und Kv1.5 Arg487Tyr durch Porphyrin, $[K^+]_a = 20$ mM, RT.

Normierte *Tail*stromamplituden bei -80 mV aufgetragen als Funktion des vorhergehenden Testpotentials vor und nach Applikation von 0,5 μ M Porphyrin

A. Normierte Strom-Spannungskurven vor (schwarze Kreise) und nach (rote Punkte) Applikation von 0,5 μ M Porphyrin #3 auf Kv1.5 Wt ($n = 3$). Bei den durchgezogenen Linien handelt es sich um Fits mit der Boltzmann-Funktion.

B. Normierte Strom-Spannungskurven vor (schwarze Kreise) und nach (rote Punkte) Applikation von 0,5 μ M Porphyrin #3 auf Kv1.5 Arg487Tyr ($n = 4$). Bei den durchgezogenen Linien handelt es sich um Fits mit der Boltzmann-Funktion.

C. Vergleich der Inhibition von Kv1.5 Wt und Kv1.5 Arg487Tyr durch 0,5 μ M Porphyrin #3 bei unterschiedlichen Spannungen.

Nach Austausch von Arginin an Position 487 gegen Tyrosin war die Affinität gegenüber Porphyrin #3 signifikant erhöht (Abb. 3.30 C). Die p -Werte lagen zwischen 0,006 und 0,03. Die Inhibition zeichnete sich durch eine nur geringe Spannungsabhängigkeit aus. Die Ergebnisse machen deutlich, dass der Porenblock bei der Inhibition des Stroms durch Porphyrin #3 eine große Rolle spielt.

3.12 Wirkung von Porphyrin #3 auf Mitglieder anderer Kaliumkanalfamilien

Nachdem innerhalb der Kv1-Familie eine unterschiedliche Spezifität für Porphyrin #3 festgestellt werden konnte, stellt sich die Frage, wie sensitiv die spannungsabhängigen Mitglieder anderer Kaliumkanalfamilien für Porphyrin #3 sein würden. Es wurde jeweils ein Mitglied der Kv2-Familie (*Shab*), der Kv7-Familie (KvLQT), der Kv4-Familie (*Shal*) und der Kv11-Familie (*ether-a-gogo*-verwandte Kanäle) untersucht. Es wurden, wie in den Experimenten mit den Kv1-Kanälen, 0,5 μM Porphyrin #3 appliziert.

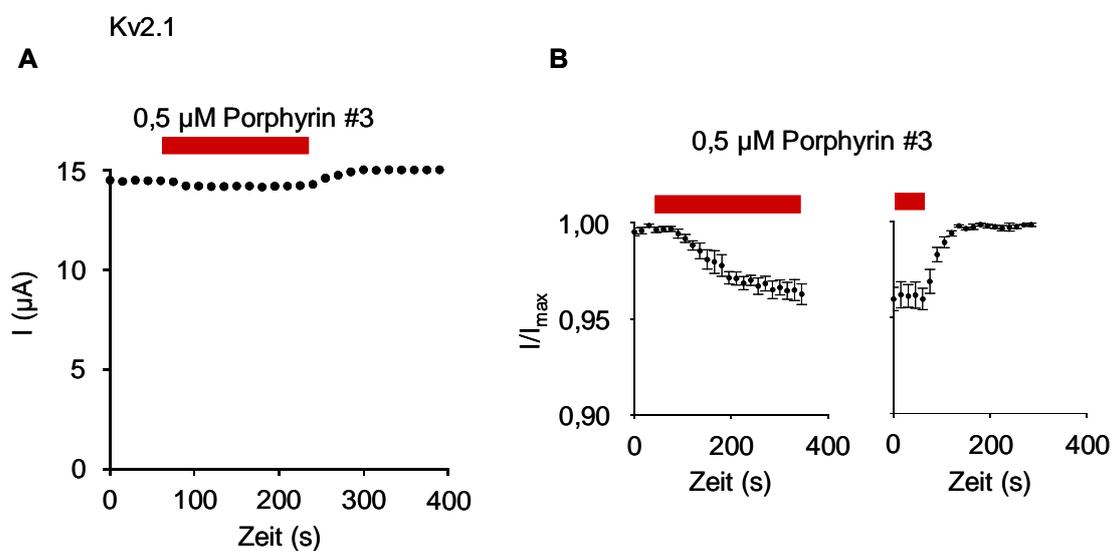


Abb. 3.31: Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 auf Kv2.1, $[\text{K}^+]_{\text{a}} = 2 \text{ mM}$, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch wiederholte Depolarisation auf $+60 \text{ mV}$ für 200 ms bei einem Interpulsintervall von 15 s geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen.

A. Applikation von 0,5 μM Porphyrin. Dargestellt sind die Amplituden des Auswärtsstroms bei $+60 \text{ mV}$ eines repräsentativen Experiments.

B. Normierte Auswärtsstromamplituden des Einwaschens und des Auswaschens aus A; normierte Auswärtsstromamplituden ($n = 4$).

Die Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 hatte auf Kv2.1 nur einen sehr geringen inhibitorischen Effekt (Abb. 3.31 A und B).

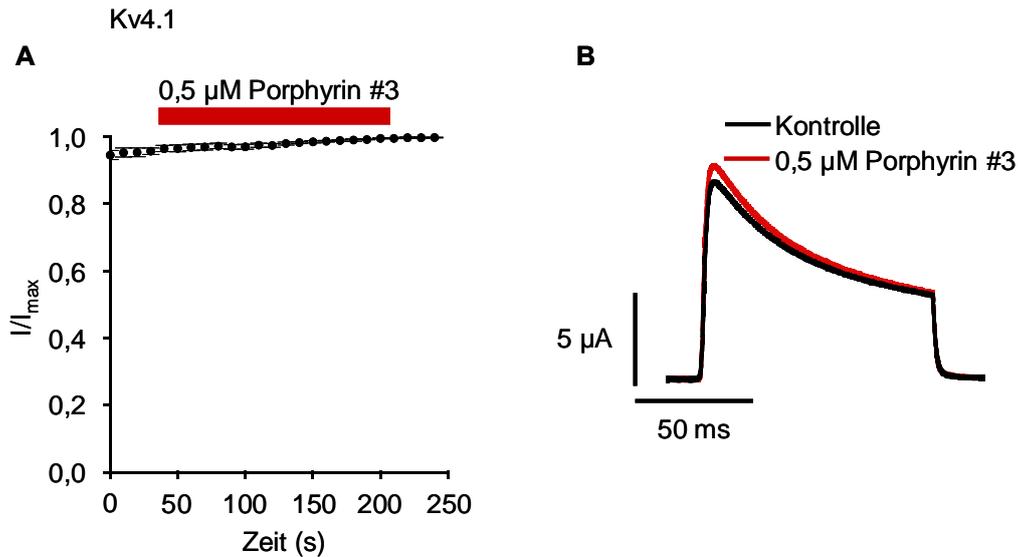


Abb. 3.32: Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 auf Kv4.1, $[\text{K}^+]_a = 2 \text{ mM}$, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch wiederholte Depolarisation auf $+60 \text{ mV}$ für 100 ms bei einem Interpulsintervall von 10 s geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen ($n = 4$).

A. Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin. Dargestellt sind die normierten Stromamplituden bei $+60 \text{ mV}$ aufgetragen gegen die Zeit.

B. Exemplarische Stromkurven vor und nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin.

Die Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin #3 hatte auf Kv4.1 keinen inhibitorischen Effekt (Abb. 3.32).

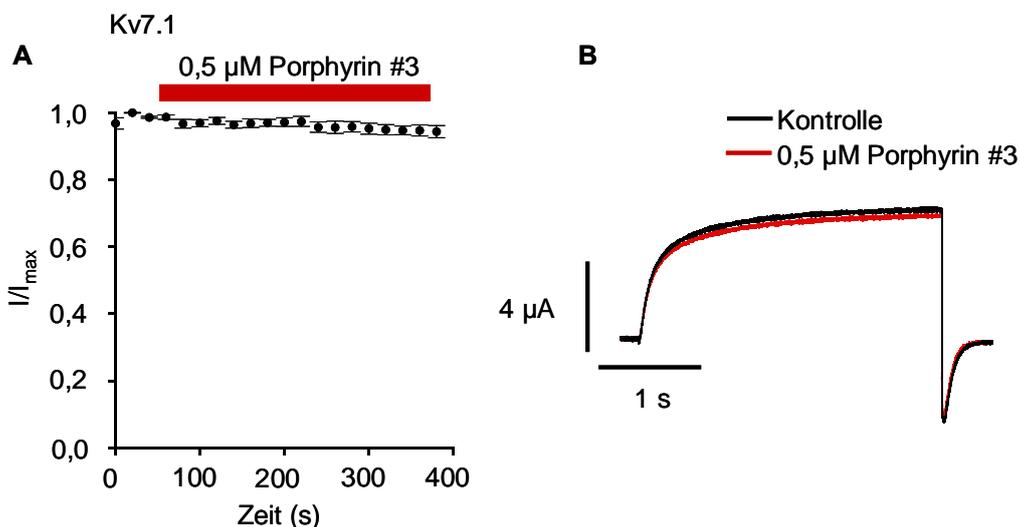


Abb. 3.33: Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 auf Kv7.1, $[\text{K}^+]_a = 2 \text{ mM}$, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV wurden die Kanäle durch wiederholte Depolarisation auf $+60 \text{ mV}$ für 3 s bei einem Interpulsintervall von 20 s geöffnet und durch Repolarisation auf -120 mV wieder geschlossen, ($n = 3$).

A. Einwaschen von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin. Dargestellt sind die normierten Stromamplituden bei $+60 \text{ mV}$ aufgetragen gegen die Zeit.

B. Exemplarische Stromkurven vor und nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin.

Die Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 hatte auf Kv7.1 keinen inhibitorischen Effekt (Abb. 3.33).

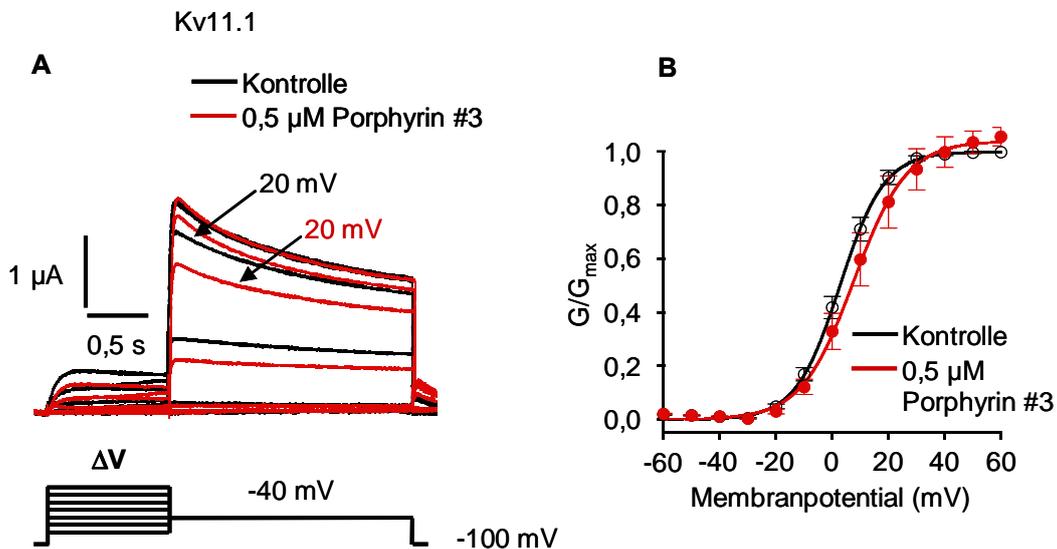


Abb. 3.34: Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 auf Kv11.1, $[\text{K}^+]_a = 2 \text{ mM}$, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV wurden die Kanäle durch unterschiedlich starke Depolarisationsschritte (ΔV) für 1 s geöffnet. Die Auswärtstailströme wurden bei -40 mV für 2 s aufgezeichnet. Anschließend wurden die Kanäle durch Repolarisation auf -100 mV wieder geschlossen. Das Interpulsintervall betrug 20 s.

A. Exemplarisches Stromkurven von -60 mV bis +60 mV in 10 mV-Schritten vor und nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin.

B. Normierte Peakstromamplituden bei -40 mV aufgetragen als Funktion des vorhergehenden Testpotentials vor und nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 ($n = 3$).

Die Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 hatte auf Kv11.1 einen geringen inhibitorischen Effekt (Abb. 3.34).

Bei Kv4.1 und Kv7.1 zeigten 0,5 μM Porphyrin #3 keinen Effekt (Abb. 3.32 bzw. Abb. 3.33).

Kv2.1 (Abb. 3.31) wurde ebenso wie Kv11.1 (Abb. 3.34) geringfügig inhibiert. Bei Kv11.1 wurden die Ströme, die auf schwacher Depolarisation (z.B. 20 mV) folgten, stärker geblockt, als Ströme starker Depolarisation. In Abb. 3.34 B sind die normierten Strom-Spannungskurven der Kontrolle und nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 dargestellt.

Die Applikation von Porphyrin #3 auf Vertreter weiterer Kv-Kanalfamilien neben denen der *Shaker*-Familie zeigte, dass die Affinität zu Porphyrin #3 sehr gering war. Die Effekte, die sich mit der Konzentration von 0,5 μM Porphyrin #3 erzielen ließen, lagen weit unter den Effekten, die beispielsweise mit Kv1.3 zu beobachten waren. Beim Vergleich der Aminosäuresequenz (Abb. 3.35) der Porenregion von Kv2.1, Kv4.1, Kv7.1 und Kv11.1 mit der Sequenz von der KcsA-Kv1.3-Chimäre und rKv1.3 fallen einige Unterschiede auf. Diese befinden sich in dem Bereich, der in den NMR-Untersuchungen für die Bindung von Porphyrin #3 an die KcsA-Kv1.3-Chimäre verantwortlich gemacht wurde (Ader *et al.*, 2008).

		S5 (Äußere Helix)	T	PH	
KcsA-Kv1.3		GSALHWRAAGAATVLLVIVLLAGSYLAVLAEADDPTSGFSSIPDAF			
rKv1.3		TLKASMRELGLLIFFLFIGVILFSSAVYFAEADDPSSGFNSIPDAF			
hKv2.1		TLRRSYNELGLLILFLAMGIMIFSSLVFFAEKDEDDTKFKSIPASF			
hKv4.1		TLKSCASELGFLLFSLTMAIIIFATVMFYAEKGTNKTNFTSIPAAF			
mKv7.1		HRQELITTLYIGFLGLIFSSYFVYLAEKDAVNESGRIEFGSYADAL			
hKv11.1		AIGNMEQPHMDSRIGWLHNLGDQIGKPYNSSGLGGPSIKDKYVTAL			
		PH	SF	T	S6 (Innere Helix)
KcsA-Kv1.3		WWSV ETATTVGYGDLY PVTLWGRCVAVVVMVAGITSFGLVTAALAT			
rKv1.3		WWAVVTMTTVGYGDMHPVTIGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVS			
hKv2.1		WWATITMTTVGYGDIYPKTLLGKIVGGLCCIAGVLVIALPIPIIVN			
hKv4.1		WYTIVTMTTLGYGDMVPSTIAGKIFGSICSLSGVLVIALPVPVIVS			
mKv7.1		WWGVVTVTTIGYGDKVPQTWVGKTIASCFSVFAISFFALPAGILGS			
hKv11.1		YFTFSSLTSVGFGNVSPNTNSEKIFSICVMLIGSLMYASIFGNVSA			

Abb. 3.35: Sequenzvergleich der Porendomäne von der KcsA-Kv1.3-Chimäre, rKv1.3, hKv2.1, hKv4.1, mKv7.1, und hKv11.1.

Die Aminosäuren, die im NMR nach Porphyrin #3-Zugabe in der Porenregion eine signifikante chemische Verschiebung zeigten, sind grün hervorgehoben. Die Aminosäureposition, die bei hKv1.5 eine Zunahme der Affinität zeigte, ist rot hervorgehoben. T = *Turret*region, PH = Porenhelix, SF = Selektivitätsfilter.

3.13 Beeinflussung der C-Typ-Inaktivierung von Kv1.3 durch Porphyrin #3

Ader *et al.*, (2008) konnten in NMR-Strukturanalysen zeigen, dass die strukturellen Veränderungen im Bereich des Selektivitätsfilters der Kaliumkanal-Chimäre KcsA-Kv1.3 nach Applikation von Porphyrin #3 den Strukturen gleichen, die auch zu beobachten sind, wenn der Kanal in den inaktivierten Zustand übergeht. Kv1.3 zeigte innerhalb der *Shaker*-Kaliumkanalfamilie die am stärksten ausgeprägte C-Typ-Inaktivierung. Bei anhaltender Depolarisation nahm die Stromamplitude in einem exponentiellen Kurvenverlauf ab und erreichte nach einigen Sekunden mit 25-30 % der Ausgangsamplitude einen Gleichgewichtszustand. Um aus dem inaktivierten Zustand wieder die Ausgangsamplitude zu erreichen, war eine Dauer von 40-50 s notwendig. Dieser Vorgang wird als „Erholung aus der Inaktivierung“ bezeichnet. Abb. 3.36 A zeigt ein repräsentatives Kontrollexperiment für die Erholung aus der Inaktivierung. Innerhalb der 10 s-Depolarisation ging ein Großteil der Kv1.3-Kanäle in den inaktivierten Zustand über, aus dem sie eine gewisse Zeit benötigten, um wieder aktivierbar zu sein. Es folgten in Abständen kurze Depolarisationen mit einer Dauer von 50 ms, um den Grad der Erholung aus der Inaktivierung zu dokumentieren.

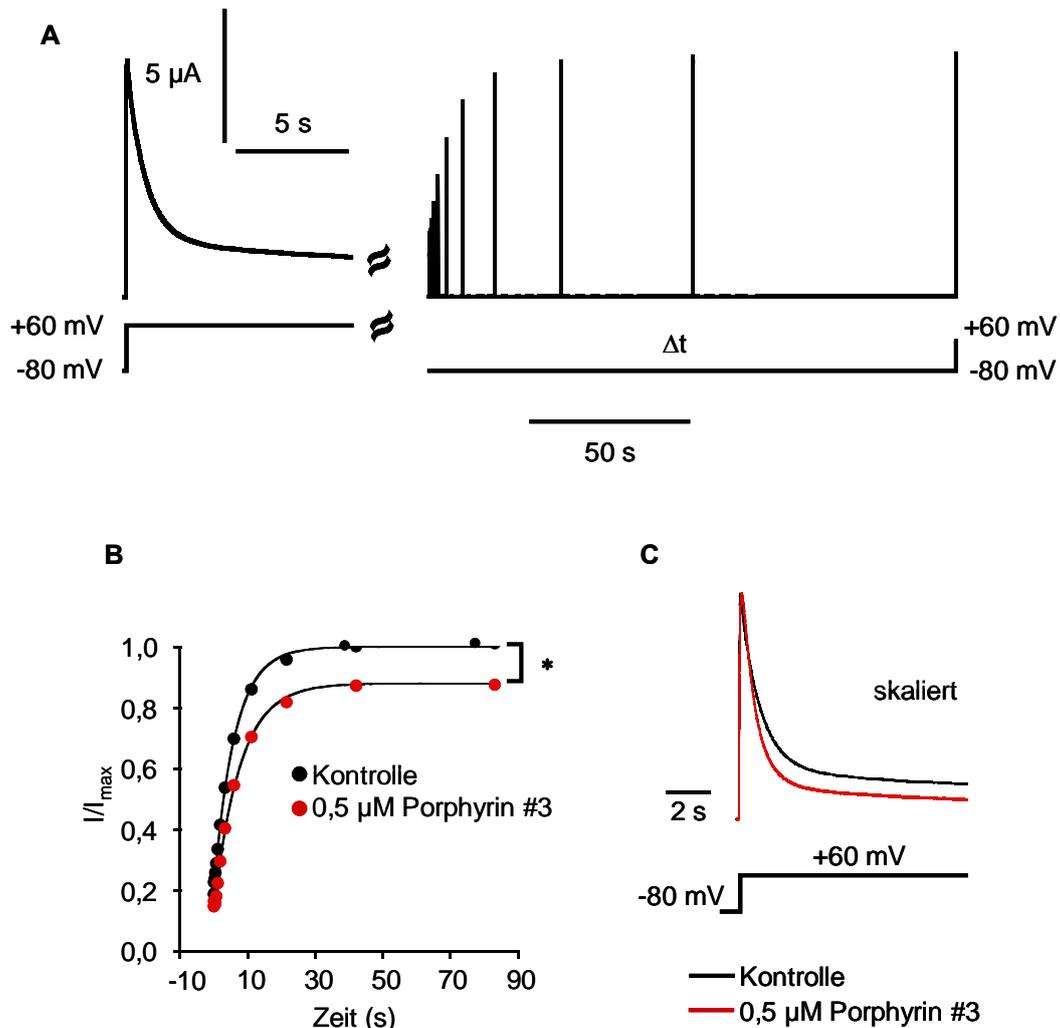


Abb. 3.36: Beeinflussung der C-Typ-Inaktivierung von Kv1.3 durch Porphyrin #3 (I), $[K^+]_a = 2$ mM, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch Depolarisation auf +60 mV für 10 s geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Darauf folgten in sukzessiver Verlängerung (Δt) des Interpulsintervalls 50 ms-Pulse, bis die Ausgangsstromamplitude des 10 s-Pulses wieder erreicht war.

A. Pulsprotokoll und repräsentative Stromantwort für eine Kontrollmessung der Erholung aus der Inaktivierung. Der linke Teil der Abbildung zeigt die inaktivierende Stromantwort, der rechte Teil die Erholung aus der Inaktivierung. Beide Teile haben die gleiche Skalierung für die Stromamplitude, aber eine unterschiedliche Zeitskala.

B. Erholung aus der Inaktivierung unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von 0,5 μ M Porphyrin. Dargestellt sind normierte Stromamplituden für Kontrollexperimente und Experimente nach Applikation von 0,5 μ M Porphyrin.

C. Skalierte Stromkurven vor und nach Applikation von 0,5 μ M Porphyrin #3 nach Depolarisation auf +60 mV.

Das Interpulsintervall wurde von Puls zu Puls verdoppelt, bis sich alle Kanäle wieder aus der Inaktivierung erholt hatten und die Stromamplitude des Ausgangspulses erreicht wurde.

Abb. 3.36 B zeigt die normierten Stromamplituden vor und nach Applikation von 0,5 μ M Porphyrin #3 aufgetragen gegen die Zeit. Es wird deutlich, dass die Erholung aus der Inaktivierung für die mit Porphyrin #3 besetzten Kanäle unvollständig blieb. Obwohl sich ein Gleichgewichtszustand, repräsentiert durch gleich bleibende Amplituden, einstellte, wurde in

den kurzen Depolarisationen die Amplitude des Ausgangspulses nicht erreicht. Die Kinetik der Erholung aus der Inaktivierung ließ sich mit einer einfach exponentiellen Funktion beschreiben. Die Zeitkonstante betrug bei den Kontrollmessungen $5,6 \pm 0,5$ s ($n = 7$) und $6,9 \pm 0,8$ s ($n = 7$) bei den Messungen nach Applikation von Porphyrin, die damit signifikant langsamer war ($p = 0,01$). In Abb. 3.36 C sind skalierte Stromspuren einer Depolarisation von 10 s Dauer vor und nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin #3 gezeigt. Es zeigte sich, dass sich die Inaktivierung nach Applikation von Porphyrin #3 beschleunigt hatte und die Inaktivierung vollständiger war.

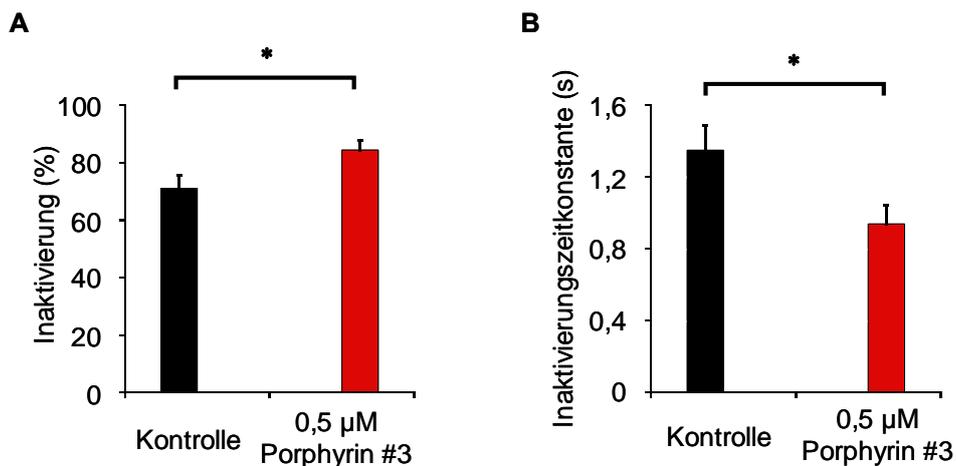


Abb. 3.37 Beeinflussung der C-Typ-Inaktivierung von Kv1.3 durch Porphyrin #3 (II).

Auswertung der Daten aus 3.36 C.

A. Vergleich des Ausmaßes der Inaktivierung vor und nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin #3.

B. Vergleich der Inaktivierungszeitkonstante vor und nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin.

In Abb. 3.37 A und B ist das Ausmaß der Inaktivierung und die Inaktivierungszeitkonstante der Stromspuren aus Abb. 3.36 C vor und nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin #3 dargestellt. Die Inaktivierung verstärkte sich von 73 ± 4 % ($n = 7$) auf 84 ± 3 % ($n = 7$) und war damit signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$). Die Inaktivierung beschleunigte sich von $1,35 \pm 0,14$ s ($n = 7$) auf $0,94 \pm 0,11$ s ($n = 7$) und war damit signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$). Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Applikation von Porphyrin #3, ähnlich wie in den Strukturanalysen mit KcsA-Kv1.3 gezeigt, Einfluss auf die C-Typ-Inaktivierung von Kv1.3 nahm.

Neben Kv1.3 wiesen auch die übrigen Mitglieder der Kv1-Familie eine C-Typ-Inaktivierung auf, die allerdings weniger stark ausgeprägt war. Analog zu den Versuchen mit Kv1.3 wurden weitere Kv1-Kanäle durch lange Depolarisation in die Inaktivierung getrieben. Abb. 3.38 A und B zeigen exemplarische Stromspuren von Kv1.1 und Abb. 3.38 C und D exemplarische Stromspuren von Kv1.2 vor und nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin #3.

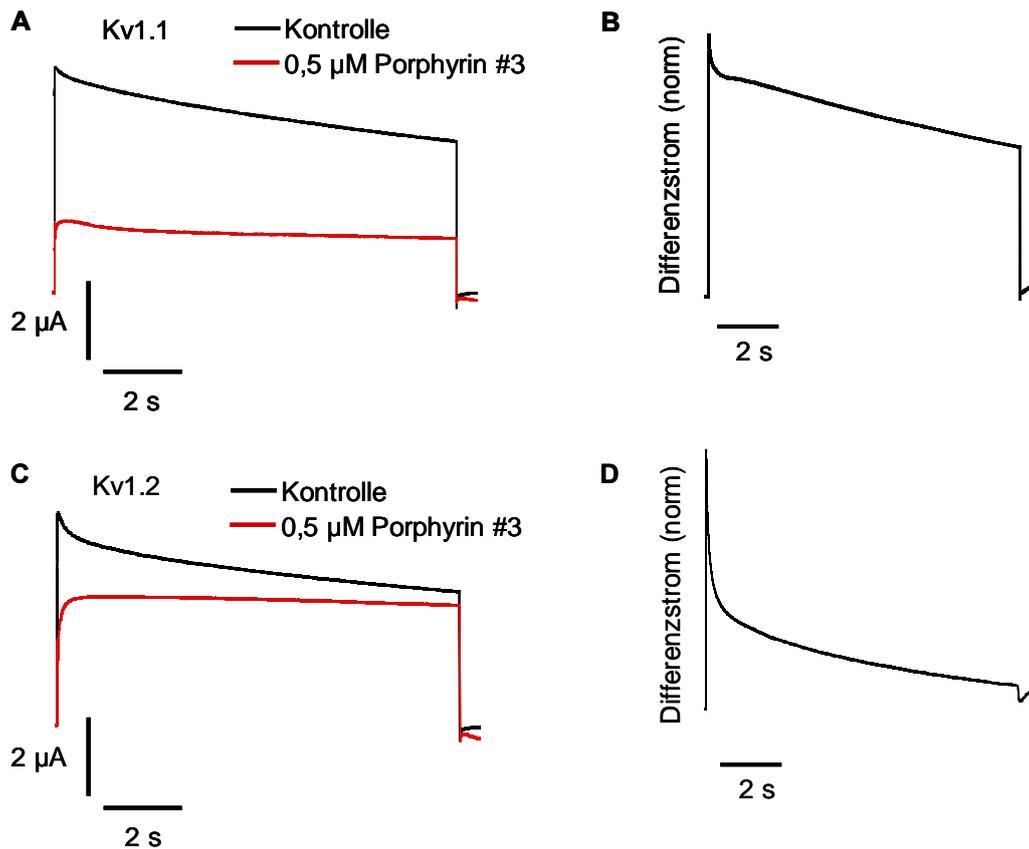


Abb. 3.38: Beeinflussung der C-Typ-Inaktivierung von Kv1.1 und Kv1.2 durch Porphyrin, $[K^+]_a = 2 \text{ mM}$, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch Depolarisation auf $+60 \text{ mV}$ für 10 s geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen.

A. Exemplarische Stromkurven von Kv1.1 vor und nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin #3 nach Depolarisation auf $+60 \text{ mV}$.

B. Darstellung des Differenzstroms von Kontrollstromspur und der Stromspur nach Porphyrinapplikation.

C. Exemplarische Stromkurven von Kv1.2 vor und nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin #3 nach Depolarisation auf $+60 \text{ mV}$.

D. Darstellung des Differenzstroms von Kontrollstromspur und der Stromspur nach Porphyrinapplikation.

Aus den Abbildungen geht hervor, dass sich das Ausmaß an Inaktivierung von Kv1.1 und Kv1.2 in den Kontrollexperimenten deutlich von der Inaktivierung von Kv1.3 unterschied. Nach der 10-sekündigen Depolarisation auf $+60 \text{ mV}$ gingen etwa 32% der Kv1.1-Kanäle in die C-Typ-Inaktivierung. Nach Applikation von Porphyrin #3 reduzierte sich der Anteil der inaktivierten Kanäle auf ca. 11% . Die Inaktivierung von Kv1.1 wurde durch Porphyrineinwirkung abgeschwächt. In Abbildung 3.38 C und D sind exemplarische Stromspuren eines analogen Experiments mit Kv1.2 dargestellt. Auch hier wurde ein Teil der Kanäle durch anhaltende Depolarisation in die C-Typ-Inaktivierung überführt (ca. 38%). Es zeigte sich, dass dieser Teil nach Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ Porphyrin #3 nahezu vollständig inhibiert war (ca. 8%). Während die Porphyrinapplikation zu Beginn der Depolarisation einen größeren inhibitorischen Effekt bei beiden Kanälen hatte, nahm dieser über die Zeit

immer mehr ab. Am Ende der Stromspuren entsprach der Anteil der Kv1.2-Kanäle in der Kontrolle, die noch nicht in die Inaktivierung gegangen waren (schwarze Stromspur), nahezu dem Strom, der durch Porphyrin #3 nicht inhibiert wurde (rote Stromspur). Verdeutlicht wird diese Beobachtung, für Kv1.1 weniger stark, in den Abbildungen 3.38 B und D, in denen jeweils der Differenzstrom aus der Kontrollstromspur und der Stromspur nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 dargestellt sind. Er beschreibt den Anteil des Gesamtstroms, der durch Porphyrin #3 inhibiert wurde. Bei Kv1.2 wurden nur die Kanäle, die in den inaktivierten Zustand überführt wurden, inhibiert. Im Gegensatz zu Kv1.3, bei dem die C-Typ-Inaktivierung durch Porphyrin #3 verstärkt wurde, wurde bei zwei weiteren Vertretern der Kv1-Familie eine verstärkte Inhibition der Kanäle beobachtet, die sich in der C-Typ-Inaktivierung befanden.

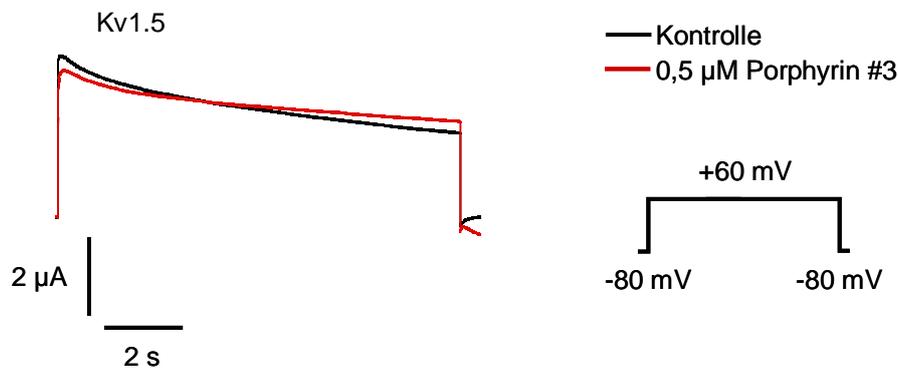


Abb. 3.39: Beeinflussung der C-Typ Inaktivierung von Kv1.5 durch Porphyrin, $[\text{K}^+]_a = 2 \text{ mM}$, RT. Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch Depolarisation auf $+60 \text{ mV}$ für 10 s geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Exemplarische Stromkurven von Kv1.5 vor und nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 nach Depolarisation auf $+60 \text{ mV}$.

Bei Kv1.5 (Abb. 3.39) waren in der Kontrolle etwa 41 % der Kanäle am Ende des 10 s-Pulses in die C-Typ-Inaktivierung gegangen. Die Zugabe von Porphyrin #3 führte hier ebenfalls zu einer Abnahme der Inaktivierung: 0,5 μM Porphyrin #3 reduzierten den Anteil der inaktivierten Kanäle auf 35 %.

3.14 Beeinflussung der Auswaschgeschwindigkeit von Porphyrin #3 durch Zugabe des Porphyrin-Derivats Antidot

Die Synthese von Kaliumkanalblockern auf Basis des Porphyringerüsts bietet eine Vielzahl von Variationsmöglichkeiten, was das Anfügen oder Entfernen einzelner chemischer Gruppen

angeht. Besonders an den sternförmig abstehenden Seitenarmen lassen sich chemische Veränderungen vornehmen. Bei dem bisher verwendeten kationischen Porphyrin-Derivat #3 befinden sich positiv geladene Aminogruppen am Ende der Seitenarme. Bei einem anderen, anionischen Porphyrin-Derivats (Antidot), das keine oder nur eine geringe inhibitorische Wirkung auf Kv1.3 aufweist (Gradl *et al.*, 2003), wurden diese durch negativ geladene Karboxylgruppen ersetzt. Es wurde untersucht, ob die Zugabe des Antidots während des Auswaschens Einfluss auf die Auswaschgeschwindigkeit von Porphyrin #3 nahm.



Schema 3.1

Bei der Bildung von Komplexen aus Porphyrin #3 und Antidot (Schema 3.1) würde das Antidot mit der Bindungsstelle am Kanal um das Porphyrin #3 kompetieren und somit weniger Porphyrin #3 für die Inhibition des Kanals zur Verfügung stehen. In Abbildung 3.40 A ist ein exemplarisches Experiment mit Pulsprotokoll dargestellt.

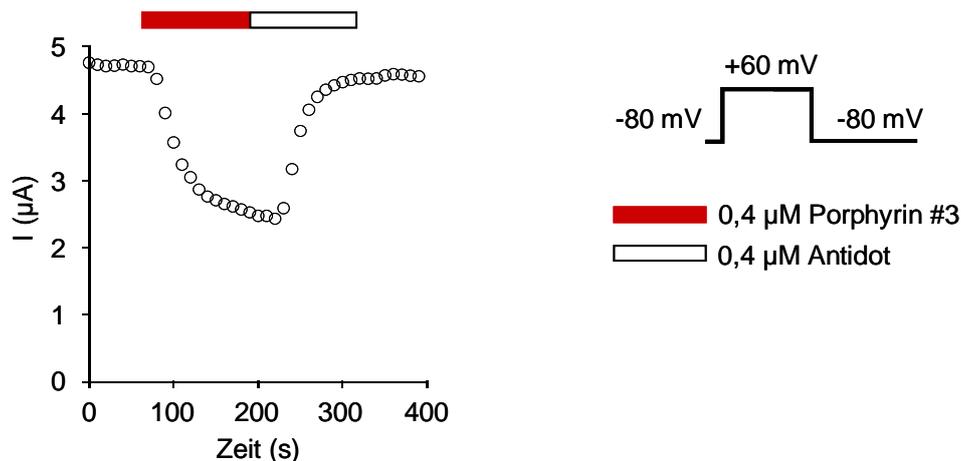


Abb. 3.40: Effekt eines anionischen Porphyrin-Derivats Antidot auf die Auswaschkinetik von Porphyrin #3 auf Kv1.3 (I), $[K^+]_a = 2 \text{ mM}$, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle durch Depolarisation auf +60 mV für 100 ms geöffnet und durch Repolarisation auf das Haltepotential wieder geschlossen. Nach Porphyrinapplikation (0,4 μM) wurde beim Auswaschen das Antidot in unterschiedlichen Konzentrationen der Kontrolllösung beigefügt. Die Abbildung zeigt die Einwasch- und die Auswaschkinetik von 0,4 μM Porphyrin #3. Zum Auswaschvorgang sind 0,4 μM Antidot zur Kontrolllösung hinzugegeben. Dargestellt sind die normierten Stromamplituden bei +60 mV.

Es zeigte sich, dass die Zugabe von 0,4 μM Antidot zu der Kontrolllösung die Zeitkonstante der Auswaschkinetik der mit 0,4 μM Porphyrin #3 inhibierten Kanäle mehr als halbieren konnte (Abb. 3.41 A und B).

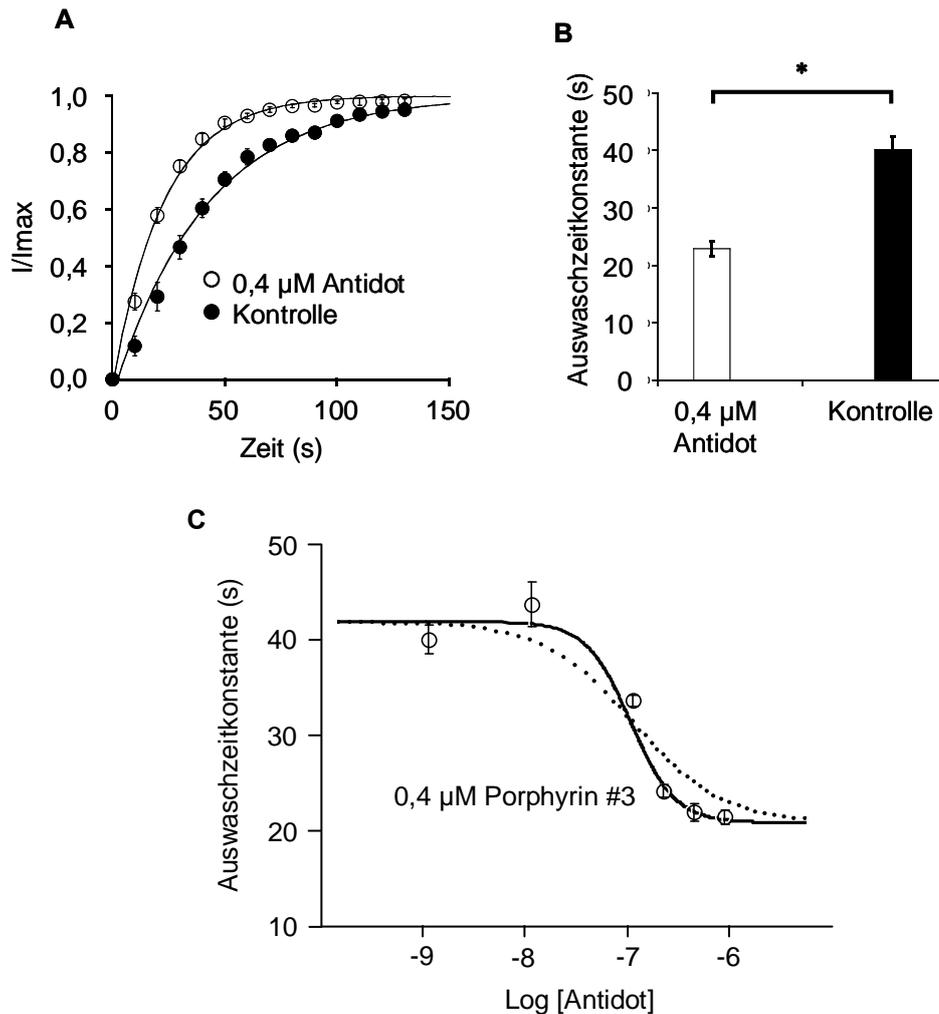


Abb. 3.41: Effekt eines anionischen Porphyrin-Derivats Antidot auf die Auswaschkinetik von Porphyrin #3 auf Kv1.3 (II), $[K^+]_a = 2 \text{ mM}$, RT.

A. Dargestellt ist die normierte Auswaschkinetik von Kontrollexperimenten ohne Zugabe des Antidots (ausgefüllte Kreise, $n = 5$) und Experimenten in denen $0,4 \mu\text{M}$ (offene Kreise, $n = 5$) zugefügt wurde. Die durchgezogenen Linien zeigen einen Fit mit einer einfach-exponentiellen Funktion.

B. Auswertung der Messungen aus Abb. 3.41 A ($n = 5$).

C. Konzentrationsabhängigkeit der Auswaschkinetik durch Zugabe von Antidot bei einer Porphyrinkonzentration von $0,4 \mu\text{M}$. Die durchgezogene Linie zeigt einen Fit mit der Hill-Gleichung mit einem Exponenten von 2. Die gestrichelte Linie zeigt einen Fit mit der Hill-Gleichung mit einem Exponenten von 1.

Die τ -Werte der Kontrollmessungen betragen $44,2 \pm 4 \text{ s}$ ($n = 5$), während die τ -Werte der Messungen bei $0,4 \mu\text{M}$ Antidot $21,2 \pm 3 \text{ s}$ ($n = 5$) lagen. Sie waren damit signifikant unterschiedlich ($p < 0.0001$). Eine weitere Erhöhung der Antidotkonzentration hatte einen nur geringen zusätzlichen Effekt. Keinen Effekt auf die Auswaschkinetik zeigte eine Konzentration von $0,01 \mu\text{M}$ Antidot. Die mit der Hill-Gleichung errechnete Konzentrationsabhängigkeit (Abb. 3.41 C, durchgezogene Linie bzw. gestrichelte Linie), zeigte, dass die Kurve näher an den ermittelten Datenpunkte lag, wenn man im Nenner einen Exponenten von 2 annahm.

3.15 Inhibition von Kv1.1 bzw. Kv1.3 durch EL1 bzw. EL2

Das inhibitorisch wirkende Porphyrin-Derivat #3 besitzt aufgrund der vier identischen Seitenketten vier potentielle Bindungsstellen. Durch Übertragung einer Seitenkette auf zwei verschiedene Kohlenstoffketten, die einer Flanke des Porphyrinringes ähneln, entstehen Substanzen mit T-förmiger Gestalt (EL1 und EL2). Es wurde vermutet, dass diese Substanzen, die nur noch eine einzelne vermeintliche Bindungsstelle aufweisen, ebenso wie Porphyrin #3 in der Lage sind, Kv-Kanäle zu blockieren.

Die Applikation von EL1 und EL2 zeigte, dass diese Kv1.1 und Kv1.3 mit geringerer Affinität als Porphyrin #3 inhibierten. Dadurch aber, dass EL1 und EL2 im Gegensatz zu Porphyrin #3 keinen Einfluss auf die Integrität der Oozytenmembran hatten und die Applikation nicht zu einer Erhöhung der Leckströme führte, konnten höhere Konzentrationen eingesetzt werden. Während EL1 eine geringe Affinität vor allem für Kv1.1 zeigte und nahezu keinen Effekt auf Kv1.3-Kanäle hatte, verhielt es sich mit EL2 umgekehrt: Kv1.3 wurde inhibiert, Kv1.1 jedoch nicht (Abb. 3.42 A-D). Die Applikation von 5 μM EL1 führte zu einem spannungsabhängigen Block von Kv1.1-Strömen (Abb. 3.42 A). Die Zeitkonstante der Einwaschkinetik von EL1 (Abb. 3.42 C) betrug bei +60 mV $\tau = 14,2 \pm 3$ s und bei -20 mV $\tau = 7,4 \pm 2$ s ($n = 4$). Die Auswaschkinetik war weniger spannungsabhängig (Abb. 3.42 D). Bei +60mV betrug $\tau = 6,7 \pm 1$ s und bei -20 mV $\tau = 7,5 \pm 1$ s. Kv1.3 wurde von einer Konzentration von 10 μM EL1 bei +60 mV nicht bzw. bei -20 mV zu einem geringen Teil inhibiert (Abb. 3.42 B).

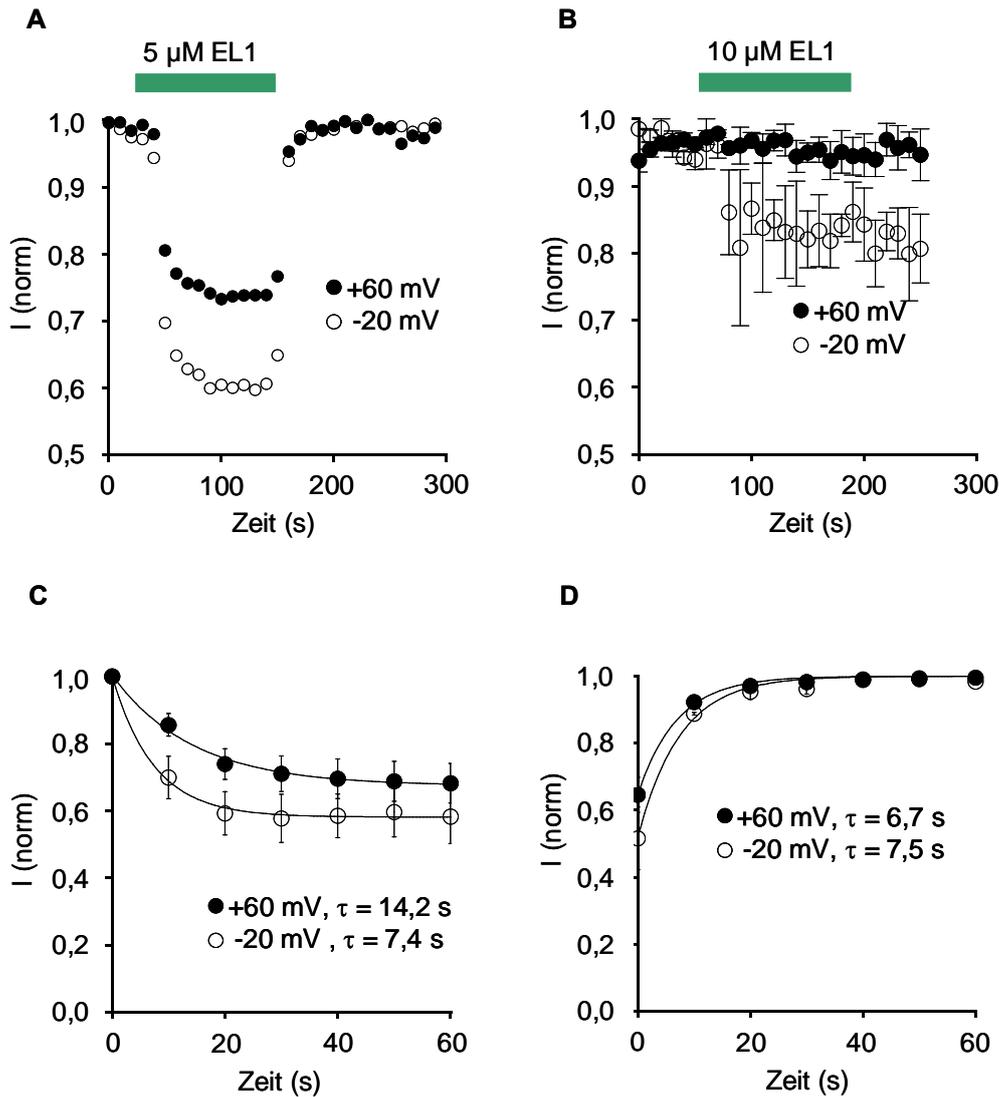


Abb. 3.42: Applikation von EL1 auf Kv1.1 und Kv1.3, $[K^+]_a = 20$ mM, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle in einem Doppelpulsprotokoll durch unterschiedlich starke Depolarisation (-20 mV und +60 mV, Interpulsintervall = 500 ms) für 100 ms geöffnet und durch Repolarisation auf -80 mV wieder geschlossen.

A. Einwaschen und Auswaschen in einem repräsentativen Experiment von 5 μ M EL1 auf Kv1.1. Dargestellt sind die normierten *Tail*stromamplituden, die auf Depolarisationen von -20 mV und +60 mV folgten, aufgetragen als Funktion der Zeit.

B. Einwaschen und Auswaschen von 10 μ M EL1 auf Kv1.3. Dargestellt sind die normierten *Tail*stromamplituden, die auf Depolarisationen von -20 mV und +60 mV folgten, aufgetragen als Funktion der Zeit ($n = 3$).

C. Einwaschkinetik von EL1 auf Kv1.1 bei -20 mV und +60 mV ($n = 4$).

D. Auswaschkinetik von EL1 auf Kv1.1 bei -20 mV und +60 mV ($n = 4$).

Die Wirkung von 10 μ M EL2 wurde in einem Doppelpulsprotokoll untersucht (Abb. 3.43 A). Während die *Tail*ströme von Kv1.3 bei -20 mV zu ca. 60 % inhibiert wurden, war der inhibitorische Effekt bei einer Depolarisationsstärke von +60 mV nahezu aufgehoben. Bei genauerer Betrachtung der Aktivierungskinetik bei +60 mV, verdeutlicht durch den Pfeil in Abb. 3.43, zeigte sich, dass sich diese nach Applikation von EL2 im Vergleich zur Kontrolle verlangsamt.

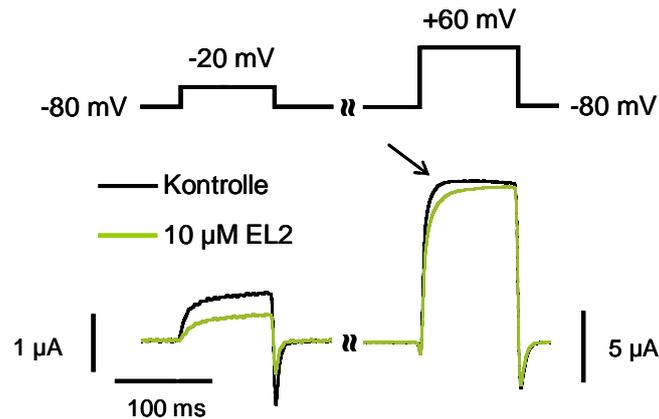


Abb. 3.43: Applikation von EL2 auf Kv1.3, $[K^+]_a = 20 \text{ mM}$, RT.

Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurden die Kanäle in einem Doppelpulsprotokoll durch unterschiedlich starke Depolarisation (-20 mV und $+60 \text{ mV}$, Interpulsintervall = 500 ms) für 100 ms geöffnet und durch Repolarisation auf -80 mV wieder geschlossen.

Repräsentative Stromspuren vor und nach Applikation von $10 \text{ }\mu\text{M}$ EL2 bei unterschiedlicher Depolarisationsstärke. Die Stromspuren haben die gleiche Zeitskala und unterschiedliche Skalen für die Stromstärke.

Abb. 3.44 A und B zeigen die spannungsabhängige Einwasch- und Auswaschkinetik nach schwacher (-20 mV) und starker Depolarisation ($+60 \text{ mV}$). Die Applikation von $10 \text{ }\mu\text{M}$ EL2 führte zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve (Abb. 3.44 C) zu positiveren Potentialen. Die halbmaximale Aktivierung lag in Kontrolle bei -13 mV und in den Experimenten mit EL2 bei -8 mV . In Abb. 3.43 D ist die prozentuale Inhibition der Kv1.3-Tailströme in Abhängigkeit der Spannung dargestellt. Über einen einfach exponentiellen Fit (grüne Linie) durch die gemittelten Messpunkte von -30 mV bis $+60 \text{ mV}$ ist ein zusätzlicher Wert bei -40 mV errechnet worden, bei dem die Kanäle noch im geschlossenen Zustand vorliegen. Hier betrug die Inhibition rechnerisch 100% .

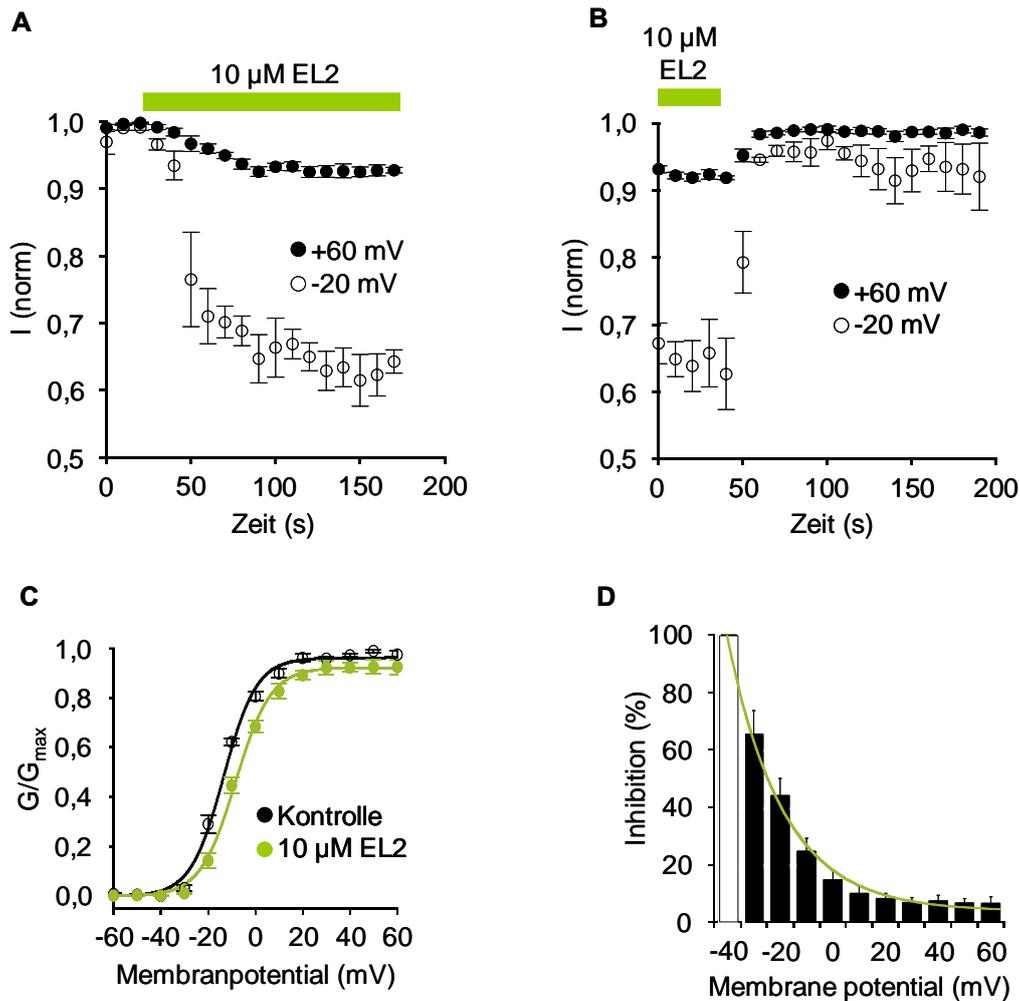


Abb. 3.44: Applikation von EL2 auf Kv1.3, $[K^+]_a = 20$ mM, RT.

A. und B. Einwaschen und Auswaschen von 10 μ M EL1 auf Kv1.3. Dargestellt sind die normierten *Tail*stromamplituden, die auf Depolarisationen von -20 mV und +60 mV folgten, aufgetragen als Funktion der Zeit ($n = 4$).

C. Normierte *Tail*stromamplituden bei -80 mV aufgetragen als Funktion des vorhergehenden Testpotentials vor und nach Applikation von 10 μ M EL2. Bei den durchgezogenen Linien handelt es sich um Fits mit der Boltzmann-Funktion (Kontrolle: $V_{1/2} = -13$ mV, $n = 4$; EL2: $V_{1/2} = -8$ mV, $n = 4$).

D. Abhängigkeit der Inhibition in Prozent von der Depolarisationsstärke. Die schwarzen Balken repräsentieren Messwerte. Der weiße Balken bei -40 mV zeigt einen hypothetischen Wert für den geschlossenen Kanal, ermittelt durch einen einfach exponentiellen Fit (grüne Linie) durch die Messpunkte.

3.16 Doppelblockexperimente mit Porphyrin #3 und den Porenblockern TEA⁺ und KTX

TEA⁺ und KTX sind Porenblocker, die Kv1.3 im millimolaren bzw. picomolaren Bereich inhibieren. Abb. 3.45 A und B zeigen die Ko-Applikation von Porphyrin #3 und TEA⁺ in unterschiedlicher Reihenfolge.

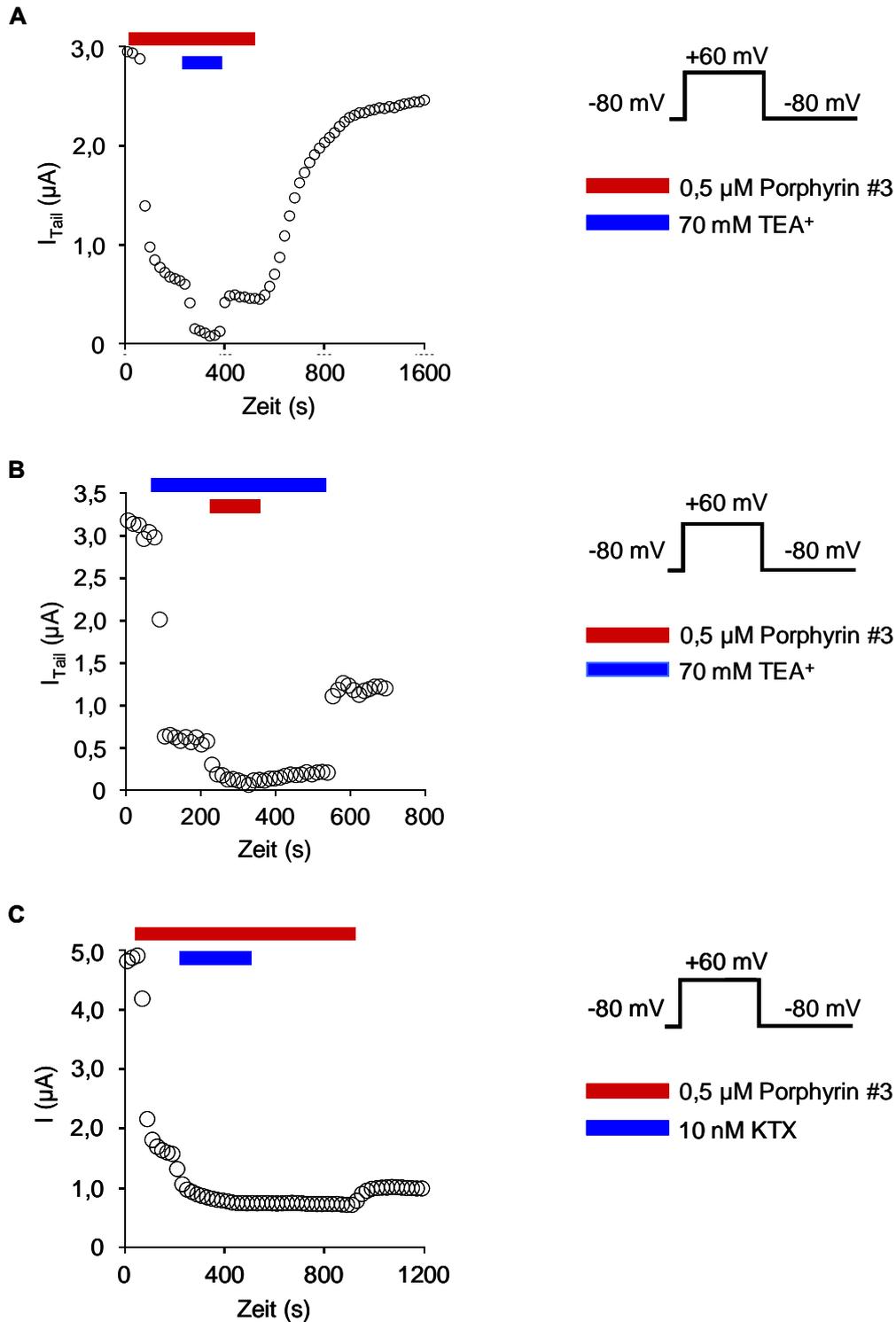


Abb.3.45: Ko-Applikation von Porphyrin #3 und dem Porenblocker TEA⁺ bzw. KTX.

A-C zeigen repräsentative Experimente.

A. Plot der *Tail*stromamplituden gemessen bei -80 mV nach vorhergehender Depolarisation von +60 mV gegen die Zeit. Nach Zugabe von 0,5 μM Porphyrin #3 und Erreichen eines Gleichgewichtszustandes wurde zusätzlich 70 mM TEA⁺ appliziert, $[\text{K}^+]_a = 20$ mM, RT.

B. Plot der *Tail*stromamplituden gemessen bei -80 mV nach vorhergehender Depolarisation von +60 mV gegen die Zeit. Nach Zugabe von 70 mM TEA⁺ und Erreichen eines Gleichgewichtszustandes wurde zusätzlich 0,5 μM Porphyrin #3 appliziert, $[\text{K}^+]_a = 20$ mM, RT.

C. Plot der Stromamplituden gemessen bei +60 mV gegen die Zeit. Nach Zugabe von 0,5 μM Porphyrin #3 und Erreichen eines Gleichgewichtszustandes wurde zusätzlich 10 nM KTX appliziert, $[\text{K}^+]_a = 2$ mM, RT.

Die Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 führte bei einer Spannung von +60 mV der vorhergehenden Depolarisation zu einer ca. 80 %igen Inhibition der *Tailstrom*amplitude. Die zusätzliche Applikation von 70 mM TEA^+ führte zu einer vollständigen Inhibition des verbliebenen Stroms. Zunächst wurde TEA^+ und anschließend Porphyrin ausgewaschen. Bei Applikation der beiden Substanzen in umgekehrter Reihenfolge kam es zu vergleichbarer prozentualer Inhibition der *Tailstrom*amplituden. Die Kanäle erholten sich jedoch nach Beginn des Auswaschens von Porphyrin #3 nur langsam aus der Inhibition. Es kam zu einem nur geringen Anstieg der Amplitude. Mit dem zusätzlichen Auswaschen von TEA^+ kam es zu einem plötzlichen Anstieg in der Stromamplitude, jedoch wurden nur etwa 30 % der Ausgangsamplitude erreicht. In Abb. 3.45 C ist ein Doppelblockexperiment mit Porphyrin #3 und KTX dargestellt. Die Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 führte zu einer ca. 70 %igen Inhibition der Stromamplitude. Die zusätzliche Applikation von 10 nM KTX inhibierte den Strom um weitere 15 %. Es blieb ein Reststrom von 15 % übrig. In Kontrollexperimenten ohne Porphyrin #3 (nicht gezeigt) wurde nach Applikation von 10 nM KTX stets 100 % der Amplitude inhibiert ($n = 4$). Die Zeitkonstanten der Einwaschkinetik von KTX verlangsamten sich in Anwesenheit von Porphyrin #3 im Vergleich zu den Kontrollexperimenten von $\tau = 6,4 \pm 1,2$ s ($n = 4$) auf $\tau = 26,4 \pm 4,4$ s ($n = 3$). Die Ergebnisse zeigen, dass die Applikation von unterschiedlichen Porenblockern zusammen mit Porphyrin #3 zu einer veränderten Affinität bzw. Kinetik führte. Die Reihenfolge der Applikation in den Experimenten mit TEA^+ und Porphyrin #3 spielte dabei eine Rolle.

3.17 Interaktion von Porphyrin #3 mit Membranlipiden: Strukturuntersuchungen

Die Applikation einer Porphyrinkonzentration >1 μM hatte eine deutliche Beeinflussung der Oozytenmembran zur Folge, die sich in einer Zunahme des Leckstroms äußerte. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass das Porphyrin #3 nicht ausschließlich mit den exprimierten Kanälen interagiert, wie aus den Experimenten mit Kv1.3 (Gradl *et al.*, 2003) und der KcsA-Kv1.3-Chimäre (Ader *et al.*, 2008) zu vermuten war, sondern auch mit den umgebenen Phospholipiden und dadurch eine mechanische oder elektrostatische Störung der Membranintegrität bewirkte. Mithilfe eines optischen *Bilayer*-Systems, zu dem ein konfokales Lasermikroskop gehört und das die Anregung eines horizontalen *Bilayers* mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge ermöglichte, konnte gezeigt werden, dass sich Porphyrin #3 in hoher Konzentration in der Membran anreicherte (Abb. 3.46).

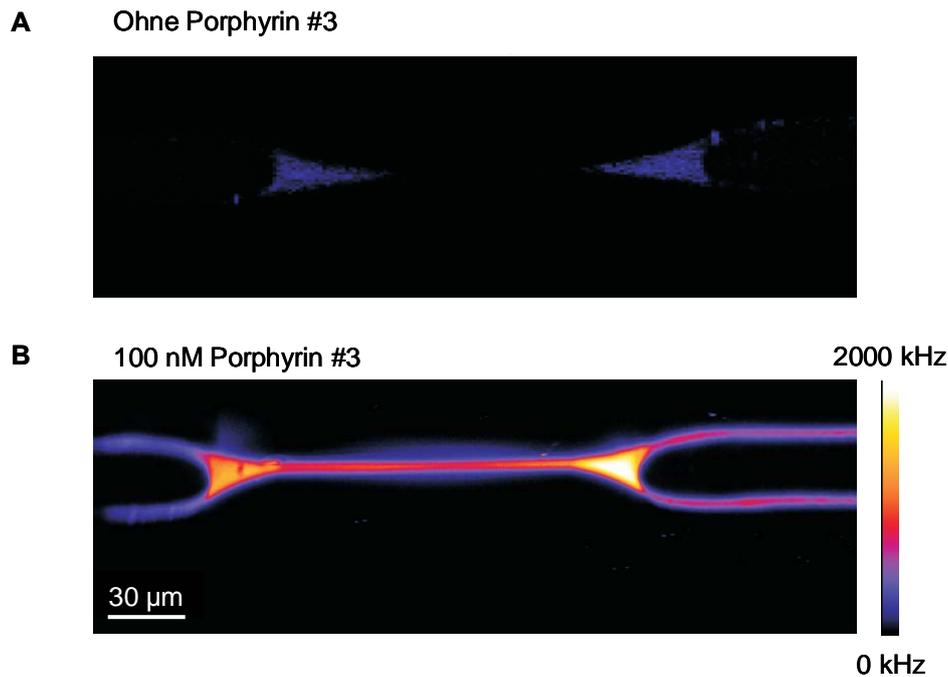


Abb. 3.46: Fluoreszenz von Porphyrin #3 im horizontalen *Bilayer*.

Für die Erzeugung der *Bilayer*-Membran wurde Asolektin, eine Mischung unterschiedlicher Lipide, verwendet. Der *Bilayer* wurde in einer ringförmigen Fassung erzeugt. Dadurch, dass der Betrachter von der Seite auf die Membran blickt, erscheint diese als flache Scheibe. Das Experiment wurde von Alf Honigmann am Institut für Biophysik der Universität Osnabrück (AG Richard Wagner) durchgeführt und hat die Abbildung freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

A. Kontroll-Messung ohne Porphyrin.

B. Messung nach Applikation von 0,1 μM Porphyrin.

Während die Membran ohne Porphyrin #3 bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm keine oder nur eine sehr geringe Fluoreszenz aufwies und nur die dreieckigen Verdickungen am Rand des *Bilayers* (= *Annulus*, nach lat. Ring) bläulich schimmerten, erschien die Membran nach Porphyrinapplikation deutlich sichtbar und wurde in verschiedenen Farben abgebildet. Die Farben zeigten die unterschiedliche Fluoreszenzintensität des Porphyrins an und somit die unterschiedlichen Konzentrationen innerhalb des *Bilayers*. Ohne genaue Aussagen über mögliche funktionelle Auswirkungen über die Anreicherung des Porphyrins in der Membran machen zu können, wurde dennoch deutlich, dass Porphyrin #3 anders als andere bekannte Porenblocker in die Membran eindringen konnte und sich anreicherte.

Zusätzliche Informationen über die Interaktion von Porphyrin #3 und den Membranlipiden wurde mithilfe der NOESY NMR-Strukturanalyse gewonnen. Im Labor von Marc Baldus am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie führte Christian Ader Experimente durch, die die Wechselwirkung von Porphyrin #3 vor allem mit den Kopfgruppen des verwendeten Lipids (DMPC = 1,2-Dimyristoyl-glycero-3-phosphatidylcholin) aufzeigte. Abb. 3.47 A bis C zeigen den Bereich der Lipide, für den eine Interaktion mit Porphyrin #3 nachgewiesen werden konnte.

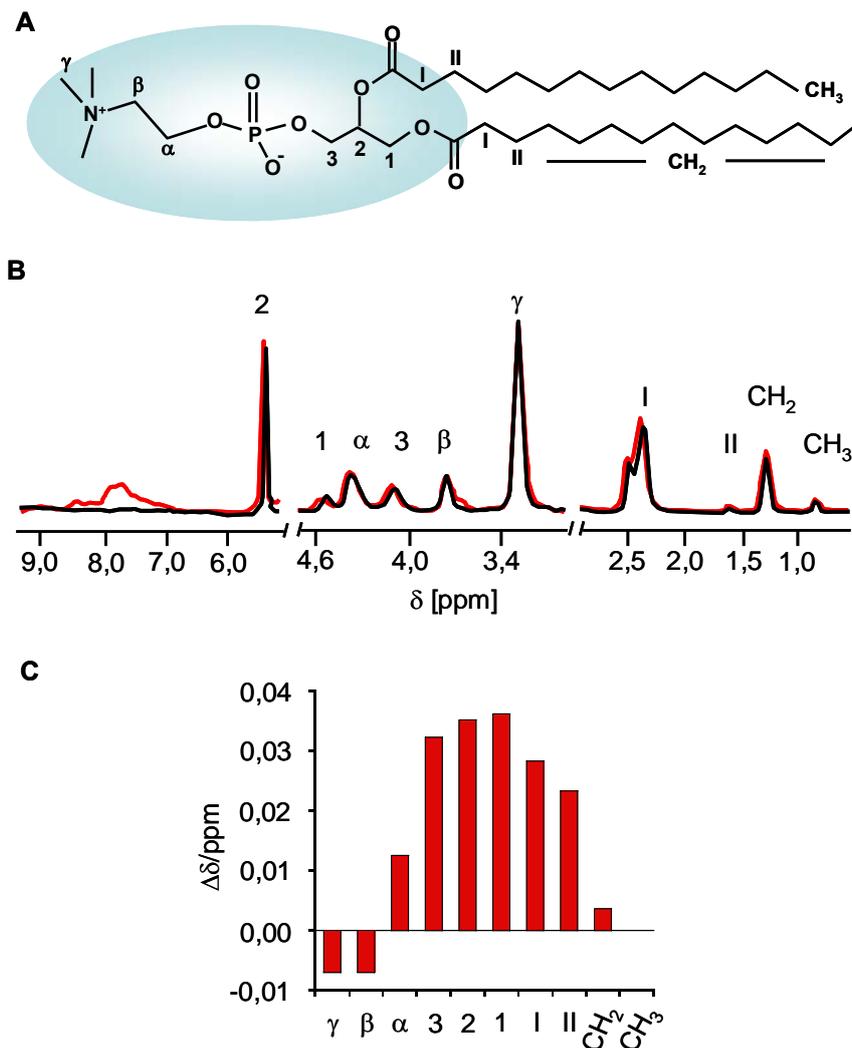


Abb. 3.47: NOESY-NMR-Spektroskopie von DMPC.

Die Abbildungen A-C wurden freundlicherweise von Christian Ader für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

A. Strukturformel von Phosphatidylcholin. Die Kopfgruppe ist blau unterlegt.

B. NOESY-Spektrum vor (schwarze Linien) und nach Zugabe von Porphyrin #3 (rote Linien). Die chemische Verschiebung (δ) ist angegeben in ppm.

C. Plot der Änderung der chemischen Verschiebung ($\Delta\delta/\text{ppm}$) nach Zugabe von Porphyrin #3.

Nach Zugabe von Porphyrin #3 wurde eine Änderung der chemischen Verschiebung ($\Delta\delta/\text{ppm}$) vor allem im Bereich des Glycerols (1, 2, 3) und innerhalb der Fettsäureschwänze im Bereich der ersten beiden Kohlenstoffe (I, II), die der Carbonylgruppe (CO) folgen, sichtbar (Abb. 3.43 B). Der Cholinanteil (α , β , γ) zeigte nach Porphyrinapplikation eine geringe Änderung der chemischen Verschiebung. Der hydrophobe Teil des Lipids blieb nahezu ohne Änderung der chemischen Verschiebung. Die Änderungen der chemischen Verschiebungen im Bereich der Lipidkopfgruppe zeigten, dass Porphyrin #3 über die äußeren Bereiche mit den Lipiden interagiert und nicht tief in die Membran eindringt (Abb. 3.47 C).

Eine genauere Untersuchung der Porphyrin-Lipid-Interaktion sollte Aufschluss darüber geben, ob Porphyrin #3 möglicherweise zu einer mechanischen Beeinträchtigung der Lipide bzw. der Liposomen führt, die einen veränderten Phasenübergang der Lipide zur Folge haben könnte.

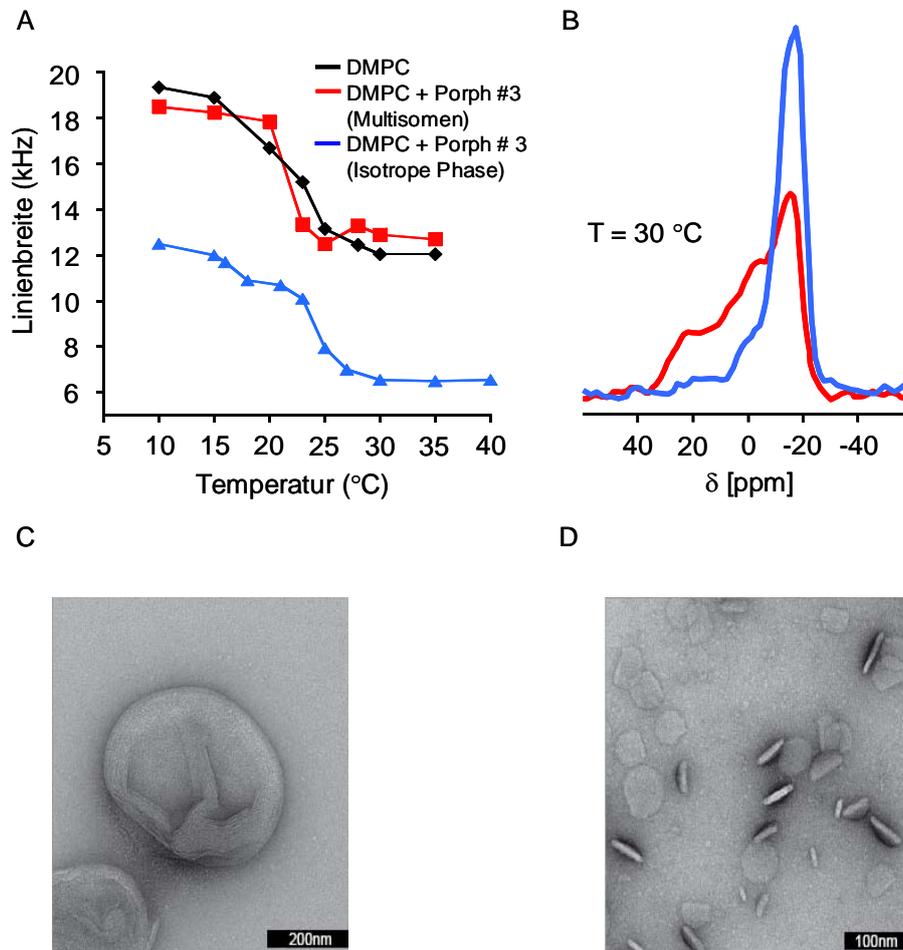


Abb. 3.48: Einfluss von Porphyrin #3 auf die Phospholipide in DMPC Liposomen.

Die Abbildungen A-D wurden freundlicherweise von Christian Ader für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

A. Temperaturabhängige Phasenverschiebung von DMPC vor (schwarze Linie) und nach (rote Linie) Applikation von Porphyrin #3 und nach einer Inkubation von einigen Stunden mit Porphyrin (blaue Linie).

B. Vergleich der chemischen Verschiebungen nach Applikation von Porphyrin #3 vor (blaue Linie) und nach (rote Linie) einer Inkubation von einigen Stunden.

C. Multilamellare Liposomen nach Applikation von Porphyrin #3 vor einer Inkubation von einigen Stunden.

D. Isotrope Phase der Liposomen nach Applikation von Porphyrin #3 nach einer Inkubation von einigen Stunden.

Der Vergleich des temperaturabhängigen Phasenübergangs der DMPC-Lipide vor und nach Applikation von Porphyrin #3 (Verhältnis Lipid:Porphyrin = 10:1) zeigte zunächst keinen signifikanten Unterschied (Abb. 3.48 A). Reines DMPC (schwarze Linie) machte wie erwartet bei etwa 23 °C einen Phasenübergang, der durch das Porphyrin #3 (rote Linie) kaum

beeinflusst wurde. Nach einiger Zeit jedoch begannen sich die aus vielen Lipidschichten zusammengesetzten Liposomen (multilamellar) in eine, im Magnetfeld ausgerichtete, isotrope Phase umzuwandeln (blaue Linie, Abb. 3.48 A und 3.48 B). Im Elektronenmikroskop (Abb. 3.48 C und D) wurden Strukturen deutlich, die eine ähnliche Form wie Bizellen (Abb. 3.48 D) aufweisen und gewöhnlich nur auftreten, wenn kurzkettige Tenside in der Probe enthalten sind. Zuvor waren die einzelnen Schichten der multilamellaren Liposomen gut zu erkennen (Abb. 3.48 C).

4 Diskussion

Die Untersuchungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit dem Kanalblocker Tetraphenylporphyrin #3 und dem spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3 durchgeführt wurden, dienten der Beschreibung des Inhibitionsmechanismus. Aufgrund der NMR-Strukturanalysen und Kompetitionsexperimente von Ader *et al.* (2008) und den elektrophysiologischen Untersuchungen von Gradl *et al.* (2003) wurde zu Beginn der Experimente davon ausgegangen, dass es sich bei Porphyrin #3 um einen Porenblocker handelt, der den Kanal über den Verschluss der Pore mit einer Stöchiometrie von 1:1 inhibiert. Während einerseits der Porenblock mittels Porenmutante bestätigt werden konnte, muss andererseits aufgrund der Inhibitionseigenschaften des Porphyrins, die dem charakteristischen Porenblock mit einer Stöchiometrie von 1:1 widersprechen, davon ausgegangen werden, dass es zusätzlich zu einer Inhibition des Spannungssensors kommt. Besonders die Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik, die Inhibition der *Gating*ströme und die steile Konzentrationsabhängigkeit des Blocks lassen sich mit einer Inhibition ausschließlich der Pore nicht erklären. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei Porphyrin #3 um einen allosterischen Effektor handelt, der den Kanal mit hoher Kooperativität inhibiert. Unter Einbeziehung der Inhibitionsweise anderer Porenblocker und *Gating*-Modifizierer sowie der experimentellen Daten, die aus der Interaktion von Porphyrin #3 mit Lipiden gewonnen wurden, soll im Folgenden ein Modell entwickelt werden, das die Wirkungsweise von Porphyrin #3 erklärt. Zudem soll diskutiert werden, inwieweit Porphyrin #3 und die abgeleiteten Blocker EL1 und EL2 Ansätze für die Entwicklung und Nutzung von selektiven Kanalblockern bieten.

4.1 Inhibition von Kv1.3 durch Porphyrin #3 im Vergleich mit Porenblockern

Der Block durch Porphyrin #3 war spannungsabhängig. Das bedeutet, dass der Kanal nicht bei allen Spannungen gleich stark inhibiert wurde. Während der Strom bei negativen Potentialen sehr stark durch Porphyrin #3 inhibiert wurde, nahm die Inhibition bei positiven Potentialen ab. Die klassische Erklärung für eine Spannungsabhängigkeit der Inhibition ist, dass sich die Bindungsstelle des geladenen Blockers in einem Bereich der Pore befindet, der vom elektrischen Feld beeinflusst wird (Woodhull, 1973). Das gilt nicht nur für Blocker, die

den Kanal von außen blockieren, sondern auch für intrazelluläre Blocker: Das elektrische Feld drückt den Blocker in die Pore hinein bzw. zieht diesen aus der Pore heraus (Tikhonov und Magazanik, 1998). Die nur schwache Spannungsabhängigkeit der Inhibition durch TEA^+ , die sowohl bei der Bindung von der Porennenseite als auch von der Porenaußenseite beobachtet wird, würde demnach darauf zurückzuführen sein, dass TEA^+ nur zu einem geringen Anteil innerhalb des elektrischen Feldes bindet (Lenaeus *et al.*, 2005). Dass die spannungsabhängige Inhibition durch Porphyrin #3 durch das Binden innerhalb des elektrischen Feldes zu erklären ist, legen die Untersuchungen von Ader *et al.* (2008) nahe. Sie zeigten in NMR-Strukturanalysen, dass Porphyrin #3, im Gegensatz zu dem spannungsunabhängig bindenden Kalitoxin (Lange *et al.*, 2006), tief in den Selektivitätsfilter und infolgedessen tief in das elektrische Feld eindringt (Abb. 4.1). Die Bindung wird durch die elektrostatische Interaktion der positiv geladenen Aminogruppen am Ende der Seitenarme mit den negativ geladenen Karbonsäureresten der Kaliumbindungsstelle S3 innerhalb des Selektivitätsfilters vermittelt.

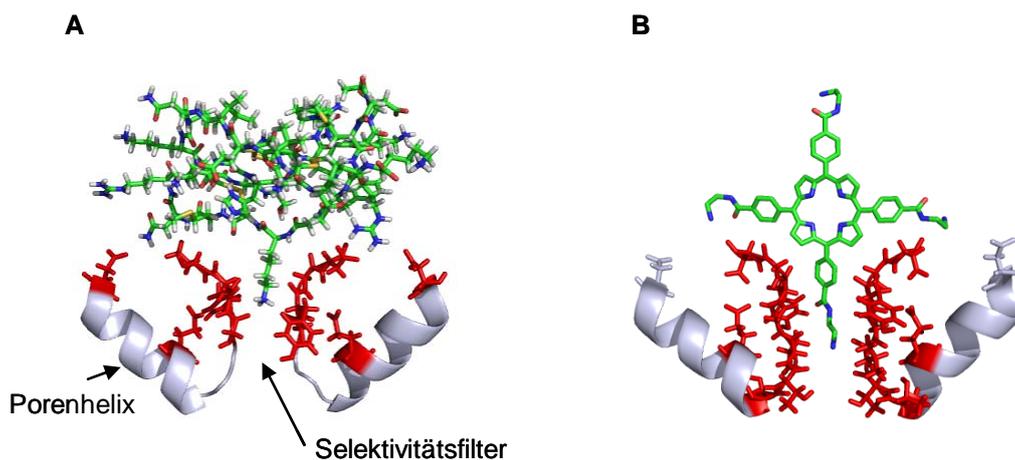


Abb. 4.1: Vergleich der NMR-Strukturdaten des Selektivitätsfilters mit gebundenem Kalitoxin bzw. Porphyrin #3.

Dargestellt sind Modelle der Selektivitätsfilter mit Porenhelix zweier gegenüberliegender Untereinheiten. Der vordere und der hintere Untereinheit sind entfernt worden. Die an der Bindung beteiligten Aminosäuren der Porenregion sind in beiden Modellen rot markiert.

Die Farben in den Blockern bedeuten: grün = Kohlenstoffatome, blau = Stickstoffatome, rot = Sauerstoffatome, weiß = Wasserstoffatome.

A. Bindung des Peptidtoxins Kalitoxin. Die positiv geladene Aminosäure Lysin 27 bindet im Selektivitätsfilter (aus Lange *et al.*, 2006).

B. Bindung von Porphyrin #3. Einer der vier identischen Seitenarme reicht bis zur Kaliumbindungsstelle S3 im Selektivitätsfilter (aus Ader *et al.*, 2008).

Die elektrophysiologischen Untersuchungen, die mit der *Inside-out*- und der *Outside-out-Patch-Clamp*-Technik durchgeführt wurden, zeigten, dass Porphyrin #3 den spannungsabhängigen Kv1.3 ausschließlich von der extrazellulären Seite inhibiert. Das ist eine wichtige Beobachtung, da von einigen Blockern, wie z.B. TEA^+ bekannt ist, dass diese

den Kanal sowohl von außen als auch von innen blockieren können. Durch die gezielte Punktmutation einer einzelnen Aminosäure am Porenausgang (Arg→Tyr) konnte die Affinität von Porphyrin #3 in den elektrophysiologischen Experimenten gegenüber Kv1.5 stark erhöht werden. Das deutet darauf hin, dass der Porenblock ebenso wie bei der KcsA-Kv1.3-Chimäre auch für die spannungsabhängigen Kanäle eine große Rolle spielte. Interessanterweise handelte es sich bei dem Tyrosin um eine Aminosäure, die auch bei zahlreichen anderen Porenblockern eine wichtige Rolle für die Bindung spielt (Gilquin *et al.*, 2005). Für diese Aminosäure (Pos. 82 bei KcsA-Kv1.3) konnten in der NMR-Analyse aufgrund fehlender Signale keine substantiellen strukturellen Veränderungen nach Applikation von Porphyrin #3 nachgewiesen werden. Ausgangspunkt für die Annahme, dass diese Aminosäure für die Bindung von Bedeutung sein könnte, war die Beobachtung, dass die untersuchten Mitglieder der *Shaker*-Familie eine Affinität für Porphyrin #3 zeigten, die ähnlich zu der Affinität von TEA⁺ war (MacKinnon und Yellen, 1990; Grissmer *et al.*, 1994). Während Porphyrin #3 für die Kanäle, die das aromatische Tyrosin an der genannten Position aufweisen, sehr hoch war, zeigten die Kanäle mit einer positiv geladenen (Arg, His, Lys) bzw. hydrophoben (Val) Aminosäure eine geringere Affinität. Neben der *Shaker*-Kanalfamilie wurden weitere spannungsabhängige Kaliumkanäle auf ihre Sensitivität für Porphyrin #3 getestet. Es wurden drei Kanäle, die im Herzen exprimiert werden (Kv2.1, Kv7.1 und Kv11.1) und ein neuronaler Kaliumkanal (Kv4.1) untersucht. Die applizierte Konzentration von 0,5 µM Porphyrin #3, die bei den meisten Mitgliedern der *Shaker*-Familie zu einer deutlichen Reduktion des Stroms führte, hatte bei den Mitgliedern der anderen Kanalfamilien keinen (Kv4.1, Kv7.1) bzw. einen nur sehr geringen Effekt (Kv2.1, Kv11.1). Das ist möglicherweise auf die Unterschiede in der Aminosäuresequenz zurückzuführen, die sich bei einem Vergleich der Porenregion mit der *Shaker*-Familie zeigten. Die Unterschiede fanden sich auch in dem Bereich, in dem sich bei der KcsA-Kv1.3-Chimäre nach Porphyrinapplikation signifikante chemische Verschiebungen zeigten.

Eine alternative Erklärung für die Spannungsabhängigkeit der Inhibition neben der Beeinflussung durch das elektrische Feld könnte eine indirekte Spannungsabhängigkeit sein, die durch permeierende K⁺-Ionen verursacht wurde, die innerhalb der Pore mit Porphyrin #3 um dieselbe Bindungsstelle kompetieren. Für das Kegelschneckenotoxin κ -Conotoxin PVIIA konnte ebenso wie für das Skorpionotoxin Charybdotoxin gezeigt werden, dass es vor allem die permeierenden Ionen sind, die die Bindung am Kanal destabilisieren und so eine scheinbare Spannungsabhängigkeit verursachen (MacKinnon und Miller, 1988; Terlau *et al.*,

1999; Garcia *et al.*, 1999). In Abbildung 4.2 ist die Beeinflussung von extrazellulären Porenblockern durch permeierende Ionen modellhaft dargestellt.

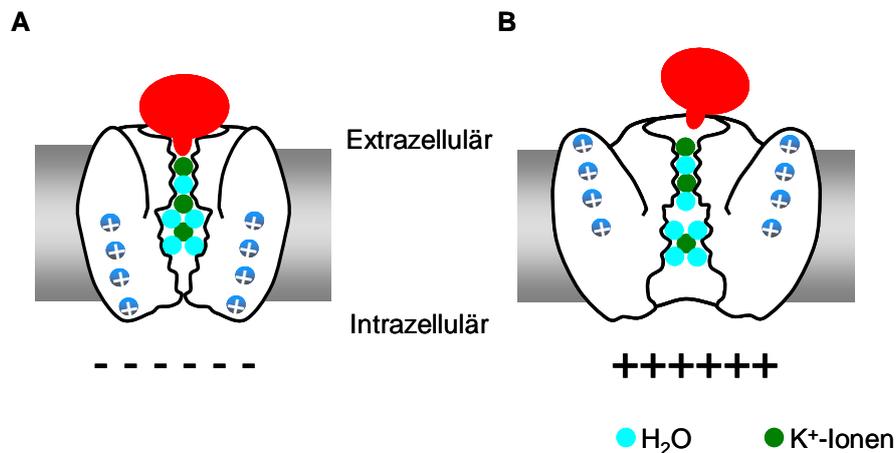


Abb. 4.2: Beeinflussung des Porenblocks durch permeierende Kaliumionen.

A. Im Geschlossenenzustand kann der Porenblocker (rot) die Bindungsstelle innerhalb des Selektivitätsfilters erreichen, ohne dass die Bindung durch K⁺-Ionen beeinflusst wird.
 B. Nach Öffnung des Kanals kommt es zu einer Destabilisierung der Bindung durch nachrückende K⁺-Ionen. Je stärker die Depolarisation ist, desto stärker wirkt sich der von innen wirkende Druck auf die Bindung aus. Die K⁺-Ionen sind als grüne, die H₂O-Moleküle als blaue Punkte dargestellt.

Nachrückende K⁺-Ionen erhöhen mit zunehmender Depolarisation die elektromechanische Kraft, die auf den Blocker einwirkt und führen zu einer Destabilisierung der Bindung.

In diesem Zusammenhang ist die Abhängigkeit des Blocks von der *extrazellulären* K⁺-Konzentration zu nennen, wie sie für CTX (Anderson *et al.*, 1988), ATX2 (Ranganathan *et al.*, 1996) und KTX (Legros *et al.*, 2000) beschrieben wurde. Auch hier wird ähnlich wie bei den permeierenden Ionen vermutet, dass der Porenblocker um die Kaliumbindestelle S1 in der Porenregion kompetiert. Auch für Porphyrin #3 kann eine Beeinflussung der Bindung durch permeierende Ionen nicht ausgeschlossen werden. Zwar wurde die Bindung durch extrazelluläres K⁺ nicht verändert, es könnte aber eine Bindungsstelle innerhalb des Selektivitätsfilters für die Beeinflussung durch permeierende Ionen verantwortlich sein.

Eine weitere Möglichkeit, die Spannungsabhängigkeit eines Porenblocks zu erklären, sind Konformationsänderungen des Ionenkanals, die beim Öffnen bzw. Schließen durchlaufen werden. Die strukturellen Änderungen bestimmter Porenregionen, die für die Bindung des Blockers wichtig sind, bewirken eine Destabilisierung des Blocks und die Affinität nimmt ab. Lenaeus *et al.* (2005) stellten aufgrund von Kristallstrukturdaten die Vermutung auf, dass es sich beispielsweise bei der spannungsabhängigen Inhibition durch TEA⁺ um eine Kombination aus mehreren Komponenten handelt. Neben der Beeinflussung durch das elektrische Feld und die Besetzung der Kaliumbindungsstellen im blockierten Zustand ist eine unterschiedliche Affinität von TEA⁺ für verschiedene Zustände des Selektivitätsfilters (leitend

oder nicht leitend) als mögliche Ursache denkbar. Alle drei Mechanismen (Beeinflussung durch das elektrische Feld, permeierende Ionen, Konformationsänderungen), die dazu dienen die Spannungsabhängigkeit eines Porenblockers zu erklären, lassen sich prinzipiell auch auf die Destabilisierung der Bindung von Porphyrin #3 anwenden.

Dass die Bindung von Porphyrin #3 beim Öffnen des Kanals destabilisiert wurde, wird bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Inhibition während einzelner Depolarisationen ersichtlich. Beim Vergleich der prozentualen Inhibition zu Beginn der Depolarisation, die den Block des geschlossenen Kanals widerspiegelt, mit der prozentualen Inhibition am Ende der Depolarisation, die den Block des offenen Kanals widerspiegelt, wird ersichtlich, dass sich diese deutlich voneinander unterscheiden. Die Inhibition war zu Beginn des Pulses stärker und nahm zum Ende des Pulses hin ab, wobei asymptotische Werte angestrebt wurden. Die Beobachtung ist dadurch zu erklären, dass Porphyrin #3 am Geschlossenenzustand des Kanals mit einer höheren Affinität bindet als am Offenzustand des Kanals. Die Wahrscheinlichkeit für U (*unblocked channels*) ist am Ende des Pulse größer als zu Beginn des Pulses: Porphyrin #3 gelangt von einem Gleichgewichtszustand über einen Relaxationsprozess zu einem neuen Gleichgewichtszustand (Abb. 4.3). Im Fall von κ -Conotoxin PVIIA lässt sich der Übergang von einem Gleichgewichtszustand in einen anderen mit einem einfach exponentiellen Verlauf beschreiben, wie es auch aufgrund des beschriebenen Mechanismus des Porenblocks zu erwarten ist (Terlau *et al.*, 1999). Bei Porphyrin #3 folgte die Relaxation dagegen einem zweifach exponentiellen Verlauf.

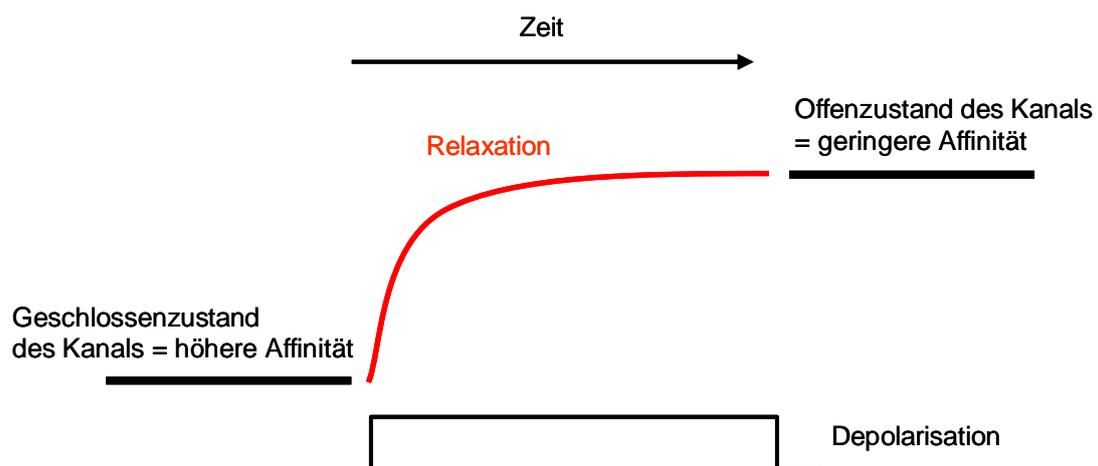


Abb. 4.3: Porphyrin #3 erreicht in Abhängigkeit des Konformationszustandes des Kanals (offen oder geschlossen) unterschiedliche Gleichgewichtszustände.

Beim Öffnen des Kanals wird die Bindung von Porphyrin #3 destabilisiert. Die Affinität im neuen Gleichgewichtszustand ist geringer als im Gleichgewichtszustand, der im geschlossenen Kanal erreicht wird.

Das führt zu der Schlussfolgerung, dass bei Porphyrin #3 eine weitere Komponente bei der Abnahme des Blocks nach Öffnen des Kanals eine Rolle spielt. Entweder handelt es sich um zwei Schritte mit unterschiedlichen Zeitkonstanten, die zum Erreichen eines neuen Gleichgewichtszustandes vollzogen werden, oder neben dem Porenblock spielt ein weiterer Inhibitionsmechanismus eine Rolle, der ebenfalls durch das Öffnen des Kanals beeinflusst wird. Eine weitere Alternative könnten verschiedene Kanalzustände sein, die vor Erreichen eines Gleichgewichtszustandes durchlaufen werden und zu denen Porphyrin #3 eine unterschiedliche Affinität aufweist. Bei Auftragung der ersten, schnelleren Relaxationszeitkonstante unterschiedlicher Testpotentiale zeigte sich, dass diese einer starken Spannungsabhängigkeit unterlag. Ein Fit mit der Woodhull-Gleichung (Woodhull, 1973) ergab für die elektrische Distanz, die Porphyrin #3 zum Erreichen der Bindungsstelle zurücklegen musste, einen Wert von $\delta = 0,47$. Unter der Annahme, dass die Spannungsabhängigkeit der Inhibition sich weitestgehend aus einem Porenblock ableiten lässt, bedeutet das, dass Porphyrin #3 etwa 50 % in das elektrische Feld eindringt, um die Bindungsstelle zu erreichen. Eine Beeinflussung der Bindung durch das elektrische Feld erscheint daher als sehr wahrscheinlich.

Die Tatsache, dass der Kv1.3-Kanal in den Kontrollmessungen bei einer Spannung von ca. +50 mV eine maximale Offenwahrscheinlichkeit erreichte, könnte in einem direkten Zusammenhang mit der beschriebenen Spannungsabhängigkeit der apparenten Dissoziationskonstante für den offenen Kanal stehen. Diese nahm bei Spannungen positiver als +50 mV nicht weiter zu und erreichte ein Plateau. Im Fall von Conotoxin (Terlau *et al.*, 1999) nimmt die apparente Dissoziationskonstante für den offenen Kanal bei stärkeren Depolarisationen stetig zu und erreicht kein Plateau. Das ist aufgrund des postulierten Modells, dass vor allem auf die Destabilisierung des Porenblocks durch permeierende K^+ -Ionen basiert, auch nicht zu erwarten, weil durch stärkere Depolarisation auch die elektromotorische Kraft zunimmt. Auch diese Beobachtung spricht bei Porphyrin #3 für eine Destabilisierung des Blocks durch strukturelle Veränderungen, die bei einer bestimmten Spannung ihr volles Ausmaß erreichen.

Einen weiteren Unterschied im Vergleich zu Bindungseigenschaften von Poren blockierenden Peptidtoxinen zeigte die Inhibition durch Porphyrin #3 in Bezug auf eine Punktmutation in der *Turret*-Region des Kv1.3-Kanals. Der Austausch der sterisch kleinen Aminosäure Glyzin an Position 377 zu der sterisch großen Aminosäure Phenylalanin führte in elektrophysiologischen Experimenten im Fall von Kaliotoxin zu einer sehr starken Abnahme der Affinität. Diese Mutation, die bei Kv1.3 zu einem weitgehenden Verlust der

C-Typ-Inaktivierung führte, hatte hingegen auf die Bindung von Porphyrin #3 keinen Einfluss. Das Glyzin an Position 377 ist an der direkten Bindung von Kaliotoxin nicht beteiligt. Es wird vermutet, dass nach Austausch der Aminosäure Kaliotoxin diese Stelle in der *Turret*-Region schlechter passieren kann und die eigentliche Bindestelle aus sterischen Gründen nicht erreicht. Das Erreichen der Bindestelle scheint für das abgeflachte, kleinere Porphyrin #3 trotz Mutation nicht beeinträchtigt zu sein.

In diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung interessant, dass die Applikationsreihenfolge des Porenblockers TEA⁺ in Doppelblockexperimenten mit Porphyrin #3 entscheidend für die Auswaschbarkeit der beiden Blocker war. Während das Auswaschen bei einer Applikationsreihenfolge gut möglich war, bei der TEA⁺ auf Porphyrin #3 folgte, blieb der Kv1.3-Strom trotz Auswaschens zu 40-50 % inhibiert, als die Reihenfolge der Applikation umgedreht wurde. Die beiden Blocker beeinflussten sich gegenseitig, wenn TEA⁺ zuerst appliziert wurde. Möglicherweise führt die Applikation von Porphyrin #3 zu strukturellen Änderungen am Kanal oder es kommt zu einer elektrostatischen Wechselwirkung der beiden Blocker, so dass TEA⁺ irreversibel gebunden blieb. Ein ähnlicher Vorgang war zu beobachten, wenn auf Porphyrin #3 der Porenblocker KTX folgte. Die Einwaschgeschwindigkeit für KTX hatte sich im Vergleich mit den Kontrollmessungen ohne Porphyrin #3 nahezu vierfach verlangsamt, so dass der Schluss nahe liegt, dass Porphyrin #3 das Erreichen der Bindestelle von KTX erschwerte. Eine genaue Erklärung für die Beobachtungen in den Doppelblockexperimenten wurde jedoch bisher nicht gefunden.

4.2 Inhibition von Kv1.3 durch Porphyrin #3 im Vergleich mit *Gating*-Modifizierern

Die spannungsabhängige Inhibition des Ionenstroms ist auch durch die Bindung eines Antagonisten am Spannungssensor möglich, wie es Swartz und MacKinnon (1997) am Beispiel des Spinnentoxins Hanatoxin, der den Kaliumkanal Kv2.1 inhibiert, zeigten. Hierbei dringt das amphiphile Peptidtoxin mit den hydrophoben Anteilen in die Lipidmembran ein, während sich die geladenen Aminosäuren des Toxins im Bereich der Lipidkopfgruppen befinden und das Toxin in der Membran verankern (Milescu *et al.*, 2007; Posokhov *et al.*, 2007). Dabei bindet dieses als *Gating*-Modifizierer bezeichnete Toxin an bestimmten Regionen des Spannungssensors und schränkt dessen Bewegungsfreiheit ein. Es handelt sich um eine allosterische Inhibition, bei der nicht die Pore blockiert wird, sondern das Toxin ausschließlich an Aminosäuren der äußeren Bereiche der Transmembransegmente S3b und S4

bindet (Alabi *et al.*, 2007). Phillips *et al.* (2005) zeigten, dass Hanatoxin während der Depolarisation den Spannungssensor nicht verlässt, sondern gebunden bleibt und einen stabilen Komplex mit dem Sensor bildet. Durch die Bindung des Toxins, welches wie ein Rucksack auf dem Spannungssensor sitzt und bei Bewegungen des Sensors mittransportiert wird, ist ein erhöhter Energieaufwand notwendig, um die für die Öffnung des Kanals notwendige Auswärtsbewegung des Sensors zu generieren. Durch stärkere Depolarisationen kann die Energiebarriere überwunden werden und der Kanal öffnet sich, wobei die Aktivierungskurve zu höheren Potentialen verschoben wird. Mittlerweile ist eine Vielzahl weiterer Spinnentoxine bekannt, die durch die Bindung an den Spannungssensor den Geschlossenenzustand des Kanals stabilisieren (Übersicht bei Swartz, 2007). In Abbildung 4.4 ist die Beeinflussung des Spannungssensors durch *Gating*-Modifizierer modellhaft dargestellt.

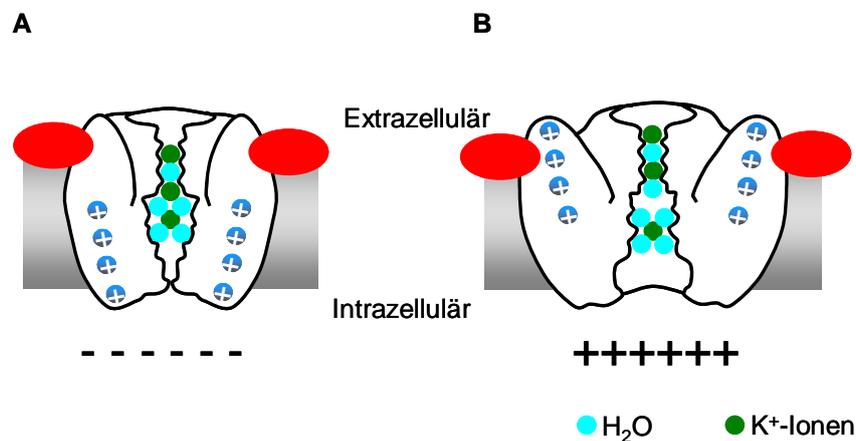


Abb. 4.4: Inhibition des Ionenkanals durch Bindung eines *Gating*-Modifizierers an den Spannungssensor.

A. Inhibition des Kanals durch einen *Gating*-Modifizierer (rot) im Geschlossenenzustand. Der Geschlossenenzustand des Spannungssensors wird stabilisiert.

B. Bei starker Depolarisation kann sich der Spannungssensor trotz gebundenem *Gating*-Modifizierer nach außen bewegen: Der Kanal öffnet sich.

Das Spinnentoxin GsMTx-4, das ebenso wie Hanatoxin und VsTx1 aus dem Gift der Roten Chile-Vogelspinne gewonnen wird, inhibiert die sogenannten streckungsaktivierten Kationenkanäle (*Stretch Activated Cation Channels*, SACs), indem es die Packungsdichte um den Kanal herum stört. Eine direkte Bindung an das Kanal-Protein ist nicht notwendig (Suchyna *et al.*, 2004). Ein Merkmal von *Gating*-Modifizierern zeigt sich in der verlangsamten Aktivierungskinetik und in der beschleunigten Deaktivierungskinetik des inhibierten Kanals, wie es von Swartz und MacKinnon (1997) beschrieben wurde. Das ist dadurch zu erklären, dass das Toxin während der Spannungssensorbewegungen gebunden bleibt und der Ruhezustand des Sensors stabilisiert wird: Die Auswärtsbewegungen werden energetisch benachteiligt, während die Einwärtsbewegungen energetisch begünstigt werden.

Die Beeinträchtigung des Spannungssensors nach Hanatoxinbindung zeigt sich auch in der Inhibition des *Gating*stroms (Lee *et al.*, 2003), der die Bewegungen der positiven Ladungen im Spannungssensor widerspiegelt. Die Inhibition des *Gating*stroms durch Hanatoxin führt, ähnlich wie bei der Inhibition des Ionenstroms, zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve zu positiven Potentialen. Anders als beim Ionenstrom, der nach Toxinzugabe auch bei Potentialen von +100 mV nicht die Amplitude der Kontrollmessung erreicht (Swartz und MacKinnon, 1997), wird die vollständige Ladungsverschiebung des Spannungssensors bei ca. +70 mV erreicht (Lee *et al.*, 2003). Aussagen über die Stöchiometrie, mit der Hanatoxin an den Kv2.1-Kanal bindet, konnten Swartz und MacKinnon (1997) über die Konzentrationsabhängigkeit des Ionenstromblocks machen, die im Bereich der hohen Toxinkonzentrationen besonders steil verlief. Die Messpunkte in der Konzentrations-Wirkungskurve stimmten am besten mit einem Modell überein, das eine Stöchiometrie von 4:1 annahm: vier Toxinmoleküle binden *unabhängig* voneinander an einen Spannungssensor, wobei die Bindung eines Moleküls ausreicht, um den Kanal zu inhibieren.

Beim Vergleich der genannten Eigenschaften von Hanatoxin und anderen *Gating*-Modifizierern mit der Inhibition von Kv1.3 durch Porphyrin #3 zeigten sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede. Auch bei Porphyrin #3 kam es zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen, wobei die Verschiebung deutlich geringer ausfiel als bei Hanatoxin und anderen *Gating*-Modifizierern. Auch die Verlangsamung der Aktivierungskinetik und die Beschleunigung der Deaktivierungskinetik waren bei Porphyrin #3 weniger stark ausgeprägt. Swartz und MacKinnon (1997) legten bei ihren Experimenten einen besonderen Wert auf die Analyse der Deaktivierungstails. Die Ursache dafür ist die Tatsache, dass es sich beim Schließen des Kanals um einen einfach zu beschreibenden Schritt handelt, der im Gegensatz zum Öffnen nicht durch eine hohe Kooperativität der vier Untereinheiten gekennzeichnet ist. Zudem ist der gemessene *Tail*strom direkt proportional zur Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, da für das Schließen des Kanals stets auf dasselbe Membranpotential repolarisiert wird. Aufgrund der sehr schnellen Schließkinetik von Kv1.3 wurde ein qualitativer Vergleich der *Tail*ströme vor und nach Applikation von Porphyrin #3 sehr erschwert. Die Kühlung der Messkammer und die Verwendung von Rb⁺-Ionen anstelle von K⁺-Ionen in der externen Lösung führte zu einer Verlangsamung der *Tail*ströme, die deren Analyse ermöglichte. Es zeigte sich, ähnlich wie nach der Applikation von Hanatoxin, dass sich die *Tail*ströme mit zunehmender Porphyrinkonzentration und zunehmender Depolarisationsstärke beschleunigten. Die Beschleunigung erreichte bei Porphyrin #3 in Hinblick auf die Depolarisationsstärke ein

Maximum bei ca. +50 mV. Ab dieser Testspannung nahm die Beschleunigung der Deaktivierungstails nicht weiter zu. Auch bei der Konzentrationsabhängigkeit wurden asymptotische Werte angestrebt. Aufgrund der konzentrationsabhängigen Empfindlichkeit der Oozyten gegenüber Porphyrin #3, die sich in einer Zunahme der Leckströme zeigte, konnten keine Konzentrationen, die oberhalb von 1 μM Porphyrin #3 lagen, eingesetzt werden. Wie bereits bei der Beschreibung der apparenten Dissoziationskonstante erwähnt, erreicht der Kv1.3-Kanal in Kontrollmessungen bei ca. +50 mV die größte Offenwahrscheinlichkeit. Dass es nach Applikation von Porphyrin #3 bei dieser Testspannung keine zusätzliche Beschleunigung der Deaktivierungstails gab, könnte damit in einem Zusammenhang stehen. Die Beschleunigung der Deaktivierung ist mit einem Porenblock nur schwer zu erklären. Der Blocker muss, damit es bei positiven Potentialen zu dem beobachteten Ionenfluss kommt, die Pore frei geben und die Bindungsstelle verlassen. Um dann die Deaktivierungskinetik beeinflussen zu können, muss das erneute Binden schneller ablaufen, als das Schließen des Kanals dauert. Die Hinreaktion der Bindungsgeschwindigkeit für Porphyrin #3 lag bei den gemessenen Potentialen in einem Bereich von mehreren Sekunden, während die Deaktivierung ein Vorgang war, der unter den Messbedingungen in einem Zeitfenster unterhalb von 100 ms ablief. Es ist daher anzunehmen, dass die Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik auf die Beteiligung des Spannungssensors zurückzuführen ist, wie es beispielsweise für das Hanatoxin gezeigt wurde. Hinweise hierfür gibt es durch die Inhibition der *Gating*ströme, die nach Applikation von 0,5 μM Porphyrin #3 bei negativen Potentialen beobachtet werden konnte. Auch bei positiven Potentialen waren die *Gating*ströme, wenn auch zu einem geringeren Maße, geblockt. Dafür könnte eine direkte Bindung von Porphyrin #3 an dem Spannungssensor verantwortlich gemacht werden oder ein indirekter Effekt durch Porphyrin#3, der über eine gestörte Interaktion des Kanals mit den umgebenden Membranlipiden vermittelt wurde. Aus einer Vielzahl von Publikationen ist bekannt, dass für die Funktion von integralen Membranproteinen, wie z. B. Ionenkanäle, der spezifischen Interaktion mit den umgebenen Membranlipiden eine besondere Bedeutung zukommt (Williamson *et al.*, 2003; Marius *et al.*, 2005; Börjesson *et al.*, 2008; Übersicht bei Boland und Drzewiecki, 2008). Die Membranlipide dienen nicht allein der Verankerung in der Membran, sondern üben über eine direkte Bindung eine regulatorische Funktion aus. Diese spielt sowohl bei einfach gebauten Ionenkanälen, wie z. B. KcsA eine wichtige Rolle als auch bei spannungsabhängigen Kanälen, bei denen die Aktivität des Spannungssensors von der Lipidzusammensetzung der Umgebung abhängt. Ist diese Interaktion gestört oder werden die geladenen Kopfgruppen verändert, wirkt sich dies direkt auf die

Offenwahrscheinlichkeit des Kanals aus (Schmidt *et al.*, 2006; Schmidt und MacKinnon, 2008).

4.3 Inhibition von Kv1.3 durch Porphyrin #3 im Vergleich mit dem Effekt von zwei- und dreiwertigen Metallionen

Von einer Vielzahl von Metallionen ist bekannt, dass diese Ionenkanäle inhibieren können. Der Inhibitionsmechanismus reicht von elektrostatischen Effekten über die mechanische Inhibition des Spannungssensors bis zu einem einfachen Porenblock von der intra- und extrazellulären Seite (Übersicht bei Elinder und Århem, 2004). In Abbildung 4.5 A-C sind Modelle unterschiedlicher Inhibitionsmechanismen dargestellt.

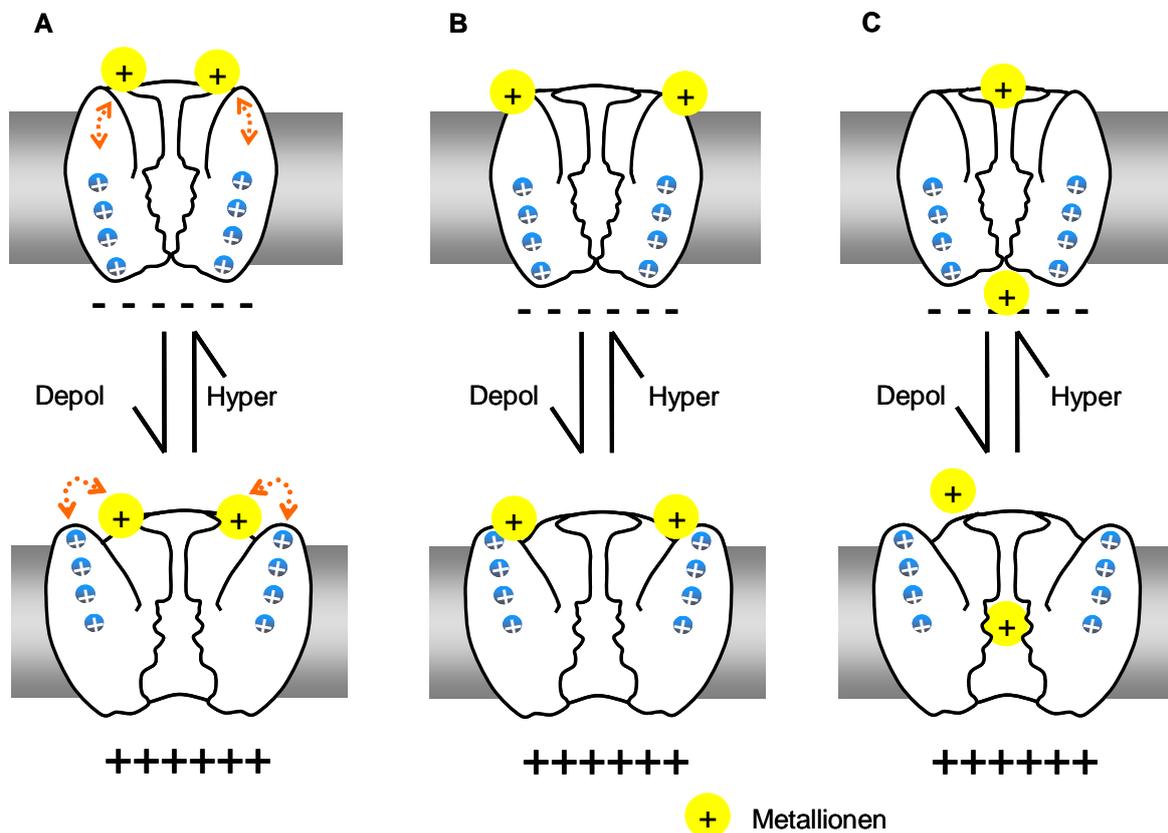


Abb. 4.5: Inhibitionsmechanismen von spannungsabhängigen Ionenkanälen durch ein-, zwei- und dreiwertige Metallionen.

In den Abb. A-C ist jeweils der geschlossene (obere Reihe) und der geöffnete (untere Reihe) Zustand des Kanals dargestellt (verändert nach Elinder und Århem, 2004).

A. Die Metallionen lagern sich über mehrere Bindungsstellen an die Kanaloberfläche an und beeinflussen die Dichte der Oberflächenladungen, was zur elektrostatischen Inhibition des Spannungssensors führt.

B. Es kommt zu einer mechanischen Beeinflussung des Spannungssensors durch Anlagerung der Metallionen. Es gibt mehrere Bindungsstellen am Kanal.

C. Die Metallionen erreichen ihre Bindungsstelle innerhalb der Pore und inhibieren den Kanal spannungsabhängig.

Die Abb. 4.5 A zeigt einen Mechanismus, bei dem es zu einer elektrostatischen Beeinflussung des Kanals durch zweiwertige Metallionen, wie z.B. Zn^{2+} (Zhang *et al.*, 2001a) und Sr^{2+} (Elinder *et al.*, 1996) kommt. Durch Bindung an den Kanal kommt es zu einer Abschirmung der Oberflächenladungen (*Surface charge*-Modell; Green und Andersen, 1991), die für die Interaktion mit dem Spannungssensor wichtig sind, bzw. es kommt zu einer direkten Interaktion mit den geladenen Metallionen (Elinder *et al.*, 1996). Das Modell in Abb. 4.5 B postuliert einen Mechanismus, bei dem der Spannungssensor nicht elektrostatisch beeinflusst wird, sondern mechanisch, vergleichbar mit dem Block durch Hanatoxin. Bei den beiden genannten Modellen kommt es neben der Verlangsamung der Aktivierungs- und der Beschleunigung der Deaktivierungskinetik zu einer Inhibition der *Gating*ströme und zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung der Kanäle zu positiveren Potentialen (Zhang *et al.*, 2001a; Zhang *et al.*, 2001b). Die unterschiedliche Affinität der Metallionen zum Geschlossen- und Offenzustand (hohe Affinität) und Offenzustand (niedrige Affinität) des Kanals lässt sich durch einen einfachen physikalischen Mechanismus erklären: Die lokale Konzentration der Metallionen an der Bindungsstelle verändert sich in Abhängigkeit der Position des Spannungssensors. Bei stärkerer Depolarisation befinden sich die positiven Ladungen des Spannungssensors weiter außen im elektrischen Feld und verdrängen die Metallionen. In Abb. 4.5 C ist der Inhibitionsmechanismus dargestellt, wie man ihn beispielsweise für Cs^{+} - oder Ba^{2+} -Ionen findet (Neyton und Miller, 1988; Jiang und MacKinnon, 2000). Die Ionen binden innerhalb der Porenregion und blockieren den Durchgang der „nativen“ Ionen. Da diese Bindung nicht selten innerhalb des elektrischen Feldes lokalisiert ist, ist die Bindung häufig spannungsabhängig.

Weil die Effekte, die durch zweiwertige Metallionen an spannungsabhängigen Kanälen hervorgerufen werden, den Effekten gleichen, die von Porphyrin #3 verursacht werden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es bei Porphyrin #3 auch zu einer Abschirmung von Oberflächenladungen am Kanal oder zu einer elektrostatischen Interaktion mit den Ladungen des Spannungssensors kommt.

4.4 Beeinflussung der Membranlipide durch Interaktion mit Porphyrin #3

Der Einfluss von Porphyrin #3 auf Membranlipide wurde in unterschiedlichen Experimenten gezeigt. Ein erster Hinweis auf den Einfluss von Porphyrin #3 auf die Membranlipide zeigte sich in den elektrophysiologischen Experimenten, in denen Konzentrationen höher als $0,5\text{-}1\ \mu\text{M}$ den elektrischen Widerstand der Oozytenmembran herabsetzten. Dies spiegelte sich

in einer Erhöhung des Leckstroms wider. In Fluoreszenzmessungen, die in einem horizontalen Bilayer vor und nach Applikation von Porphyrin #3 durchgeführt wurden, zeigte sich, dass Porphyrin #3 sich stark in der Membran anreicherte. Eine direkte Interaktion von Porphyrin #3 mit den Membranlipiden wurde in NMR-Untersuchungen festgestellt, bei der die chemischen Verschiebungen bestimmter Phospholipidanteile vor und nach Applikation von Porphyrin #3 gemessen wurden. Aus den Änderungen der chemischen Verschiebungen nach Porphyrinapplikation ließ sich ableiten, dass Porphyrin #3 vor allem über die Lipidkopfguppen interagiert und nicht über die hydrophoben Seitenketten. Aus den Ergebnissen ließ sich ein Modell entwickeln, das das Porphyrin #3 flach in die Membran eingebettet zeigt, umgeben von den Kopfguppen der Membranlipide (Abb. 4.6).

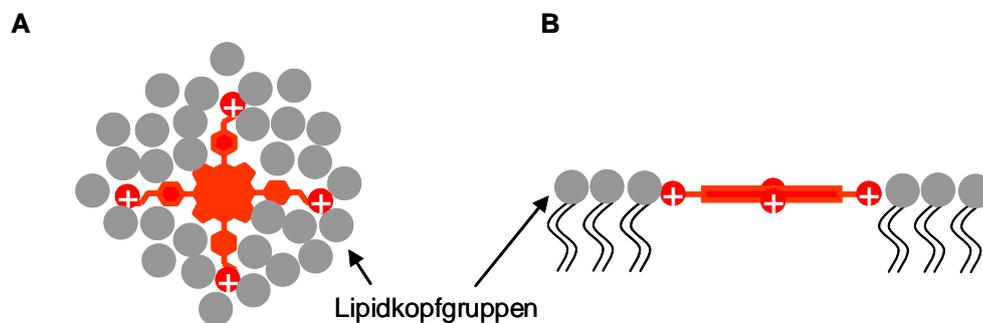


Abb. 4.6: Vereinfachte Vorstellung der Interaktion von Porphyrin #3 mit den Kopfguppen der Membranlipide.

A. Aufsicht. Porphyrin #3 ist eingebettet in die Membran, umgeben von den negativ geladenen Lipidkopfguppen (graue Kreise), die mit den positiv geladenen Aminogruppen (rote Kreise) interagieren.

B. Seitenansicht. Porphyrin #3 interagiert über die Aminogruppen mit den Phospholipiden, wobei die hydrophoben Fettsäureketten an der Interaktion nicht beteiligt sind.

Weitere Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie und Elektronenmikroskopie gaben Aufschluss darüber, ob Porphyrin #3 den Phasenübergang von Membranlipiden beeinflussen kann. Beim Phasenübergang handelt es sich um eine Zustandsänderung der Lipide, die die physikalischen Eigenschaften der Membran verändert und besonders bei Erwärmung zu beobachten ist. Bei tieferen Temperaturen liegen die Lipide in einer gestreckten Konformation vor und bilden eine kristalline Struktur mit maximalen Van-der-Waals-Kontakten zwischen den hydrophoben Seitenketten (Gelphase). Werden die Lipide erwärmt, liegen die Fettsäureketten wesentlich ungeordneter und lockerer gepackt vor (Flüssigkeitsphase). Infolgedessen nimmt beim Phasenübergang die Dicke der Lipiddoppelschicht (Abb. 4.7) ab.

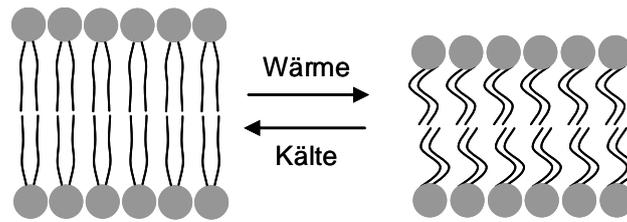


Abb. 4.7: Schematische Darstellung des Phasenübergangs einer Lipiddoppelschicht (aus Horton, 2008).

Durch Erwärmung werden die Lipide von einem gelartigen, geordneten Zustand in einen flüssig-kristallinen ungeordneten Zustand überführt.

Der Phasenübergang von Doppelschichten, die nur aus einem einzelnen Lipidtyp aufgebaut sind, findet bei einer charakteristischen Phasenübergangstemperatur statt. Für das in der NMR verwendete DMPC liegt diese bei ca. 23 °C. Während sich zunächst beim temperaturabhängigen Phasenübergang kein Unterschied zwischen Kontrolle und Porphyrinmessung zeigte, wurden nach einigen Stunden massive strukturelle Umordnungen beobachtet, die auch im elektronenmikroskopischen Bild erkennbar waren. Die multilamellaren Liposomen, die eine kugelförmige Gestalt aufwiesen, wandelten sich nach Porphyrinapplikation in bizellenartige Strukturen um, die sich in dem Magnetfeld ausrichteten. Normalerweise wird dies durch kurzkettige Tenside erreicht, Substanzen, die die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit oder die Grenzflächenspannung zwischen zwei Phasen herabsetzen. Möglicherweise wirkt Porphyrin #3 unter den genannten Versuchsbedingungen ähnlich. Die in Bezug auf die Beeinflussung der Lipidmembran gemachten Beobachtungen, die nach Applikation von Porphyrin #3 in verschiedenen Systemen auftreten, lassen den Schluss zu, dass Porphyrin #3 die Integrität der Membran massiv beeinflusst. Neben dem Porenblock erscheint es wahrscheinlich, dass die Beeinflussung der Membran Auswirkungen auf die Kanal-Lipidkopfgruppen-Interaktion hat und diese zu einem veränderten *Gating* führt. Die Inhibition des Spannungssensors zeigte sich sowohl in der Inhibition der *Gating*ströme als auch in der Beeinflussung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik. Ob aber die in der Elektronenmikroskopie und die in der mit der NMR-Technik beobachteten Effekte des Porphyrins auf die Liposomen uneingeschränkt auf die elektrophysiologischen Experimente mit den Oozyten zu übertragen sind, bleibt unklar. Schließlich treten die bizellenartigen Strukturen erst nach einigen Stunden auf - ein Zeitraum, der für die elektrophysiologischen Messungen nicht in Anspruch genommen wurde. Es wird jedoch als sehr wahrscheinlich erachtet, dass die beschriebene Anreicherung in die Membran und die Interaktion von Porphyrin #3 mit den Lipidkopfgruppen auch in der Oozytenmembran stattfand, obgleich die Lipidzusammensetzung im Vergleich zu den Liposomen

unterschiedlich ist. Die Empfindlichkeit der Oozyten gegenüber Porphyrin #3, die sich in einer Erhöhung der Leckströme zeigte, ist ein deutliches Indiz hierfür.

Dadurch, dass bisher keine direkte Interaktion von Porphyrin #3 mit dem Spannungssensor untersucht wurde, was über gezielte Punktmutationen innerhalb des Sensors ermöglicht würde oder über die Konstruktion von Chimären aus einem sehr affinen mit einem weniger affinen Kanal, kann keine abschließende Aussage darüber getroffen werden, ob Porphyrin #3 direkt am Sensor bindet oder die beobachteten Effekte ausschließlich über Membraninteraktion verursacht werden. Eine direkte Interaktion erscheint aber wahrscheinlich, da Porphyrin #3 eine große Spezifität gegenüber der *Shaker*-Kanalfamilie zeigte und Kanäle anderer Familien kaum oder nicht inhibiert wurden. Abb. 4.8 zeigt anhand der Kaliumkanalchimäre aus Kv1.2 und Kv2.1 (Long *et al.*, 2007), die zusammen mit gebundenen Lipidmolekülen kristallisiert wurde, wie sich Porphyrinmoleküle in die Membran einlagern könnten, um so die *Gating*-Eigenschaften des Kanals zu beeinträchtigen. Möglicherweise hat Porphyrin #3 eine ähnliche Wirkung wie das oben erwähnte Spinnentoxin GsMTx-4 indem es die Packungsdichte der Lipide um den Kanal herum stört.

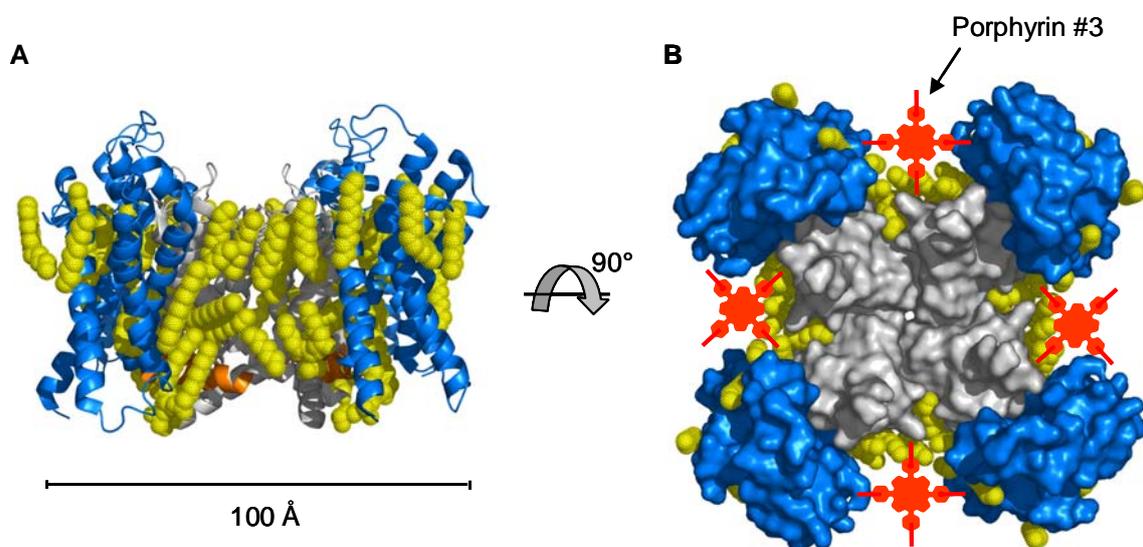


Abb. 4.8: Kristallstruktur-Modell der Kaliumkanalchimäre aus Kv1.2 (Porendomäne) und Kv2.1 (Spannungssensordomäne) (Long *et al.*, 2007).

A. Darstellung der α -helikalen Anteile und der Turret-Region von der Kv1.2/Kv2.1-Chimäre in Seitenansicht. Die Spannungssensordomäne ist in blau dargestellt, die Porendomäne in grau und der S4-S5-Linker in orange. Die Lipidmoleküle sind in gelb abgebildet.

B. Darstellung der Oberflächenstruktur der Kv1.2/Kv2.1-Chimäre in Aufsicht. Gleicher Farbcode wie in A. Zusätzlich sind hypothetisch maßstabsgetreue Porphyrinmoleküle (rot) abgebildet, die sich seitlich an den Kanal anlagern.

Die unterschiedliche Affinität von Porphyrin #3 könnte neben der unterschiedlichen Aminosäuresequenz in der Bindungsstelle eine weitere Ursache haben. Es ist bekannt, dass

sich Ionenkanäle innerhalb der Zellmembran in Bereichen unterschiedlicher Lipidkomposition befinden (Tillman und Cascio, 2007). Diese als *Lipid rafts* (*raft* = Floß) bezeichneten Mikrodomänen sind für die Funktion der Kanäle von großer Bedeutung und im Herzen u. a. für Kv1.4, Kv1.5 und Kv2.1 beschrieben worden (Maguy *et al.*, 2006). Möglicherweise werden auch in den *Xenopus*-Oozyten *raft*ähnliche Strukturen für bestimmte Kanäle ausgebildet, die eine abweichende Lipidzusammensetzung aufweisen und in denen sich Porphyrin #3 schlechter anreichern kann. Das hätte eine geringere Beeinflussung der *Gating*-Eigenschaften des Kanals zur Folge.

4.5 Beeinflussung der C-Typ-Inaktivierung von Kv1-Kanälen

Die Ergebnisse von Ader *et al.* (2008) zeigten, dass der Selektivitätsfilter der Kaliumkanal-Chimäre KcsA-Kv1.3 nach Applikation von Porphyrin #3 in einen Konformationszustand übergeht, wie er auch für den C-Typ-inaktivierten Kanal beobachtet wird. Hierbei wechseln die Carbonylsauerstoffe der Peptidbindung von einer „*conductive, in line*“-Konformation in eine „*non-conductive, out of line*“- bzw. in eine „*blocked, out of line*“-Konformation. Der Vorgang der C-Typ-Inaktivierung wird in der Literatur häufig als Kollabierung der Pore beschrieben. Bei dem Kollaps handelt es sich aber nicht um eine strukturelle Verengung oder Blockierung des Ionendurchgangs, sondern um die Auflösung der elektrostatisch günstigen Konformation, die die notwendige Entfernung der Hydrathülle der Ionen für den Eintritt in den Selektivitätsfilter energetisch ermöglicht. Aus den mit der NMR-Technik für KcsA-Kv1.3 gewonnenen Daten geht nicht hervor, ob dieser Zustand durch Porphyrin #3 induziert wird oder ob Porphyrin #3 präferentiell an den C-Typ-inaktivierten Zustand bindet. In den elektrophysiologischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt in Bezug auf die C-Typ-Inaktivierung bei vier Vertretern der *Shaker*-Familie untersucht: Kv1.3 zeigte die stärkste C-Typ-Inaktivierung, während die drei anderen Kanäle (Kv1.1, Kv1.2 und Kv1.5) eine nur geringe C-Typ-Inaktivierung zeigten. Nachdem die Kanäle durch verlängerte Depolarisationen in die Inaktivierung getrieben wurden, wurde Porphyrin #3 appliziert und die Stromspuren normalisiert. Bei Kv1.3 zeigte Porphyrin #3 sowohl in Bezug auf die Inaktivierungskinetik, als auch in Bezug auf die Erholung aus der Inaktivierung einen signifikanten Effekt. Die Inaktivierung wurde beschleunigt und war vollständiger, so dass sich schlussfolgern lässt, dass Porphyrin #3 zu einer Verstärkung der C-Typ-Inaktivierung führte. Bei Kv1.5, dem Kanal mit der geringsten Affinität zu Porphyrin #3, ließ sich hingegen nur eine geringe Wirkung in Bezug auf die Inaktivierung feststellen. Bei Kv1.1 wurde die

Inaktivierung nicht wie bei Kv1.3 verstärkt, sondern nach Porphyrinapplikation geblockt und im Fall von Kv1.2 nahezu vollständig aufgehoben. Es hatte den Anschein, als würde Porphyrin #3 an diese Kanäle präferentiell binden, wenn diese durch eine lange Depolarisation in die C-Typ-Inaktivierung getrieben wurden. Nach diesen Beobachtungen lässt sich keine generelle Aussage für spannungsabhängige Kanäle treffen, ob Porphyrin #3 den C-Typ-inaktivierten Zustand verstärkt oder präferentiell an diesen Zustand bindet. Es scheint, in Abhängigkeit des beobachteten Kanals, beides möglich zu sein. Die Stärke der Inhibition hing aber nicht von den Inaktivierungseigenschaften der untersuchten Kanäle ab. Kv1.3 wurde stark von Porphyrin #3 inhibiert und weist eine ausgeprägte C-Typ-Inaktivierung auf. Kv1.1 und Kv1.5 weisen eine geringe C-Typ-Inaktivierung auf, zeigten aber eine deutlich unterschiedliche Affinität zu Porphyrin #3.

4.6 Entwicklung eines Modells für die Interaktion zwischen Porphyrin #3 und spannungsabhängigen Kaliumkanälen

Der Zusammenhang zwischen der eingesetzten Konzentration eines Liganden und der erzielten Wirkung, kann in einer Konzentrations-Wirkungskurve graphisch dargestellt werden. Bei logarithmischer Auftragung der Ligandenkonzentration auf der Abszisse gegen die erzielte Wirkung auf der Ordinate erhält man einen sigmoiden Kurvenverlauf, aus dem die Konzentration, bei der der halbmaximale Effekt (EC_{50}) beobachtet wird, abgelesen werden kann. Zusätzlich erhält man die Konzentrationen, bei der die minimal messbare Wirkung und der maximale Effekt erzielt werden kann, woraus sich die Steilheit der Kurve ergibt. Die Kurve kann mit der Hill-Gleichung beschrieben werden, die für die Steilheit der Kurve den Hill-Koeffizienten ausgibt. Porenblocker, die mit einer Stöchiometrie von 1:1 an die Pore binden, weisen einen Hill-Koeffizienten von 1 auf (z. B. KTX). Die Konzentrations-Wirkungskurve von Hanatoxin wich davon dahingehend ab, dass sie im Bereich der höheren Konzentrationen etwas steiler verlief, wodurch Swartz und MacKinnon (1997) die Bindung von vier *unabhängigen* Bindungsstellen für Hanatoxin postulierten. Die Konzentrations-Wirkungskurve für den Ionenstromblock von Porphyrin #3 verlief bei den untersuchten Kanälen (Kv1.1, Kv1.3 bei RT und 16 °C) insgesamt sehr steil und die ermittelten Hill-Koeffizienten lagen zwischen 4,7 und 5,3, was auf eine kooperative Wirkung von Porphyrin #3 hindeutet. Folglich gilt ein einfacher Porenblock mit einer Stöchiometrie von 1:1 als alleinige Erklärung für die Inhibition des Stromes als ausgeschlossen. Auch die *unabhängige* Bindung mehrerer Porphyrinmoleküle an den Spannungssensor, wie es für

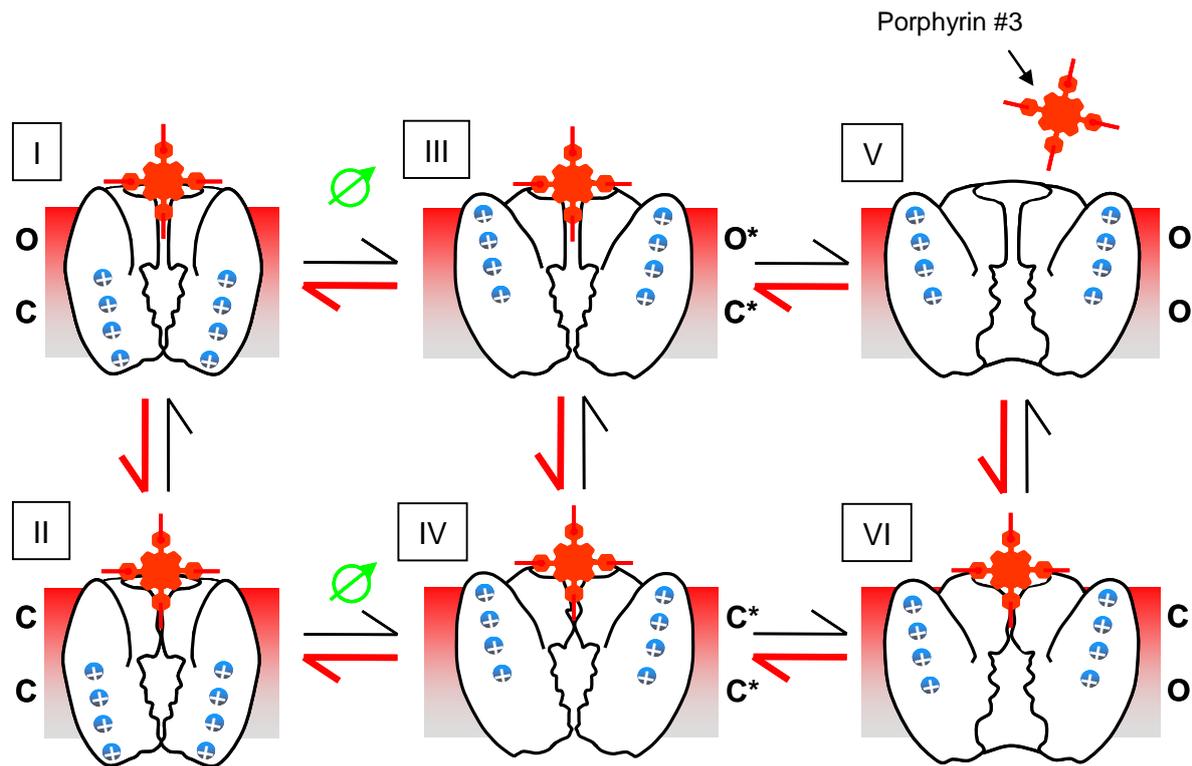


Abb. 4.9: Modell zur Erläuterung des Inhibitionsmechanismus von spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Kv1) durch Porphyrin #3.

Die Zustände, in der sich der Kanal nach Applikation befindet, sind mit I – VI bezeichnet. Die mit Porphyrin #3 angereicherte Membran ist im extrazellulären Bereich rot angefärbt, um die Beeinflussung durch Porphyrin #3 anzudeuten. Zwischen I und III und II und IV ist die Spannungsänderung zu positiven Potentialen durch ein grünes Symbol veranschaulicht. Porphyrin #3 stabilisiert den geschlossen, inaktivierten Kanal, was durch die roten Pfeile angedeutet wird.

I. Der Kanal beim Ruhemembranpotential. Das Aktivierungstor ist geschlossen (C) und das Inaktivierungstor ist geöffnet (O). Porphyrin #3 reichert sich in der Membran an und blockiert die Pore.

II. Der Kanal beim Ruhemembranpotential. Durch Bindung im Selektivitätsfilter nimmt dieser einen Zustand an, der dem des inaktivierten Zustands gleicht: Beide Tore sind geschlossen.

III. Durch Depolarisation kommt es zur Verschiebung der positiven Ladungen innerhalb des Spannungssensors; dieser Vorgang wird durch membranständiges Porphyrin #3 erschwert, was sich in einer Inhibition der Gatingströme zeigt. Das Inaktivierungstor ist offen. * = aktivierter Zustand.

IV. Durch Depolarisation kommt es zur Verschiebung der positiven Ladungen innerhalb des Spannungssensors; dieser Vorgang wird durch membranständiges Porphyrin #3 erschwert, was sich in einer Inhibition der Gatingströme zeigt. Das Inaktivierungstor ist geschlossen. * =aktivierter Zustand.

V. Trotz gebundenen Porphyrins kann der Kanal öffnen und Poren blockierendes Porphyrin #3 verlässt die Bindungsstelle hoher Affinität. Beide Tore sind offen, es fließt Ionenstrom.

VI. Das Aktivierungstor öffnet sich, das Inaktivierungstor bleibt jedoch geschlossen. Es fließt kein Strom.

Die Applikation höherer Konzentrationen ($> 0,2 \mu\text{M}$) hat strukturelle Änderungen der Membran zur Folge, die vergleichbar mit dem temperaturabhängigen Phasenübergang der Membranlipide sind. Dies führt über die Beeinflussung des Spannungssensors zu veränderten *Gating*-Eigenschaften, aus dem eine geringere Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals resultiert. Die geringe Öffnungswahrscheinlichkeit wiederum führt zu einer erhöhten Affinität des Blockers auch bei positiven Potentialen. Möglicherweise wird der Kanal in einen Zustand getrieben, der dem inaktivierten Zustand gleicht. Nach Erreichen dieses Zustandes kann

Porphyrin #3 auch die Bindestelle in der Pore mit hoher Affinität besetzen. Der offene Kanal weist bei starken Depolarisationen eine porphyrinfreie Pore auf und kann K^+ -Ionen leiten. Durch die Beeinträchtigung der Spannungssensorbewegungen sind jedoch stärkere Depolarisationen notwendig, um die Energiebarriere zu überwinden, so dass die Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen verschoben wird. Durch die aromatische Aminosäure Tyrosin wird die Affinität stark erhöht, so dass die Inhibition bei Kv1.1 und Kv1.6 auch bei positiven Potentialen nahezu 100 % beträgt.

Die Beschreibung der Konzentrationsabhängigkeit des Porphyrinblocks mit der Hill-Gleichung (Hill, 1910) erscheint zunächst als annehmbar, da es auf einfache Weise die kooperativen Effekte der Porphyrinbindung gut beschreibt und eine quantitative Abschätzung der Ligandenzahl erlaubt, die im Fall von Porphyrin #3 möglicherweise bei fünf liegt: Ein Porphyrinmolekül bindet in der Porenregion, während vier weitere Moleküle an den Spannungssensor binden und die *Gating*-Eigenschaften des Kanals modulieren. Allerdings ist das Hill-Modell für die Beschreibung auf molekularer Ebene unrealistisch, da es eine „*Alles oder Nichts-Reaktion*“ postuliert: Nach Bindung des ersten Liganden an den Rezeptor ist die Bindungskonstante für alle weiteren Liganden gleich, Zwischenzustände werden nicht besetzt. Um den Inhibitionsmechanismus auf molekularer Ebene beschreiben zu können, wird im Folgenden ein alternatives Modell zur Hill-Beziehung vorgestellt, das die Kooperativität der Bindung von Porphyrin #3 erklärt. Das Symmetrie-Modell nach Monod, Wyman und Changeux (MWC, 1965) beschreibt allosterische Übergänge von Proteinen mit identischen Untereinheiten durch Bindung von Liganden. Als Konsequenz der Bindung eines Liganden an ein Rezeptorprotein wird das Gleichgewicht zwischen zwei verschiedenen Konformationszuständen des Proteins zu dem Zustand verschoben, der eine höhere Affinität für den Liganden aufweist. Das Modell stützt sich auf bestimmte Voraussetzungen, die bei mehreren allosterischen Enzymen und anderen Proteinen, wie auch dem Hämoglobin, beobachtet wurden (Bisswanger, 2000):

1. Ein allosterisches Enzym ist ein, aus einer begrenzten Anzahl n identischer Einheiten (Protomere) gebildetes Oligomer.
2. Protomere besetzen äquivalente Positionen im Enzymmolekül, das damit zumindest eine Symmetrieachse besitzt.
3. Das Enzym kann in mindestens zwei Konformationen existieren, die als T-Zustand (*tense* = gespannt) und R-Zustand (*relaxed* = entspannt) bezeichnet werden und sich in ihrem Energiegehalt unterscheiden. In Abwesenheit des Liganden stehen beide Enzymformen miteinander in einem durch die Konstante L charakteristischen Gleichgewicht:

$$L = \frac{[T]}{[R]} \quad \text{Gleichung 4.1}$$

4. Beim Übergang von der einen in die andere Enzymform bleibt die molekulare Symmetrie erhalten. Alle Untereinheiten existieren zur gleichen Zeit entweder nur im T- oder nur im R-Zustand, Zwischenformen mit Protomeren in verschiedenen Konformationen sind nicht möglich.

5. Beide Enzymformen unterscheiden sich in ihrer Affinität zum Liganden. T ist die weniger affine Form, d. h. das Verhältnis c der Dissoziationskonstanten (K) ist:

$$c = \frac{K_R}{K_T} < 1 \quad \text{Gleichung 4.2}$$

Allosterische Inhibitoren binden bevorzugt an die T-Form eines Enzyms und verschieben daher das Gleichgewicht aller möglichen Konformationen in Richtung T-Form. Da sich Ionenkanäle auch als allosterische Enzyme beschreiben lassen, die den Transport von Ionen katalysieren, kann man den Begriff „Enzym“ in den Voraussetzungen ohne weiteres durch Ionenkanal ersetzen und die Zustandsformen „T“ durch „C“ (*closed* = geschlossen) bzw. „I“ (inaktiviert) und „R“ durch „O“ (offen). Abbildung 4.10 zeigt eine vereinfachte schematische Darstellung der Konformationszustände eines Kaliumkanals und der fraktionellen Absättigung durch Porphyrin #3 nach dem Symmetrie-Modell. Dargestellt sind die vier Untereinheiten des Kanals im geschlossenen Zustand C (Quadrate), im geschlossen-aktivierten Zustand C* (Kreise) und im offenen Zustand (Kreise mit zentrale Öffnung). Der Übergang vom geschlossenen in den geschlossen-aktivierten Zustand ist stark spannungsabhängig, durch zahlreiche, voneinander unabhängige Schritte der Untereinheiten gekennzeichnet und wird durch die Gleichgewichtskonstante $K_m(V)$ beschrieben. Dieser Zustand wird gefolgt von einem spannungsunabhängigen, konzertierten Schritt mit hoher Kooperativität, der durch die Gleichgewichtskonstante L beschrieben wird. Durch Bindung an den Spannungssensor kommt es sowohl zu einer Verschiebung des Gleichgewichts $K(V)$ als auch zu einer Verschiebung des Gleichgewichts L in Richtung geschlossener Kanal. Möglicherweise ist es besonders der inaktivierte Zustand, an den Porphyrin #3 präferentiell bindet (Untereinheiten gelb unterlegt).

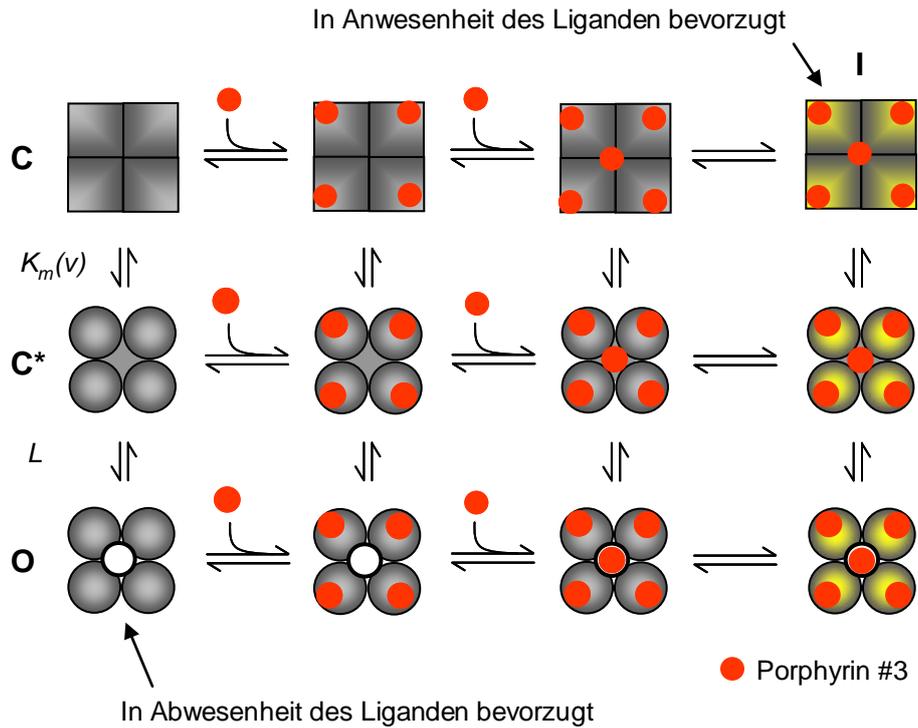
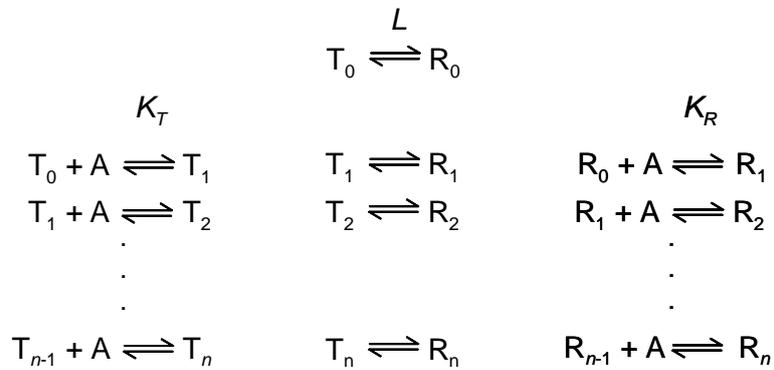


Abbildung 4.10: Vereinfachte schematische Darstellung der Konformationszustände und der fraktionellen Absättigung eines Ionenkanals mit Porphyrin #3 nach dem Symmetrie-Modell (verändert nach Monod, Wyman und Changeux, 1965).

Der tetramere Ionenkanal hat insgesamt fünf Bindungsstellen, die durch Porphyrin #3 besetzt werden können: Eine Bindungsstelle liegt innerhalb des Selektivitätsfilters, die übrigen befinden sich am Spannungssensor bzw. beeinflussen den Spannungssensor über Interaktion mit der Membran. Im Offenzustand des Kanals nimmt die Affinität stark ab und Porphyrin #3 (roter Punkt) gibt die Pore frei. Bei C handelt sich um einen geschlossenen Zustand (Quadrate), bei C* um den geschlossenen-aktivierten Zustand (Kreise), der durch einen koordinierten Schritt in den Offenzustand (O) wechselt (Kreise mit zentraler Öffnung). Möglicherweise bindet Porphyrin präferentiell an den inaktivierten Zustand (I, gelbe Farbe). $K_m(V)$ beschreibt die Gleichgewichtskonstanten der Übergänge vom geschlossenen Zustand in den geschlossenen-aktivierten Zustand und L beschreibt das spannungsunabhängige Gleichgewicht zwischen geschlossenen-aktiviertem und offenem Zustand.

Für die Beschreibung der Konzentrations-Wirkungskurve von Porphyrin #3 mit dem MWC-Modell wird im folgenden der konzertierte Öffnungsschritt betrachtet, da bei der Inhibition des Ionenstroms nur der offene Kanal beobachtet wird. In dem allgemeinen MWC-Modell, in dem die Konformationszustände als T und R bezeichnet werden, ergeben sich für die Bindung des Liganden A folgende Gleichgewichte:



Schema 4.2

Bei K_T und K_R handelt es sich um die mikroskopischen Dissoziationskonstanten für den Zustand hoher Affinität (R) bzw. niedriger Affinität (T) für einzelne Untereinheiten. Die einzelnen Oligomerformen T_1 bis T_n bzw. R_1 bis R_n können durch folgende Konstanten ausgedrückt werden:

$$\begin{array}{ll}
 T_1 = T_0 n \frac{[A]}{K_T} & R_1 = R_0 n \frac{[A]}{K_R} \\
 T_2 = T_1 \frac{n-1}{2} \frac{[A]}{K_T} & R_2 = R_1 \frac{n-1}{2} \frac{[A]}{K_R} \\
 \vdots & \vdots \\
 \vdots & \vdots \\
 T_n = T_{n-1} \frac{1}{n} \frac{[A]}{K_T} & R_n = R_{n-1} \frac{1}{n} \frac{[A]}{K_R}
 \end{array}$$

Die Fraktion des allosterischen Proteins im T-Zustand kann durch die Funktion \bar{T} ausgedrückt werden (Gleichung 4.3):

$$\bar{T} = \frac{T_0 + T_1 + T_2 + \dots + T_n}{(T_0 + T_1 + T_2 + \dots + T_n) + (R_0 + R_1 + R_2 + \dots + R_n)} \quad \text{Gleichung 4.3}$$

Durch Einfügen der Vereinfachungen

$$\frac{[A]}{K_R} = \alpha \quad \frac{K_R}{K_T} = c$$

wobei α die relative Affinität ist und c das Affinitätsverhältnis zwischen den beiden Zuständen erhält man für den T-Zustand die Funktion \bar{T} nach Monod, Wyman und Changeux (1965, Gleichung 4.4):

$$\bar{T} = \frac{L(1+c\alpha)^n}{L(1+c\alpha)^n + (1+\alpha)^n} \quad \text{Gleichung 4.4}$$

Sigmoide Sättigungskurven werden immer dann erhalten, wenn gleichzeitig die drei Bedingungen $L > 1$, $c < 1$ und $n > 1$ erfüllt sind (Bisswanger, 2000). Das Ausmaß der Kooperativität ist umso ausgeprägter, je deutlicher diese Bedingungen erfüllt sind.

Die durch die Porphyrin bedingte Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit bzw. die Zunahme der Geschlossenwahrscheinlichkeit (P_G) für den Kanal lässt sich mit der Gleichung 4.5 nach Monod *et al.* (1965) als Funktion der Porphyrinkonzentration darstellen. In die, die mit der Hill-Funktion ermittelten Koeffizient von fünf eingesetzt wird.

$$P_G = \frac{L \left(1 + \frac{[A]}{K_C} \right)^5}{L \left(1 + \frac{[A]}{K_C} \right)^5 + \left(1 + \frac{[A]}{K_O} \right)^5} \quad \text{Gleichung 4.5}$$

[A] ist die Konzentration des Antagonisten Porphyrin #3, K_C und K_O sind die makroskopischen Gleichgewichtskonstanten für den geschlossenen bzw. geöffneten Kanal und L beschreibt das Gleichgewicht zwischen geschlossenem und offenem Zustand. Durch Umformen erhält man Gleichung 4.6:

$$P_G = \frac{1}{1 + \frac{\left[\left(1 + \frac{[A]}{K_O} \right) \right]^5}{\left[\left(1 + \frac{[A]}{K_C} \right) \right]^5} \cdot L} \quad \text{Gleichung 4.6}$$

[A], K_C , K_O und L sind wie oben beschrieben. Abbildung 4.11 zeigt die Konzentrations-Wirkungskurve, die nach der MWC-Gleichung für Porphyrin #3 und dem Kv1.3-Kanal erstellt wurde.

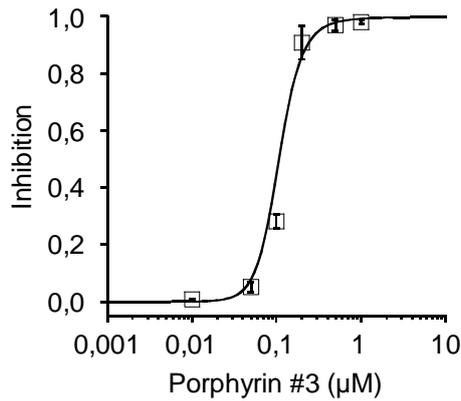


Abb. 4.11: Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition von Kv1.3-Strömen durch Porphyrin #3, $[Rb^+]_a = 20 \text{ mM}$, 16°C .

Aufgetragen ist die Porphyrinkonzentration gegen die Inhibition des Kv1.3-Tailstroms. Die durchgezogene Linie zeigt einen Fit mit der MWC-Gleichung mit $n =$ fünf Bindungsstellen. Für K_C wurde 13 nM eingesetzt, für K_O wurde 290 nM eingesetzt. Der beste Fit wurde mit $L = 1090$ erzielt.

Die apparenten Dissoziationskonstanten K_C und K_O wurden bei der Untersuchung der Inhibitionsstärke zu Beginn und am Ende einer Depolarisation bestimmt und betragen $K_C = 0,013 \text{ μM}$ und $K_O = 0,29 \text{ μM}$. Der beste Fit wurde mit $L = 1090$ erzielt.

Das Symmetrie-Modell nach Monod, Wyman und Changeux (1965) ist bereits mehrfach für die Beschreibung der Inhibition von Ionenkanälen angewendet worden (Karlin, 1967; Colquhoun, 1973; Iwai *et al.*, 1996) und erscheint auch für die Beschreibung der Bindung von Porphyrin #3 an spannungsabhängige Kaliumkanäle als einfaches Modell annehmbar.

4.7 Das Antidot bildet einen Komplex mit Porphyrin #3

Neben dem Tetraphenylporphyrin-Derivat #3 wurden im Labor von Dirk Trauner weitere Porphyrine synthetisiert. Das Tetraphenylporphyrin-Derivat „Antidot“ hat seinen Namen erhalten, weil es wie ein Gegengift der Inhibition von Porphyrin #3 entgegenwirkt. Es besitzt an den Seitenarmen anstelle von positiv geladenen Aminogruppen negativ geladene Karboxylgruppen, die dazu beitragen, dass das Antidot mit dem Porphyrin #3 Komplexe bildet, die aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen in der Kernregion des Moleküls verstärkt werden. In den Experimenten wurde das Antidot beim Auswaschen von Porphyrin #3 zugesetzt, um zu beobachten, ob die Auswaschgeschwindigkeit von Porphyrin #3 beeinflusst wird. Nach der Applikation von $0,4 \text{ μM}$ Porphyrin #3 und der Inhibition des Stroms wurde zum Auswaschen der Kontrolllösung das Antidot in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt, was die Auswaschgeschwindigkeit stark beschleunigte. Die graphische Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit aufgetragen gegen

die Auswaschgeschwindigkeit zeigte eine sigmoiden Kurvenverlauf, der bei 0,4 μM Antidot den maximalen Effekt zeigte. Bei einer eingesetzten Konzentration von 0,4 μM Porphyrin #3 könnte diese Beobachtung einen Hinweis auf die Stöchiometrie von Porphyrin #3 und Antidot liefern, die möglicherweise bei 1:1 liegt. Der Fit der Konzentrationsabhängigkeit mit der Hill-Gleichung passte allerdings mit einem Exponenten von zwei besser mit den Messpunkten überein als der Fit mit einem Exponenten von eins, so dass an dieser Stelle keine endgültige Aussage über die Porphyrin #3:Antidot-Komplexe getroffen werden kann.

4.8 Liefern Porphyrin #3 und Abkömmlinge des Porphyrins Ansätze zur Entwicklung von selektiven Kaliumkanalblockern?

Bei der funktionellen und strukturellen Analyse von Ionenkanälen sind Kanalblocker wertvolle Werkzeuge des Ionenkanalforschers (Bogin, 2006; Ahern und Kobertz, 2008). Die pharmakologischen Experimente, die mit den heute als klassische Kanalblocker bezeichneten Substanzen wie Tetrodotoxin (TTX) oder Tetraethylammonium (TEA^+) in den siebziger Jahren des vorigen Jahrhunderts begonnen wurden, halfen bei der Identifizierung von Ionenkanälen und trugen zur Aufklärung ihrer Topologie bei (Hille, 2001). Die Einteilung der Blocker kann beispielsweise nach ihrer *Herkunft* erfolgen (pflanzlich, tierisch, synthetisch), nach ihrem *chemischen Aufbau* (Metallion, Peptid, Alkaloid), die *Art und Weise* wie sie Kanäle inhibieren (Porenblocker, *Gating*-Modifizierer) oder nach dem *Rezeptorkanal*, den sie blockieren (Ca^{2+} -Kanal, K^+ -Kanal, etc.). Die Selektivität der Kanalblocker kann sehr verschieden sein. Während einige Blocker nur an einen Kanal oder sehr wenige Kanäle binden, weisen andere Blocker eine Vielzahl an Kanälen als Ziel auf. Die Affinität kann dabei von Kanal zu Kanal sehr unterschiedlich sein. Oftmals reicht eine einzelne Aminosäure am Ionenkanal aus, um die Affinität deutlich zu erhöhen oder herabzusetzen. Die Affinität beruht neben einer strukturellen Kompatibilität vor allem auf elektrostatischer Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor. Die quantitative Struktur-Aktivitätsbeziehung (*Quantitative structure-activity relationship* = QSAR) ist ein Vorgang, bei dem chemische Strukturen quantitativ mit einer biologischen oder chemischen Aktivität korreliert werden. Das Verfahren basiert auf der Annahme, dass gleiche oder gleichartige Moleküle die gleiche Aktivität aufweisen. Bei der Entwicklung und Herstellung von selektiven Liganden, die möglicherweise zur therapeutischen Anwendung genutzt werden können, wird QSAR in die Synthesepanungen einbezogen, um chemische Strukturen zu identifizieren, die einen guten inhibitorischen Effekt mit geringen Nebenwirkungen aufweisen. Die Synthese des Kaliumkanalblockers

Tetraphenylporphyrin #3 basierte auf der Beobachtung, dass die vierfachsymmetrische Struktur des Blockers gut mit der ebenfalls vierfachsymmetrischen Topologie der Kaliumkanäle übereinstimmt. Die Vorstellung war, dass sich Porphyrin #3 flach auf die Pore legt und den Kanal über eine Porenblock inhibiert (Gradl *et al.*, 2003). Ader *et al.* (2008) zeigten jedoch in einer NMR-basierten Strukturanalyse mit der Kaliumkanal-Chimäre KcsA-Kv1.3, dass Porphyrin #3 nicht waagrecht auf der Pore liegt, sondern mit einem der Seitenarme tief in den Selektivitätsfilter eindringt, wobei der gegenüberliegende Seitenarm von der Pore weg zeigt und die beiden übrigen Arme zwischen Porenausgang und *Turret*-Region zum Liegen kommen. In den Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass Porphyrin #3 eine unterschiedliche Affinität zu den Mitgliedern der *Shaker*-Familie aufwies und Mitglieder anderer Kaliumkanalfamilien nicht (Kv4.1 und Kv7.1) oder nur zu einem geringen Ausmaß (Kv2.1 und Kv11.1) blockierte. Bei den Kanälen handelte es sich mit Ausnahme von Kv4.1 um kardiale Kanäle, die in der Repolarisationsphase beim Herzaktionspotential eine wichtige Rolle spielen (Nerbonne und Kass, 2005). Von besonderer Bedeutung bei der Entwicklung und Etablierung von Ionenkanalblockern bzw. -öffnern, die zu therapeutischen Zwecken verwendet werden sollen, ist der Kv11.1-Kanal. In der Vergangenheit wurden durch die Anwendung einer Vielzahl unterschiedlicher Medikamente bei Patienten ventrikuläre Arrhythmien durch eine ungewollte Wechselwirkung mit Kv11.1 ausgelöst, die teilweise zum Tode führten (Bowlby *et al.*, 2006). Die amerikanische Arzneimittelzulassungsbehörde (*Food and Drug Administration* = FDA) hat aus diesem Grunde eine Richtlinie erlassen, die vorsieht, dass bei allen Medikamenten in einer frühen Phase der Entwicklung mit elektrophysiologischen Methoden die Wirkung auf Kv11.1 geprüft wird (www.FDA.gov). Während die Wirkung von Porphyrin #3 auf diesen Herzkanal bei der eingesetzten Konzentration nur sehr gering ausfiel, ist eine andere „Nebenwirkung“ des Porphyrins von entscheidender Bedeutung. Es reichert sich in der Membran an, verändert die Integrität der Membran und macht diese durchlässig. Aufgrund dieses unspezifischen Effekts ist davon auszugehen, dass neben den Ionenkanälen auch viele weitere membrandurchspannende Proteine in ihrer Funktionsweise eingeschränkt und auch die Funktionen der Membran selbst beeinträchtigt werden. Das Tetraphenylporphyrin-Derivat #3 eignet sich somit nicht als selektiver Blocker hinsichtlich einer Entwicklung für eine therapeutische Anwendung. Es ist allerdings durchaus denkbar, dass chemische Veränderungen, die z. B. an den Seitenarmen des Moleküls vorgenommen werden können, zu einer Reduzierung der „Nebenwirkungen“ führen. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass der Austausch der endständigen chemischen Gruppen ($\text{NH}_3 \rightarrow \text{COOH}$)

zu einem Molekül führt, das als eine Art Gegengift wirkt und bezeichnender Weise den Namen „Antidot“ trägt. Obgleich Gegengifte vor allem in Hinblick auf Vergiftungen durch giftige Tiere entwickelt werden und auf der Wirkung von Antikörpern basieren, zeigt diese Beobachtung einen Weg auf, wie man irrtümlich eingenommene Wirkstoffe beispielsweise bei Überdosierung oder fälschlicher Einnahme unschädlich machen könnte.

Aus der Entdeckung heraus, dass Porphyrin #3 mit einem der vier möglichen Seitenarme die Pore inhibiert, wurden in dem Labor von Dirk Trauner weitere Kanalblocker (EL1 und EL2) synthetisiert, die auf der Struktur von Porphyrin #3 basieren, aber eine reduzierte Anzahl an putativen Bindungsstellen aufweisen. Sie zeigten in den elektrophysiologischen Experimenten einerseits eine reduzierte Affinität zu den getesteten Kanälen (Kv1.1 und Kv1.3), konnten andererseits aber in höherer Konzentration eingesetzt werden, ohne die Membran zu schädigen und zeigten eine selektive Affinität zu Kv1.1 und Kv1.3. Die beiden Blocker EL1 und EL2 haben eine T-förmige Gestalt und ähneln in der Struktur einer Flanke von Porphyrin #3, sind aber diesbezüglich nicht identisch. In Abbildung 4.12 A und B sind Strukturvergleiche zwischen dem Porphyrin #3-Molekül und dem EL1-Molekül sowie dem EL2-Molekül dargestellt. Ungeachtet der höheren Flexibilität der T-förmigen Blocker im Gegensatz zu Porphyrin #3 zeigen sich bei beiden Molekülen Unterschiede, die möglicherweise zu der beobachteten reduzierten Affinität führten. Bei EL1 sind vor allem eine zusätzlich Karbonylgruppe und ein fehlender Pyrrolring, an dessen Stelle ein Amid tritt, zu nennen. Bei EL2 sind die Seitenketten leicht unterschiedlich und es gibt auch hier eine zusätzliche, hervorstehende Karbonylgruppe.

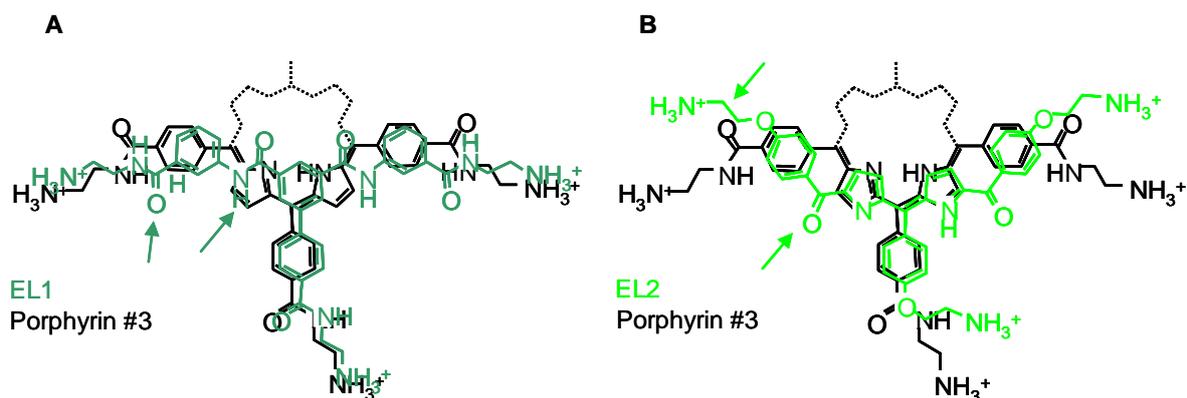


Abb. 4.12: Vergleich der Molekülstruktur von Porphyrin #3 mit EL1 und EL2.

A. Die Strukturformeln von Porphyrin #3 (schwarz) und EL1 (dunkelgrün) wurden leicht versetzt übereinander gelegt. Die putative Bindungsseite zeigt nach unten. Die Pfeile deuten Unterschiede in der Struktur an, die möglicherweise Affinitätsänderungen zur Folge haben. Von Porphyrin #3 ist der vierte Seitenarm nicht dargestellt und der Porphyrinring (gestrichelte Linie) nur angedeutet.

B. Die Strukturformeln von Porphyrin #3 (schwarz) und EL2 (hellgrün) wurden leicht versetzt übereinander gelegt. Die putative Bindungsseite zeigt nach unten. Die Pfeile deuten Unterschiede in der Struktur an, die möglicherweise Affinitätsänderungen zur Folge haben. Von Porphyrin #3 ist der vierte Seitenarm nicht dargestellt und der Porphyrinring (gestrichelte Linie) nur angedeutet.

Der Block beider Substanzen war stark spannungsabhängig. Bei EL2 hatte es den Anschein, dass der Block in einem direkten Zusammenhang mit den Bewegungen des Spannungssensors stand. Das zeigte sich durch einen Vergleich der Inhibition des Ionenstroms mit Q, der spannungsabhängigen Ladungsverschiebung des Sensors im elektrischen Feld.

Möglicherweise lässt sich durch strukturelle Veränderungen der Blocker die Affinität zu dem jeweiligen Kanal erhöhen, so dass die Kanalspezifität, die in den elektrophysiologischen Experimenten beobachtet wurde, noch stärker in den Vordergrund tritt. Neben Kv1.1 und Kv1.3 wurden noch keine weiteren Kaliumkanäle auf die Sensitivität für EL1 und EL2 getestet. Um von selektiven Blockern sprechen zu können, muss dies in weiteren Experimenten nachgeholt werden. Interessant ist die Beobachtung, dass mit der im Vergleich zu Porphyrin #3 reduzierten Affinität von EL1 und EL2, die Empfindlichkeit der Membran gegenüber den Blockern niedriger war. Auch hohe Konzentrationen führten nicht zu einer Zunahme der Leckströme. Anscheinend konnten diese Blocker nicht in die Membran eindringen und führten nicht zu veränderten Membraneigenschaften. Somit gab es vermutlich keine Beeinflussung der Kanal-Lipidkopfgruppen-Interaktion. Der Einfluss von EL1 und EL 2 auf die *Gating*ströme sowie auf die Deaktivierungskinetik wurde bisher allerdings nicht untersucht. Die Experimente mit EL2 zeigten eine geringe Verlangsamung der Aktivierungskinetik. Neben dem reduzierten Einfluss von EL1 und EL2 auf die Membran muss für die geringere Affinität der Blocker vor allem ein reduzierter Porenblock verantwortlich gemacht werden, der auf die strukturelle Verschiedenheit zwischen Porphyrin #3 und den T-förmigen Blockern zurückzuführen ist.

Während sich Porphyrin #3 nach den vorliegenden Ergebnissen aufgrund der starken Nebenwirkungen nicht als therapeutischer Wirkstoff eignet, kann es durchaus als Basis für die Entwicklung selektiver Porenblocker dienen. Die beiden abgeleiteten Blocker EL1 und EL2 sind ein gutes Beispiel für das Potential, das in diesem Blocker steckt. Vielleicht kann durch weitere Modifikationen an EL1 und EL2 die Affinität erhöht werden. Dass es bei der Behandlung von verschiedenen Erkrankungen Bedarf für hoch affine, selektive Porenblocker gibt, wurde in mehreren Übersichtsartikeln der letzten Jahre aufgezeigt (Wickenden, 2002; Judge und Bever, 2006; Lawson und McKay, 2006; Panyi *et al.*, 2006).

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion des vierfach-symmetrischen Kaliumkanalblockers Tetraphenylporphyrin-Derivat #3 (Porphyrin #3, Porphyrin) mit spannungsabhängigen Kaliumkanälen unterschiedlicher Kanalfamilien mit elektrophysiologischen Methoden untersucht. Ergebnisse aus der Strukturanalyse, die mit der NMR-Technik erzielt wurden, und Erkenntnisse aus Fluoreszenzmessungen, die mithilfe der *Bilayer*-Technik gewonnen wurden, flossen vor allem bei der Bewertung der Wechselwirkung von Porphyrin #3 mit den Lipiden der Membran mit ein. Diese wurden von kooperierenden Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt.

Die elektrophysiologischen Experimente, die an *Xenopus*-Oozyten durchgeführt wurden, zeigten, dass die Bindung des Porphyrins mit hoher Kooperativität erfolgte. Dies spiegelte sich in einer steilen Konzentrations-Wirkungskurve wider (Hill-Koeffizienten: 4,7-5,3) und führte zu dem Schluss, dass es sich bei Porphyrin #3 um einen allosterischen Effektor handelt. Die Bindung, die neben einem Porenblock auch die Inhibition des Spannungssensors beinhaltet, erfolgte präferentiell an den geschlossenen Kanal. Die Inhibition des Spannungssensors zeigte sich über die Messung der *Gating*ströme und die Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik und resultierte mutmaßlich aus einer gestörten Kanal-Lipid-Interaktion, die durch eine Anreicherung von Porphyrin #3 in die Membran verursacht wurde. Aufgrund der Spezifität von Porphyrin #3 für die Kv1-Familie wird auch eine direkte Bindung an den Spannungssensor für wahrscheinlich erachtet. Für die Beschreibung des Inhibitionsmechanismus wurde das Symmetrie-Modell nach Monod, Wyman und Changeux (MWC, 1965), das die Wechselwirkung von Liganden mit allosterischen Proteinen beschreibt, verwendet.

Der Block durch Porphyrin war spannungsabhängig und bei negativen Testpotentialen stärker ausgebildet. Dies hatte eine Verschiebung der Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen zur Folge. Die Ursache dafür wird vor allem in der Bindung innerhalb des elektrischen Feldes gesehen, in das einer der positiv geladenen Seitenarme des Porphyrinmoleküls eindringen muss, um die Bindungsstelle im Selektivitätsfilter zu erreichen (Ader *et al.*, 2008). Für *Shaker*-Kanäle zeigte sich, dass eine Aminosäureposition, die sich unweit des Selektivitätsfilters am Porenausgang befindet, die Affinität durch Porphyrin #3 stark beeinflusste: Der Austausch der positiv geladenen Aminosäure Arginin zu der aromatischen Aminosäure Tyrosin führte bei Kv1.5 zu einer Erhöhung der Affinität. Porphyrin #3 hatte auf den Kv2.1- und Kv11.1-Kanal einen geringen inhibitorischen Effekt, auf den Kv7.1- und

Kv11.1-Kanal keinen inhibitorischen Effekt. *Inside-out*- und *Outside-out*-Messungen mit Kv1.3 zeigten, dass Porphyrin #3 den Kanal ausschließlich von außen blockierte. Die Bindung in der Pore wurde nicht, wie z.B. für Kaliotoxin beschrieben (Legros *et al.*, 2000), durch eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration beeinflusst. Auch der Aminosäureaustausch in einer extrazellulären Porenregion (*Turret*) von einer sterisch kleinen (Glyzin) zu einer sterisch großen Aminosäure (Phenylalanin) hatte im Gegensatz zu Experimenten mit dem Porenblocker Kaliotoxin keinen Einfluss auf die Bindung.

Das Tetraphenylporphyrin-Derivat Antidot weist eine große strukturelle Ähnlichkeit zu Porphyrin #3 auf, besitzt aber negativ geladene Seitenarme und zeigt keine inhibitorischen Eigenschaften. Es bildete Komplexe mit Porphyrin #3 und beschleunigte dadurch in den Experimenten die Auswaschgeschwindigkeit konzentrationsabhängig, wenn es der Kontrolllösung zugesetzt wurde.

Die Porphyrin-Abkömmlinge EL1 und EL2 besitzen T-förmige Gestalt und wurden durch Übertragung einer Seitenkette von Porphyrin #3 auf zwei verschiedene Kohlenstoffketten, die einer Flanke des Porphyrinringes ähneln, hergestellt. Sie zeigten eine selektive Wirkung auf den Kv1.1- und den Kv1.3-Kanal mit geringer Affinität als Porphyrin #3.

Die Verwendung der in dieser Arbeit eingesetzten Kanalblocker als strukturelle Grundlage für die Herstellung selektiver Kanalblocker wird für Porphyrin #3 aufgrund der starken „Nebenwirkungen“ als negativ eingeschätzt, für EL1 und EL2 als positiv.

6 Literaturverzeichnis

1. ADER, C., SCHNEIDER, R., HORNIG, S. et al. (2008) A structural link between inactivation and block of a K⁺ channel, *Nat Struct Mol Biol*, 15, 605-12.
2. AHERN, C. A. & KOBERTZ, W. R. (2009) Chemical tools for K(+) channel biology, *Biochemistry*, 48, 517-26.
3. ALABI, A. A., BAHAMONDE, M. I., JUNG, H. J., KIM, J. I. & SWARTZ, K. J. (2007) Portability of paddle motif function and pharmacology in voltage sensors, *Nature*, 450, 370-5.
4. ANDERSON, C. S., MACKINNON, R., SMITH, C. & MILLER, C. (1988) Charybdotoxin block of single Ca²⁺-activated K⁺ channels. Effects of channel gating, voltage, and ionic strength, *J Gen Physiol*, 91, 317-33.
5. AZAM, P., SANKARANARAYANAN, A., HOMERICK, D., GRIFFEY, S. & WULFF, H. (2007) Targeting effector memory T cells with the small molecule Kv1.3 blocker PAP-1 suppresses allergic contact dermatitis, *J Invest Dermatol*, 127, 1419-29.
6. BAUKROWITZ, T. & YELLEN, G. (1995) Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: a tale of two inactivation mechanisms, *Neuron*, 15, 951-60.
7. BEZANILLA, F. (2002) Voltage sensor movements, *J Gen Physiol*, 120, 465-73.
8. BISSWANGER, H. (2000). Enzymkinetik, Theorie und Methoden. *Wiley-VCH, Weinheim*, 3. Auflage.
9. BOGIN, O. (2006). Venom toxins as ion channels research tools. *Modulator*, 21. www.alomone.com
10. BOLAND, L. M. & DRZEWIECKI, M. M. (2008) Polyunsaturated fatty acid modulation of voltage-gated ion channels, *Cell Biochem Biophys*, 52, 59-84.
11. BÖRJESSON, S. I. & ELINDER, F. (2008) Structure, function, and modification of the voltage sensor in voltage-gated ion channels, *Cell Biochem Biophys*, 52, 149-74.
12. BÖRJESSON, S. I., HAMMARSTROM, S. & ELINDER, F. (2008) Lipoelectric modification of ion channel voltage gating by polyunsaturated fatty acids, *Biophys J*, 95, 2242-53.
13. BOWLBY, M. R., PERI, R., ZHANG, H. & DUNLOP, J. (2008) hERG (KCNH2 or Kv11.1) K⁺ channels: screening for cardiac arrhythmia risk, *Curr Drug Metab*, 9, 965-70.
14. BROOMAND, A. & ELINDER, F. (2008) Large-scale movement within the voltage-sensor paddle of a potassium channel-support for a helical-screw motion, *Neuron*, 59, 770-7.
15. CATTERALL, W. A., SCHMIDT, J. W., MESSNER, D. J. & FELLER, D. J. (1986) Structure and biosynthesis of neuronal sodium channels, *Ann N Y Acad Sci*, 479, 186-203.
16. CHANDA, B., ASAMOAH, O. K., BLUNCK, R., ROUX, B. & BEZANILLA, F. (2005) Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement, *Nature*, 436, 852-6.
17. CHANDY, K. G., WULFF, H., BEETON, C. et al. (2004) K⁺ channels as targets for specific immunomodulation, *Trends Pharmacol Sci*, 25, 280-9.
18. CHANGEUX, J. P., KASAI, M. & LEE, C. Y. (1970) Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 67, 1241-7.
19. CHOI, K. L., ALDRICH, R. W. & YELLEN, G. (1991) Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 5092-5.
20. COETZEE, W. A., AMARILLO, Y., CHIU, J. et al. (1999) Molecular diversity of K⁺ channels, *Ann N Y Acad Sci*, 868, 233-85.
21. COLQUHOUN, D. (1973) The relation between classical and cooperative models for drug action. In: drug receptors. Rang, H.P. (ed.). London: Macmillan

22. DAVIES, N. W., MCKILLEN, H. C., STANFIELD, P. R. & STANDEN, N. B. (1996) A rate theory model for Mg²⁺ block of ATP-dependent potassium channels of rat skeletal muscle, *J Physiol*, 490 (Pt 3), 817-26.
23. DOYLE, D. A., MORAIS CABRAL, J., PFUETZNER, R. A. et al. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity, *Science*, 280, 69-77.
24. DURELL, S. R. & GUY, H. R. (1992) Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels, *Biophys J*, 62, 238-47; discussion 247-50.
25. DURELL, S. R., SHRIVASTAVA, I. H. & GUY, H. R. (2004) Models of the structure and voltage-gating mechanism of the shaker K⁺ channel, *Biophys J*, 87, 2116-30.
26. ELINDER, F. & ÅRHEM, P. (2004) Metal ion effects on ion channel gating, *Q Rev Biophys*, 36, 373-427.
27. ELINDER, F., MADEJA, M. & ÅRHEM, P. (1996) Surface Charges of K channels. Effects of strontium on five cloned channels expressed in *Xenopus* oocytes, *J Gen Physiol*, 108, 325-32.
28. ESCOUBAS, P. (2006) Molecular diversification in spider venoms: a web of combinatorial peptide libraries, *Mol Divers*, 10, 545-54.
29. ESCOUBAS, P., SOLLOD, B. & KING, G. F. (2006) Venom landscapes: mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach, *Toxicon*, 47, 650-63.
30. ESTRADA, G., VILLEGAS, E. & CORZO, G. (2007) Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs, *Nat Prod Rep*, 24, 145-61.
31. FERRER, T., RUPP, J., PIPER, D. R. & TRISTANI-FIROUZI, M. (2006) The S4-S5 linker directly couples voltage sensor movement to the activation gate in the human ether-a'-go-go-related gene (hERG) K⁺ channel, *J Biol Chem*, 281, 12858-64.
32. GARCIA, E., SCANLON, M. & NARANJO, D. (1999) A marine snail neurotoxin shares with scorpion toxins a convergent mechanism of blockade on the pore of voltage-gated K channels, *J Gen Physiol*, 114, 141-57.
33. GARCIA, M. L., GARCIA-CALVO, M., HIDALGO, P., LEE, A. & MACKINNON, R. (1994) Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom, *Biochemistry*, 33, 6834-9.
34. GILQUIN, B., BRAUD, S., ERIKSSON, M. A. et al. (2005) A variable residue in the pore of Kv1 channels is critical for the high affinity of blockers from sea anemones and scorpions, *J Biol Chem*, 280, 27093-102.
35. GOLDIN, A. L. & SUMIKAWA, K. (1992) Preparation of RNA for injection into *Xenopus* oocytes, *Methods Enzymol*, 207, 279-97.
36. GOLDSTEIN, S. A. & MILLER, C. (1993) Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K⁺ channel, *Biophys J*, 65, 1613-9.
37. GRADL, S. N., FELIX, J. P., ISACOFF, E. Y., GARCIA, M. L. & TRAUNER, D. (2003) Protein surface recognition by rational design: nanomolar ligands for potassium channels, *J Am Chem Soc*, 125, 12668-9.
38. GREEN, W. N. & ANDERSEN, O. S. (1991) Surface charges and ion channel function, *Annu Rev Physiol*, 53, 341-59.
39. GRISSMER, S., NGUYEN, A. N., AIYAR, J. et al. (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines, *Mol Pharmacol*, 45, 1227-34.
40. HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. & SIGWORTH, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflugers Arch*, 391, 85-100.

41. HEMSLEY, A., ARNHEIM, N., TONEY, M. D., CORTOPASSI, G. & GALAS, D. J. (1989) A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction, *Nucleic Acids Res*, 17, 6545-51.
42. HIGUCHI, R., KRUMMEL, B. & SAIKI, R. K. (1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions, *Nucleic Acids Res*, 16, 7351-67.
43. HILL, A. V. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. In: *The journal of physiology* (London) Band 40
44. HILLE, B. (2001). Ion Channels of Excitable Membranes. *Sutherland, Massachusetts: Sinauer Associates*, 3rd. Edition
45. HORTON, H. R., MORAN, L. A., SCRIMGEOUR K. G., PERRY M. D., RAWN J. D. (2008). Biochemie. *Pearson Studium*, 4. aktualisierte Auflage.
46. HOSHI, T., ZAGOTTA, W. N. & ALDRICH, R. W. (1991) Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region, *Neuron*, 7, 547-56.
47. HOSHI, T., ZAGOTTA, W. N. & ALDRICH, R. W. (1994) Shaker potassium channel gating. I: Transitions near the open state, *J Gen Physiol*, 103, 249-78.
48. INAGAKI, N., GONOI, T., CLEMENT, J. P. T. et al. (1995) Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor, *Science*, 270, 1166-70.
49. IWAI, T., KIHARA, H., IMAIAND, K. & UCHIDA, M. (1996) Dose-response curve for anaesthetics based on the Monod-Wyman-Changeux model, *Br J Anaesth*, 77, 517-21.
50. JIANG, Y., LEE, A., CHEN, J. et al. (2003a) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel, *Nature*, 423, 33-41.
51. JIANG, Y. & MACKINNON, R. (2000) The barium site in a potassium channel by x-ray crystallography, *J Gen Physiol*, 115, 269-72.
52. JIANG, Y., RUTA, V., CHEN, J., LEE, A. & MACKINNON, R. (2003b) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel, *Nature*, 423, 42-8.
53. JUDGE, S. I. & BEVER, C. T., JR. (2006) Potassium channel blockers in multiple sclerosis: neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment, *Pharmacol Ther*, 111, 224-59.
54. KARLIN, A. (1967) On the application of "a plausible model" of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine, *J Theor Biol*, 16, 306-20.
55. KOO, G. C., BLAKE, J. T., TALENTO, A. et al. (1997) Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo, *J Immunol*, 158, 5120-8.
56. KOSCHAK, A., BUGIANESI, R. M., MITTERDORFER, J. et al. (1998). Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by hongotoxin-1, a novel peptide from *Centruroides limbatus* venom. *J Biol Chem*, 273(5), 2639-44.
57. LANGE, A., GILLER, K., HORNIG, S. et al. (2006) Toxin-induced conformational changes in a potassium channel revealed by solid-state NMR, *Nature*, 440, 959-62.
58. LANGMUIR, I. (1916). The constitution and fundamental properties of solids and liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 38, 2221-95 1916
59. LAWSON, K. & MCKAY, N. G. (2006) Modulation of potassium channels as a therapeutic approach, *Curr Pharm Des*, 12, 459-70.
60. LEE, H. C., WANG, J. M. & SWARTZ, K. J. (2003) Interaction between extracellular Hanatoxin and the resting conformation of the voltage-sensor paddle in Kv channels, *Neuron*, 40, 527-36.
61. LEGROS, C., POLLMANN, V., KNAUS, H. G. et al. (2000) Generating a high affinity scorpion toxin receptor in KcsA-Kv1.3 chimeric potassium channels, *J Biol Chem*, 275, 16918-24.

62. LENAËUS, M. J., VAMVOUKA, M., FOCIA, P. J. & GROSS, A. (2005) Structural basis of TEA blockade in a model potassium channel, *Nat Struct Mol Biol*, 12, 454-9.
63. LEWIS, R. J. & GARCIA, M. L. (2003) Therapeutic potential of venom peptides, *Nat Rev Drug Discov*, 2, 790-802.
64. LIMAN, E. R., TYTGAT, J. & HESS, P. (1992) Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs, *Neuron*, 9, 861-71.
65. LONG, S. B., CAMPBELL, E. B. & MACKINNON, R. (2005a) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel, *Science*, 309, 897-903.
66. LONG, S. B., CAMPBELL, E. B. & MACKINNON, R. (2005b) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling, *Science*, 309, 903-8.
67. LONG, S. B., TAO, X., CAMPBELL, E. B. & MACKINNON, R. (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment, *Nature*, 450, 376-82.
68. LOPEZ-BARNEO, J., HOSHI, T., HEINEMANN, S. H. & ALDRICH, R. W. (1993) Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels, *Receptors Channels*, 1, 61-71.
69. MACKINNON, R. (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel, *Nature*, 350, 232-5.
70. MACKINNON, R. & MILLER, C. (1988) Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel, *J Gen Physiol*, 91, 335-49.
71. MACKINNON, R. & YELLEN, G. (1990) Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels, *Science*, 250, 276-9.
72. MAGUY, A., HEBERT, T. E. & NATTEL, S. (2006) Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function, *Cardiovasc Res*, 69, 798-807.
73. MARIUS, P., ALVIS, S. J., EAST, J. M. & LEE, A. G. (2005) The interfacial lipid binding site on the potassium channel KcsA is specific for anionic phospholipids, *Biophys J*, 89, 4081-9.
74. MCKINNEY, J. D., RICHARD, A., WALLER, C. ET AL. (2000) The practice of structure activity relationship (SAR) in toxicology, *Toxicolog. Res*, 56, 8-17
75. MEBS, D. (2000). Gifttiere: Ein Handbuch für Biologen, Toxikologen, Ärzte und Apotheker. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, GmbH. 2. Auflage.
76. MILEDI, R., PARKER, I. & SUMIKAWA, K. (1982) Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in *Xenopus* oocytes, *Embo J*, 1, 1307-12.
77. MILESCU, M., VOBECKY, J., ROH, S. H. et al. (2007) Tarantula toxins interact with voltage sensors within lipid membranes, *J Gen Physiol*, 130, 497-511.
78. MONOD, J., WYMAN, J. & CHANGEUX, J. P. (1965) On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model, *J Mol Biol*, 12, 88-118.
79. MORAIS-CABRAL, J. H., ZHOU, Y. & MACKINNON, R. (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter, *Nature*, 414, 37-42.
80. MOUHAT, S., JOUIROU, B., MOSBAH, A., DE WAARD, M. & SABATIER, J. M. (2004) Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels, *Biochem J*, 378, 717-26.
81. MURATA, Y., IWASAKI, H., SASAKI, M., INABA, K. & OKAMURA, Y. (2005) Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor, *Nature*, 435, 1239-43.
82. NERBONNE, J. M. & KASS, R. S. (2005) Molecular physiology of cardiac repolarization, *Physiol Rev*, 85, 1205-53.
83. NEYTON, J. & MILLER, C. (1988) Discrete Ba²⁺ block as a probe of ion occupancy and pore structure in the high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, *J Gen Physiol*, 92, 569-86.

84. ONDETTI, M. A., RUBIN, B. & CUSHMAN, D. W. (1977) Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents, *Science*, 196, 441-4.
85. PANYI, G. & DEUTSCH, C. (2006) Cross talk between activation and slow inactivation gates of Shaker potassium channels, *J Gen Physiol*, 128, 547-59.
86. PANYI, G., POSSANI, L. D., RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C., GASPAR, R. & VARGA, Z. (2006) K⁺ channel blockers: novel tools to inhibit T cell activation leading to specific immunosuppression, *Curr Pharm Des*, 12, 2199-220.
87. PARDO, L. A., HEINEMANN, S. H., TERLAU, H. et al. (1992) Extracellular K⁺ specifically modulates a rat brain K⁺ channel, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 2466-70.
88. PENNINGTON, M. W., BEETON, C., GALEA, C. A. et al. (2009) Engineering a stable and selective peptide blocker of the Kv1.3 channel in T lymphocytes, *Mol Pharmacol*, 75, 762-73.
89. PHILLIPS, L. R., MILESCU, M., LI-SMERIN, Y. et al. (2005) Voltage-sensor activation with a tarantula toxin as cargo, *Nature*, 436, 857-60.
90. PLATNICK, N. I. (2008) The World Spider Catalog, Version 9.5; <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/>
91. POPOT, J. L. & ENGELMAN, D. M. (2000) Helical membrane protein folding, stability, and evolution, *Annu Rev Biochem*, 69, 881-922.
92. POSOKHOV, Y. O., GOTTLIEB, P. A., MORALES, M. J., SACHS, F. & LADOKHIN, A. S. (2007) Is lipid bilayer binding a common property of inhibitor cysteine knot ion-channel blockers?, *Biophys J*, 93, L20-2.
93. RAMSEY, I. S., MORAN, M. M., CHONG, J. A. & CLAPHAM, D. E. (2006) A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain, *Nature*, 440, 1213-6.
94. RAMU, Y., XU, Y. & LU, Z. (2006) Enzymatic activation of voltage-gated potassium channels, *Nature*, 442, 696-9.
95. RANGANATHAN, R., LEWIS, J. H. & MACKINNON, R. (1996) Spatial localization of the K⁺ channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis, *Neuron*, 16, 131-9.
96. RUSSEL, D. W. und SAMBROOK, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*; 3rd edition (January 15, 2001)
97. REHM, H. & LAZDUNSKI, M. (1988) Purification and subunit structure of a putative K⁺-channel protein identified by its binding properties for dendrotoxin I, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 4919-23.
98. SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
99. SASAKI, M., TAKAGI, M. & OKAMURA, Y. (2006) A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel, *Science*, 312, 589-92.
100. SCHMIDT, D., JIANG, Q. X. & MACKINNON, R. (2006) Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors, *Nature*, 444, 775-9.
101. SCHMIDT, D. & MACKINNON, R. (2008) Voltage-dependent K⁺ channel gating and voltage sensor toxin sensitivity depend on the mechanical state of the lipid membrane, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 19276-81.
102. SRINIVASAN, K. N., SIVARAJA, V., HUYS, I. et al. (2002) kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity, *J Biol Chem*, 277, 30040-7.
103. STAHEL, W. A. (2000) Statistische Datenanalyse. Eine Einführung für Naturwissenschaftler. *Vieweg Friedrich. und Sohn Verlag*; 2. Auflage.
104. STARACE, D. M. & BEZANILLA, F. (2004) A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field, *Nature*, 427, 548-53.

105. STÜHMER, W., RUPPERSBERG, J. P., SCHRÖTER, K. H. et al. (1989). Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *Embo J*, 8(11), 3235-44.
106. STÜHMER, W. (1992) Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes, *Methods Enzymol*, 207, 319-39.
107. SUCHYNA, T. M., TAPE, S. E., KOEPPE, R. E., 2ND et al. (2004) Bilayer-dependent inhibition of mechanosensitive channels by neuroactive peptide enantiomers, *Nature*, 430, 235-40.
108. SUH, B. C. & HILLE, B. (2008) PIP₂ is a necessary cofactor for ion channel function: how and why?, *Annu Rev Biophys*, 37, 175-95.
109. SWARTZ, K. J. (2007) Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels, *Toxicon*, 49, 213-30.
110. SWARTZ, K. J. (2008) Sensing voltage across lipid membranes, *Nature*, 456, 891-7.
111. SWARTZ, K. J. & MACKINNON, R. (1995). An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean Tarantula, *Neuron*, 15(4), 941-9.
112. SWARTZ, K. J. & MACKINNON, R. (1997) Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites, *Neuron*, 18, 665-73.
113. TAO, X. & MACKINNON, R. (2008) Functional analysis of Kv1.2 and paddle chimera Kv channels in planar lipid bilayers, *J Mol Biol*, 382, 24-33.
114. TERLAU, H., BOCCACCIO, A., OLIVERA, B. M. & CONTI, F. (1999) The block of Shaker K⁺ channels by kappa-conotoxin PVIIA is state dependent, *J Gen Physiol*, 114, 125-40.
115. TIKHONOV, D. B. & MAGAZANIK, L. G. (1998) Voltage dependence of open channel blockade: onset and offset rates, *J Membr Biol*, 161, 1-8.
116. TILLMAN, T. S. & CASCIO, M. (2003) Effects of membrane lipids on ion channel structure and function, *Cell Biochem Biophys*, 38, 161-90.
117. TOMBOLA, F., PATHAK, M. M. & ISACOFF, E. Y. (2006) How does voltage open an ion channel?, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 23-52.
118. Triggle, D. J., Gopalakrishnan, M., Rampe, D., Zheng, W. (2006) Voltage-gated ion channels as drug targets, *Wiley-VCH*, Vol. 29.
119. VALIYAVEETIL, F. I., ZHOU, Y. & MACKINNON, R. (2002) Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K⁺ channel, *Biochemistry*, 41, 10771-7.
120. WICKENDEN, A. D. (2002) Potassium channels as anti-epileptic drug targets, *Neuropharmacology*, 43, 1055-60.
121. WILLIAMSON, I. M., ALVIS, S. J., EAST, J. M. & LEE, A. G. (2003) The potassium channel KcsA and its interaction with the lipid bilayer, *Cell Mol Life Sci*, 60, 1581-90.
122. WOODHULL, A. M. (1973) Ionic blockage of sodium channels in nerve, *J Gen Physiol*, 61, 687-708.
123. XU, Y., RAMU, Y. & LU, Z. (2008) Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K⁺ channels, *Nature*, 451, 826-9.
124. YAROV-YAROVY, V., BAKER, D. & CATTERALL, W. A. (2006) Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K⁺ channels, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7292-7.
125. Yifrach, O. & MacKinnon, R. (2002) Energetics of pore opening in a voltage-gated K⁺ channel, *Cell*, 111, 231-39.
126. ZACHARIAE, U., SCHNEIDER, R., VELISSETY, P. et al. (2008) The molecular mechanism of toxin-induced conformational changes in a potassium channel: relation to C-type inactivation, *Structure*, 16, 747-54.
127. ZAGOTTA, W. N., HOSHI, T. & ALDRICH, R. W. (1994) Shaker potassium channel gating. III. Evaluation of kinetic models for activation. *J Gen Physiol*, 103 (2), 321-62.

128. ZHANG, S., KEHL, S. J. & FEDIDA, D. (2001a) Modulation of Kv1.5 potassium channel gating by extracellular zinc, *Biophys J*, 81, 125-36.
129. ZHANG, S., KWAN, D. C., FEDIDA, D. & KEHL, S. J. (2001b) External K(+) relieves the block but not the gating shift caused by Zn(2+) in human Kv1.5 potassium channels, *J Physiol*, 532, 349-58.

7 Anhang

7.1 Fachliche Abkürzungen

4-AP	4-Aminopyridin
Å	Ångström
A ₀	relative Amplitude
A ₁	Stromamplitude
Abb.	Abbildung
AD/DA	analog-digital/ digital-analog
app	apparent
ATX	Agitoxin
ATX2	Agitoxin 2
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B</i>	<i>Blocked</i>
Ba ²⁺	Bariumionen
Bad-El.	Badelektrode
C	<i>closed</i> , geschlossen
c	Gleichgewichtszustand K_R/K_T bzw. K_C/K_O
Ca ²⁺	Kalziumionen
CaCl ₂	Kalziumchlorid
Ci-VSP	spannungsabhängige Phosphatase aus <i>Ciona intestinalis</i>
cRNA	<i>copy</i> Ribonukleinsäure
Cs ⁺	Cäsiumionen
C-Terminus	Karboxyl-Terminus
CTX	Charybdotoxin
3,4-DAP	3,4-Diaminopyridin
δ	elektrische Distanz
Da	Dalton
Δδ	Änderung der chemischen Verschiebung
Depol	Depolarisation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMPC	1,2-Dimyristoyl-glycero-3-phosphatidylcholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dV, ΔV	Spannungsdifferenz
dt	Zeitdifferenz
E	Umkehrpotential
EAE	experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EL1	Kaliumkanalblocker synthetisiert von <u>Erica Lauterwasser</u> 1
EL2	Kaliumkanalblocker synthetisiert von <u>Erica Lauterwasser</u> 2
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
exp	Exponent
F	Faraday-Konstante
γ	Einzelkanalleitfähigkeit
G	Leitfähigkeit
Gd ³⁺	Gadoliniumionen
G/Gmax	relative Leitfähigkeit
°C	Grad Celcius

G _{max}	maximale Leitfähigkeit
GV	Leitfähigkeits-Spannung-Beziehung
h	human/Stunde(n)
HaTX	Hanatoxin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan-sulfonsäure
Herg	humaner ether-r-gogo-verwandter Kanal
HgTX	Hongotoxin
H _v	Protonenkanal
Hyperpol	Hyperpolarisation
Hz	Herz
I	Strom
I _i	Ionenstrom
¹²⁵ I-KTX	Jod-125 markiertes Kaliotoxin
I _L	Leckstrom
I _M	Membranstrom
IV	Strom-Spannungs-Beziehung
I _{max}	maximaler Strom
<i>IR</i>	<i>Inactivation removed</i>
[K ⁺] _a	äußere Kaliumkonzentration
k ₊₁	Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion
k ₋₁	Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion
K _C	Dissoziationskonstante für den geschlossenen Kanal
KCl	Kaliumchlorid
KcsA	Kaliumkanal aus <i>Streptomyces lividans</i>
K _D	Gleichgewichtskonstante
K _D (0)	Gleichgewichtskonstante bei 0 mV
kHz	Kiloherz
<i>Km</i> (V)	Gleichgewichtskonstanten der spannungsabhängigen Konformationsänderungen des geschlossenen Kanals
K _O	Dissoziationskonstante für den geöffneten Kanal
KTX	Kaliotoxin
K _v	spannungsabhängige Kaliumkanäle
K _{v1}	<i>Shaker</i> -verwandte Kaliumkanäle
K _{v2}	<i>Shab</i> -verwandte Kaliumkanäle
K _{v4}	<i>Shal</i> -verwandte Kaliumkanäle
K _{v7}	K _v LQT-verwandte Kaliumkanäle
K _{v11}	<i>Herg</i> -verwandte Kanäle
K _v AP	spannungsabhängiger Kaliumkanal aus <i>Aeropyrum pernix</i>
<i>L</i>	Gleichgewichtskonstante für die konzertierte Umwandlung von R und T-Konformation
L	Ligand
[L]	Ligandenkonzentration
La ³⁺	Lanthanionen
Li ⁺	Lithiumionen
m	Maus
<i>MCS</i>	<i>Multiple Cloning Site</i>
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μS	Mikrosekunde
mg	Milligramm
mL	Milliliter

Mg ²⁺	Magnesium
mM	millimolar
ms	Millisekunden
MS	Multiple Sklerose
mV	Millivolt
n, <i>n</i>	Anzahl
N	Anzahl der Kanäle
NaCl	Natriumchlorid
Ni ²⁺	Nickelionen
nM	nanomolar
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOESY	<i>Nuclear Oberhauser Effect Spectroscopy</i>
norm	normiert
N-Terminus	Amino-Terminus
O	<i>open</i> , offen
OP-Vers.	Operationsverstärker
OR2	Oozyten Ringer Lösung 2
<i>p</i>	<i>probability</i> , Irrtumswahrscheinlichkeit
PAP-1	5-(4-phenoxybutoxy)psoralen
Pb ²⁺	Bleiionen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Porendomäne
PH	Porenhelix
pM	picomolar
P _o	Offenwahrscheinlichkeit
Poly A	Polyadenylierungsstelle
ppm	<i>parts per million</i>
%	Prozent
Q	Ladung
Q _{max}	normierte Ladungs-Spannungs-Beziehung
QV	Ladungs-Spannungs-Beziehung
R	Gaskonstante, Rezeptor, Widerstand, R-Konformation
[R]	Rezeptorkonzentration
r	Ratte
RbCl	Rubidiumchlorid
Ref.-El.	Referenzelektrode
R:L	Rezeptor-Ligand-Komplex
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S1-S6	Transmembransegmente 1-6
S1-S4	Kaliumbindungsstellen 1-4
<i>s.e.m.</i>	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
SF	Selektivitätsfilter
Sr ²⁺	Strontium
SMase C,D	Sphingomyelinase C, D
SSD	Spannungssensordomäne
<i>T</i>	<i>Turret</i>
T	Temperatur (Kelvin), T-Konformation
t	Zeit
Tab.	Tabelle
τ	tau, Zeitkonstante

[T]	Toxinkonzentration
TBA ⁺	Tetrabutylammonium
TEA ⁺	Tetraethylammonium
U ^(C)	<i>Unblock Probability</i> für geschlossene (<i>closed</i>) Kanäle
U ^(O)	<i>Unblock Probability</i> für offene Kanäle
V	Spannung
V ₀	Spannung bei 0 mV
V _{1/2}	Spannung der halbmaximalen Aktivierung
V _C	Voltage clamp
V _M	Membranspannung
Vers. 1	Verstärker 1
Vers. 2	Verstärker 2
VsTX1	<i>Voltage sensing toxin 1</i>
Wt	Wildtyp
Y	Anteil des gebundenen Liganden
Y _{max}	maximale Ligandenbindung
Zn ²⁺	Zink
z-Wert	Ladungswert

7.2 Aminosäureliste

Liste der proteinogenen Aminosäuren mit Ein-Buchstaben-Code und Drei-Buchstaben-Code.

Aminosäure	Ein-Buchstaben-Code	Drei-Buchstaben-Code
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asp
Asparaginsäure	D	Asn
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glyzin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleuzin	I	Ile
Leuzin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

7.3 EC₅₀-Werte von Blockern der Kv1-Familie

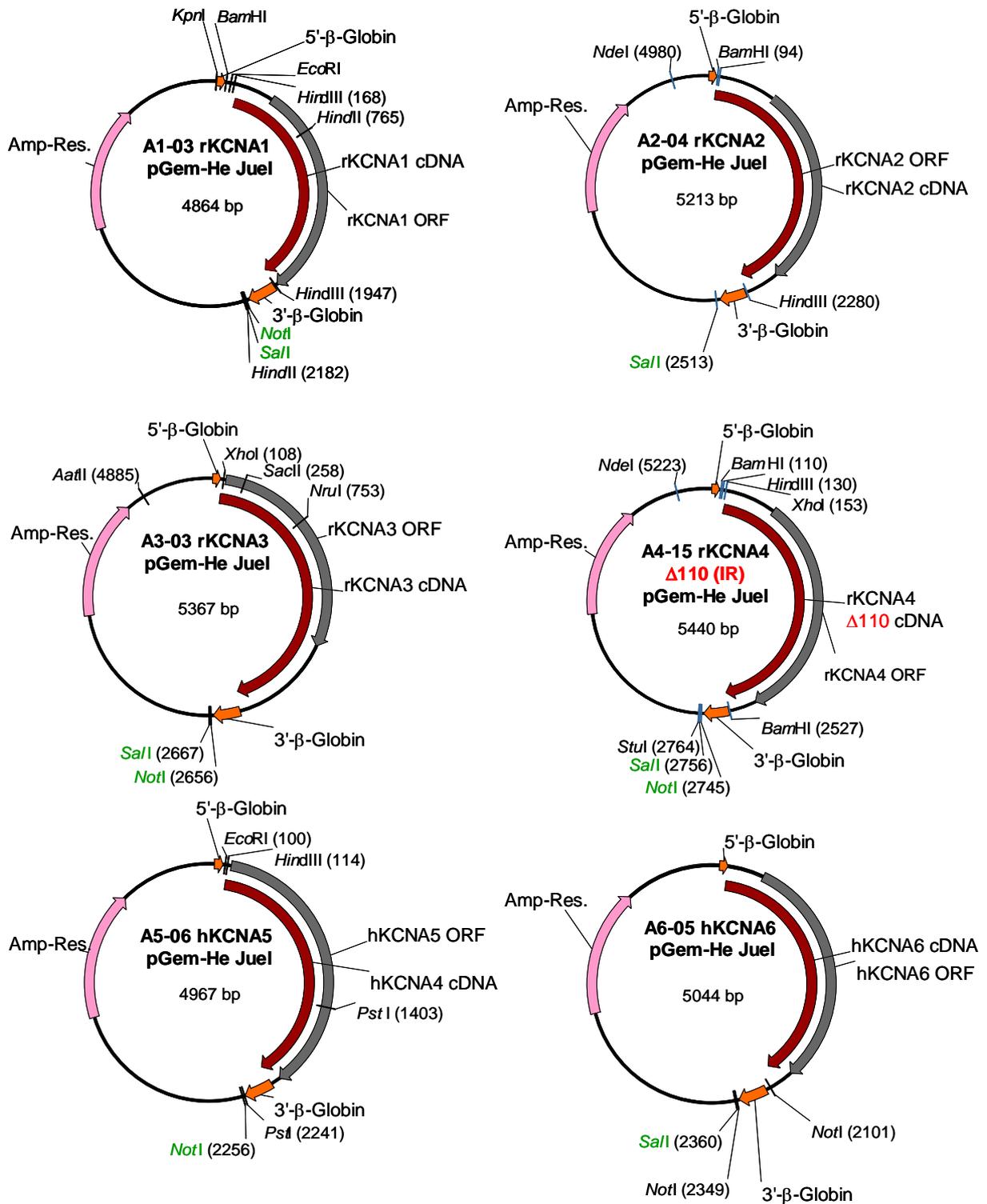
EC₅₀-Werte von Peptidtoxinen, kleinen Kohlenwasserstoffverbindungen und Metallionen für den Kv1.3-Kanal, die aus *Patch-Clamp*-Messungen und Bindungsassays [a] gewonnen wurden (aus Triggler *et al.*, 2006).

Peptidtoxine	EC ₅₀ -Werte	Kleine Kohlenwasserstoff-Verbindungen und Metallionen	EC ₅₀ -Werte
Agitoxin 2	200 pM	4-Aminopyridin	195 µM
Charybdotoxin	3 nM	PAP-1	2 nM
Hongotoxin	86 pM ^[a]	Tetraethylammonium	10 mM
Kaliotoxin	650 pM	Tetraphenylporphyrin #3	20 nM ^[a]
Maurotoxin	150 nM	Ba ²⁺ , Cd ²⁺	2 mM
α-Dendrotoxin-I	200 nM	Co ²⁺ , Zn ²⁺	200 µM
κ-Hefutoxin	150 µM	La ³⁺	50 µM

Vergleiche von EC₅₀-Werten von Peptidtoxinen und kleinen Kohlenwasserstoffverbindungen für den Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 und Kv1.5-Kanal, die aus *Patch-Clamp*-Messungen und Bindungsassays [a] gewonnen wurden (aus Triggler *et al.*, 2006; ergänzt nach Grissmer *et al.*, 94).

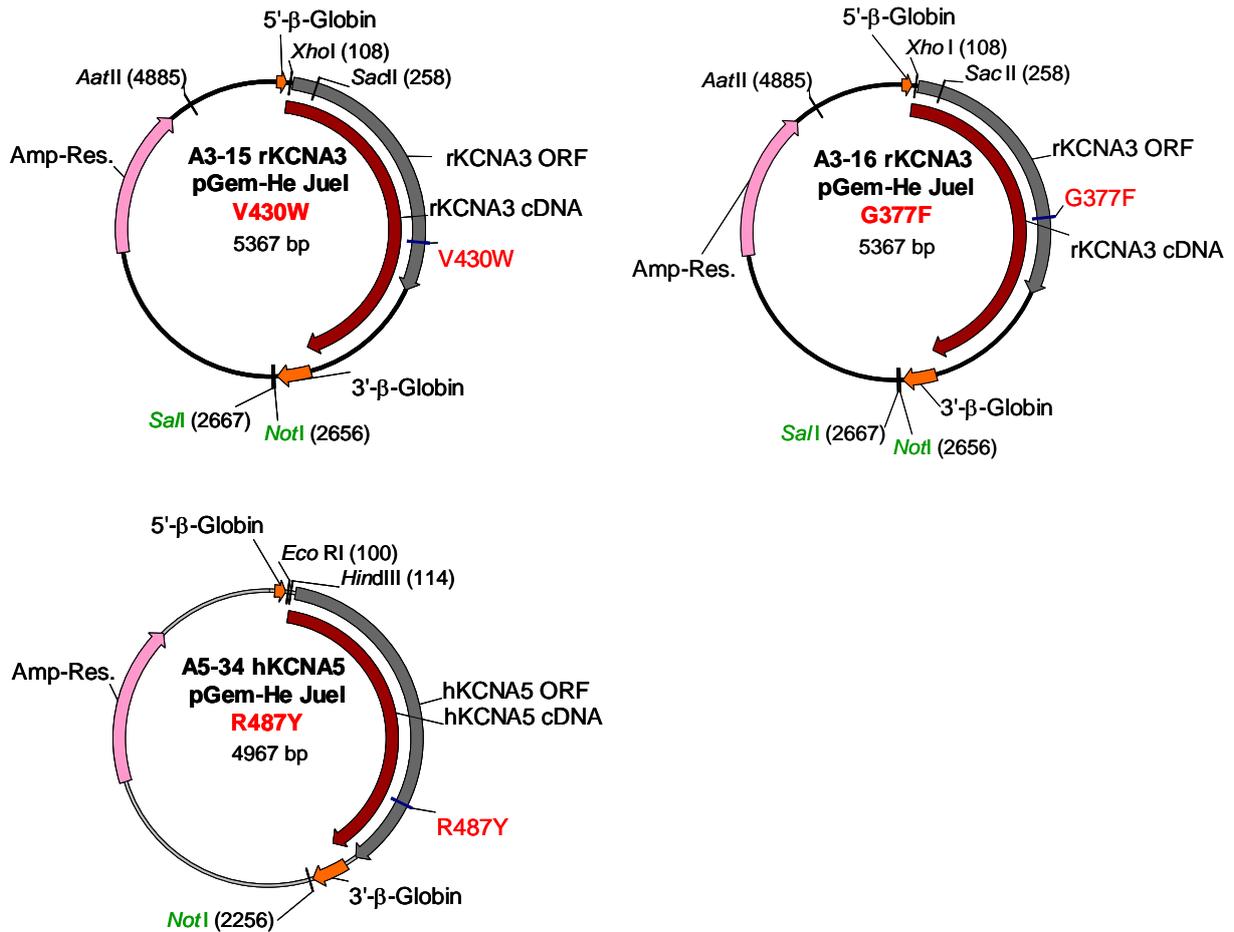
Blocker	EC ₅₀ -Werte			
	Kv1.1	Kv1.2	Kv1.3	Kv1.5
Agitoxin 2	44 pM	keine Angabe	200 pM	Keine Angabe
Charybdotoxin	> 1 µM	14 nM	3 nM	> 100 nM
Hongotoxin	31 pM ^[a]	170 pM ^[a]	86 pM ^[a]	Keine Angabe
Kaliotoxin	41 nM	> 1 µM	650 pM	> 1 µM
α-Dendrotoxin-I	20 nM	17 nM	200 nM	< 1 µM
4-Aminopyridin	290 µM	590 µM	195 µM	270 µM
PAP-1	65 nM	250 nM	2 nM	45 nM
TEA ⁺	0,3 mM	560 nM	10 mM	330 mM

7.4 Klonarten



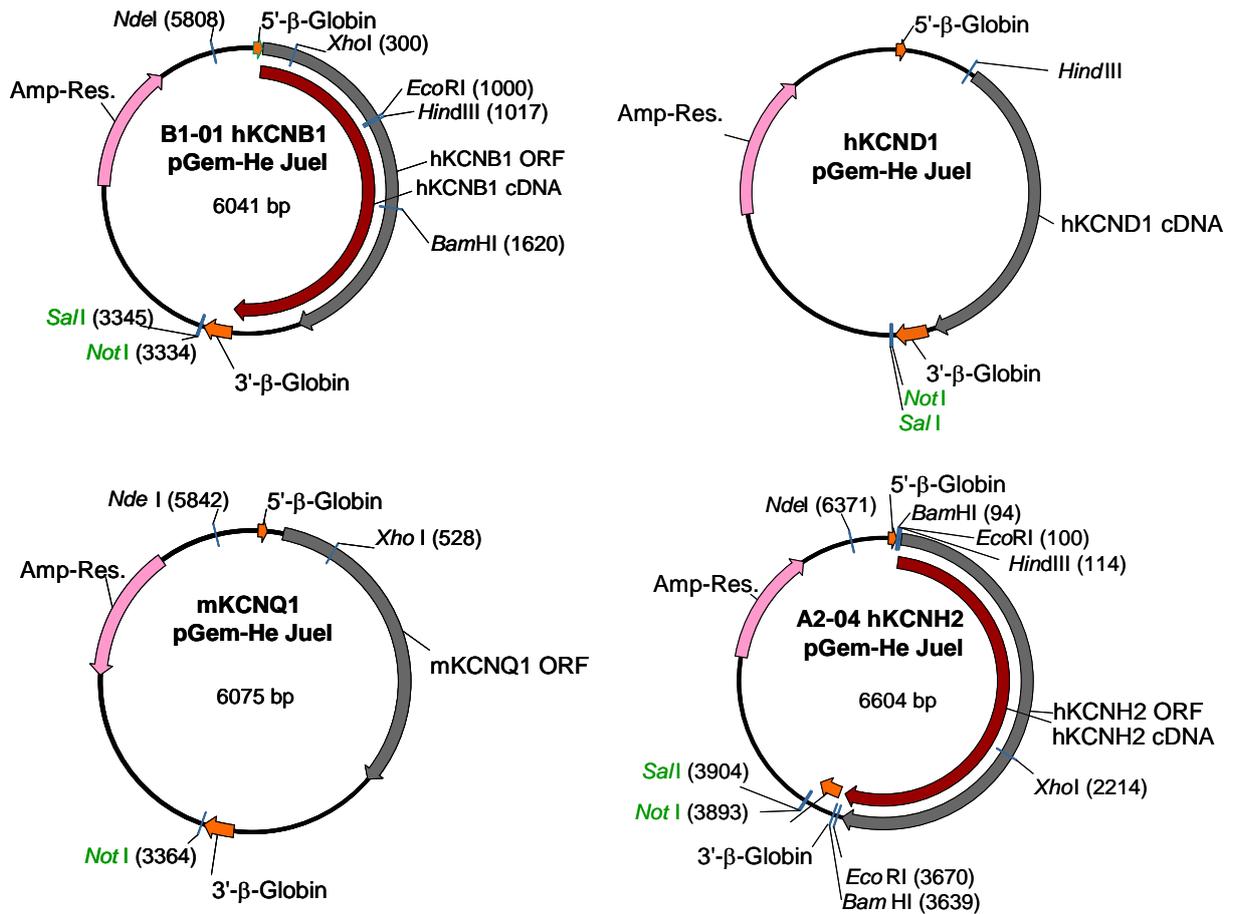
Klonarten für die in der Arbeit verwendeten Vertreter der Kv1-Kaliumkanalfamilie.

Mit Ausnahme von rKCNA4 Δ110, bei der die N-Typ-Inaktivierungsdomäne deletiert wurde, handelt es sich um die Wildtypkanäle. Für die Linearisierung zur cRNA-Synthese wurden die Restriktionsenzyme verwendet, die in grüner Farbe dargestellt sind.



Klonkarten für die in der Arbeit verwendeten Vertreter der Kv1-Kaliumkanalfamilie.

Verwendete Punktmutanten von rKv1.3 und hKv1.5. Für die Linearisierung zur cRNA-Synthese wurden die Restriktionsenzyme verwendet, die in grüner Farbe dargestellt sind.



Klonarten für die in der Arbeit verwendeten Vertreter der Kv2-, Kv4-, Kv7- und Kv11-Kaliumkanalfamilien.

Für die Linearisierung zur cRNA-Synthese wurden die Restriktionsenzyme verwendet, die in grüner Farbe dargestellt sind.

8 Danksagung

Prof. Dr. Olaf Pongs danke ich für die Gelegenheit, in einem technisch optimal ausgestatteten Labor arbeiten zu dürfen. Ich danke für viele hilfreiche Hinweise und für die von ihm aufgebrachte Geduld.

PD Dr. Hartwig Lüthen danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit als externe Promotion zu betreuen.

Ein großer Dank geht an die Arbeitsgruppen von Marc Baldus, Stefan Becker und Dirk Trauner, von denen ich neben dem Porphyrin und dem KTX viele interessante Informationen erhalten habe und durch deren Kooperation sehr ordentliche Veröffentlichungen entstanden sind.

Viele liebe Kollegen habe ich in meiner Doktorandenzeit kennengelernt, mit denen ich so manche interessante Diskussion hatte, von denen ich Hilfe erfahren habe und mit denen es einfach Spaß gemacht hat, zusammenzuarbeiten. Ich danke Silke und Lars aus dem Icy-Lab für eine schöne Zeit. Aus der Chef-Labor-Zeit möchte ich vor allem Birgit, Gregor, Iris, Joanna, Malte, Martin, Phanindra und Simone nennen, mit denen es nie langweilig wurde.

Aus der „Essensgruppe“ hat sich eine Truppe formiert, die ich ganz besonders vermissen werde, wenn es mich einmal an einen anderen Ort verschlagen sollte. Mit Christoph, Jacqueline, Jan, Kathrin, Quyen und Sabine habe ich in den letzten Jahren eine Vielzahl schöner Dinge unternommen, die ich nicht missen möchte.

Der allergrößte Dank geht an meine lieben Eltern, die nie die Hoffnung aufgegeben haben, dass alles noch zu einem guten Ende kommt. Vielen Dank für Eure Unterstützung!